

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Mariana Martins Flores

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER EM CÃES DA  
REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL: 50 ANOS (1964-2013)**

Santa Maria, RS  
2016

**Mariana Martins Flores**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER EM CÃES DA REGIÃO CENTRAL  
DO RIO GRANDE DO SUL: 50 ANOS (1964-2013)**

Tese apresentada ao Curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Rafael Almeida Fighera.

Santa Maria, RS

2016

**Mariana Martins Flores**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER EM CÃES DA REGIÃO CENTRAL  
DO RIO GRANDE DO SUL: 50 ANOS (1964-2013)**

Tese apresentada ao Curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 4 de abril de 2016:

---

**Rafael Almeida Figuera**  
(Presidente/Orientador)

---

**Eduardo Kenji Masuda, Dr. (Axys Análises)**

---

**Maria Andreia Inkelmann, Dra. (UNIJUÍ)**

---

**Glaucia Denise Kommers, PhD (UFSM)**

---

**Alexandre Krause, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho. Ao meu orientador, Dr. Rafael Almeida Figuera, pelos ensinamentos, incentivo, confiança em mim depositada e por ser um exemplo profissional desde o início. Aos professores patologistas Dr. Luiz Francisco Irigoyen e Dra. Glaucia Denise Kommers pelos ensinamentos, convivência e tempo dedicado à minha formação como patologista. À patologista Dra. Ingeborg Langohr por ter tornado possível a minha ida à Louisiana, Estados Unidos, e pela orientação e ensinamentos durante o meu doutorado sanduíche. Ao professor Dr. Luís Gustavo Corbellini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo auxílio e sugestões. Ao meu pai, professor Dr. Eduardo Flores pelo apoio e pelo auxílio na revisão de um dos artigos científicos desta tese. À minha família e amigos pela compreensão e incentivo. Ao Guilherme Cervi Prado pelo apoio em todas as horas. E, finalmente, aos colegas do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e do Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory, da Louisiana State University, pela amizade, apoio e ensinamentos. Os meus sinceros agradecimentos.

*Demore o tempo que for para decidir o que  
você quer da vida, e depois que decidir não  
recue ante nenhum pretexto, porque o mundo  
tentará lhe dissuadir.*

*(Friederich Nietzsche)*

## RESUMO

### ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER EM CÃES DA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL: 50 ANOS (1964-2013)

AUTOR: Mariana Martins Flores

ORIENTADOR: Rafael Almeida Figuera

As finalidades deste trabalho foram: (1) analisar o padrão de ocorrência do câncer como causa de morte ou razão para eutanásia em cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) ao longo de 50 anos (1964-2013), com ênfase nos aspectos epidemiológicos; (2) analisar os aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos do hemangiossarcoma em cães do LPV-UFSM; (3) analisar a aplicabilidade de testes auxiliares no diagnóstico e prognóstico de mastocitomas cutâneos no LPV-UFSM. Para o primeiro estudo e segundo estudos, os protocolos de cães (1964-2013) foram revisados, e deles foram retiradas informações referentes ao gênero, à idade, à raça e à causa de morte. As informações foram separadas por década (1964-2013). Posteriormente, foram separados aqueles protocolos em que a causa de morte foi atribuída a algum tipo de câncer, e a prevalência e os dados epidemiológicos do câncer foram analisados por década. Para o terceiro estudo, os casos diagnosticados como hemangiossarcoma foram separados, e informações referentes à macroscopia dos tumores foram coletadas. Foram confeccionadas novas lâminas e realizou-se imuno-histoquímica para o fator de von Willebrand. Para o quarto estudo, os arquivos de biopsia do LPV-UFSM foram revisados, e deles, foram retirados casos de mastocitoma cutâneo. Os casos foram submetidos à gradação histológica (KIUPEL et al. 2011), imuno-histoquímica (KIT e Ki-67) e PCR para mutações no exon 11. Dos 7.780 cães necropsiados, 11,1% morreram ou foram eutanasiados em decorrência de câncer. A prevalência do câncer sofreu um aumento importante nesses 50 anos. Os tumores mais prevalentes foram carcinomas mamários (24,5%), linfomas (8,8%), osteossarcomas esqueléticos (7,8%), colangiocarcinomas (5,5%), mastocitomas cutâneos (5,4%) e hemangiossarcoma multicêntrico (3,3%). A prevalência do câncer foi maior em fêmeas (58,5%) e idosos (56,2%), mas, semelhante entre os cães de raça definida (RD) (60,4%) e os cães SRD (39,6%). A prevalência foi maior em Boxer e Rottweiler. Quanto aos 40 hemangiossarcomas analisados, o Pastor Alemão foi mais afetado. Os principais órgãos afetados foram baço, pulmão, fígado e peritônio. A maioria dos tumores era histologicamente bem diferenciada e de baixo grau, e todos os casos testados demonstraram imuno-marcação para o fator de von Willebrand. Quanto aos mastocitomas, foram recuperados 40 casos dos arquivos do LPV, dos quais 69,2% eram de baixo grau e 30,8% eram de alto grau. Todos tiveram um padrão II de expressão de KIT e 30,6% tiveram alta contagem para Ki-67. Dois tumores foram positivos para mutações. Por meio deste trabalho, foi possível comprovar que o câncer como causa de morte em cães necropsiados no LPV-UFSM tem aumentado ao longo dos anos. O estudo também possibilitou conhecer os diferentes aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos dos hemangiossarcomas diagnosticados no LPV-UFSM, e comprovar a aplicabilidade de técnicas auxiliares no prognóstico de mastocitomas cutâneos caninos neste laboratório.

Palavras-chave: Neoplasmas. Cães. Epidemiologia. Brasil

## ABSTRACT

### **EPIDEMIOLOGIC ASPECTS OF CANCER IN DOGS FROM THE CENTRAL REGION OF RIO GRANDE DO SUL: 50 YEARS (1964-2013)**

AUTHOR: Mariana Martins Flores

ADVISOR: Rafael Almeida Figuera

The goals of this study were: (1) to analyze the occurrence as a cause of death or reason for euthanasia in autopsied dogs in the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) over 50 years (1964-2013), with emphasis on epidemiological aspects; (2) to analyze the epidemiological and pathological aspects of hemangiosarcoma in dogs from LPV-UFSM; (3) to analyze the applicability of ancillary tests in the diagnosis and prognosis of cutaneous mast cell tumors in LPV-UFSM. For the first and second studies, necropsy files from LPV-UFSM were reviewed, and information about gender, age, race and cause of death were collected. This information was separated by decade (1964-2013). Later, those protocols in which the cause of death was attributed to some form of cancer were separated, and the prevalence and epidemiological aspects of cancer were analyzed per decade. For the third study, cases diagnosed as hemangiosarcoma were separated, and information about the macroscopic aspects of the tumors were collected. New histology slides were stained and the cases were submitted to immunohistochemistry for von Willebrand factor. For the fourth study, the biopsy files from LPV-UFSM were reviewed, and cases diagnosed as cutaneous mast cell tumor were separated. These cases were submitted to histological grading (KIPEL et al. 2011), immunohistochemistry (KIT and Ki-67) and PCR for mutations in exon 11. Of the 7,780 dogs necropsied, 11.1% died or were euthanized due to cancer. The prevalence of cancer experienced a significant increase over 50 years. The most prevalent tumors were mammary carcinomas (24.5%), lymphomas (8.8%), skeletal osteosarcoma (7.8%), cholangiocarcinoma (5.5%), cutaneous mast cell tumors (5.4%) and multicentric hemangiosarcoma (3.3%). The prevalence of cancer was higher in females (58.5%) and the old-aged dogs (56.2%), but similar between the purebred (60.4%) and mixed breed dogs. The prevalence was higher in Boxer and Rottweiler. As for the 40 haemangiosarcomas analyzed, the German Shepherd was most affected. The main organs affected were spleen, lung, liver and peritoneum. Most tumors were histologically well differentiated and low grade, and all cases tested showed immunostaining for von Willebrand factor. As for mast cell tumors, 40 cases were recovered from the LPV-UFSM files, of which 69.2% were low grade and 30.8% were high grade. All had a KIT expression pattern II and 30.6% had a high growth fraction (Ki-67). Two tumors were positive for mutations. Through this work, it was possible to prove that cancer has increased as a cause of death in autopsied dogs from LPV-UFSM over the years. This study also made it possible to analyze the different epidemiological and pathological aspects of hemangiosarcomas from LPV-UFSM, and to prove the applicability of ancillary techniques in the prognosis of canine cutaneous mast cell tumors from this laboratory.

Keywords: Neoplasms. Dogs. Epidemiology. Brazil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO 1

Figura 1.....	33
Figura 2.....	33
Figura 3.....	33
Figura 4.....	33
Figura 5.....	34
Figura 6.....	34

### ARTIGO 2

Figura 1.....	51
Figura 2.....	51
Figura 3.....	51
Figura 4.....	52
Figura 5.....	52

### ARTIGO 3

Figura 1.....	63
Figura 2.....	64
Figura 3.....	64
Figura 4.....	65
Figura 5.....	65
Figura 6.....	66
Figura 7.....	66
Figura 8.....	67
Figura 9.....	67
Figura 10.....	68
Figura 11.....	68
Figura 12.....	69
Figura 13.....	69
Figura 14.....	70
Figura 15.....	70

### ARTIGO 4

Figura 1.....	87
Figura 2.....	88



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 – *Ranking* por década das principais raças necropsiadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).....32

### ARTIGO 2

Tabela 1 – Quadro 1. Parâmetros populacionais e mortalidade proporcional das principais raças caninas necropsiadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.....49

Tabela 2 – Prevalência por décadas dos principais tipos de cânceres como causa de morte ou razão para eutanásia de cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.....50

## LISTA DE LEGENDAS

<b>ARTIGO 1</b> .....	35
<b>ARTIGO 2</b> .....	53
<b>ARTIGO 3</b> .....	71

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	PROBLEMA.....	11
1.2	OBJETIVOS.....	12
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivos gerais</b> .....	12
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	13
1.3	JUSTIFICATIVA.....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	17
3.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DO HEMANGIOSSARCOMA EM CÃES.....	19
3.3	AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE TÉCNICAS AUXILIARES NO DIAGNÓSTICO DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS.....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
4.1	ARTIGO 1 – Caracterização do gênero, da raça e da idade de uma população de 7.780 cães da Região Central do Rio Grande do Sul submetidos à necropsia ao longo de cinco décadas (1964-2013).....	25
4.2	ARTIGO 2 – Aspectos epidemiológicos do câncer em uma população de 867 cães da Região Central do Rio Grande do Sul submetidos à necropsia ao longo de cinco décadas (1964-2013).....	36
4.3	ARTIGO 3 – Aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012).....	54
4.4	ARTIGO 4 – Use of ancillary techniques on the evaluation of canine cutaneous mast cell tumors from Brazil.....	72
4.5	DISCUSSÃO .....	89
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	90
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer tem ganhado uma notável importância em Medicina Veterinária nos últimos anos. A busca por tratamentos cada vez mais eficazes e específicos para cada tipo de câncer tem crescido na Medicina Veterinária, o que, obviamente, requer cada vez mais estudos de prevalência, epidemiologia e patogênese do câncer (WITHROW et al., 2013). Além da preocupação cada vez maior dos proprietários pelo bem-estar de seus cães, há, também, um ramo no estudo do câncer em cães voltado para o uso destes animais como modelos comparativos para a oncologia humana, com o objetivo de elucidar aspectos relacionados à etiologia e à patogênese de determinados tumores (MARCONATO et al., 2012; PAOLONI e KHANNA, 2007; ROWELL et al., 2011; SHAFIEE et al., 2013; SIMPSON et al., 2013).

Apesar de alguns autores enfatizarem que a prevalência do câncer em cães tem aumentado ao longo dos últimos anos (PAOLONI e KHANNA, 2007; WITHROW et al., 2013), não existem estudos que confirmem ou refutem tal hipótese. É difícil confirmar esta ideia atualmente, principalmente porque a metodologia dos estudos acerca da prevalência do câncer em diferentes épocas e regiões é diferente, o que impossibilita comparar a prevalência do câncer entre diferentes estudos. Outro motivo é que não existem estudos que analisem a prevalência do câncer ao longo de um extenso período.

O conhecimento da prevalência do câncer, juntamente com o diagnóstico dos diferentes tipos de tumores na clínica veterinária está se tornando cada vez mais importante, principalmente porque os proprietários estão cada vez mais interessados no tratamento dos seus cães, e cada vez optam menos pela eutanásia, por exemplo (NELSON e COUTO, 1998; WITHROW et al., 2013). O papel do patologista e dos estudos acerca do câncer como causa de morte em cães é importante para que se saibam quais são os tipos mais comuns em determinadas idades e raças, por exemplo, contribuindo para o diagnóstico e escolha da melhor terapia para cada caso (EHRHART et al., 2013).

### 1.1 PROBLEMA

Há poucos estudos relacionados à prevalência do câncer em populações de cães no Brasil (ANDRADE et al., 2012; BENTUBO et al., 2007; FIGHERA et al., 2008; TRAPP et al., 2010) e mais especificamente no Rio Grande do Sul (FIGHERA et al., 2008). Embora estes estudos reflitam a realidade observada em outros países, a maioria deles é voltada apenas para aspectos clínicos e anatomopatológicos do câncer em cães e não aborda os seus critérios

epidemiológicos de forma mais aprofundada. Com base nisto, podemos inferir que não existem estudos epidemiológicos acerca da mortalidade por câncer em populações de cães do Brasil, à semelhança daqueles existentes nos Estados Unidos (FLEMING et al., 2011) e na Suécia (BONNETT et al., 2005). Além disto, apesar de muitos clínicos e patologistas afirmarem que a incidência do câncer tem aumentado com o passar dos anos, não há nenhum estudo, brasileiro ou internacional, com o objetivo de confirmar ou refutar tal hipótese. Isto ocorre porque os estudos que analisam a frequência dos neoplasmas em cães possuem um caráter estático, ou seja, não investigam as mudanças nesta prevalência ao longo de um maior período de tempo.

Outro ponto importante é que apesar de existirem estudos acerca da maioria dos tumores mais prevalentes no LPV-UFSM (FIGHERA et al., 2006; FLORES et al., 2013; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; RECH et al., 2004; TROST et al., 2012), os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos do hemangiossarcoma, um dos principais tumores diagnosticados em cães do LPV-UFSM, não foram explorados em nenhum estudo até o momento. Adicionalmente, desde a publicação de um trabalho acerca dos mastocitomas cutâneos caninos diagnosticados no LPV-UFSM (RECH et al., 2004), muitos avanços foram feitos acerca do entendimento da patogênese, diagnóstico e terapia destes tumores, e novas técnicas têm sido agregadas à rotina de diagnóstico destes tumores em outros países, especialmente Estados Unidos. Estas técnicas são raramente oferecidas por laboratórios brasileiros, particularmente no Rio Grande do Sul.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivos gerais

Com base nisto, os objetivos gerais deste estudo são:

(1) Analisar a prevalência e os aspectos epidemiológicos dos diferentes tipos de câncer diagnosticados como causa de morte ou razão para eutanásia em cães necropsiados no LPV nos últimos 50 anos (1964-2013), possibilitando comparar a prevalência dos casos de câncer a cada década e em cada parcela da população, e determinar possíveis fatores predisponentes (gênero, raça e idade) à morte por câncer em cães da Região Central do Rio Grande do Sul;

(2) Analisar a prevalência e os aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e imuno-histoquímicos do hemangiossarcoma em cães;

(3) avaliar a aplicabilidade de técnicas auxiliares para a avaliação de mastocitomas cutâneos caninos na rotina de diagnósticos do LPV-UFSM.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

(1) (1a) investigar o gênero, a faixa etária e as raças dos cães que compõem a população total de cães necropsiados no LPV-UFSM entre 1964 e 2013; (1b) determinar a prevalência do câncer como causa de morte ou razão para eutanásia em cães; (1c) demonstrar se houve variações nesta prevalência ao longo de cinco décadas; (1d) traçar um perfil epidemiológico em relação ao sexo, à faixa etária e às raças caninas afetadas por câncer em geral; (1e) estabelecer a prevalência dos órgãos/sistemas primariamente afetados por câncer em geral; (1f) estabelecer quais os tipos específicos de câncer mais comuns como causas de morte ou razões para eutanásia em cães; (1g) analisar se houve variações na prevalência desses tipos específicos de câncer ao longo de cinco décadas; (1h) traçar um perfil epidemiológico em relação ao sexo, à faixa etária e às raças caninas afetadas pelos principais tipos específicos de câncer; e (1i) investigar inclusive a possibilidade da existência de fatores predisponentes;

(2) Analisar os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos do hemangiossarcoma em cães, diante da importância deste tumor como causa de morte e da ausência deste tipo de investigação na região de abrangência do LVP-UFSM;

(3) avaliar a aplicabilidade do novo método de gradação de mastocitomas cutâneos caninos (MCCs) proposto por KIUPEL et al. (2011), da imuno-histoquímica para KIT e Ki-67 e do PCR para mutações no exon 11 na avaliação de MCCs na rotina de diagnósticos do LPV-UFSM.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

O estudo dos aspectos epidemiológicos do câncer vai muito além de determinar a prevalência de suas diferentes formas de apresentação nos segmentos de uma população. Estudos aprofundados podem trazer informações realmente úteis para clínicos e patologistas veterinários. Fleming et al. (2011), por exemplo, demonstraram que os cães norte-americanos das raças Pinscher Miniatura e Dachshund tinham um menor risco de morrerem por câncer quando comparados às outras 80 raças analisadas. Esse estudo também demonstrou que o risco de morte relacionada a câncer era muito maior em cães de porte grande quando comparado ao risco dos cães de porte pequeno. Além disto, estudos epidemiológicos podem auxiliar na

determinação de fatores predisponentes para o desenvolvimento de tipos específicos de câncer, o que auxilia no diagnóstico clínico e patológico de casos futuros e na tentativa de controlar a ocorrência de determinados neoplasmas em uma população.

Com relação aos mastocitomas cutâneos caninos, determinar o comportamento biológico destes tumores é um desafio para o patologista veterinário, principalmente por não haver uma relação direta entre a aparência histológica e o grau de agressividade de MCCs (GROSS et al., 2005). Identificar tumores biologicamente agressivos é importante por auxiliar na determinação do prognóstico. Além disto, os tumores que possuem determinadas mutações (*internal tandem duplications*) no exon 11 do gene *c-kit* têm uma probabilidade muito maior de responderem ao tratamento com inibidores da tirosinoquinase (PRYER et al., 2003), o que faz do PCR para mutações um exame extremamente útil e importante na escolha da melhor terapia (LONDON et al., 1999).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Estudos europeus e americanos baseados em populações de cães atendidos em clínicas, consultórios e hospitais (FLEMING et al., 2011; O'NEILL et al., 2013), registrados em companhias de seguro de vida (BONNETT et al., 2005; BONNETT et al., 1997; MICHELL, 1999), pertencentes ao serviço militar (MOORE et al., 2001), cadastrados em associações de criadores (ADAMS et al., 2010; PROSCHOWSKY et al., 2003) ou selecionados de forma aleatória (BENTUBO et al., 2007) chamam atenção para o fato de que pelo menos nas últimas décadas, o câncer se mantém entre as duas principais causas de morte ou razões para eutanásia de cães em diferentes países ao redor do mundo.

Esta entidade chega a representar 13% a 23% das causas de morte em cães ao redor do mundo (BENTUBO et al., 2007; BRONSON, 1982; PROSCHOWSKY et al., 2003), e quando se fala em cães com 10 anos ou mais, a prevalência é ainda maior, subindo de 23% em cães adultos para 45% em cães idosos no estudo de BRONSON (1982). De forma semelhante ao que é relatado mundialmente, o câncer é responsável por 7,8% das causas de morte ou razões para eutanásia de cães que chegam ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para realização de necropsia. Em cães idosos, a prevalência sobe para 32% (FIGHERA et al., 2008). Ainda de acordo com o estudo de Fighera et al. (2008), os cânceres mais comuns no LPV-UFSM são, em ordem decrescente: neoplasmas malignos mamários, linfoma multicêntrico, osteossarcoma esquelético, colangiocarcinoma, mastocitoma

cutâneo, hemangiossarcoma multicêntrico e carcinoma renal. Estes tumores, com exceção do hemangiossarcoma, já foram alvo de estudos locais que analisaram os seus aspectos epidemiológicos e clinico-patológicos (FIGHERA et al., 2006; FLORES et al., 2013; INKELMANN et al., 2011; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; RECK et al., 2004; TROST et al., 2012).

O mastocitoma é o tumor de pele mais comum em cães da nossa região (FIGHERA et al., 2008; SOUZA et al., 2006;) e o segundo mais comum em um estudo norte-americano (GOLDSCHMIDT e SCHOFER, 1992). Identificar mastocitomas cutâneos caninos (MCCs) biologicamente agressivos representa um desafio para o patologista veterinário (GROSS et al., 2005). Apesar de a histopatologia ser uma das principais ferramentas com esta finalidade (KIUPEL et al., 2011; PATNAIK et al., 1984), ainda existe uma distorção significativa entre o grau histológico e o comportamento biológico de alguns MCCs. Isto estimulou a realização de diferentes investigações acerca de técnicas que poderiam auxiliar na identificação de MCCs biologicamente agressivos. Entre elas, a determinação do índice de proliferação celular pela imuno-marcação com Ki-67 (WEBSTER et al., 2007), a determinação do padrão de imuno-marcação dos mastócitos neoplásicos para a proteína de membrana KIT (KIUPEL et al., 2004) e a investigação de mutações (*internal tandem duplications*) no exon 11 do gene *c-kit* (LONDON et al., 1999) estão entre os principais fatores prognósticos descobertos nos últimos anos, e hoje, são técnicas auxiliares utilizadas rotineiramente na avaliação dos MCCs em laboratórios internacionais, particularmente nos Estados Unidos. A presença de mutações no exon 11 do *c-kit*, demonstrada por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR), é determinante não só na avaliação do comportamento biológico do tumor, como também na determinação do melhor tratamento. Isto ocorre porque os tumores positivos para mutação são normalmente mais agressivos e menos diferenciados, mas ao mesmo tempo, respondem de forma mais eficaz ao tratamento com inibidores da tirosinoquinase (PRYER et al., 2003).

Alguns autores enfatizam que a prevalência do câncer em cães tem aumentado ao longo dos últimos anos (PAOLONI e KHANNA, 2007; WITHROW et al., 2013). Os três fatores que podem estar causando este possível aumento, segundo eles, são: um aumento da própria incidência do câncer, um crescimento na população total de cães (população de risco) e/ou um maior interesse da população acerca da qualidade de vida de seus cães, levando a um maior número de casos diagnosticados. Uma causa para um possível aumento na incidência de câncer é a maior expectativa de vida dos cães na atualidade, atribuída a uma série de fatores relacionados à nutrição e ao desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas mais



eficientes (NELSON e COUTO, 1998; PAOLONI e KHANNA, 2007; WITHROW et al., 2013).

Embora se saiba da atual importância do câncer em cães, é difícil estimar com precisão a prevalência e a incidência desta afecção em animais de estimação (BUTLER et al., 2013). Muitos autores justificam que a inexistência de censos populacionais e a escassez de bancos de dados de diagnóstico de doenças em cães dificultam a determinação da real frequência do câncer nessa espécie (BUTLER et al., 2013; DOBSON, 2012). Outro fator agravante é a variação na metodologia dos estudos acerca do assunto, o que muitas vezes torna difícil comparar resultados de estudos com sistemáticas diferentes. Alguns autores incluem em seus levantamentos de dados todos os diagnósticos de câncer feitos em hospitais e clínicas veterinárias, muitos dos quais não possuem confirmação histopatológica (BENTUBO et al., 2007; BONNETT et al., 1997). Outros estudos se baseiam apenas em informações relatadas pelos proprietários dos animais, sem sequer a confirmação de um veterinário (MICHELL, 1999; PROSCHOWSKY et al., 2003). Esses são dois exemplos de metodologia que podem gerar resultados não muito fidedignos à real ocorrência de câncer na população.

A determinação das taxas de mortalidade do câncer em cães é geralmente menos complexa, e se baseia, na maioria das vezes, em estudos de necropsia (FIGHERA et al., 2008; MOORE et al., 2001). Esses estudos têm resultados bastante úteis em vários aspectos, e seus dados podem ser facilmente comparados a outros estudos semelhantes (BONNETT et al., 2005; FLEMING et al., 2011). Isto ocorre principalmente porque eles se baseiam em uma população fixa e facilmente determinada – a população de cães necropsiados –, o que nem sempre ocorre com estudos de prevalência em populações vivas, como vimos no parágrafo anterior. Além disso, geralmente, estudos de necropsia seguem metodologias semelhantes, que incluem o diagnóstico microscópico de todos os tumores observados como causa de morte na necropsia (FIGHERA et al., 2008; MOORE et al., 2001). Apesar disso, deve-se levar em conta que o estudo do câncer como causa de morte obviamente subestima a ocorrência de neoplasmas incidentais e tende a superestimar aqueles tumores agressivos e frequentemente fatais. Com base nas diferentes metodologias adotadas, a comparação entre estudos de prevalência/incidência do câncer em animais vivos e estudos de câncer como causa de morte deve ser feita com cautela.

O diagnóstico dos diferentes tipos de câncer na clínica veterinária está se tornando cada vez mais importante, visto que cada tipo diferente de câncer responde a um tratamento específico (WITHROW et al., 2013). Cada vez menos, os proprietários optam pela eutanásia,

principalmente quando há opções terapêuticas viáveis (NELSON e COUTO,1998; WITHROW et al., 2013). Este embasamento teórico voltado para os aspectos patológicos e epidemiológicos é bastante útil no diagnóstico de novos casos na clínica, bem como no tratamento e na determinação prognóstica das diferentes formas de câncer (EHRHART et al., 2013).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER**

Os protocolos de necropsias de cães, realizadas entre 1964 e 2013 no LPV-UFSM, foram revisados, e deles foram retiradas informações referentes ao sexo, à idade e às raças de todos os cães oriundos dos municípios que compõem a Região Central do RS (oficialmente Mesorregião Centro Ocidental Rio-grandense), a saber: Agudo, Cacequi, Capão do Cipó, Dilermando de Aguiar, Dona Francisca, Faxinal do Soturno, Formigueiro, Itaara, Itacurubi, Ivorá, Jaguari, Jari, Júlio de Castilhos, Mata, Nova Esperança do Sul, Nova Palma, Pinhal Grande, Quevedos, Restinga Seca, Santa Maria, Santiago, São João do Polêsine, São Martinho da Serra, São Pedro do Sul, São Sepé, São Vicente do Sul, Silveira Martins, Toropi, Tupanciretã, Unistalda e Vila Nova do Sul. Do total de protocolos de necropsias, foram separados os casos em que o diagnóstico definitivo da condição que cursou com a morte espontânea ou por eutanásia foi algum tipo de neoplasma maligno (câncer). Para fins de melhor entendimento, esses cães serão denominados como “população alvo”. Desses protocolos, além das informações previamente descritas, foram separados dados anatomopatológicos (macroscópicos e histológicos) referentes ao diagnóstico definitivo e ao(s) órgão(s) acometido(s).

Quanto ao sexo, os cães foram classificados apenas como macho e fêmea, independentemente de serem castrados ou não. A idade foi contabilizada quanto ao número de anos. Idades expressas em meses (ex.: 24 meses) foram convertidas em anos (no caso do exemplo anterior, dois anos). Em cães com idades expressas em anos e meses (ex.: um ano e três meses), o número de meses foi desconsiderado (no caso do exemplo anterior, foi considerado que o cão tinha um ano). Quanto às raças, os cães foram classificados em sem raça definida (SRD) ou de raça definida (RD). Cães mestiços, do cruzamento de duas RD, foram incluídos como SRD. As raças de cães necropsiados foram consideradas apenas a partir de 1974, visto que antes deste ano, dados referentes à raça não constavam nos protocolos de

necropsia. As raças incluídas foram aquelas homologadas pela *Fédération Cynologique Internationale* (FCI [FCI 2015]) e/ou pelo *American Kennel Club* (AKC [AKC 2015]). As raças não reconhecidas por nenhuma dessas associações (FCI e AKC), mas que fazem parte do Grupo 11 (“raças não reconhecidas pela FCI”) da Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC [CBKC 2015]) também foram contempladas. Para fins de comparação, este estudo foi dividido em cinco décadas: 1964-1973, 1974-1983, 1984-1993, 1994-2003 e 2004-2013.

O número total de cães que morreram ou foram eutanasiados em decorrência do câncer e as informações referentes ao sexo, à idade e à raça destes cães foram comparados com as informações da população total de necropsias e considerada para esse fim como “população controle”. Embora muitos cães tivessem mais do que um processo patológico descrito na ficha de necropsia, um único diagnóstico definitivo foi estabelecido para cada caso e foram excluídos os casos em que o câncer não foi considerado como a causa de morte ou razão para eutanásia. O câncer foi considerado como sendo a causa de morte quando: (1) o tumor primário e/ou as metástases eram extensos ou graves o suficiente para terem contribuído diretamente com a falência de um ou mais órgãos vitais (ex.: carcinomas renais bilaterais culminando em uremia); (2) o tumor primário e/ou as metástases tinham uma localização específica que tenha contribuído diretamente com a falência de um órgão vital (ex.: tumores de encéfalo ou coração); ou (3) o tumor primário e/ou as metástases tenham gerado consequências graves suficientes para terem contribuído com a morte (ex.: hemangiossarcoma esplênico rompido, culminando em hemoperitônio). O câncer foi considerado como sendo a razão para eutanásia quando: (1) o histórico indicava o câncer ou os sinais clínicos relacionados ao câncer como sendo a razão para eutanásia; (2) quando não havia indicação do motivo para eutanásia no histórico, o câncer foi considerado o motivo para o procedimento quando o tumor primário e/ou as metástases eram o principal achado de necropsia e/ou mostravam-se graves o suficiente para ter culminado com manifestações clínicas e justificado a opção pela eutanásia.

A proporção de casos de câncer em cada raça foi denominada “mortalidade proporcional”, e foi comparada à prevalência total de câncer na população controle (ADAMS et al., 2010). Para calcular a mortalidade proporcional, utilizou-se um sistema adaptado de Adams et al. (2010). Assim, foram separadas apenas as raças com “n” representativo na população total de cães necropsiados, aqui definido como  $n \geq 100$ , para calcular tal parâmetro. A mortalidade proporcional em cada uma dessas raças foi então calculada dividindo-se o número de casos de câncer na raça pelo número total de exemplares desta raça na população necropsiadas. O resultado deste cálculo foi multiplicado por 100. A mortalidade proporcional

foi, então, comparada à prevalência do câncer na população controle, ou seja, o número total de casos de câncer/número total de cães necropsiados. O resultado deste cálculo foi multiplicado por 100. Quando a mortalidade proporcional por câncer em determinada raça foi maior do que a prevalência do câncer na população controle, esta raça foi considerada como tendo uma proporção maior de casos câncer, definida aqui pela expressão “mortalidade proporcional maior”. Quando a mortalidade proporcional por câncer em determinada raça foi menor do que a prevalência do câncer na população controle, esta raça foi considerada como tendo uma proporção menor de casos câncer, definida aqui pela expressão “mortalidade proporcional menor”.

A classificação quanto à localização dos tumores por órgão/sistema acometido foi adaptada de Meuten (2002) e Withrow et al. (2013), a saber: 1) sistema tegumentar (pele e tecido subcutâneo), 2) sistema hematopoiético, 3) sistema osteoarticular, 4) sistema respiratório, 5) sistema alimentar (apenas o trato gastrointestinal), 6) fígado e sistema biliar; 7) pâncreas exócrino, 8) glândulas endócrinas (incluindo pâncreas endócrino), 9) sistema urinário, 10) sistema cardiovascular, 11) sistema nervoso (incluindo central e periférico), 12) olhos, 13) músculo esquelético, 14) sistema genital masculino, 15) sistema genital feminino e 16) glândula mamária. A classificação dos hemangiossarcomas quanto ao sítio anatômico primário foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos por Flores et al. (2012), a saber: multicêntrico, solitário e primário com metástases. Para este estudo, os hemangiossarcomas considerados multicêntricos por Flores et al. (2012) foram incluídos na localização “sistema cardiovascular”. Os hemangiossarcomas considerados solitários ou primários com metástases foram incluídos no órgão/sistema correspondente ao seu sítio primário. Todos os linfomas foram incluídos na localização “sistema hematopoiético”, independentemente de sua apresentação anatômica (multicêntrico, mediastínico, alimentar ou extra-nodal). Outros tumores incluídos no sistema hematopoiético, independentemente de sua origem, foram os sarcomas histiocíticos, os mielomas e a mastocitose sistêmica.

Finalmente foram estabelecidas as prevalências quanto ao sexo, à idade e à raça dos principais tipos de cânceres como causa de morte ou razão para eutanásia em cães. Apenas as raças com mortalidade proporcional maior foram incluídas para esse fim.

### 3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DO HEMANGIOSSARCOMA EM CÃES

Os protocolos de necropsias de cães realizadas entre 1965 e 2012 no LPV-UFSM foram revisados em busca de casos de hemangiossarcoma. O método de inclusão dos casos neste estudo foi o diagnóstico definitivo do tumor através de critérios histológicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores mesenquimais de tecidos moles (WEISS 1974) e pela *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP) para tumores mesenquimais da pele e dos tecidos moles (HENDRICK et al. 1998) e aplicados durante esse período a partir de consultas a diferentes edições do principal livro-texto de patologia de tumores em animais domésticos (MEUTEN 2002). Os protocolos de necropsia referentes a esses casos foram separados e examinados. Desses protocolos de necropsia foram retiradas informações referentes ao sexo, a idade, as raças e aos achados macroscópicos. Os cães foram classificados apenas como macho e fêmea, independentemente de serem castrados ou não. Foram ainda divididos em três categorias de idade, conforme publicado anteriormente (FIGHERA et al., 2008): filhotes (até 1 ano de idade), adultos (de 1 a 9 anos de idade) e idosos (10 anos de idade ou mais). Quanto as raças, os cães foram classificados em sem raça definida (SRD) ou de raça definida (RD). Cães mestiços, do cruzamento de duas RD, foram considerados como SRD. Todos os casos incluídos ocorreram no Município de Santa Maria, localizado na Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense, popularmente conhecida como Região Central do RS. Para fins de comparação, foram calculados os mesmos dados epidemiológicos (idade, sexo e raça) de toda a população de cães necropsiada no LPV-UFSM nesse mesmo período. Foram considerados para este estudo apenas casos em que o hemangiossarcoma foi a causa da morte ou a razão para eutanásia do cão (n=40). A apresentação macroscópica dos hemangiossarcomas foi classificada em: 1) pápula (aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito com menos de 1 cm de diâmetro), 2) nódulo (aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito com 1 a 10 cm de diâmetro), 3) massa (aumento de volume sólido, irregular, não circunscrito e de qualquer tamanho ou aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito [nódulo], porém, com mais de 10 cm de diâmetro), 4) macula/mancha (áreas focais, não elevadas, bem ou mal circunscritas, respectivamente, e com menos ou mais de 1 cm de diâmetro, respectivamente) e 5) organomegalia difusa (aumento de volume difuso de um órgão sem ocorrência de tumorações). Foram reavaliados histologicamente todos os casos em que os blocos de parafina foram encontrados no Arquivo do LPV-UFSM (n=25). Os achados histológicos reavaliados incluíram: 1) grau de diferenciação (bem diferenciados ou pouco diferenciados), 2) índice mitótico (baixo grau [ $\leq 2$  mitoses/cga] ou alto grau [ $\geq 3$  mitoses/cga]), 3) padrão estromal (escasso ou abundante), 4) ocorrência de pleomorfismo celular, 5) atipia e

6) necrose, hemorragia e trombose. Para essa reavaliação foram utilizados diferentes tecidos afetados e que constavam no arquivo. Com exceção de um caso (n=24), pelo menos um tecido de cada um desses casos reavaliados histologicamente foi escolhido e submetido à imuno-histoquímica. A reavaliação histológica e a interpretação imuno-histoquímica foram realizadas por dois (M.M.F. e R.A.F.) e três (M.M.F., G.D.K. e R.A.F.) patologistas veterinários, respectivamente. A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) empregada foi a imunomarcação para o fator de von Willebrand, conforme protocolo descrito a seguir. Após a desparafinização e reidratação dos tecidos, foi realizada a recuperação antigênica com solução de TRIS-EDTA (pH 9,0) em forno micro-ondas, em potência máxima, por dez minutos. Como anticorpo primário, foi utilizado anticorpo policlonal anti-fator de von Willebrand humano produzido em coelho, diluído 1:400 em PBST, e incubado por 60 minutos a 37°C. O anticorpo secundário biotilado e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase<sup>6</sup> foram utilizados consecutivamente, incubados a 25°C por 30 minutos e marcados através da adição do cromógeno de tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB). A contra-coloração foi com hematoxilina de Mayer. Como controle positivo foram utilizados os vasos sanguíneos normais de áreas não afetadas pelo tumor nas mesmas secções histológicas (controle interno). Como controle negativo, as mesmas secções foram utilizadas, com substituição do anticorpo primário por PBST. A imunomarcação para o fator de von Willebrand foi classificada como leve, moderada ou acentuada, conforme estudos prévios realizados (SABATTINI e BETTINI, 2009; von BEUST et al., 1988).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE TÉCNICAS AUXILIARES NO DIAGNÓSTICO DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

Foram resgatados dos arquivos de biopsias do LPV-UFSM (2010-2015) 40 casos de MCCs. Os critérios para inclusão foram: (1) terem sido diagnosticados como mastocitomas de pele (derme); (2) terem sido classificados como grau II (PATNAIK et al., 1984); e (3) terem sido diagnosticados e graduados por um mesmo patologista (R.A.). Os blocos e as lâminas referentes a estes casos foram resgatados e enviados ao Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory (LADDL), pertencente à Louisiana State University (LSU) em Baton Rouge, Louisiana, Estados Unidos. No LADDL, os casos foram submetidos ao sistema de graduação de KIUPEL et al. (2011) por um segundo patologista (I.L.). Posteriormente, todos os casos foram submetidos à imuno-histoquímica (IHQ) para KIT e Ki-67. Subsequentemente à IHQ,

alguns casos foram selecionados para realização de reação de polimerase em cadeia (PCR) para o exon 11 do gene *c-kit*. Os *amplicons* dos casos com suspeita de mutação foram encaminhados para sequenciamento.

A imuno-histoquímica para KIT e Ki-67 foi realizada de acordo com artigos previamente publicados (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al. 2007). Foram feitos novos cortes de 4 µm dos referidos casos em lâminas positivamente carregadas. Os cortes foram submetidos à desparafinização em xilol e à reidratação em etanol. Foi realizada neutralização das peroxidases endógenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% durante 10 minutos, seguido de lavagem em solução tampão por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com Biocare Decloaker (Biocare)<sup>1</sup> por 10 minutos. Para KIT, foi utilizado Dako Target Retrieval Solution (Ph 9.0, Dako, S1000)<sup>2</sup>; para Ki-67, foi utilizado Dako Target Retrieval Solution (Ph 6.0, Dako, S1699)<sup>2</sup>. O bloqueio das reações inespecíficas foi feito com soro de cabra (Vector, S1000) para KIT e com soro de equino (Vector, S2000)<sup>3</sup> para Ki-67 por 30 minutos. As lâminas foram então encubadas por 30 minutos a 37°C com: anticorpo policlonal de coelho (anti-humano) para KIT (pAb, 1:200, Dako, A4502)<sup>2</sup>; e anticorpo monoclonal de camundongo (anti-humano) para Ki-67 (MIB-1 mAb, 1:50, Dako, M7240)<sup>2</sup>. Para incubação dos controles negativos, utilizou-se IgG de Coelho (Vector, X0720)<sup>3</sup> para KIT e IgG de camundongo (Dako, X0931)<sup>2</sup> para Ki-67. O substrato de 3,3' diaminobenzidina (Dako)<sup>2</sup> foi utilizado como cromógeno. A contra coloração foi feita com hematoxilina de Mayer (Anatech)<sup>4</sup>.

A interpretação do padrão de imuno-marcação para KIT foi baseada em um artigo previamente publicado (KIUPEL et al., 2004). Os casos foram divididos em: padrão I, quando a marcação era de membrana, com mínima marcação citoplasmática; padrão II, quando a marcação era citoplasmática, com distribuição focal ou na forma de um pontilhado disseminado no citoplasma; ou padrão III, quando a marcação era citoplasmática com distribuição difusa a ponto de impedir a visualização de outras estruturas citoplasmáticas. A interpretação da imuno-marcação para Ki-67 foi baseada em um artigo previamente publicado (WEBSTER et al., 2007). Áreas com maior proporção de células neoplásicas imuno-marcadas foram identificadas. A partir disto, as células imuno-marcadas presentes em uma área de 10 x 10 mm foram contadas utilizando-se uma grade de 1cm<sup>2</sup> (10 x 10) no aumento de 400 X. O número de células positivas por área da grade foi contado em 5 campos de grande aumento (cga) e, subsequentemente, foi

---

<sup>1</sup> Biocare, Concord, Califórnia, Estados Unidos

<sup>2</sup> Dako, Carpinteria, Califórnia, Estados Unidos

<sup>3</sup> Vector, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos

<sup>4</sup> Anatech, Battle Creek, Michigan, Estados Unidos

calculada a média do número de células positivas em 5 cga. Os tumores foram divididos em dois grupos: tumores com média menor do que 23 e tumores com média igual ou maior do que 23 (WEBSTER et al., 2007). Os ceratinócitos da epiderme foram utilizados como controle interno. Em todos os casos em que não foi possível encontrar ceratinócitos imuno-marcados para Ki-67, considerou-se que o protocolo de IHQ não funcionou. Com base em critérios já publicados (KIUPEL et al. 2004, WEBSTER et al. 2007), apenas os casos com maior probabilidade de conterem mutações no exon 11 foram selecionados para realização de PCR, sabidamente: aqueles com padrão II ou III de marcação para KIT e que tinham, concomitantemente, média de contagem para Ki-67 maior ou igual a 23. Os casos foram encaminhados para PCR independentemente da sua graduação histológica pelo método de Kiupel et al. (2011).

Para extração, foi utilizado um kit comercial (Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue Kit®, Quiagen, 56404)<sup>5</sup>. Quatro secções de parafina (5µm) foram obtidas de cada caso a partir dos blocos de parafina, e com no máximo quatro dias de antecedência à extração. Os cortes foram colocados em tubos de 2 ml. A desparafinização das amostras foi realizada por tratamento com xilol e etanol. As amostras foram secas e, posteriormente, adicionou-se 180µl de tampão ATL e 20 µl de proteinase K, seguido de homogeneização. As amostras foram incubadas a 56°C por 1 hora e subsequentemente, a 90°C por mais 1 hora. Os tubos foram então posicionados dentro do QIAcube<sup>5</sup> e o protocolo “Isolation of genomic DNA from FFPE tissue sections” foi selecionado. Um controle negativo de extração (NEC) foi incluído no procedimento.

O protocolo de PCR para exon 11 e intron 11 foi realizado utilizando-se os seguintes primers: PE1/PE2 (PE1: CCCATGTATGAAGTACAGTGGAAG; PE2: GTTCCCTAAGTCAT TGTTACACG) (JONES et al., 2004). Uma amostra não diluída e uma amostra 1:10 foram testadas. A PCR foi realizada utilizando-se PE1/PE2 para uma desnaturação inicial a 98°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de 98°C por 20 segundos, 65,7°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi analisado pelo uso de eletroforese em gel agarose (gel agarose em tampão Tris-acetato-EDTA, 4%). Os amplicons dos casos considerados positivos para mutação foram enviados para sequenciamento ao Genelab (LSU). Este laboratório realiza sequenciamentos por meio do Applied Biosystems® (ABI) 3130 Genetic Analyzer (ABI standard protocols). O software utilizado foi o DNASTAR Lasergene®12. Um mastocitoma positivo (PCR+) e um negativo (ITD-) para mutações foram incluídos como controles positivos. Um controle negativo de PCR (PCR-) também foi utilizado.

---

<sup>5</sup> Qiagen, Valencia, Califórnia, Estados Unidos



Este estudo utilizou como análise estatística o modelo de regressão simples para determinar a relação entre o grau histológico e a média de contagem para Ki-67. A correlação entre estas variáveis foi avaliada por meio do coeficiente de correlação de Pearson. A análise foi realizada utilizando-se o software Statgraphics Centurion® XV versão 15.1.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4.1 ARTIGO 1

Artigo a ser submetido para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira

**Caracterização do gênero, da raça e da idade de uma população de 7.780 cães da Região Central do Rio Grande do Sul submetidos à necropsia ao longo de cinco décadas (1964-2013)<sup>6</sup>**

Mariana M. Flores<sup>7</sup>, Renata D. Mazaro<sup>8</sup>, Ana Paula Serafini Poeta<sup>9</sup>, Gláucia D. Kommers<sup>5</sup> e Rafael A. Fighera<sup>10\*</sup>

**ABSTRACT.-** Flores M.M., Mazaro R.D., Poeta A.P.S., Kommers G.D. & Fighera R.A. 2016. [Characterization of a population of 7,780 dogs submitted to necropsy over five decades (1964-2013) in the Central Region of Rio Grande do Sul.] Caracterização do gênero, da raça e da idade de uma população de 7.780 cães da Região Central do Rio Grande do Sul submetidos à necropsia ao longo de cinco décadas (1964-2013). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00)00-00. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. \*E-mail: [anemiaveterinaria@yahoo.com.br](mailto:anemiaveterinaria@yahoo.com.br)

Based on the lack of demographic database on the canine population living in the midland region of Rio Grande do Sul State, Brazil, and on the need for a “control population” in the accomplishment of several prevalence-based studies of different diseases diagnosed at the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), the objective of this study was to describe the breed, gender and age characteristics of the population of dogs necropsied in this diagnostic service over 50 years (1964-2013). The protocols of necropsies performed on dogs and recorded in the LPV-UFSM between 1964 and 2013 were reviewed, and information related to gender, age and breed from dogs from all the districts within the Central Region of RS were separated. A total of 7,780 dogs were necropsied, among which 469 (6%) were registered in the first decade (1964-1973), 1,133 (14.6%) in the second decade (1974-1983), 1,334 (17.1%) in the third decade (1984-1993), 1,705 (22%) in the fourth decade (1994-2003) and 3,139 (40.3%) in the fifth decade (2004-2013). Of dogs whose gender was reported in the protocols, 52.6% were males and 47.4% were females. The median age of death was 3 years. Of dogs whose breed was reported in the protocols, 59.8% were purebred and 40.2% were mixed breed. The most common large and giant breed dogs were German Shepherd Dog (17.2%), Boxer (6.9%), Rottweiler (5.3%), Fila Brasileiro (4.6%), English Pointer (3.9%), Collie Rough (3.7%), Dobermann (3.7%), and Labrador Retriever (2.1%). The most common small and medium breed dogs were Poodle (8.9%), Dachshund (6.3%), Miniature Pinscher (5.6%), English Cocker Spaniel (4.5%), Pekingese (3.4%), Yorkshire Terrier (3.3%), and Brazilian Terrier (2.8%). The percentage of females and the median age of death showed an increase during the five decades of this study. Although there has been a significant increase in the proportion of pure breed dogs compared to mongrels, we observed some changes in the occurrence of different breeds over time, including a significant decrease in the frequency of the Pekingese, Brazilian Terrier, English Pointer, and German Shepherd Dog, and significant increase in the frequency of the Poodle, Dachshund, Rottweiler, and Labrador Retriever. The results presented

<sup>6</sup> Recebido em XX de xxxxxx de 2016.

Aceito para publicação em XX de xxxxxx de 2016.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

<sup>7</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

<sup>8</sup> Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. Bolsista PIBIC/CNPq/UFSM.

<sup>9</sup> Laboratório de Epidemiologia Veterinária (EPILAB), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.

<sup>10</sup> Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

here will serve as an allowance for future comparative studies of disease prevalence in dogs of Central Region of RS, helping to a more correct understanding and interpretation of results from these data surveys.

INDEX TERMS: demographic study, data base, data survey, canine population, mortality.

**RESUMO.-** Devido à ausência de um banco de dados demográficos da população canina que habita a Região Central do Rio Grande do Sul (RS) e à necessidade em se estabelecer uma “população controle” para a melhor interpretação da prevalência das doenças diagnosticadas pelo Laboratório de Patologia Veterinária (LPV-UFSM) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), este estudo objetivou realizar uma análise das características relacionadas à raça, ao gênero e à idade dos cães necropsiados neste serviço de diagnóstico ao longo de 50 anos (1964-2013). Para isto, os laudos de necropsias de cães, realizadas entre 1964 e 2013, foram revisados, e deles foram retiradas informações referentes ao gênero, à idade e às raças de todos os cães oriundos dos municípios que compõem a Região Central do RS. Ao todo, 7.780 cães foram necropsiados; desses, 469 (6%) na primeira década (1964-1973), 1.133 (14,6%) na segunda década (1974-1983), 1.334 (17,1%) na terceira década (1984-1993), 1.705 (22%) na quarta década (1994-2003) e 3.139 (40,3%) na quinta década (2004-2013). Do total de cães com gênero informado nos laudos, 52,6% eram machos e 47,4% eram fêmeas. A mediana da idade de morte foi de três anos. Dos cães cuja raça foi informada nos laudos, 59,8% eram de raça definida (RD) e 40,2% não tinham raça definida (SRD). As raças de porte grande ou gigante mais frequentes foram: Pastor Alemão (17,2%), Boxer (6,9%), Rottweiler (5,3%), Fila Brasileiro (4,6%), Pointer Inglês (3,9%), Collie Pelo Longo (3,7%) Dobermann (3,7%) e Labrador Retriever (2,1%). As raças de porte pequeno ou médio mais frequentes foram: Poodle (8,9%), Dachshund (6,3%), Pinscher Miniatura (5,6%), Cocker Spaniel Inglês (4,5%), Pequinês (3,4%), Yorkshire Terrier (3,3%) e Terrier Brasileiro (2,8%). Houve um aumento na proporção de fêmeas e um crescimento na mediana referente à idade de morte ao longo das cinco décadas avaliadas. Apesar de não ter havido um aumento relevante na proporção de cães de RD em comparação com os SRD, observaram-se algumas mudanças na ocorrência de diferentes raças ao longo do tempo, incluindo principalmente uma dramática diminuição na percentagem de Pequinês, Terrier Brasileiro, Pointer Inglês e Pastor Alemão, e um aumento marcado na percentagem de Poodle, Dachshund, Rottweiler e Labrador Retriever. Os resultados aqui apresentados servirão como um subsídio comparativo para futuros estudos retrospectivos sobre prevalência de doenças em cães da Região Central do RS, auxiliando para uma mais correta compreensão e interpretação dos resultados encontrados nesses levantamentos de dados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: estudo demográfico, base de dados, levantamento de dados, população canina, mortalidade.

## INTRODUÇÃO

Estudar os aspectos epidemiológicos de uma determinada doença exige que se conheçam as características do grupo em risco (Thrusfield 2004). Há um número razoável de estudos demográficos que caracterizaram populações caninas. Estudos descritivos sobre as raças, o gênero e as idades dos cães já foram realizados em países das Américas (Fielding & Plumridge 2005, Fiorello et al. 2006, Acosta-Jamett et al. 2010, Pulczer et al. 2013), Europa (Slater et al. 2008, Downes et al. 2009, Murray et al. 2010), África (Butler & Bingham 2000, Kitala et al. 2001, Ratsitorahina et al. 2009) e Ásia (Matter et al. 2000, Pal 2001, Kongkaew et al. 2004) e visam, principalmente, o estabelecimento de programas de controle de doenças. No entanto, não existem dados publicados acerca das características da população canina que habita o estado do Rio Grande do Sul (RS). Também são escassos, os estudos que analisam as populações de quaisquer outras regiões do Brasil (Nunes et al. 1997, Dias et al. 2004, Canatto et al. 2012).

A população de cães encaminhada para necropsia em um serviço de diagnóstico anatomopatológico *post mortem* pode ser considerada uma ferramenta no estudo indireto de diferentes aspectos e doenças locais. É plausível pensar que tais cães representem uma amostra da população local que morre a cada ano. Diante da necessidade em se estabelecer um perfil da população canina recebida para realização de necropsias no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV-UFSM) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o objetivo deste estudo é caracterizar demograficamente essa população canina quanto ao gênero, à raça e à idade, com a finalidade de disponibilizar um banco de dados a partir dos cães necropsiados, já que dificilmente teremos, pelo

menos em curto prazo, como estabelecer os mesmos achados da população total de cães da Região Central do RS. Os resultados aqui apresentados servirão como um subsídio comparativo para futuros estudos sobre epidemiologia em cães da Região Central do RS, auxiliando para uma mais correta compreensão e interpretação dos resultados encontrados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os laudos de necropsias de cães, realizadas entre 1964 e 2013 no LPV-UFSM, foram revisados, e deles foram retiradas informações referentes ao gênero, à idade e às raças de todos os cães oriundos dos municípios que compõem a Região Central do RS. Quanto ao gênero, os cães foram classificados apenas como macho e fêmea, independentemente de serem castrados ou não. A idade foi contabilizada quanto ao número de anos. Idades expressas em meses (ex.: 24 meses) foram convertidas em anos (no caso do exemplo anterior, dois anos). Em cães com idades expressas em anos e meses (ex.: um ano e três meses), o número de meses foi desconsiderado. Quanto às raças, os cães foram classificados em sem raça definida (SRD) ou de raça definida (RD). Cães mestiços, do cruzamento de duas RD, foram incluídos como SRD. As raças de cães necropsiados foram consideradas apenas a partir de 1974, visto que antes deste ano, dados referentes à raça não constavam nos laudos de necropsia. Somente foram incluídas raças homologadas pela *Fédération Cynologique Internationale* (FCI [FCI 2015]) e/ou pelo *American Kennel Club* (AKC [AKC 2015]). As raças não reconhecidas por nenhuma dessas associações (FCI e AKC), mas que fazem parte do Grupo 11 ("raças não reconhecidas pela FCI") da Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC [CBKC 2015]) também foram contempladas. Para fins de comparação, este estudo foi dividido em cinco décadas: 1964-1973, 1974-1983, 1984-1993, 1994-2003 e 2004-2013.

As análises estatísticas descritivas foram realizadas através do programa Microsoft® Office Excel® 2010 e SPSS.

## RESULTADOS

No período que compreende os anos entre 1964 e 2013, foram localizados 7.780 laudos de necropsia de cães. Uma comparação gráfica da percentagem de necropsias por década pode ser contemplada na Figura 1. Dos cães cujo gênero foi informado nos laudos (n=7.634), 4.012 (52,6%) eram machos e 3.622 (47,4%) eram fêmeas. A proporção de machos e fêmeas na população ao longo das cinco décadas pode ser observada na Figura 2.

A idade dos cães variou de um dia a 22 anos de vida (mediana = 3 anos). A Figura 3 demonstra a distribuição do número de cães necropsiados pelas idades de morte. Com a Figura 4 é possível visualizar essa distribuição ao longo das décadas. Dos cães cuja raça foi informada nos laudos (n=6.885), 4.119 (59,8%) eram de RD e 2.766 (40,2%) não tinham raça definida. A proporção de cães de RD e SRD na população ao longo das quatro décadas foi de: 56,7% (RD)/43,3% (SRD) (1974-1983), 54,1% (RD)/45,9% (SRD) (1984-1993), 60,5%(RD)/39,5% (SRD) (1994-2003) e 62,6%(RD)/37,4% (SRD) (2004-2013). Foram observados cães de 66 raças diferentes, das quais 63 são reconhecidas pela FCI e 61 pelo AKC. Das 66 raças observadas, as mais frequentes foram: Pastor Alemão (n=710 [17,2%]), Poodle (n=365 [8,9%]), Boxer (n=285 [6,9%]), Dachshund (n=259 [6,3%]), Pinscher Miniatura (n=230 [5,6%]), Rottweiler (n=220 [5,3%]), Fila Brasileiro (n=189 [4,6%]), Cocker Spaniel Inglês (n=185 [4,5%]), Pointer Inglês (n=162 [3,9%]), Collie Pelo Longo (n=154 [3,7%]) Dobermann (n=151 [3,7%]), Pequinês (n=138 [3,4%]) e Yorkshire Terrier (n=135 [3,3%]), Terrier Brasileiro (n=117 [2,8%]), Labrador Retriever (n=85 [2,1%]), Dálmata (n=66 [1,6%]) e Shih Tzu (n=61 [1,5%]). A frequência de ocorrência das principais raças de cães necropsiados ao longo das quatro décadas pode ser observada na Figura 5 (raças de cães de porte grande e gigante) e na Figura 6 (raças de cães de porte pequeno e médio). As principais mudanças na ocorrência das raças ao longo das décadas deste estudo foram, dentre as mais marcantes nas raças de porte grande e gigante: a diminuição na percentagem de Pastor Alemão, Pointer Inglês e Collie Pelo Longo e o aumento na proporção de Rottweiler, Boxer e Labrador Retriever. E dentre as raças de porte pequeno e médio, o aumento na frequência de Poodle, Dachshund, Pinscher Miniatura e Yorkshire Terrier e uma diminuição na ocorrência de Terrier Brasileiro e Pequinês. O *ranking* das raças mais frequentemente necropsiadas por década no LPV-UFSM pode ser visualizado no Quadro 1.

## DISCUSSÃO

Através dos resultados, pôde-se observar mudanças no perfil da população de cães necropsiados no LPV-UFSM ao longo dos últimos 50 anos. Determinar as características populacionais de cães que habitam a Região Central do RS está muito além do alcance desse estudo, entretanto, ao longo da discussão, iremos comparar alguns resultados observados a partir dos cães necropsiados no LPV-UFSM com perfis de populações vivas e necropsiadas em outras partes do mundo e discutir acerca das diferenças e semelhanças entre estas populações.

Ao longo dos anos, observou-se um crescimento gradual da frequência na população de cães necropsiados no LPV-UFSM. Dos 7.780 cães incluídos neste estudo, 6% foram necropsiados na primeira década (1964-1973), enquanto cerca de 40% foram necropsiados na última (2004-2013). As hipóteses para o aumento da população necropsiada devem incluir: 1) uma maior divulgação e reconhecimento dos serviços prestados ao longo dos anos; 2) o crescimento do número de cães atendidos em consultórios e clínicas particulares e no Hospital Veterinário Universitário (HUV) da UFSM, o que leva, conseqüentemente, a uma maior busca por diagnósticos *post mortem*; e/ou 3) o crescimento da população de cães que habita nossa região nos últimos anos. Infelizmente não há como comprovar ou refutar nenhuma dessas hipóteses.

Uma das principais transformações observadas no perfil epidemiológico da população de cães necropsiados no LPV-UFSM ao longo do tempo foi o crescimento do número de fêmeas, gerando uma proporção muito semelhante entre machos e fêmeas na última década (2004-2013). Enquanto as cadelas correspondiam a apenas cerca de 33% da população do laboratório na primeira década (1964-1973), elas passaram a representar aproximadamente 53% dessa mesma população nos últimos dez anos (2004-2013). Alguns estudos realizados em populações de cães vivos da Suécia (Egenvall et al. 2000), do Zimbábue (Butler & Bingham 2000), das Bahamas (Fielding & Plumridge 2005), da Bolívia (Fiorello et al. 2006) e da Irlanda (Downes et al. 2009) não detectaram diferenças significativas entre o número de machos e fêmeas dos grupos analisados. Já estudos conduzidos no Brasil (Nunes et al. 1997, Canatto et al. 2012), na Índia (Pal 2001), no Quênia (Kitala et al. 2001), na Itália (Slater et al. 2008), em Madagascar (Ratsitorahina et al. 2009) e na Inglaterra (O'Neill et al. 2013) relataram uma discreta predominância de machos. Ainda outros levantamentos populacionais, realizados no Sri Lanka (Matter et al. 2000), na Tailândia (Kongkaew et al. 2004), no Chile (Acosta-Jamett et al. 2010) e na Guatemala (Pulczer et al. 2013), demonstraram uma grande proporção de machos nas populações analisadas. Daniels (1983) chegou a relatar uma proporção de três machos para cada fêmea em um antigo estudo realizado nos Estados Unidos. Mesmo com a predominância de machos nos estudos anteriormente citados, não é possível inferir que a proporção de machos está aumentando ou diminuindo nestes grupos ao longo do tempo, pois todos estes estudos são estáticos, tornando difícil confrontar os resultados encontrados por esses autores com aqueles aqui expressos. De qualquer forma, podemos perceber que a predominância de machos em populações vivas de cães é ainda muito descrita na literatura, e atribuída por muitos autores: 1) à preferência do público por cães desse gênero (Daniels 1983, Kitala et al. 2001, Hsu 2003, Ratsitorahina et al. 2009, Acosta-Jamett et al. 2010); 2) à maior mortalidade de fêmeas (Cleaveland 1996, Butler & Bingham 2000, Kitala et al. 2001, Pulczer et al. 2013) e/ou; 3) à maior natalidade de machos (Pal 2001), citada por um autor como variando de 51% a 56% (Mialot 1988).

A mediana de idade dos cães necropsiados no LPV-UFSM foi de 3 anos. Neste estudo, foi utilizado o parâmetro "mediana" para a análise devido à característica da distribuição da variável "idade" ao longo das décadas. Na literatura mundial, já foram relatadas "idades medianas de morte" de 11 e 12 anos no Reino Unido (Michell 1999, Adams et al. 2010, O'Neill et al. 2013), 10 anos na Dinamarca (Proschowsky et al. 2003), 8,5 anos nos Estados Unidos (Patronek et al. 1997), 3 anos no Brasil (Bentubo et al. 2007). As distorções observadas entre as medianas de idade de diferentes estudos podem ser atribuídas a diferenças na metodologia adotada por cada autor e a variações nas características das populações analisadas. Grupos de cães atendidos em clínicas e hospitais (Lund et al. 1999) ou com morte súbita (Olsen & Allen 2000), por exemplo, geralmente têm uma idade menor de morte quando comparados a grupos selecionados aleatoriamente (Michell 1999).

Algumas características das populações analisadas também podem ter influência na mediana de idade de morte. A massa corporal dos cães, por exemplo, tem uma relação inversa com a expectativa de vida (Greer et al. 2007), o que significa dizer que os cães de raças de porte pequeno têm, geralmente, uma maior expectativa de vida quando comparados aos de porte grande (Patronek et al. 1997, Michell 1999, Egenvall et al. 2000, Proschowsky et al. 2003, Greer et al. 2007, Adams et al. 2010, Fleming et al. 2011, O'Neill et al. 2013). Além do peso corporal, há fatores genéticos que aumentam ou diminuem a expectativa de vida para diferentes raças, como é o exemplo dos cães Boxer, que têm uma grande probabilidade de morrerem antes dos 10 anos de idade, ou seja, uma expectativa de vida menor quando comparada a cães de outras raças, mas de mesmo porte (Egenvall

et al. 2000). O terceiro fator que pode causar distorções na mediana de idade de morte de uma população é o país onde o estudo foi realizado. Em países em desenvolvimento, a proporção de cães vacinados e castrados é pequena, os cães visitam menos o veterinário, e frequentemente tem acesso irrestrito a rua (Butler & Bingham 2000, Matter et al. 2000, Ratsitorahina et al. 2009, Acosta-Jamett et al. 2010, Canatto et al. 2012), fatores que podem contribuir com mortes relacionadas a agentes infecciosos e traumatismos (Bentubo et al. 2007, Acosta-Jamett et al. 2010). Por esses motivos, a morte por agentes infecciosos é altamente prevalente no Brasil, o que já foi demonstrado em São Paulo (Bentubo et al. 2007) e no RS (Figuera et al. 2008), e pode diminuir significativamente a expectativa de vida das populações de cães que habitam esses países, influenciando a mediana de idade de morte dos cães que chegam para necropsia.

O crescimento na mediana ao longo das cinco décadas pode indicar que a expectativa de vida da população de cães que habita a Região Central do RS esteja aumentando. A falta de dados referentes à população total de cães que habitam essa região impede que se confirme ou refute tal teoria. No entanto, alguns autores afirmam que os cães realmente têm vivido mais nos dias de hoje (Withrow et al. 2013). É muito provável que o aumento da expectativa de vida refletirá, a médio e longo prazo, no aumento da incidência de determinadas doenças relacionadas à senilidade, como por exemplo, o câncer e as doenças degenerativas. O aumento da incidência do câncer em humanos tem uma relação muito bem estabelecida com o crescente aumento na expectativa de vida dos diferentes países (Mukherjee 2012) e isso tem sido frequentemente extrapolado para cães (Withrow et al. 2013). Outro ponto importante na análise da idade foi o pico de ocorrência de cães com 1 e 10 anos de idade (Figura 3). Os motivos para este aumento pontual na frequência destas duas idades permanecem desconhecidos.

Discorrer detalhadamente acerca da representatividade das raças na população de cães necropsiados no LPV-UFSM e dos motivos da preferência por determinadas raças vai muito além dos propósitos deste estudo. No entanto, discutiremos aqui alguns pontos que consideramos importantes em relação às mudanças observadas ao longo dos anos. Um levantamento do AKC sobre as raças de cães mais comuns nos Estados Unidos em 2013 incluiu, em ordem decrescente de frequência, Labrador Retriever, Pastor Alemão, Golden Retriever, Boxer, Poodle, Rottweiler e Dachshund na lista das 10 raças mais populares entre os norte-americanos. Interessantemente, todas essas raças, com exceção do Dachshund, também apareceram entre as mais comuns em um estudo de mortalidade baseado em informações de diversas clínicas norte-americanas (Fleming et al. 2011), sugerindo que a população que morreu e foi incluída no estudo de Fleming et al. (2011) tenha sido bastante semelhante à população total de cães que habita o país. Seis das raças citadas na lista do AKC e cinco das mais comuns no estudo de Fleming et al. (2011) também estão entre as primeiras raças mais comumente necropsiadas no LPV-UFSM na última década e demonstradas no Quadro 1, ou seja: Pastor Alemão, Poodle, Boxer, Dachshund, Rottweiler e Labrador Retriever. Muitas dessas raças também aparecem com frequência liderando as listas de raças mais comuns em outros estudos de mortalidade realizados na Inglaterra (Michell 1999), Suécia (Egenvall et al. 2000, Bonnett et al. 2005) e Dinamarca (incluindo aqui o Cocker Spaniel Inglês) (Proschowsky et al. 2003) e em estudos de popularidade, como o realizado no Canadá (*Canadian Kennel Club [CKC {CKC 2007}]*).

Apesar das mudanças na frequência de ocorrência de diferentes raças no LPV-UFSM ao longo das décadas, observou-se apenas um discreto aumento na proporção de cães de RD no LPV-UFSM nos últimos 40 anos. Na segunda década (1974-1983), havia 56,7% de cães de RD na população, enquanto na última (2004-2013), a percentagem foi de 62,6%, uma variação muito pequena. No trabalho de Slater et al. (2008), cães de RD correspondiam a 40% da população da Itália. A maioria dos estudos populacionais, no entanto, não inclui a raça em sua coleta de dados. Estudos de mortalidade semelhantes a este, realizados na Inglaterra (O'Neill et al. 2013) e nos Estados Unidos (Fleming et al. 2011), relatam que 77,9% e 75,4% dos cães incluídos, respectivamente, eram de RD; resultados até certo ponto próximos à percentagem aqui descrita para os últimos 10 anos (2004-2013).

As informações obtidas neste estudo retrospectivo devem ser interpretadas com cautela, principalmente porque o grupo de cães que chega para realização de necropsia no LPV-UFSM é oriundo, predominantemente, de clínicas, consultórios e hospitais veterinários. Além de que todos os cães incluídos morreram ou foram eutanasiados em decorrência de diferentes doenças. Sabe-se que esses fatores culminam em uma distorção dos resultados obtidos em estudos com tal sistemática (Beaver 2001), o que significa dizer que a população aqui analisada não é um reflexo fidedigno da população total que habita a Região Central do RS, mas, possivelmente, aproxime-se dessa.

## CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados demonstram que a população de cães necropsiados sofreu mudanças importantes no que diz respeito ao gênero, à idade e às raças mais comuns em cada década. O conhecimento destas alterações é fundamental no estudo epidemiológico dos distúrbios que causam a morte ou justificam a eutanásia de cães. Certamente, algumas mudanças ocorridas na estrutura da população de necropsias, como por exemplo, o aumento na proporção de idosos, irão influenciar diretamente na incidência das diferentes doenças diagnosticadas no LPV-UFSM. Espera-se que este estudo traga resultados úteis para comparação com muitos outros acerca de doenças de cães, tanto no Rio Grande do Sul quanto no restante do Brasil. A realização de estudos semelhantes a este em populações de cães necropsiados ao longo de um extenso período em outras regiões e países certamente ajudará a reforçar, confirmar ou refutar algumas das hipóteses aqui propostas no que diz respeito às mudanças relacionadas ao gênero, à idade e à raça dos cães pertencentes à população da Região Central do RS.

### AGRADECIMENTOS

Ao professor Luís Gustavo Corbellini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelas sugestões, principalmente acerca dos diferentes vieses deste estudo. Mariana Martins Flores é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### REFERÊNCIAS

- Acosta-Jamett G., Cleaveland S., Cunningham A.A. & Bronsvoort B.M.D. 2010. Demography of domestic dogs in rural and urban areas of the Coquimbo region of Chile and implications for disease transmission. *Prev. Vet. Med.* 94:272-281.
- Adams V.J., Evans K.M., Simpson J. & Wood J.L.N. 2010. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J. Small Anim. Pract.* 51:512-524.
- American Kennel Club (AKC). 2015. Dog Owners – Breeds. Disponível em <<http://www.akc.org/breeds/index.cfm>> Acesso em 5 jan. 2015.
- Beaver B.V. 2001. Comportamento canino: um guia para veterinários. Roca, São Paulo, 444p.
- Bentubo H.D.L., Tomaz M.A., Bondan E.F. & Lallo M.A. 2007. Expectativa de vida e causas de morte em cães da área metropolitana de São Paulo (Brasil). *Ciência Rural* 37:1021-1026.
- Bonnett B.N., Egenvall A., Hedhammar A. & Olson P. 2005. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Vet. Scand.* 46:105-120.
- Butler J.R.A. & Bingham J. 2000. Demography and dog-human relationships of the dog population in Zimbabwean communal lands. *Vet. Rec.* 147:442-446.
- Canadian Kennel Club (CKC). 2007 Top 20 CKC Breeds. Disponível em: <<http://web.archive.org/web/20081230161349/http://www.ckc.ca/en/portals/0/pdf/Top%2020Breeds%202007.pdf>> Acesso em 13 jan. 2015.
- Canatto B.D., Silva E.A., Bernardi F., Mendes M.C.N.C., Paranhos N.T. & Dias R.A. 2012. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64:1515-1532.
- Cleaveland S. 1996. The epidemiology of rabies and canine distemper in the Serengeti, Tanzania. Ph.D. Thesis, University of London. Department of Medical Parasitology. London School of Hygiene and Tropical Medicine. London, UK, 267p.
- Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC). 2015. Raças não reconhecidas pela FCI. Disponível em <<http://www.cbkc.org/padroes/grupo11.html>> Acesso em 5 jan. 2015.
- Daniels T.J. 1983. The social organization of free-ranging urban dogs. I. Non-estrous social behavior. *Appl. Anim. Ethol.* 10:341-363.
- Dias R.A., Garcia R.C., Silva D.F., Amaku M., Ferreira Neto J.S., Ferreira F. 2004. Estimativa de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. *Rev. Saúde Pública* 38:565-570.
- Downes M., Cauty M.J. & More S.J. 2009. Demography of the pet dog and cat population on the island of Ireland and human factors influencing pet ownership. *Prev. Vet. Med.* 92:140-149.
- Egenvall A., Bonnett B.N., Olson P. & Hedhammar A. 2000. Gender, age, breed and distribution of morbidity and mortality in insured dogs in Sweden during 1995 and 1996. *Vet Rec.* 519-525.
- Fielding W.J. & Plumridge S.J. 2005. Characteristics of owned dogs on the island of New Providence, The Bahamas. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 8:345-260.

- Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesq. Vet. Bras.* 28: 223-230.
- Fédération Cynologique Internationale (FCI). 2015. FCI Breeds nomenclature. Disponível em <<http://www.fci.be/en/Nomenclature/>>. Acesso em 5 jan. 2015.
- Fiorello C.V., Andrew J.N. & Deem S.L. 2006. Demography, Hunting Ecology, and pathogen exposure of Domestic dogs in the Isoso of Bolivia. *Conserv. Biol.* 20:762-771.
- Fleming J.M., Creevy K.E. & Promislow D.E.L. 2011. Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size- and breed-related causes of death. *J. Vet. Intern. Med.* 25:187-198.
- Greer K.A., Canterberry S.C. & Murphy K.E. 2007. Statistical analysis regarding the effects of height and weight on life span of the domestic dog. *Res. Vet. Sci.* 82:208-214.
- Hsu Y. 2003. Dog keeping in Taiwan: its contribution to the problem of free-roaming dogs. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 6:1-23.
- Kitala P., McDermott J., Kyule M., Gathuma J., Perry B. & Wandeler A. 2001. Dog ecology and demography information to support the planning of rabies control in Machakos District, Kenya. *Acta Tropica.* 78:217-230.
- Kongkaew W., Coleman P., Pfeiffer D.U., Antarasena C. & Thiptara A. 2004. Vaccination coverage and epidemiological parameters of the owned-dog population in Thungsong District, Thailand. *Prev. Vet. Med.* 65:105-115.
- Lund E.M., Armstrong P.J., Kirk C.A., Kolas L.M. & Klausner J.S. 1999. Health status and population characteristics of dog and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214:1336-1341.
- Matter H.C., Wandeler A.I., Neuenschwander B.E., Harischandra L.P.A. & Meslin F.X. 2000. Study of the dog population and the rabies control activities in the Mirigama area of Sri Lanka. *Acta Tropica.* 75:95-108.
- Mialot J.P. 1988. *Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. A hora veterinária*, Porto Alegre, 160p.
- Michell A.R. 1999. Longevity of British breeds of dog and its relationship with sex, size, cardiovascular variables and disease. *Vet. Rec.* 45:625-629.
- Mukherjee S. 2012. O imperador de todos os males {Uma biografia do Câncer}. Schwarcz, São Paulo, 728p.
- Murray J.K., Browne W.J., Roberts M.A., Whitmarsh A. & Gruffydd-Jones T.J. 2010. Number and ownership profiles of cats and dogs in the UK. *Vet. Rec.* 166:163-168.
- Nunes C.M., Martines D.A., Fikaris S. & Queiróz L.H. 1997. Avaliação da população canina da zona urbana do município de Araçatuba, São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 31: 308-309.
- O'Neill D.G., Church D.B., McGreevy P.D., Thomson P.C. & Brodbelt D.C. 2013. Longevity and mortality of owned dogs in England. *Vet. J.* 198:638-643.
- Olsen T.F. & Allen A.L. 2000. Causes of sudden and unexpected death in dogs: a 10-year retrospective study. *Can. Vet. J.* 41:873-875.
- Pal S.K. 2001. Population ecology of free-ranging urban dogs in West Bengal, India. *Acta Theriol.* 46:69-78.
- Patronek G.J., Waters D.J. & Glickman T. 1997. Comparative Longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 52A:171-178.
- Proschowsky H.F., Rugbjerg H. & Ersboll A.K. 2003. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Prev. Vet. Med.* 58:63-74.
- Pulzner A.S., Jones-Bitton A., Waltner-Toews D. & Dewey C.E. 2013. Owned dog demography in Todos Santos Cuchumatán, Guatemala. *Prev. Vet. Med.* 108:209-217.
- Ratsitorahina M., Rasambainarivo J.H., Raharimanana S., Rakotonandrasana H., Andriamiarisoa M., Rakalomanana F.A. & Richard V. 2009. Dog ecology and demography in Antananarivo, 2007. *BMC Vet. Res.* 5:1-7.
- Slater M.R., Nardo A.D., Pediconi O., Villa P.D., Candeloro L., Alessandrini B. & Papa S.D. 2008. Cat and dog ownership and management patterns in central Italy. *Prev. Vet. Med.* 85:267-294.
- Thrusfield M. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. Roca, São Paulo, 556p.
- Withrow S. J., Vail D.M. & Page R.L. 2013. *Withrow & MacEwen's Small Animal Oncology*. 5th ed. Elsevier, St. Louis, 864p.



## QUADROS

Quadro 1. *Ranking* por década das principais raças necropsiadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).

Posição	1974-1983		1984-1993		1994-2003		2004-2013	
	Total RD	N(%)	Total RD	N(%)	Total RD	N(%)	Total RD	N(%)
1 <sup>a</sup>	Pastor Alemão	165(32%)	Pastor Alemão	203(31%)	Pastor Alemão	167(16,6%)	Poodle	201(10,3%)
2 <sup>a</sup>	Pointer Inglês	90(17,4%)	Dobermann	66(10%)	Poodle	112(11,1%)	Dachshund	166(8,5%)
3 <sup>a</sup>	Pequinês	89(17,2%)	Boxer	62(10%)	Boxer	81(8,1%)	Pastor Alemão	156(8%)
4 <sup>a</sup>	Terrier Brasileiro	41(7,9%)	Collie Pelo Longo	42(6,4%)	Fila Brasileiro	76(7,6%)	Rottweiler	139(7,2%)
5 <sup>a</sup>	Boxer	20(3,9%)	Pointer Inglês	38(5,8%)	Pinscher Miniatura	69(6,9%)	Pinscher Miniatura	122(6,3%)
6 <sup>a</sup>	Collie Pelo Longo	18(3,5%)	Pequinês	31(4,7%)	Cocker Spaniel Inglês	67(6,7%)	Boxer	109(5,6%)
7 <sup>a</sup>	Dobermann	17(3,3%)	Terrier Brasileiro	30(4,6%)	Dachshund	62(6,2%)	Yorkshire Terrier	101(5,2%)
8 <sup>a</sup>	Cocker Spaniel Inglês	14(2,7%)	Cocker Spaniel Inglês	28(4,3%)	Rottweiler	56(5,6%)	Labrador Retriever	71(3,7%)
9 <sup>a</sup>	Dálmata	11(2,1%)	Fila Brasileiro	27(4,1%)	Collie Pelo Longo	47(4,7%)	Fila Brasileiro	70(3,6%)
10 <sup>a</sup>	Poodle	8(1,5%)	Poodle	19(2,9%)	Dobermann	41(4,1%)	Cocker Spaniel Inglês	66(3,4%)
11 <sup>a</sup>	Pinscher Miniatura	7(1,4%)	Husky Siberiano	18(2,8%)	Terrier Brasileiro	23(2,3%)	Shih Tzu	58(3%)
12 <sup>a</sup>	Fila Brasileiro	6(1,2%)	Pinscher Miniatura	16(2,5%)	Yorkshire Terrier	23(2,3%)	Collie Pelo Longo	44(2,3%)
13 <sup>a</sup>	Dogue Alemão	5(1%)	Dogue Alemão	12(1,8%)	Dogue Alemão	20(2%)	Maltês	29(1,5%)
14 <sup>a</sup>	Weimaraner	5(1%)	Dálmata	9(1,4%)	Dálmata	18(1,8%)	Dálmata	27(1,4%)
15 <sup>a</sup>	Setter Inglês	4(0,8%)	Basset Hound	7(1,1%)	Pointer Inglês	18(1,8%)	Dobermann	27(1,4%)
16 <sup>a</sup>	Afghan Hound	3(0,6%)	Dachshund	7(1,1%)	Husky Siberiano	14(1,4%)	Chow Chow	26(1,3%)
17 <sup>a</sup>	Dachshund	3(0,6%)	Pastor Belga	6(0,9%)	Pastor Belga	11(1,1%)	American Pit Bull Terrier	25(1,3%)
18 <sup>a</sup>	Basset Hound	2(0,4%)	Setter Inglês	5(0,8%)	Akita	9(0,9%)	Border Collie	22(1,1%)
19 <sup>a</sup>	Bulldog	2(0,4%)	Rottweiler	4(0,6%)	Old English Sheepdog	9(0,9%)	Terrier Brasileiro	19(1%)
20 <sup>a</sup>	Beagle	1(0,2%)	Akita	3(0,5%)	Labrador Retriever	8(0,8%)	Beagle	17(0,9%)
21 <sup>a</sup>	Chihuahua	1(0,2%)	Galgo Espanhol	3(0,5%)	São Bernardo	7(0,7%)	São Bernardo	17(0,9%)
22 <sup>a</sup>	Husky Siberiano	1(0,2%)	São Bernardo	3(0,5%)	Beagle	6(0,6%)	Pointer Inglês	16(0,8%)
23 <sup>a</sup>	São Bernardo	1(0,2%)	Weimaraner	3(0,5%)	Weimaraner	6(0,6%)	Bulldog	15(0,8%)
24 <sup>a</sup>	Schnauzer	1(0,2%)	Afghan Hound	2(0,3%)	Basset Hound	5(0,5%)	Dogue Alemão	15(0,8%)
25 <sup>a</sup>	Whippet	1(0,2%)	Beagle	2(0,3%)	Chihuahua	5(0,5%)	Husky Siberiano	13(0,7%)
26 <sup>a</sup>	Yorkshire Terrier	1(0,2%)	Chihuahua	2(0,3%)	Chow Chow	5(0,5%)	Lhasa Apso	13(0,7%)
27 <sup>a</sup>	-	-	Old English Sheepdog	2(0,3%)	Shar Pei	5(0,5%)	Pequinês	13(0,7%)
28 <sup>a</sup>	-	-	Bull Terrier	1(0,2%)	Bulldog	4(0,4%)	Shar Pei	12(0,6%)
29 <sup>a</sup>	-	-	Chow Chow	1(0,2%)	Lhasa Apso	4(0,4%)	Akita	11(0,6%)
30 <sup>a</sup>	-	-	Greyhound	1(0,2%)	Pequinês	4(0,4%)	Chihuahua	10(0,5%)

LISTA DE FIGURAS

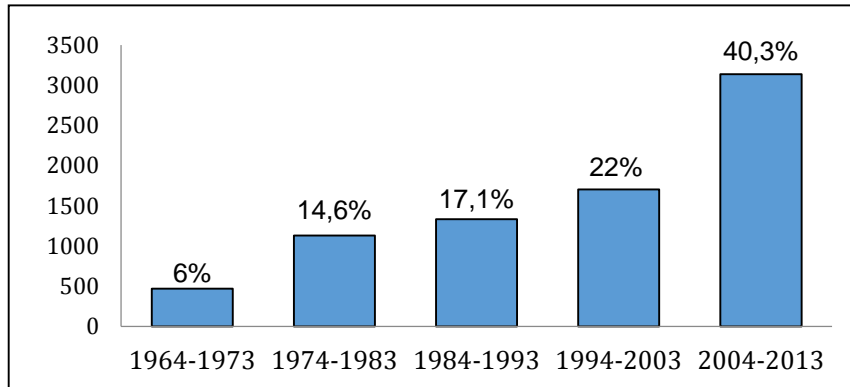


Fig. 1.

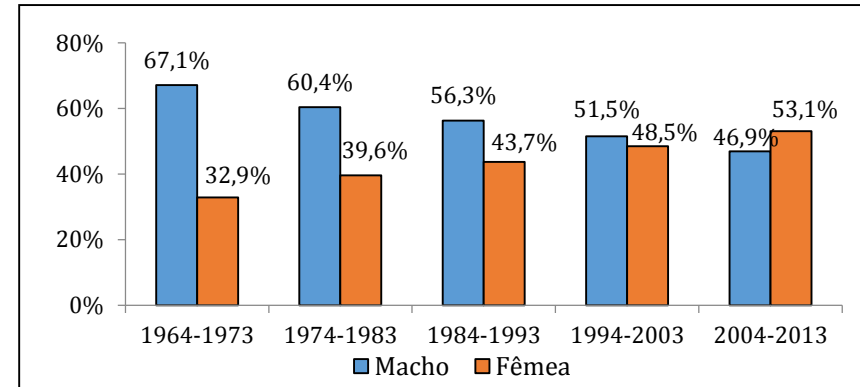


Fig. 2.

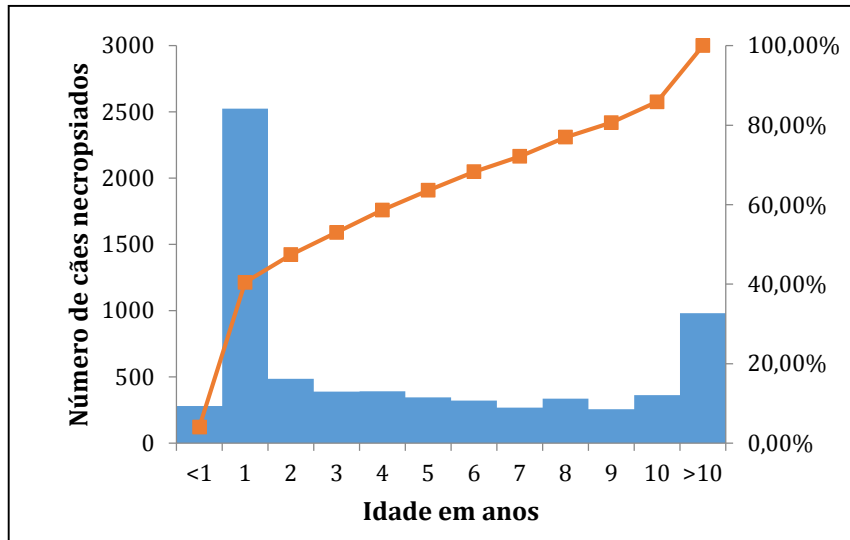


Fig. 3.

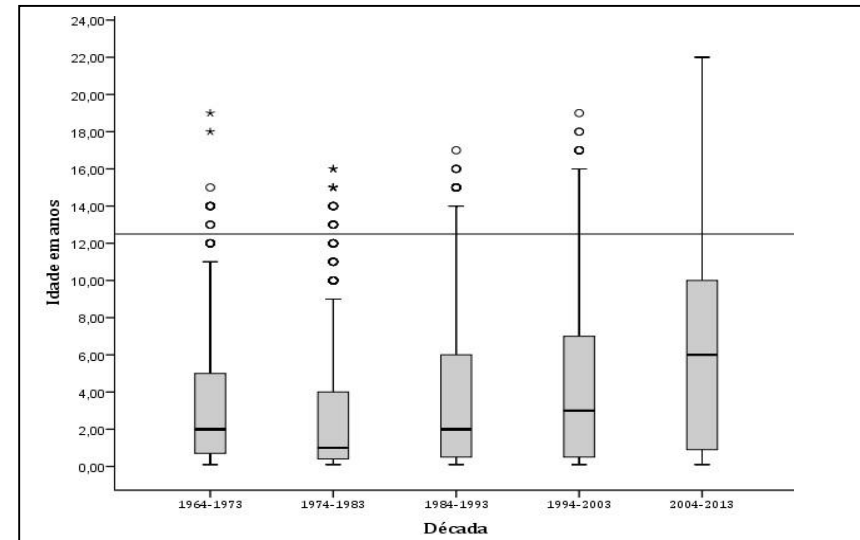


Fig. 4.

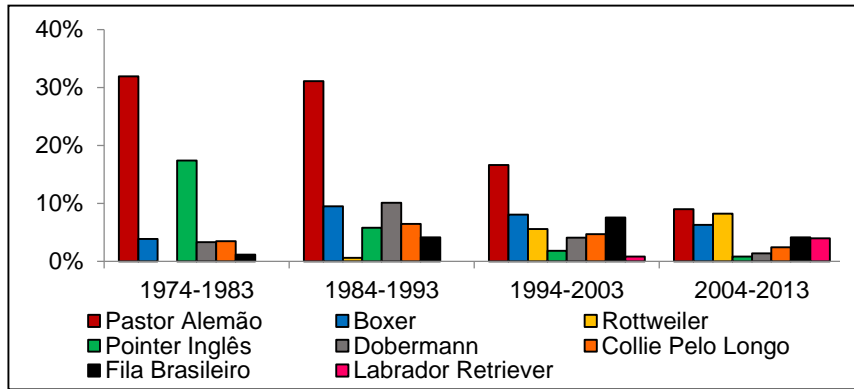


Fig. 5.

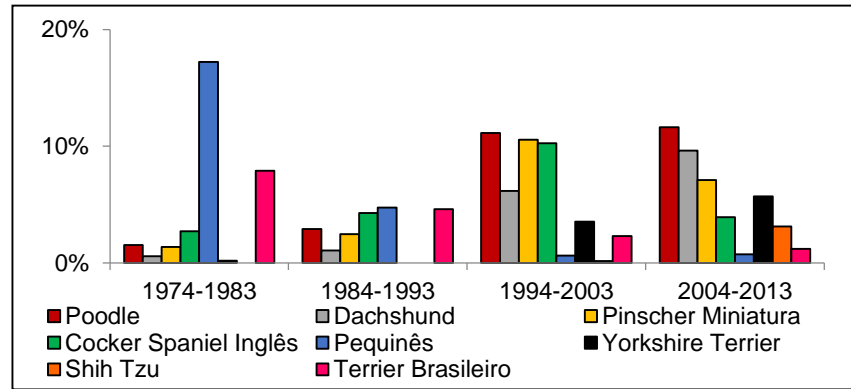


Fig. 6.

### LISTA DE LEGENDAS

Fig. 1. Percentagem de cães necropsiados por década no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).

Fig. 2. Percentagem de cães quanto ao gênero necropsiados por década no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).

Fig. 3. Distribuição do número de cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013) pela idade de morte.

Fig. 4. Distribuição do número de cães necropsiados por década no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013) pela idade de morte.

Fig. 5. Percentagem das principais raças de cães de porte grande e gigante necropsiados por década no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1974-2013).

Fig. 6. Percentagem das principais raças de cães de porte pequeno e médio necropsiados por década no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1974-2013).

## 4.2 ARTIGO 2

Artigo a ser submetido para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

**Aspectos epidemiológicos do câncer em uma população de 867 cães da Região Central do Rio Grande do Sul submetidos à necropsia ao longo de cinco décadas (1964-2013)<sup>1</sup>**

Mariana M. Flores<sup>2</sup>, Renata D. Mazaro<sup>3</sup>, Glaucia D. Kommers<sup>4</sup>, Luiz F. Irigoyen<sup>4</sup> e Rafael A. Fighera<sup>4</sup>

**ABSTRACT.-** Flores M.M., Mazaro R.D., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Fighera R.A. 2016. [Epidemiological aspects of cancer in a population of 867 dogs submitted to necropsy over five decades (1964-2013) in the Central Region of Rio Grande do Sul.] Aspectos epidemiológicos do câncer em uma população de 867 cães da Região Central do Rio Grande do Sul submetidos à necropsia ao longo de cinco décadas (1964-2013). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00)00-00. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [anemiaveterinaria@yahoo.com.br](mailto:anemiaveterinaria@yahoo.com.br)

Cancer has been pointed out by a number of European and American studies as one of the two most important causes of death in dogs in recent years. Many authors believe it is important to conduct local studies on this category of diseases with the main objective of identifying differences in its demographical pattern of occurrence. Nevertheless, data on the mortality from cancer in Brazilian dogs are still scarce. Hence, the purpose of this article was to analyze the pattern of occurrence of cancer as a cause of death or reason for euthanasia in dogs necropsied at the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) over 50 years (1964-2013), emphasizing its epidemiological aspects. The protocols of necropsies performed on dogs were reviewed, and information related to gender, age and breed from dogs from all the districts within the Central Region of RS whose cause of death was attributed to cancer were collected. Of the 7,780 dogs necropsied at the LPV-UFSM, 11.1% died or were euthanized due to some form of cancer. The prevalence of cancer suffered a major increase, mainly observed in the last two decades (1994-2013). The most prevalent tumors were mammary carcinomas (24.5%), lymphomas (8.8%), skeletal osteosarcomas (7.8%), cholangiocarcinomas (5.5%), cutaneous mast cell tumors (5.4%) and multicentric hemangiosarcoma (3.3%). Comparing the segments of the population that died of cancer with the total population necropsied at the LPV-UFSM, the prevalence of this condition was higher in females (58.5%) and old-aged dogs (56.2%), but very similar among purebred (60.4%) and mixed breed dogs (39.6%). When comparing cancer prevalence among breeds, Boxers and Rottweilers were more frequently affected. The similar prevalence of cancer among purebred and mixed breed dogs and the high proportion of cholangiocarcinomas were important results, especially for disagreeing with many published studies on the subject. Through this survey, it was possible to prove that the prevalence of cancer as a cause of death in dogs necropsied at the LPV-UFSM has increased over the years. Although the idea of cancer becoming more common in dogs is exceedingly discussed among clinicians and pathologists, it is rarely analyzed in other studies.

INDEX TERMS: diseases of dogs, neoplastic diseases, oncology, epidemiology, predisposition.

**RESUMO.-** O câncer tem sido apontado por uma série de estudos europeus e norte-americanos como uma das duas causas de morte mais importantes em cães nos últimos anos. Muitos autores julgam

<sup>1</sup> Recebido em XX de xxxxxx de 2016.

Aceito para publicação em XX de xxxxxx de 2016.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

<sup>3</sup> Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. Bolsista PIBIC/CNPq/UFSM.

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900. \*Autor para correspondência: [anemiaveterinaria@yahoo.com.br](mailto:anemiaveterinaria@yahoo.com.br)

fundamental a realização de estudos locais acerca desta categoria de doença, com o objetivo principal de identificar mudanças demográficas em seu padrão de ocorrência. Apesar disso, dados acerca da mortalidade de cães brasileiros por câncer ainda são escassos. Diante disto, o propósito deste artigo foi analisar o padrão de ocorrência do câncer como causa de morte ou razão para eutanásia em cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) ao longo de 50 anos (1964-2013), com ênfase nos aspectos epidemiológicos. Para isso, os protocolos de necropsias de cães foram revisados, e deles foram retiradas informações referentes ao sexo, à idade e à raça dos cães cuja causa de morte foi atribuída a algum tipo de câncer. Dos 7.780 cães necropsiados, 11,1% morreram ou foram eutanasiados em decorrência de algum tipo de câncer. A prevalência do câncer sofreu um aumento importante nesses 50 anos, observado principalmente nas últimas duas décadas (1994-2013). Os tumores mais prevalentes foram carcinomas mamários (24,5%), linfomas (8,8%), osteossarcomas esqueléticos (7,8%), colangiocarcinomas (5,5%), mastocitomas cutâneos (5,4%) e hemangiossarcoma multicêntrico (3,3%). Comparando-se os segmentos da população que morreu de câncer com os da população total do LPV-UFSM, a prevalência foi maior em fêmeas (58,5%) e idosos (56,2%), mas, muito semelhante entre os cães de raça definida (RD) (60,4%) e os cães SRD (39,6%). Quando se compararam as prevalências entre raças, Boxer e Rottweiler foram mais frequentemente acometidos. A prevalência semelhante do câncer entre cães de RD e SRD e a alta prevalência dos colangiocarcinomas são resultados importantes, principalmente por se oporem a muitos estudos já publicados acerca do assunto. Por meio deste levantamento, foi possível comprovar que o câncer como causa de morte em cães necropsiados no LPV-UFSM tem aumentado muito ao longo dos anos. Apesar de a ideia do câncer estar se tornando mais prevalente em cães ser muito discutida entre clínicos e patologistas, ela é raramente analisada em outros estudos acerca do assunto.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** doenças de cães, doenças neoplásicas, oncologia, epidemiologia, predisposição.

## INTRODUÇÃO

Levantamentos epidemiológicos sobre mortalidade realizados em populações de cães atendidos em clínicas e consultórios veterinários (Fleming et al. 2011, O'Neill et al. 2013), registrados em companhias de seguro de vida (Bonnett et al. 1997, Michell 1999, Bonnett et al. 2005), pertencentes ao serviço militar (Moore et al. 2001) ou cadastrados em associações de criadores (Proschowsky et al. 2003, Adams et al. 2010) têm apontado o câncer como uma das duas principais causas de morte ou razões para eutanásia em cães europeus e norte-americanos. Apesar da heterogeneidade dos grupos analisados nesses estudos, os resultados são sempre semelhantes, e reforçam a informação de que esta condição vitima uma grande proporção de cães mundialmente a cada ano (Withrow et al. 2013). Da mesma forma ao que tem sido descrito em outros países, o câncer é responsável por uma grande quantidade de mortes de cães na Região Central do RS, Brasil. Aqui, as doenças neoplásicas são a segunda categoria de doenças que mais mata e correspondem a 7,8% das causas de morte ou razões para eutanásia em cães (Figuera et al. 2008).

Estudos acerca da morbidade e da mortalidade do câncer possibilitam identificar diferenças geográficas no padrão de ocorrência desta condição e determinar grupos de indivíduos sob maior risco (Dorn et al. 1968b). Desde a década de 60, estudos tem sido publicado em países da América do Norte (Dorn et al. 1968a, Dorn et al. 1968b, MacVean et al. 1978, Cohen et al. 1974) e Europa (Dobson et al. 2002, Merlo et al. 2008, Vascellari et al. 2009, Bronden et al. 2010), mas poucos na América do Sul (Andrade et al. 2012). Além da prevalência dos diferentes tipos de tumores, muitos desses estudos tentam estabelecer uma relação entre a ocorrência de determinados tipos de câncer com a raça, o sexo e a idade dos cães acometidos (Dorn et al. 1966, Dorn et al. 1968a, Dorn et al. 1968b, Cohen et al. 1974, Merlo et al. 2008,). Entretanto, a maioria deles utiliza amostragens muito pequenas (Dorn et al. 1966) e limita a sua análise a um curto intervalo de tempo (Dorn et al. 1966, Dorn et al. 1968a, Cohen et al. 1974, MacVean et al. 1978, Dobson et al. 2002). Dois grandes estudos sobre mortalidade por câncer em cães, no entanto, ganharam destaque dentre os levantamentos epidemiológicos já publicados. Esses estudos, realizados nos Estados Unidos (Fleming et al. 2011) e na Suécia (Bonnett et al. 2005), analisaram populações grandes e representativas de cães e trouxeram uma série de informações novas e úteis para o campo de oncologia veterinária. Por meio deles, por exemplo, foi demonstrado que os cães norte-americanos de porte pequeno tinham um risco aparentemente menor de morrerem de câncer quando comparados a cães porte grande ou gigante (Fleming et al. 2011) e que a morte por câncer em cães suecos ocorria mais precocemente

em raças com risco elevado em desenvolver câncer quando comparada a raças de baixo risco (Bonnnett et al. 2005).

Diante da escassez de dados locais acerca da mortalidade canina por câncer, da ausência de estudos epidemiológicos nacionais sobre o assunto e da inexistência de levantamentos internacionais por um período maior do que 20 anos, o propósito deste artigo é analisar o padrão de ocorrência do câncer como causa de morte ou razão para eutanásia em cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) ao longo de 50 anos (1964-2013), com ênfase na prevalência e nos aspectos epidemiológicos desta condição. As principais metas são: (1) determinar qual a prevalência do câncer como causa de morte ou razão para eutanásia em cães; (2) demonstrar se houve variações nesta prevalência ao longo de cinco décadas; (3) traçar um perfil epidemiológico em relação ao gênero, à faixa etária e às raças caninas afetadas por câncer em geral; (4) estabelecer a prevalência dos órgãos/sistemas primariamente afetados por câncer em geral; (5) estabelecer quais os tipos específicos de câncer mais comuns como causas de morte ou razões para eutanásia em cães; (6) analisar se houve variações na prevalência desses tipos específicos de câncer ao longo de cinco décadas; (7) traçar um perfil epidemiológico em relação ao sexo, à faixa etária e às raças caninas afetadas pelos principais tipos específicos de câncer.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos de necropsias de cães, realizadas entre 1964 e 2013 no LPV-UFSM, foram revisados, e deles foram retiradas informações referentes ao gênero, à idade e às raças de todos os cães oriundos dos municípios que compõem a Região Central do RS (oficialmente Mesorregião Centro Ocidental Rio-grandense). Os detalhes referentes à população total de cães necropsiados neste período de 50 anos foram previamente publicados (Flores et al. 2016). Do total de protocolos de necropsias, foram separados os casos em que o diagnóstico definitivo da condição que cursou com a morte espontânea ou por eutanásia foi algum tipo de neoplasma maligno (câncer). Para fins de melhor entendimento, esses cães serão denominados como “população alvo”. Desses protocolos, além das informações previamente descritas, foram separados dados anatomopatológicos (macroscópicos e histológicos) referentes ao diagnóstico definitivo e ao(s) órgão(s) acometido(s).

Quanto ao gênero, os cães foram classificados apenas como macho e fêmea, independentemente de serem castrados ou não. A idade foi contabilizada quanto ao número de anos. Idades expressas em meses (ex.: 24 meses) foram convertidas em anos (no caso do exemplo anterior, dois anos). Em cães com idades expressas em anos e meses (ex.: um ano e três meses), o número de meses foi desconsiderado. Quanto às raças, os cães foram classificados em sem raça definida (SRD) ou de raça definida (RD). Cães mestiços, do cruzamento de duas RD, foram incluídos como SRD. As raças de cães necropsiados foram consideradas apenas a partir de 1974, visto que antes deste ano, dados referentes à raça não constavam nos protocolos de necropsia. As raças incluídas foram aquelas homologadas pela *Fédération Cynologique Internationale* (FCI [FCI 2015]) e/ou pelo *American Kennel Club* (AKC [AKC 2015]). As raças não reconhecidas por nenhuma dessas associações (FCI e AKC), mas que fazem parte do Grupo 11 (“raças não reconhecidas pela FCI”) da Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC [CBKC 2015]) também foram contempladas. Para fins de comparação, este estudo foi dividido em cinco décadas: 1964-1973, 1974-1983, 1984-1993, 1994-2003 e 2004-2013.

O número total de cães que morreram ou foram eutanasiados em decorrência do câncer e as informações referentes ao gênero, à idade e à raça destes cães foram comparados com as informações da população total de necropsias previamente publicada (Flores et al. 2016) e considerada para esse fim como “população controle”. Embora muitos cães tivessem mais do que um processo patológico descrito na ficha de necropsia, um único diagnóstico definitivo foi estabelecido para cada caso e foram excluídos os casos em que o câncer não foi considerado como a causa de morte ou razão para eutanásia. O câncer foi considerado como sendo a causa de morte quando: (1) o tumor primário e/ou as metástases eram extensos ou graves o suficiente para terem contribuído diretamente com a falência de um ou mais órgãos vitais (ex.: carcinomas renais bilaterais culminando em uremia); (2) o tumor primário e/ou as metástases tinham uma localização específica que tenha contribuído diretamente com a falência de um órgão vital (ex.: tumores de encéfalo ou coração); ou (3) o tumor primário e/ou as metástases tenham gerado consequências graves suficientes para terem contribuído com a morte (ex.: hemangiossarcoma esplênico rompido, culminando em hemoperitônio). O câncer foi considerado como sendo a razão para eutanásia quando: (1) o histórico indicava o câncer ou os sinais clínicos relacionados ao câncer como sendo a razão para eutanásia; (2) quando não havia indicação do motivo para eutanásia no histórico, o câncer foi considerado o motivo para o procedimento quando o tumor primário e/ou as metástases eram o principal achado de

necropsia e/ou mostravam-se graves o suficiente para ter culminado com manifestações clínicas e justificado a opção pela eutanásia.

A proporção de casos de câncer em cada raça foi denominada “mortalidade proporcional”. Para calcular a mortalidade proporcional, utilizou-se um sistema adaptado de Adams et al. (2010). Assim, foram separadas apenas as raças com “n” representativo na população total de cães necropsiados, aqui definido como  $n \geq 100$  e foi realizado o cálculo exposto abaixo. A mortalidade proporcional foi comparada à prevalência do câncer na população controle (Adams et al. 2010), calculada conforme cálculo a seguir:

Mortalidade proporcional = número de casos de câncer na raça/número de cães da raça x 100

Prev. do câncer na pop. controle = n total de casos de câncer/n total de cães necropsiados x 100

Quando a mortalidade proporcional por câncer em determinada raça foi maior do que a prevalência do câncer na população controle, esta raça foi considerada como tendo uma proporção maior de casos câncer, definida aqui pela expressão “mortalidade proporcional maior”. Quando a mortalidade proporcional por câncer em determinada raça foi menor do que a prevalência do câncer na população controle, esta raça foi considerada como tendo uma proporção menor de casos câncer, definida aqui pela expressão “mortalidade proporcional menor”.

A classificação quanto à localização dos tumores por órgão/sistema acometido foi adaptada de Meuten (2002) e Withrow et al. (2013), a saber: 1) sistema tegumentar (pele e tecido subcutâneo), 2) sistema hematopoiético, 3) sistema osteoarticular, 4) sistema respiratório, 5) sistema alimentar (apenas o trato gastrointestinal), 6) fígado e sistema biliar; 7) pâncreas exócrino, 8) glândulas endócrinas (incluindo pâncreas endócrino), 9) sistema urinário, 10) sistema cardiovascular, 11) sistema nervoso (incluindo central e periférico), 12) olhos, 13) músculo esquelético, 14) sistema genital masculino, 15) sistema genital feminino e 16) glândula mamária. A classificação dos hemangiossarcomas quanto ao sítio anatômico primário foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos por Flores et al. (2012). Os seguintes tumores foram incluídos no sistema hematopoiético, independentemente de sua origem: linfomas, sarcomas histiocíticos, os mielomas e a mastocitose sistêmica.

Finalmente foram estabelecidas as prevalências quanto ao gênero, à idade e à raça dos principais tipos de cânceres como causa de morte ou razão para eutanásia em cães. Apenas as raças com mortalidade proporcional maior foram incluídas para esse fim.

## RESULTADOS

Entre 1964 e 2013, foram localizados 7.780 protocolos de necropsia de cães. Dos cães cujo gênero foi informado nos protocolos ( $n=7.634$ ), 4.012 (52,6%) eram machos e 3.622 (47,4%) eram fêmeas. A idade dos cães variou de um dia a 22 anos de vida (mediana = 3 anos). Dos cães cuja idade foi informada nos protocolos ( $n=7.178$ ), 3.420 (47,6%) tinham entre 1 e 10 anos, 2.397 (33,4%) tinham menos de 1 ano e 1.361 (19%) tinham 10 anos ou mais. Dos cães cuja raça foi informada nos protocolos ( $n=6.885$ ), 4.119 (59,8%) eram de RD e 2.766 (40,2%) eram SRD. Foram observados cães de 66 raças diferentes, das quais 63 são reconhecidas pela FCI e 61 pelo AKC. Das 66 raças observadas, aquelas com  $n \geq 100$  podem ser observadas no Quadro 1.

Dos 7.780 cães necropsiados, 867(11,1%) tiveram a sua morte ou razão para eutanásia relacionada a algum tipo de câncer. A prevalência do câncer por década pode ser visualizada na Figura 1. Dos cães cujo gênero foi informado nos protocolos ( $n=852$ ), 498 (58,5%) eram fêmeas e 354 (41,5%) eram machos. Dos cães cuja idade foi informada nos protocolos ( $n=812$ ), quatro (0,5%) tinham menos de 1 ano, 352 (43,3%) tinham entre 1 e 10 anos e 456 (56,2%) tinham 10 anos ou mais. A idade dos cães afetados variou de cinco meses a 22 anos (mediana = 10). Dos cães cuja raça foi informada nos protocolos ( $n=823$ ), 498 (60,5%) eram de RD e 325 (39,5%) eram SRD. Foram observados cães de 45 raças diferentes, das quais todas são reconhecidas pela FCI e pelo AKC, com exceção do American Pit Bull Terrier. A mortalidade proporcional das raças mais frequentemente representadas na população controle ( $n \geq 100$ ) pode ser visualizada no Quadro 1.

Os órgãos/sistemas acometidos por câncer podem ser visualizados na Figura 2. Os tipos específicos de câncer mais prevalentes foram: carcinomas mamários ( $n=212$  [24,5% do total de cânceres e 2,7% do total geral de causas de morte ou razões para eutanásia]), linfomas ( $n=76$  [8,8% e 1%]), osteossarcomas esqueléticos ( $n=68$  [7,8% e 0,9%]), colangiocarcinomas ( $n=48$  [5,5% e 0,6%]), mastocitomas cutâneos ( $n=47$  [5,4% e 0,6%]) e hemangiossarcoma multicêntrico ( $n=29$  [3,3% e 0,4%]). Essas prevalências podem ser observadas na Figura 3. No Quadro 2 é possível visualizar a prevalência desses mesmos tumores pelas décadas do estudo. Os tumores mais comuns em machos e fêmeas podem ser visualizados na Figura 4; e os tumores mais comuns nas duas raças com



mortalidade proporcional maior por câncer (Boxer e Rottweiler), podem ser visualizados na Figura 5.

Do total de mortes por câncer, 212 (24,5%) foram atribuídas a carcinomas mamários (CM). Dos cães afetados cujos dados referentes ao gênero, idade e raça foram informados nos protocolos, 208 (99%) eram fêmeas e dois (1%) eram machos; 54 (27,6%) tinham entre 1 e 10 anos e 142 (72,4%) tinham 10 anos ou mais (“mediana de idade de morte” = 11,5 anos); e 108 (54,5%) eram RD e 90 (45,5%) eram SRD. Os CM foram proporcionalmente mais comuns em Pastor Alemão (n=37 cães desta raça com carcinoma mamário/n=92 cães desta raça com câncer [40,2%]), Cocker Spaniel Inglês (9/26 [34,6%]) e Dobermann (6/21 [28,6%]).

Do total de mortes por câncer, 76 (8,8%) foram atribuídas a linfomas (LN). Dos cães afetados cujos dados referentes ao gênero, idade e raça foram informados nos protocolos, 30 (39,5%) eram fêmeas e 46 (60,5%) eram machos; 49 (68,1%) tinham entre 1 e 10 anos e 23 (31,9%) tinham 10 anos ou mais (mediana = 8 anos); e 46 (64,8%) eram RD e 25 (35,2%) eram SRD. LN foram proporcionalmente mais comuns em Dobermann (5/21 [23,8%]) e Fila Brasileiro (3/30[10%]).

Do total de mortes por câncer, 68 (7,8%) foram atribuídas a osteossarcomas esqueléticos (OE). Dos cães afetados cujos dados referentes ao gênero, idade e raça foram informados nos protocolos, 28 (42,4%) eram fêmeas e 38 (57,6%) eram machos; 41 (64,1%) tinham entre 1 e 10 anos e 23 (35,9%) tinham 10 anos ou mais (mediana = 8,5 anos); e 46 (71,9%) eram RD e 18 (28,1%) eram SRD. OE foram proporcionalmente mais comuns em Rottweiler (23/61 [37,7%]), Fila Brasileiro (6/30 [20%]) e Dobermann (2/21 [9,5%]).

Do total de mortes por câncer, 48 (5,5%) foram atribuídas a colangiocarcinomas (CC). Dos cães afetados cujos dados referentes ao gênero, idade e raça foram informados nos protocolos, 20 (47,6%) eram fêmeas e 22 (52,4%) eram machos; 11 (36,7%) tinham entre 1 e 10 anos e 19 (63,3%) tinham 10 anos ou mais (mediana = 10,5 anos); e 25 (61%) eram RD e 16 (39%) eram SRD. CC foram proporcionalmente mais comuns no Cocker Spaniel Inglês (2/26 [7,7%]).

Do total de mortes por câncer, 47 (5,4%) foram atribuídas a mastocitomas cutâneos (MC). Dos cães afetados cujos dados referentes ao gênero, idade e raça foram informados nos protocolos, 24 (52,2%) eram fêmeas e 22 (47,8%) eram machos; um (2,2%) tinha menos de 1 ano, 19 (41,3%) tinham entre 1 e 10 anos e 26 (56,5%) tinham 10 anos ou mais (mediana = 10 anos); e 23 (51,1%) eram RD e 22 (48,9%) eram SRD. MC foram proporcionalmente mais comuns em Fila Brasileiro (4/30 [13,3%]) e Boxer (8/72 [11,1%]).

Do total de mortes por câncer, 29 (3,3%) foram atribuídas a hemangiossarcoma multicêntrico (HM). Dos cães afetados cujos dados referentes ao gênero, idade e raça foram informados nos protocolos, 13 (44,8%) eram fêmeas e 16 (55,2%) eram machos; seis (20,7%) tinham entre 1 e 10 anos e 23 (79,3%) tinham 10 anos ou mais (mediana = 11 anos); e 18 (62,1%) eram RD e 11 (37,9%) eram SRD. O HM foi proporcionalmente mais comum em Cocker Spaniel Inglês (2/26 [7,7%]) e Pastor Alemão (7/92 [7,6%]).

## DISCUSSÃO

Há um grande número de estudos disponíveis na literatura internacional acerca da mortalidade por câncer em diferentes populações de cães. As populações alvo utilizadas nesses levantamentos epidemiológicos incluem grupos de cães atendidos em hospitais veterinários (Trapp et al. 2010, Fleming et al. 2011), registrados em companhias de seguro de vida (Bonnett et al. 2005) ou em clubes de criadores (Proschowsky et al. 2003, Adams et al. 2010), necropsiados (Figuera et al. 2008, Eleni et al. 2014), pertencentes ao serviço militar (Moore et al. 2001) ou escolhidos por outros métodos de amostragem (Michell 1999, Bentubo et al. 2007). Por uma série de motivos relacionados às populações alvo analisadas e ao país de origem de cada estudo, a prevalência do câncer como causa de morte em cães varia muito. Quando apenas cães oriundos de uma população hospitalar são incluídos, a prevalência do câncer como causa de morte varia entre 10% (Trapp et al. 2010) e 13% (Bentubo et al. 2007), semelhantemente àquela vista (7,8%) quando a população alvo é de cães submetidos à necropsia (Figuera et al. 2008). Entretanto, quando apenas cães de companhias de seguro ou de clubes de criadores são utilizados nos estudos, a prevalência pode alcançar 18% (Bonnett et al. 2005) a 27% (Adams et al. 2010) das causas de morte, respectivamente. Além disso, quando se divide estes estudos por país de origem, observa-se uma maior prevalência de câncer em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento. No Reino Unido (16%-27%) (Michell 1999, Adams et al. 2010), na Suécia (18%) (Bonnett et al. 2005) e nos Estados Unidos (18%) (Moore et al. 2001), por exemplo, a prevalência de morte por câncer em cães é maior do que aquela até então descrita para populações caninas no Brasil (7,8% a 13%) (Bentubo et al. 2007, Figuera et al. 2008,

Trapp et al. 2010). Para entender as diferentes prevalências do câncer em cada estudo, é importante lembrar-se de alguns fatores. Populações hospitalares ou grupos de cães necropsiados são constituídos de uma grande proporção de cães doentes quando comparados a uma população hígida. Este simples fato aumenta a representatividade de várias outras doenças não neoplásicas nesses grupos, diminuindo proporcionalmente a importância do câncer nos mesmos. Além disso, sempre que determinadas medidas preventivas forem aplicadas em uma população, algumas categorias de doenças tenderão a ter sua prevalência diminuída, e outras, como o câncer, tenderão a tornar-se proporcionalmente mais importantes. Esta observação é importante em populações de países desenvolvidos, em que a vacinação correta, o acompanhamento veterinário regular e a restrição do acesso dos cães à rua são hábitos difundidos, e, conseqüentemente, as mortes por doenças infecciosas e traumas tornam-se, comparativamente, menos frequentes. Nestas populações de cães – e aqui, podemos citar os cães pertencentes a países desenvolvidos e a grupos registrados em clubes de criadores e companhias de seguro de vida – o câncer tende a ter uma importância proporcionalmente maior. A dinâmica entre doenças infecciosas e trauma *versus* doenças neoplásicas já foi bastante discutida por outros autores (Bentubo et al. 2007, Figuera et al. 2008) e parece contribuir para que o câncer tenha uma prevalência proporcionalmente mais baixa em estudos como este (11,1%).

Há pelo menos 50 anos, muitos autores têm procurado traçar relações entre a ocorrência de determinados tipos de câncer e o gênero, a raça e a idade dos cães acometidos (Cohen et al. 1974, Dorn et al. 1968a, Dorn et al. 1968b, Dorn et al. 1966, Cohen et al. 1974, Merlo et al. 2008). Há algumas questões já estabelecidas em relação a isto, dentre elas, pode-se citar (1) o fato de que a predisposição ao desenvolvimento de tumores aumenta com o envelhecimento dos indivíduos de uma população (Dorn et al. 1966, Cohen et al. 1974, Merlo et al. 2008); (2) o fato de que os tumores malignos acometem cães de idade mais avançada quando comparados aos tumores benignos (Dorn et al. 1966, Bronden et al. 2010); (3) a relação entre os cães de raça pura e o maior risco para o desenvolvimento de tumores em geral (Dorn et al. 1966, Vascellari et al. 2009); (4) a existência de raças específicas com risco maior para o desenvolvimento de tipos específicos de câncer (Cohen et al. 1974, Bronden et al. 2010); e (5) o fato de que cadelas inteiras são mais predispostas ao desenvolvimento de câncer de mama (Schneider et al. 1969, Cohen et al. 1974, Merlo et al. 2008).

Os resultados apresentados neste estudo demonstram claramente que a prevalência do câncer na população de cães necropsiados no LPV-UFSM sofreu um aumento importante ao longo dos anos, variando muito pouco (3,5% a 5,2%) nas três primeiras décadas (1964-1993) e aumentando significativamente (12,8% a 16,6%) nas últimas duas (1994-2013). Há muitos fatores que influenciam a prevalência do câncer em uma população de cães e podem ajudar a justificar o aumento deste índice no LPV-UFSM, são eles: (1) o aumento na prevalência das raças caninas consideradas de alto risco para o desenvolvimento de câncer (Olsen & Allen 2000, Dobson et al. 2002, Withrow et al. 2013); (2) a diminuição da relação macho:fêmea na população de risco (Olsen & Allen 2000, Withrow et al. 2013); (3) o aumento na proporção de cães idosos e, conseqüentemente, na “mediana de idade de morte” da população de risco (Dobson et al. 2002, Dobson 2013, Withrow et al. 2013); (4) e a diminuição na incidência de outras categorias de doenças, principalmente, doenças infecciosas e trauma (Olsen & Allen 2000).

A ideia de que cães de RD apresentam um risco maior para o desenvolvimento de câncer quando comparados a cães SRD é descrita há vários anos (Dorn et al. 1966) e ainda hoje (Vascellari et al. 2009) defendida por alguns pesquisadores. Este risco já foi demonstrado ser duas vezes maior para cães de RD em comparação com os SRD em estudos realizados nos Estados Unidos (Dorn et al. 1966) e na Itália (Vascellari et al. 2009). Surpreendentemente, neste estudo, a prevalência do câncer entre cães SRD e cães de RD foi muito semelhante, o que significa dizer que os cães RD aqui incluídos têm uma chance muito parecida de morrerem de câncer quando comparados aos cães SRD. Entretanto, a prevalência do câncer entre cães RD *versus* SRD muda muito se abordarmos tipos específicos de tumores. LN e OE, por exemplo, foram bem mais comuns nos cães RD quando comparados aos SRD. O mesmo não ocorre para CM, CC, MC e HM, tumores cuja ocorrência não parece ter tido qualquer relação com o fato de o cão ser de RD.

Há muitos anos, a literatura internacional aponta na direção de raças caninas que apresentam um risco maior em desenvolverem câncer (Olsen & Allen 2000, Dobson 2013, Withrow et al. 2013). Apesar de a maioria dos cânceres ser provavelmente de etiologia multifatorial, o fato de podermos associar determinadas raças à ocorrência de determinados tumores é uma importante pista que poderá contribuir, futuramente, para o entendimento dos mecanismos genéticos desta condição (Dobson 2013). Cães Boxer (Dorn et al. 1968b, Cohen et al. 1974, Bastianello 1983, Richards et al. 2001, Bonnett et al. 2005, Capík et al. 2008, Bronden et al. 2010, Fleming et al. 2011) e Rottweiler (Cohen et al. 1974, Michell 1999, Proschowsky et al. 2003, Adams et al. 2010) são associados a um

maior risco nesses vários estudos citados. Essas duas raças também foram as que apresentaram uma maior mortalidade proporcional por câncer no LPV-UFSM. Interessantemente, Flores et al. (2016) demonstraram um aumento importante da raça Boxer na população de necropsias do LPV-UFSM a partir de 1984-1993. De forma semelhante, esses mesmos autores (Flores et al. 2016) observaram que cães Rottweiler tornaram-se a quarta raça mais encaminhada à necropsia entre 2004-2013. É possível que essa mudança no perfil racial seja uma das responsáveis pelo aumento na percentagem do câncer nas duas últimas décadas. A possibilidade de aumento da incidência do câncer associada à mudança na ocorrência de determinadas raças na população em risco já foi discutida por pelo menos um estudo anterior a este (Dobson et al. 2002).

O Cocker Spaniel Inglês, Fila Brasileiro, Dobermann e Pastor Alemão também foram apontados, neste estudo, como tendo uma mortalidade proporcionalmente maior por câncer (14,05%). Apesar de estudos anteriores apontarem o Cocker Spaniel Inglês (Dorn et al. 1966, Bastianello 1983, Reid-Smith et al. 2000), o Dobermann e o Pastor Alemão (Dorn et al. 1966) como tendo maior risco para o desenvolvimento de câncer, há estudos que tenham associado estas raças a um risco menor (Bonnett et al. 2005, Adams et al. 2010, Bronden et al. 2010, Fleming et al. 2011). As informações relacionadas à ocorrência de câncer no Fila Brasileiro são escassas por esta raça não aparecer em estudos internacionais. As raças com mortalidade proporcional menor para câncer neste estudo incluíram Collie Pelo Longo, Pointer Inglês, Poodle, Dachshund, Terrier Brasileiro, Pinscher Miniatura, Pequinês e Yorkshire Terrier. Dessas oito raças, seis são de pequeno porte, o que vai ao encontro dos resultados apresentados por Fleming et al. (2011), que chamam atenção para o fato de que as raças de pequeno porte incluídas em seu levantamento tinham uma mortalidade proporcionalmente menor quando comparadas à população total. Os motivos para esta aparente relação entre o porte e o risco de câncer permanece desconhecido. Provavelmente, as variações no risco associado às diferentes raças entre os estudos disponíveis podem ser, em parte, explicadas pela diferença na ocorrência de determinadas raças nas populações e/ou pela presença de linhagens geneticamente distintas nas diversas regiões geográficas (Dobson 2013).

É interessante notar que as duas raças com mortalidade proporcional maior (Rottweiler e Boxer) tiveram predisposições altas para tumores diferentes. Por exemplo, osteossarcomas esqueléticos, sarcomas histiocíticos e melanomas cutâneos, juntos, contribuíram com cerca de 60% de todos os tumores que causaram morte em Rottweiler. A predisposição do Rottweiler para o desenvolvimento de tumores histiocíticos não é novidade. Apesar de, no início, estes tumores terem sido fortemente associados ao Boiadeiro Bernês (Moore 1984), o Golden Retriever e o Rottweiler também têm sido apontados como raças de risco aumentado (Kerlin & Hendrick 1996). Osteossarcomas esqueléticos (Michell 1999, Mc Neill et al. 2007) e melanomas cutâneos (Schultheiss 2006) também são relatados como sendo mais comuns no Rottweiler. Apesar disto, alguns autores (Goldschmidt & Hendrick 2002, Gillard et al. 2013) não citam o Rottweiler entre as raças mais predispostas em desenvolver melanomas cutâneos. Diferentemente do Rottweiler e da população total que morreu de câncer, cerca de 30% dos tumores que causaram a morte em Boxer eram mastocitomas cutâneos, oligodendrogliomas e meningiomas encefálicos. Este achado chama atenção, principalmente diante da baixa prevalência dos tumores de sistema nervoso na população total. A predisposição do Boxer por mastocitomas cutâneos (Cohen et al. 1974, Warland & Dobson 2013) e tumores encefálicos (Gough & Thomas 2006) também não é novidade no campo de oncologia veterinária. A propósito, apesar de o Boxer ter sido super-representado em apenas três tumores neste estudo, esta raça tem um número bastante grande de tumores em sua lista de doenças de alto risco, entre eles, melanomas cutâneos, carcinomas de células escamosas cutâneas, linfomas, quimiodectomas e tumores vasculares, endócrinos, gengivais e testiculares (Gough & Thomas 2006).

Outro aspecto epidemiológico interessante e que é muito difundido na literatura está relacionado à afirmação por parte de alguns autores de que fêmeas são mais predispostas em desenvolver câncer, o que faz com que a diminuição da relação macho:fêmea em uma população esteja relacionada ao aumento da prevalência de câncer (Olsen & Allen 2000, Withrow et al. 2013). Comparando essa afirmação, os resultados aqui descritos e os resultados obtidos por Flores et al. (2016) nesta mesma população alvo, pode-se observar que o aumento da prevalência do câncer nas últimas décadas coincidiu com a diminuição da relação macho:fêmea. Flores et al. (2016) observaram uma queda gradual e muito significativa dessa relação quando compararam-se cinco décadas (1964-1973 [M:F=2], 1974-1983 [M:F=1,5], 1984-1993 [M:F=1,3], 1994-2003[M:F=1,1] e 2004-2013[M:F=0,9]). Além disso, se apenas compararmos a prevalência do câncer por gênero com a prevalência do gênero na população-alvo, temos 58,5% dos casos de câncer em cadelas que correspondem a apenas 47,6% da população em questão. Entretanto, no geral, de todos os tumores malignos aqui descritos como comuns, apenas os carcinomas mamários foram, obviamente, mais comuns em fêmeas. Não temos

evidências que permitam ir contra a afirmação de que o aumento de fêmeas em uma população aumenta proporcionalmente a prevalência do câncer (Olsen & Allen 2000, Merlo et al. 2008, Withrow et al. 2013), pelo contrário, os resultados encontrados inclusive corroboram essa afirmação, mas salientamos que talvez isso se deva muito mais, ou apenas, à acentuada discrepância entre 99% de carcinomas mamários em fêmea e 1% desses mesmos tumores em machos.

O fator mais frequentemente incriminado na variação da prevalência do câncer em diferentes populações alvo é a idade da população canina (Dorn et al. 1966, Capík et al. 2008, Bronden et al. 2010, Andrade et al. 2012). É consenso entre pesquisadores, criadores de cães e clínicos veterinários (Withrow et al. 2013), mas também atualmente entre o público leigo, que quanto maior a expectativa de vida dos cães, maior a chance de morte por câncer. Dessa forma, o envelhecimento da população canina, semelhantemente ao que é descrito para a população humana, está diretamente relacionado com o aumento da prevalência de câncer (Dorn et al. 1966, Dobson et al. 2002). Na prática, isso pode ser comprovado com base em vários estudos, tanto recentes (Dobson et al. 2002, Eleni et al. 2014), quanto clássicos (Dorn et al. 1968a, Dorn et al. 1968b). Isso é atribuído principalmente ao acúmulo de danos genéticos e à queda na imunidade ao longo do envelhecimento (Cullen et al. 2002). Flores et al. (2016) demonstraram que a percentagem de cães idosos aumentou grandemente, oscilando entre cerca de 8% e 11% nas três primeiras décadas (1964-1993) para 16% na quarta década (1994-2003) e, posteriormente, para 28% na última década (2004-2013). Comparando os resultados desses autores, com aqueles aqui descritos, pode-se observar uma estreita relação entre o aumento da expectativa de vida e o aumento no risco de desenvolvimento de câncer na população alvo estudada.

A prevalência do câncer nos diferentes estudos semelhantes a este aumenta proporcionalmente com a idade, atinge um pico em determinado período e, posteriormente, entra em declínio (Cohen et al. 1974, Dobson et al. 2002, Capík et al. 2008, Merlo et al. 2008). Nos estudos de Merlo et al. (2008) e de Vascellari et al. (2009), realizados na Itália, os picos de ocorrência do câncer ocorreram nos grupos com idades entre 9 e 11 anos e a partir de 12 anos, respectivamente. Capík et al. (2008) descreveram um pico aos 12 anos na Eslováquia, e Bhaiyat et al. (2013) descreveram um pico entre 8 e 12 anos na Índia. Cohen et al. (1974) demonstraram uma média de idade semelhante ao pico descrito por Merlo et al. (2009), de 9,1 anos, em cães norte americanos. Dobson et al. (2002) descreveram o pico de ocorrência aos 10 anos em cães do Reino Unido. Entretanto, isso pode ser muito variável, pois vários estudos demonstram que a média de idade dos cães com linfomas (Cohen et al. 1974, Merlo et al. 2008) e com osteossarcomas esqueléticos (Cohen et al. 1974), por exemplo, era menor quando comparada à média de idade dos cães com outros tipos de câncer. Cohen et al. (1974) encontraram uma média de idade de 7,3 anos para cães com linfomas e 7,9 anos para cães com osteossarcomas esqueléticos, enquanto a média de idade do câncer em geral era de 9,1 anos. Merlo et al. (2008) observaram que, enquanto a maioria dos cães com câncer situava-se na faixa etária entre 9 e 11 anos, os cães com linfomas tinham entre 7 e 9 anos. Isto significa dizer que a “idade do câncer” era menor para linfomas e osteossarcomas esqueléticos. Semelhantemente a isso, a “mediana de idade de morte” devido a linfomas (8 anos) e osteossarcomas esqueléticos (8,5 anos) caninos foi muito menor quando comparada a “mediana de idade de morte” por câncer em geral (10 anos). Alguns autores sugerem que o fato de a “idade do câncer” ser menor para linfomas e osteossarcomas esqueléticos possa indicar uma possível etiologia em comum para esses dois tumores (Cohen et al. 1974). Apesar disso, é mais plausível depreender que a presença de um fator de risco adicional para determinados tipos de tumores, como, por exemplo, o peso corporal, no caso dos osteossarcomas esqueléticos, possa induzir o desenvolvimento precoce desse tipo de câncer (Thompson & Pool 2002).

Os carcinomas mamários, o linfoma, o osteossarcoma esquelético e o mastocitoma cutâneo são frequentemente citados como os tipos de câncer mais prevalentes nos diferentes estudos citados anteriormente (Cohen et al. 1974, Bastianello 1983, Dobson et al. 2002, Merlo et al. 2008, Bronden et al. 2010). Esses mesmos tumores foram observados como altamente prevalentes neste estudo. Carcinomas mamários, por exemplo, que representavam cerca de 15% dos cânceres entre 1964 e 1983, aumentaram muito sua prevalência, chegando a aproximadamente 33% entre 1984 e 1993, vindo posteriormente a estabilizar-se na faixa de 25% nas últimas duas décadas (1994-2003 e 2004-2013). Osteossarcoma esquelético, colangiocarcinoma e linfoma oscilaram ainda mais, ao contrário do mastocitoma, que se manteve sempre ao redor de 5% nos diferentes momentos deste estudo. Esses achados demonstram que estes quatro tipos de câncer sempre tiveram alguma importância como causas de morte ou razões para eutanásia de cães. A importância dos carcinomas mamários e linfomas em cães não é novidade: eles aparecem entre os tumores mais prevalentes em estudos realmente antigos, alguns dos quais foram publicados há quase 50 anos (Bastianello 1983, Dorn et al. 1968a, Cohen et al. 1974). Já a prevalência do osteossarcoma esquelético em estudos mais antigos

é baixa (Dorn et al. 1968b, Bastianello 1983), perfazendo apenas o sétimo câncer mais importante no estudo de Cohen et al. (1974). Desconhecemos o motivo pelo qual a prevalência do osteossarcoma esquelético deste estudo cai de 12,5% para 1,4% entre 1974-1983 e 1984-1993. Apesar de ter se mantido entre os tumores mais importantes entre todas as décadas, o colangiocarcinoma apresentou um leve declínio em sua prevalência, passando de 10,5% a 2,7% entre 1964-1973 e 1994-2003. O colangiocarcinoma é um tumor importante no LPV-UFSM, e não é possível justificar a sua baixa representatividade entre 1994 e 2003. A prevalência estável do mastocitoma ao longo dos 50 anos deste estudo (2004-2013) reflete a sua real importância em Medicina Veterinária. Há evidências que estes tumores já pareciam ser bastante importantes a partir da década de 60, como demonstram os estudos de Dorn et al. (1968b), Cohen et al. (1974) e Bastianello (1983).

Os carcinomas mamários (CM) foram o tipo de câncer mais prevalente neste estudo, representando 24,5% de todos os tumores. Esses resultados já eram esperados, principalmente diante de alguns dados prévios publicados neste mesmo laboratório (Figuera et al. 2008, Oliveira Filho 2010) e da grande quantidade de cadelas não castradas presentes em países como o Brasil. Isto culmina em uma alta prevalência de tumores mamários nestes locais (Cohen et al. 1974, Bronden et al. 2010). Semelhantemente aos resultados por nós descritos, Egenvall et al. (2005) e Bhaiyat et al. (2013) apontaram o Dobermann como tendo alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama.

Os linfomas (LN) corresponderam a 8,8% de todos os tumores e foram o segundo câncer mais prevalente neste estudo. Estes tumores já foram assunto de uma publicação prévia deste laboratório (Figuera et al. 2006). O LN é o tumor hematopoiético mais importante de cães (Jacobs et al. 2002), e segundo alguns autores, o Boxer (Dorn et al. 1968b) e o Rottweiler (Jagielski et al. 2002) têm maior risco para o desenvolvimento do tumor. Apesar disto, essas duas raças não demonstraram uma mortalidade proporcional maior para LN neste estudo. Além disso, os cães RD parecem ter um maior risco para o desenvolvimento de linfomas quando comparados aos SRD (Vascellari et al. 2009), o que foi observado neste estudo.

Os osteossarcomas esqueléticos (OE) foram o terceiro câncer mais prevalente neste estudo, correspondendo a 7,8% de todos os tumores. OE são os tumores ósseos primários mais comuns em cães (Thompson & Pool 2002), e acometem mais frequentemente animais entre 7,5 e 8 anos (Thompson & Pool 2002), o que vai ao encontro da “mediana de idade de morte” relativamente baixa encontrada aqui. Em um estudo anterior deste mesmo laboratório (Trost et al. 2012), 43% dos OE acometiam Rottweiler. Apesar das raças de porte grande e gigante, em geral, apresentarem um alto risco para o desenvolvimento de OE (Thompson & Pool 2002), algumas raças específicas parecem ter maior risco, são elas: Boxer, Dobermann, Dogue Alemão, Golden Retriever, São Bernardo, Setter Irlandês e Rottweiler (Brodey & Riser 1969, McNeill et al. 2007, Morello et al. 2011).

O colangiocarcinoma (CC) foi o quarto tipo de câncer mais comum neste estudo, correspondendo a 5,5% de todos os tumores. A alta prevalência de CC no LPV-UFSM (Figuera et al. 2008) é considerada atípica (Flores et al. 2013), por ser descrita apenas em raros estudos acerca do assunto, todos eles bastante antigos (Messow 1952, Rooney 1959, Bastianello 1983). A grande maioria dos artigos científicos (Strombeck 1978, Patnaik et al. 1980, Ramos-Vara et al. 2001) e dos autores dos principais livros de patologia veterinária (Ponomarev & Mackey 1976, Cullen & Popp 2002, Head et al. 2003, Stalker & Hayes 2007) concorda que o CC é um tumor incomum em cães e considera o carcinoma hepatocelular como o câncer hepático primário mais prevalente. Os motivos para a alta prevalência de CC em cães necropsiados no LPV-UFSM permanecem desconhecidos. Apesar de Flores et al. (2013) terem descrito uma maior ocorrência do tumor em Boxer e Poodle, outros autores acreditam não haver raças de maior risco para CC (Rooney 1959, Patnaik et al. 1980).

O mastocitoma cutâneo (MC) foi o quinto tipo de câncer mais prevalente neste estudo, correspondendo a 5,4% de todos os tumores. Estes tumores já foram assunto de uma publicação prévia deste laboratório (Reck et al. 2004) e estão entre os tumores de pele mais prevalentes em estudos de outros países (Bostock 1977, Bastianello 1983, Goldschmidt & Shofer 1992, Reid-Smith et al. 2000, Dobson et al. 2002, Bronden et al. 2010, Bhaiyat et al. 2013), o que vai ao encontro dos resultados aqui apresentados. O Boxer (Warland & Dobson 2013), raça com mortalidade proporcionalmente maior para MC neste estudo, está entre as raças de maior risco. Outras raças citadas na literatura internacional incluem Boston Terrier, Bull Terrier, Bullmastiff, American Staffordshire Terrier, Bulldog, Dachshund e Shar Pei (Goldschmidt & Shofer 1992, Gross et al. 2005, Miller et al. 2012).

O hemangiossarcoma multicêntrico (HM) foi o sexto tipo de câncer mais prevalente neste estudo, correspondendo a 3,3% de todos os tumores. Este tumor já foi previamente estudado neste laboratório (Flores et al. 2012) e também tem importância em outros estudos, tanto mais antigos (Bastianello 1983) quanto recentes (Bhaiyat et al. 2013). O HM tem prognóstico reservado a

desfavorável, pois apresenta um comportamento agressivo e tem uma alta capacidade de metastatizar para outros órgãos (Goldschmidt & Hendrick 2002). Há fortes indícios de que o Pastor Alemão apresente um risco alto para o desenvolvimento do tumor (Hirsch et al. 1981, Brown et al. 1985), raça que demonstrou uma mortalidade proporcionalmente maior por HM neste e no estudo publicado previamente pela equipe de diagnóstico deste mesmo laboratório (Flores et al. 2012).

É importante lembrar que a prevalência dos diferentes tipos de câncer aqui relatados não é um reflexo totalmente fidedigno da ocorrência de câncer em cães na Região Central do RS. Em primeiro lugar, as mortes de cães no Brasil não são registradas de forma sistemática, como ocorre para cães em muitos países desenvolvidos ou como ocorre com a morte de humanos. Isto acaba criando vieses no grupo de cães necropsiados no LPV-UFSM, pois além de ele não englobar todos os cães que morrem na Região Central do RS, ele não é selecionado de forma aleatória, como deveriam ser selecionadas as amostras de um estudo como este. Proprietários e veterinários que julgam desnecessária a realização de necropsia em determinados cães, cães de rua que morrem atropelados diariamente e não passam pelo exame *post mortem* e cães pertencentes a proprietários que não têm acesso ao serviço de diagnóstico do LPV-UFSM por uma série de motivos são exemplos de fatores externos que influenciam a amostragem de cães necropsiados no LPV-UFSM. Esses fatores podem: (1) influenciar a prevalência das raças, gêneros e idades na população total de cães necropsiados tornando-a diferente da população total de cães que morrem na Região Central do RS; e (2) subestimar a prevalência de algumas condições como o atropelamento, o que aumenta proporcionalmente a importância das outras categorias de doenças, entre elas, o câncer. Em segundo lugar, este estudo incluiu apenas os tumores diagnosticados como causas de morte ou razões para eutanásia, o que significa dizer que aqueles tumores marcadamente comuns, mas que não causam morte – como, por exemplo, lipomas (Gross et al. 2005) –, não aparecerão em resultados de estudos como este. Esta exclusão de tumores comuns, porém, de comportamento benigno, acaba elevando a proporção de tumores frequentemente fatais, passando a impressão de que esses tumores são mais comuns do que outros. Apesar da existência desses vieses, é importante enfatizar que uma das melhores formas de conduzir um estudo de prevalência do câncer em cães ainda é utilizar um banco de dados oriundo de clínicas e hospitais que se utilizam de serviços de diagnóstico *post mortem*, visto que o câncer exige confirmação histopatológica, e estudos em populações híidas provavelmente não possibilitem esta confirmação em todos os casos incluídos. Além disto, a ausência de dados demográficos completos das populações caninas brasileiras, e, mais especificamente, da população que habita Região Central do RS, dificulta a realização de estudos como este, o que acaba estimulando o uso de grupos de cães examinados em hospitais e clínicas (Cohen et al. 1974), segurados (Dobson et al. 2002) ou, como no nosso caso, necropsiados (Andrade et al. 2012) como “população total” para o cálculo de prevalência da condição estudada.

## CONCLUSÃO

A partir dos achados encontrados na análise epidemiológica do padrão de ocorrência do câncer em cães, podemos concluir que o câncer tem se tornado mais prevalente como causa de morte e razão para eutanásia em cães necropsiados no LPV-UFSM nos últimos 50 anos. O aumento no número de fêmeas e idosos e determinadas mudanças nas raças mais comuns na população controle podem ter contribuído para esta variação. Algumas raças foram apontadas como tendo uma mortalidade maior por câncer na nossa região, o que pode representar um risco aumentado destas raças para o desenvolvimento de tumores. Apesar de os tipos de câncer mais comuns no LPV-UFSM terem oscilado entre as décadas deste estudo, eles tiveram em comum o fato de manterem-se sempre entre os principais tipos de câncer em cães necropsiados neste laboratório.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Luís Gustavo Corbellini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelas sugestões, principalmente acerca dos diferentes vieses deste trabalho. Mariana Martins Flores é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

Adams V.J., Evans K.M., Sampson J. & Wood J.L.N. 2010. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J. Small Anim. Pract.* 51:512-524.

- American Kennel Club (AKC). Dog Owners - Breeds. Disponível em <<http://www.akc.org/breeds/index.cfm>> Acesso em 5 jan. 2015.
- Andrade R.L.F.S., Oliveira D.M., Dantas A.F.M., Souza A.P., Nóbrega Neto P.I & Riet-Correa F. 2012. Tumores de cães e gatos diagnosticados no semiárido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 32(10):1037-1040.
- Bastianello S.S. 1983. A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the republic of South Africa. VI. Tumours occurring in dogs. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 50:199-220.
- Bentubo H.D.L., Tomaz M.A., Bondan E.F. & Lallo M.A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). 2007. *Ciência Rural* 37:1021-1026.
- Bhaiyat M.I., Chikweto A., Tiwari K.P., DeAllie C., Pawaiya R.S., Inga A., Hegamin-Younger C. & Sharma N. 2013. A retrospective study of canine tumors in Grenada, West Indies. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 1(5):134-139.
- Bonnett B.N., Egenvall A., Hedhammar A. & Olson P. 2005. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Vet. Scand.* 46:105-120.
- Bonnett B.N., Egenvall A., Olson P. & Hedhammar A. 1997. Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. *Vet. Rec.* 141:40-44.
- Bostock D.E. 1977. P.493-505. Neoplasia of the skin and mammary glands in dogs and cats. In.: Kirk, R.W. *Current veterinary therapy*. Philadelphia, Saunders.
- Brodey R.S., & Riser W.H. 1969. Canine osteosarcoma: A clinico-pathologic study of 194 cases. *Clin. Orthop.* 62:54-64.
- Bronden 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. *Vet. Rec.* 166:586-590.
- Brown O., Patnaik A.K. & MacEwen G. 1985. Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186(1):56-58.
- Capík I., Sevcík A. & Sevcíková Z. 2008. Tumour diseases in dogs. *Folia Vet.* 52:194-198.
- Cohen D., Reif J.S., Brodey R.S. & Keiser H. 1974. Epidemiological Analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res.* 34:2859-2868.
- Confederação brasileira de Cinofilia (CBKC). Raças não reconhecidas pela FCI. Disponível em <<http://www.cbkc.org/padroes/grupo11.html>> Acesso em 5 jan. 2015.
- Cullen J.M., Page R. & Misdrop W. 2002. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management, p.3-44. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> Ed. Iowa State Press, Ames.
- Cullen J.M. & Popp J.A. 2002. Tumors of the liver and gall bladder, p.483-508. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> Ed. Iowa State Press, Ames.
- Dobson J.M. 2013. Breed-Predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet. Sci.* 1-23.
- Dobson J.M., Samuel S., Milstein H., Rogers K. & Wood J.L.N. 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small Anim. Pract.* 43:240-246.
- Dorn C.R., Taylor D.O.N., Chaulk L.E. & Hibbard H.H. 1966. The prevalence of spontaneous neoplasms in a defined canine population. *Am. J. Public Health* 56:254-265.
- Dorn C.R., Taylor D.O.N., Frye F.L. & Hibbard H.H. 1968a. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *J. Natl. Cancer Inst.* 40:295-305.
- Dorn C.R., Taylor D.O.N., Schneider R., Hibbard H.H. & Klauber M.R. 1968b. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl. Cancer Inst.* 40:307-318.
- Eleni C., Panetta V., Scholl F. & Scaramozzino, P. 2014. Causes of death in dogs in the province of Rome (Italy). *Vet. Ital.* 50:137-143.
- Egenvall A., Bonnett B.N., Öhagen P., Olson P., Hedhammar A. & von Euler H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev. Vet. Med.* 69:109-127.
- Fédération Cynologique Internationale (FCI). FCI Breeds nomenclature. Disponível em <<http://www.fci.be/en/Nomenclature/>>. Acesso em 5 jan. 2015.
- Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesq. Vet. Bras.* 28:223-230.

- Figuera R.A., Souza T.M., Rodrigues A. & Barros C.S.L. 2006. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. *Rev. Cient. Med. Vet. Pequenos Anim. Estim.* 4(12):139-146.
- Figuera R.A., Souza T.M., Barros C.S.L. 2002. Linfossarcoma em cães. *Ciência Rural* 32(5):895-899.
- Fleming J.M., Creevy K.E. & Promislow D.E.L. 2011. Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size- and breed-related causes of death. *J. Vet. Intern. Med.* 25:187-198.
- Flores M.M., Martins M.T., Mazaro R.D., Lopes E.M.B., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Figuera R.A. 2015. Caracterização de uma população de 7.780 cães da Região Central do Rio Grande do Sul submetidos à necropsia ao longo de cinco décadas (1964-2013). *Pesq. Vet. Bras.* Em tramitação.
- Flores M.M., Bianchi R.M., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Barros C.S.L. & Figuera R.A. 2013. Prevalência e achados epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores hepáticos primários de cães da Região Central do Rio Grande do Sul (1965-2012). *Pesq. Vet. Bras.* 33:497-511.
- Flores M.M., Panziera W., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Barros C.S.L. & Figuera R.A. 2012. Aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012). *Pesq. Vet. Bras.* 32:1319-1328.
- Gillard M., Cadieu E., Brito C., Abadie J., Vergier B., Devauchelle P., Degorce F., Dréano S., Primot A., Dorso L., Lagadic M., Galibert F., Hédan B., Galibert M.D. & André C. 2013. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27:90-102.
- Goldschmidt M.H. & Hendrick M.J. 2002. Cap.2. p.44-117. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten D.J. *Tumors in domestic animals.* 4<sup>th</sup>Ed. Ames: Iowa State.
- Goldschmidt M.H. & Shofer F.S. 1992. *Skin tumors of the dog and cat.* Oxford: Pergamon, 316p.
- Gough A. & Thomas. A. 2006. *Predisposições a doenças de acordo com as diferentes raças de cães e gatos.* p.1-233. 1<sup>a</sup> Ed. Roca: São Paulo.
- Gross T.L., Ihrke P.J., Walder W.J. & Affolter V.K. 2005. Mesenchymal neoplasms and other tumors, p.709-888. In: *Ibid.* (eds), *Skin Diseases of the dog and cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis.* 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Head K.W., Cullen J.M., Dubielzig R.R., Else R.W., Misdrop W., Patnaik A.K., Tateyama S. & van der Gaag I. 2003. *Histological Classification of Tumors of Alimentary System of Domestic Animals.* Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, p.119-130.
- Hirsch V.M., Jacobsen J. & Mills J.H.L. 1981. A retrospective study of canine hemangiossarcoma and its association with acanthocytosis. *Can. Vet. J.* 22(5):152-155.
- Jacobs R.M., Messick J.B. & Valli V.E. 2002. Tumors of the hemolymphatic system, p.119-198. In: Meuten D.J. *Tumors in domestic animals.* 4<sup>th</sup>Ed. Ames: Iowa State.
- Jagielski D., Lechowski R., Hoffmann-Jagielska M. & Winiarczyk S. 2002. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *J. Vet. Med.* 49:419-424.
- MacVean D.W., Monlux A.W., Anderson Jr. P.S., Silberg S.L. & Roszel J.F. 1978. *Vet. Pathol.* 15:700-715.
- McNeill C.J., Overley B., Shofer F.S., Kent M.S., Clifford C.A., Samluk M., Haney S., Van Winkle T.J. & Sorenmo K.U. 2007. Characterization of the biological behaviour of appendicular osteosarcoma in Rottweilers and a comparison with other breeds: a review of 258 dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 5:90-98.
- Merlo D.F., Rossi L., Pellegrino C., Ceppi M., Cardellino U., Capurro C., Ratto A., Sambucco P.L., Sestito V., Tanara G. & Bocchini V. 2008. Cancer Incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J. Vet. Intern. Med.* 22:976-984.
- Messow C. 1952. Die Lebertumoren unserer Haussäugetiere. *Wiss. Z. Humboldt Univ. Berl. (Ges Sprachwiss).* 2:121-152.
- Meuten D.J. 2002. *Tumors in Domestic Animals.* 4th ed. Iowa State Press, Ames. 788p.
- Michell A.R. 1999. Longevity of British breeds of dog and its relationship with sex, size, cardiovascular variables and disease. *Vet. Rec.* 45:625-629.
- Miller W.H., Griffin C.E. & Campbell K.L. 2012. Chapter 20. Neoplastic and Non-Neoplastic Tumors, p.774-843. In: *Ibid.* (eds), *Small Animal Dermatology.* 7<sup>th</sup> Ed. Elsevier Mosby, St. Louis.
- Moore P.F. 1984. Systemic Histiocytosis of Bernese Mountain Dogs. *Vet. Pathol.* 21:554-563.
- Moore G.E., Burkman K.D., Carter M.N. & Peterson M.R. 2001. Causes of death or reasons for euthanasia in military working dogs: 927 cases (1993-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219(2):209-214.
- Morello E., Martano M. & Buracco P. 2011. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: Similarities and differences with human osteosarcoma. *Vet. J.* 189:268-277.



- Oliveira Filho J.C., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques B.M.F.P.P., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq. Vet. Bras.* 30(2):177-185.
- Olsen T.F. & Allen A.L. 2000. Causes of sudden and unexpected death in dogs: a 10-year retrospective study. *Can. Vet. J.* 41:873-875.
- O'Neill D.G., Church D.B., McGreevy P.D., Thomson P.C. & Brodbelt D.C. 2013. Longevity and mortality of owned dogs in England. *Vet. J.* 198:638-643.
- Patnaik A.K., Hurvitz A.I. & Lieberman P.H. 1980. Canine hepatic neoplasms: a clinicopathologic study. *Vet. Pathol.* 17:553-564.
- Ponomarev V. & Mackey L.J. 1976. Tumours of the liver and biliary system. *Bull. World Health Organ.* 53:187-194.
- Proschowsky H.F., Rugbjerg H. & Ersboll A.K. 2003. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Prev. Vet. Med.* 58:63-74.
- Ramos-Vara J.A., Miller M.A. & Johnson G.C. 2001. Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasms with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and a monoclonal antibody to cytokeratin 7. *Vet. Pathol.* 38:636-643.
- Rech R.R., Graça D.L., Kommers G.D., Sallis E.S.V., Raffi M.B. & Garmatz S.L. 2004. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56(4):441-448.
- Reid-Smith R.J., Bonnett B.N., Martin S.W., Kruth S.A., Abrams-Ogg A. & Hazlett M.J. 2000. The incidence of neoplasia in the canine and feline patient populations of private veterinary practices in southern Ontario. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*. Breckenridge, Colorado. s/p.
- Richards H.G., McNeil P.E., Thompson H. & Reid S.W.J. 2001. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Prev. Vet. Med.* 51:125-136.
- Rooney J.R. 1959. Liver carcinoma in the dog. *Acta Pathol.* 45:321-330.
- Schneider R. et al. 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 43:1249-1261.
- Schultheiss P.C. 2006. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:422-425.
- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and Biliary System, p.348-353. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals: Vol.1, 5<sup>th</sup> ed.* Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Strombeck D.R. 1978. Clinicopathologic features of primary and metastatic neoplastic diseases of the liver in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173:267-269.
- Thompson K.G. & Pool R.R. 2002. Tumors of bones, p.245-317. In: Meuten D.J. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Ames, 788p.
- Trapp S.M., Iacuzio A.I., Barca Junior F.A., Kemper B., Silva L.C., Okano W., Tanaka N.M., Grecco F.C.A.R., Cunha Filho L.F.C. & Sterza F.A.M. 2010. Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população hospitalar de cães e gatos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 47:395-402.
- Trost M.E., Kommers G.D., Brown C.C., Barros C.S.L., Irigoyen L.F., Figuera R.A., Inkelmann M.A. & Silva T.M. 2012. Primary bone neoplasm in dogs: 90 cases. *Pesq. Vet. Bras.* 32:1329-1335.
- Yager J.A. & Wilcock B.B. 1994. Cap. 3, p.239-313. In: Yager J.A. & Wilcock B.B. (Ed.), *Color atlas and text of surgical pathology of the dog and cat: dermatopathology and skin tumors*. Vol.1. Wolfe, London.
- Vascellari M., Baioni E., Ru G., Carminato A. & Mutinelli F. 2009. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Vet. Res.* 5:39-47.
- Warland J. & Dobson J. 2013. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. *Vet. J.* 197:496-498.
- Withrow S. J., Vail D.M. & Page R. L. 2013. *Withrow & MacEwen's Small Animal Oncology*. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier, St. Louis, 768p.

## QUADROS

Quadro 1. Parâmetros populacionais e mortalidade proporcional das principais raças caninas necropsiadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

<b>Raça</b>	<b>População necropsiada</b>	<b>População com câncer</b>	<b>%</b>	<b>Mortalidade proporcional</b>
Rottweiler	220	61	27,72%	↑↑
Boxer	285	72	25,26%	↑↑
Fila Brasileiro	189	30	15,87%	↑
Cocker Spaniel Inglês	185	26	14,05%	↑
Dobermann	151	21	13,91%	↑
Pastor Alemão	710	92	12,96%	↑
<b>População controle (raça pura)</b>	<b>4.119</b>	<b>469</b>	<b>11,38%</b>	-
<b>População controle (total)</b>	<b>7.780</b>	<b>867</b>	<b>11,14%</b>	-
Collie Pelo Longo	154	17	11,04%	↓
Pointer Inglês	162	17	10,49%	↓
Poodle	365	33	9,04%	↓
Dachshund	259	22	8,49%	↓
Terrier Brasileiro	117	6	5,13%	↓↓
Pinscher Miniatura	230	10	4,35%	↓↓
Pequinês	138	4	2,90%	↓↓
Yorkshire Terrier	135	3	2,22%	↓↓

Mortalidade proporcional maior: ↑ aumento leve e ↑↑ aumento acentuado.

Mortalidade proporcional menor: ↓ diminuição leve e ↓↓ diminuição acentuada.

Quadro 2. Prevalência por décadas dos principais tipos de cânceres como causa de morte ou razão para eutanásia de cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

1964-1973	%	1974-1983	%	1984-1993	%	1994-2003	%	2004-2013	%
Carcinomas mamários	15,8	Linfomas	20	Carcinomas mamários	32,9	Carcinomas mamários	26,1	Carcinomas mamários	23,3
Colangiocarcinomas	10,5	Carcinomas mamários	17,5	Linfomas	11,4	Linfomas	11	Osteossarcomas esqueléticos	8,3
Linfomas	10,5	Colangiocarcinomas	12,5	Mastocitomas cutâneos	5,7	Osteossarcomas esqueléticos	7,8	Linfomas	6,5
Osteossarcomas esqueléticos	10,5	Osteossarcomas esqueléticos	12,5	Colangiocarcinomas	4,3	Mastocitomas cutâneos	5,5	Colangiocarcinomas	6,2
Mastocitomas cutâneos	5,3	Mastocitomas cutâneos	2,5	Osteossarcomas esqueléticos	1,4	Colangiocarcinomas	2,7	Mastocitomas cutâneos	5,6
Hemangiossarcoma multicêntrico	0	Hemangiossarcoma multicêntrico	2,5	Hemangiossarcoma multicêntrico	0	Hemangiossarcoma multicêntrico	2,8	Hemangiossarcoma multicêntrico	4,2
Outros tumores	47,4	Outros tumores	32,5	Outros tumores	44,3	Outros tumores	44,1	Outros tumores	45,9

## LISTA DE FIGURAS

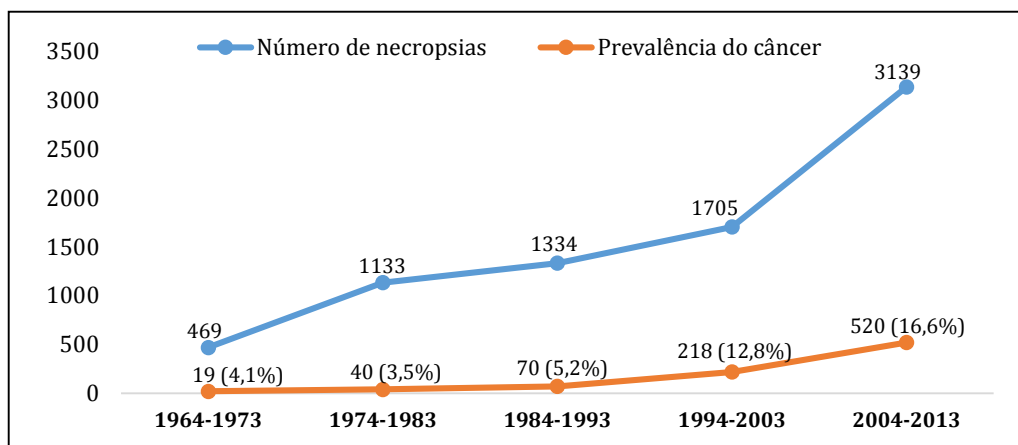


Fig. 1.

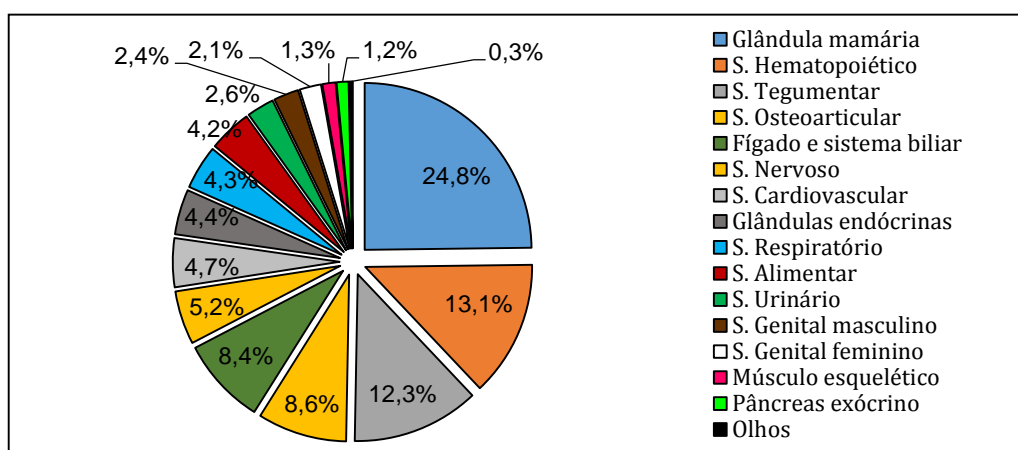


Fig. 2.

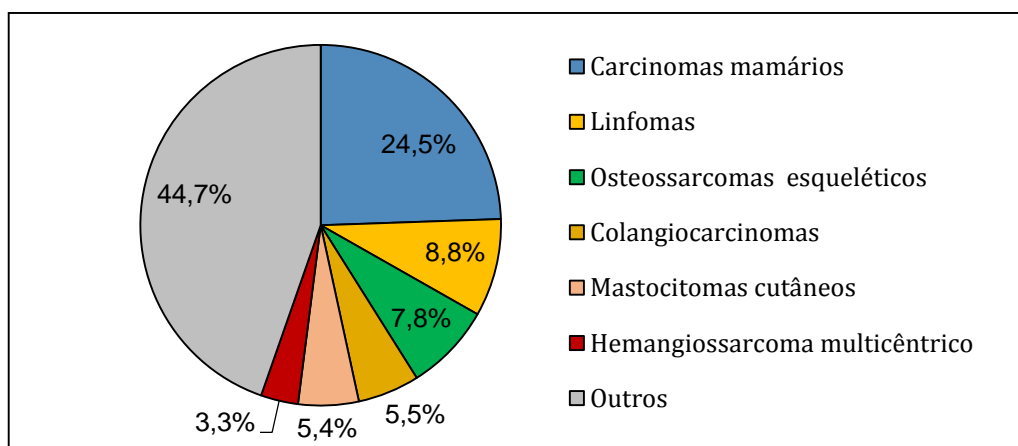
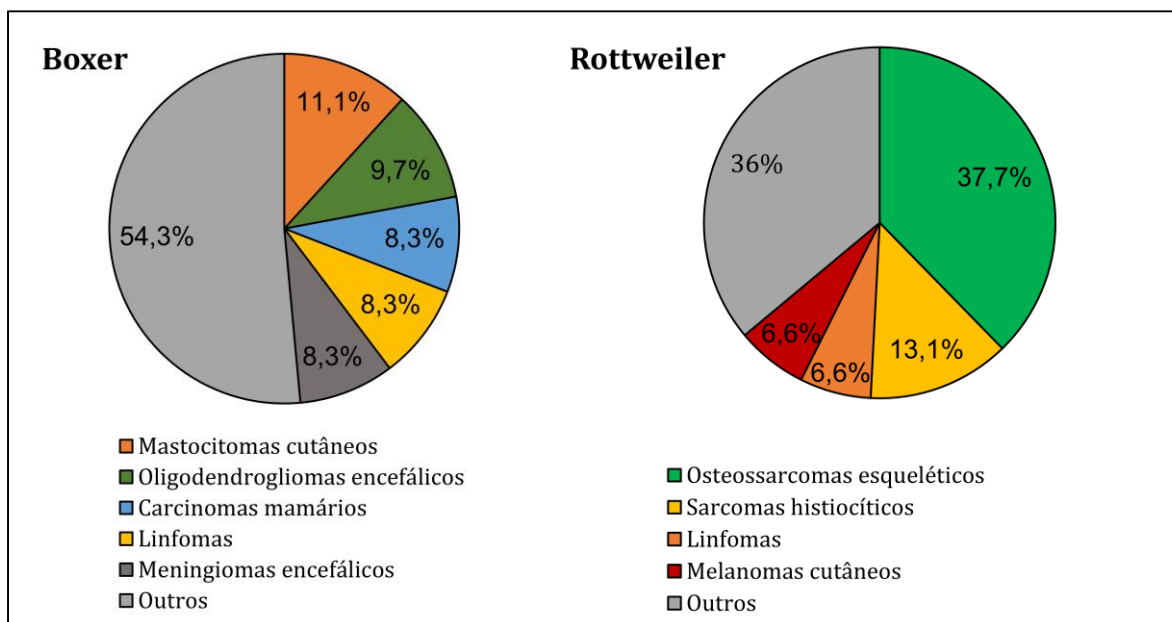
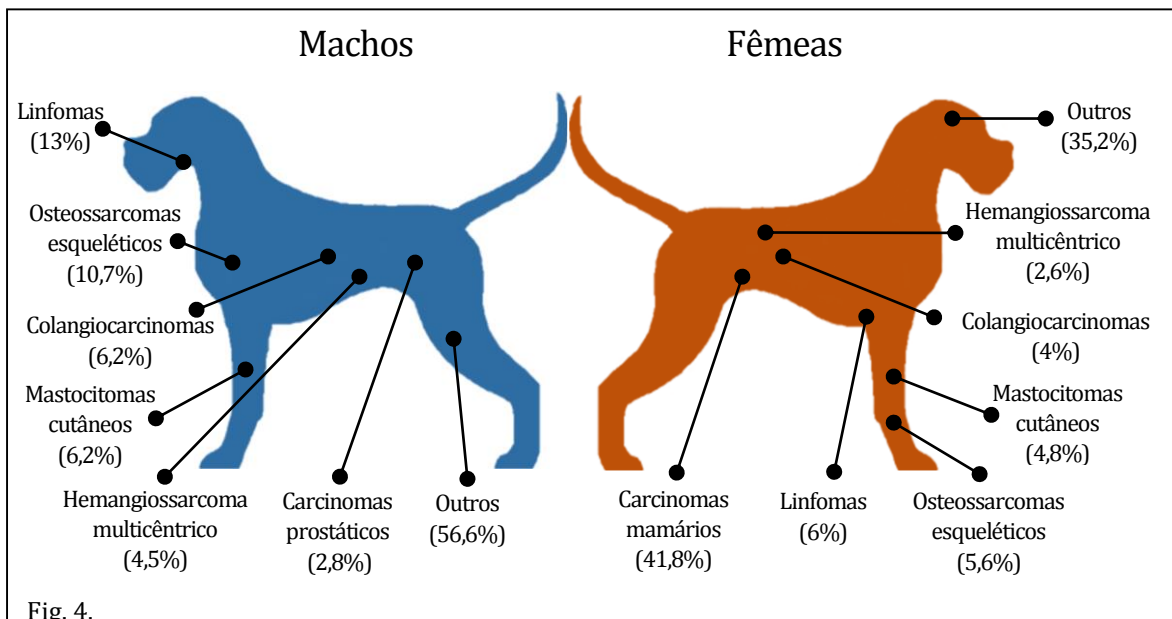


Fig. 3.



**LISTA DE LEGENDAS**

Fig.1. Percentagem de cães necropsiados por década cuja morte ou razão para eutanásia foi relacionada a câncer no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).

Fig. 2. Prevalência do câncer por sistemas/órgãos como causa de morte ou razão para eutanásia de cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).

Fig. 3. Cânceres mais comuns como causa de morte ou razão para eutanásia de cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).

Fig. 4. Influência do gênero na prevalência dos cânceres mais comuns como causa de morte ou razão para eutanásia de cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (1964-2013).

Fig. 5. Cânceres mais comuns como causa de morte ou razão para eutanásia de cães das raças Boxer e Rottweiler necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria por década (1964-2013).

## 4.3 ARTIGO 3

Artigo publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

### Aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012)<sup>1</sup>

Mariana M. Flores<sup>2</sup>, Welden Panziera<sup>3</sup>, Glaucia D. Kommers<sup>4</sup>, Luiz Francisco Irigoyen<sup>4</sup>, Claudio S.L. Barros<sup>4</sup> e Rafael A. Fighera<sup>4\*</sup>

**ABSTRACT.-** Flores M.M., Panziera W., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Barros C.S.L. & Fighera R.A. 2012. [Epidemiological and pathological aspects of hemangiosarcoma in dogs: 40 cases (1965-2012).] Aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00)00-00. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [anemiaveterinaria@yahoo.com.br](mailto:anemiaveterinaria@yahoo.com.br)

Epidemiological and pathological aspects of hemangiosarcoma in dogs from the Central Region of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Out of the studied cases (n=40), aged dogs (72.2% of the cases) and dogs of German shepherd breed (20% of the cases) were clearly more frequently affected since in the total population of necropsied dogs in the same period (n=7,063) this age group and breed were comparatively less represented (respectively 14.6% e 10.1% of the cases). At necropsy (n=40) most tumors (92.5%) occurred as nodules and less frequently as masses (37.5%), affecting mainly the spleen (62.5%), lung (60%), liver (52.5%), peritoneum (42.5%), kidney (37.5%), brain (30%), pleura (25%), and heart (22.5%). Hemoperitoneum (42.5% of the cases) and resultant anemia (22.5% of the cases) were also observed. On histological examination (n=25), most hemangiosarcomas (84%), were, in general, well differentiated, of low grade (64%) and possessed a scant stroma (84%), although frequently (68%) focal areas with cells displaying some degree of atypia were seen. Necrosis, hemorrhage, and thrombosis were observed in all cases, however extramedullary hematopoiesis (28%) and benign angiomatous proliferation (12%) were less common findings. In all cases submitted to immunohistochemistry staining (n=24) the tumor cells displayed a finely granular positive staining when using anti-factor von Willebrand. Regarding anatomical classification, 55% of the hemangiosarcomas were considered as multicentric, 30% as primary tumors with one or more metastasis and 15% were solitary tumors. This paper discusses these results and suggests, based on the combination of affected organs, a scheme for setting apart primary hemangiosarcoma with metastasis from multicentric hemangiosarcoma, aiming to uniformize communication between pathologists regarding this tumor.

INDEX TERMS: Diseases of dogs, oncology, pathology, multicentric tumors, hemangiosarcoma.

**RESUMO.-** Os aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos de casos de hemangiossarcoma em cães da Região Central do RS foram estudados. Dos casos avaliados (n=40), cães idosos e da raça Pastor Alemão foram nitidamente os mais afetados (72,2% e 20% dos casos, respectivamente), visto que na população total de cães necropsiados nesse mesmo período (n=7.063) essa faixa etária e raça tiveram comparativamente uma prevalência bem mais baixa (14,6% e 10,1% dos casos, respectivamente). Na necropsia (n=40), os tumores ocorreram quase sempre como nódulos (92,5%) e, menos frequentemente, como massas (37,5%), e afetaram principalmente: baço (62,5), pulmão (60%), fígado (52,5%), peritônio (42,5%), rim (37,5%), encéfalo (30%), pleura (25%) e coração

<sup>1</sup> Recebido em 3 de setembro de 2012.

Aceito para publicação em 9 de outubro de 2012.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

<sup>3</sup> Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS. Bolsista PIBIC/CNPq/UFSM.

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900. \*Autor para correspondência: [anemiaveterinaria@yahoo.com.br](mailto:anemiaveterinaria@yahoo.com.br)

(22,5%). Hemoperitônio (42,5%) e, conseqüentemente, anemia (22,5%) foram vistos com certa frequência. Na histologia (n=25), os hemangiossarcomas eram principalmente bem diferenciados (84%), de baixo grau (64%) e com estroma escasso (84%), mas frequentemente (68%) havia áreas com células demonstrando algum grau de atipia. Necrose, hemorragia e trombose foram vistos em todos os casos, mas hematopoiese extramedular (28%) e proliferação angiomasiosa benigna (12%) foram achados menos comuns. Na imuno-histoquímica (n=24), utilizando anticorpo anti-fator de von Willebrand, todos os casos demonstraram marcação de intensidade variável com um padrão citoplasmático finamente granular. Em relação à classificação anatômica, 55% dos hemangiossarcomas foram considerados como multicêntricos, 30% como primários com metástase(s) e 15% como solitários. Esse artigo discute esses resultados e propõe, com base em combinações de órgãos afetados, um esquema de separação entre hemangiossarcomas primário com metástase(s) e multicêntrico, a fim de tentar homogeneizar a maneira com que patologistas veterinários referem-se a esse neoplasma.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Doenças de cães, oncologia, patologia, tumores multicêntricos, hemangiossarcoma.

### INTRODUÇÃO

Hemangiossarcomas são neoplasmas malignos que se originam do endotélio vascular sanguíneos (Goldschmidt & Hendrick 2002); tais tumores são diagnosticados frequentemente em cães (Brown et al. 1985, Schultheiss 2004, Pirie et al. 2006), mas apenas ocasionalmente nas outras espécies domésticas (Monluxa et al. 1956, Southwood et al. 2000, Godoy et al. 2009). Na rotina do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM), hemangiossarcoma representa: 1) cerca de 5% dos neoplasmas malignos encontrados em necropsias de cães, o que o torna o sexto tumor mais frequentemente associado à morte (incluindo eutanásia) nessa espécie (Figuera 2008); e 2) cerca de 3% dos tumores diagnosticado através de biópsia de pele, o que o torna o quarto câncer de pele mais comum de cães (Souza et al. 2006).

Embora muito se saiba acerca de hemangiossarcoma, a prevalência dos órgãos afetados por esse tumor é tema bastante controverso na literatura internacional, principalmente porque os vários estudos que abordam tal assunto utilizam sistemáticas diferentes em relação à classificação anatômica, mas também devido à falta de dados de necropsia dos casos incluídos (Culbertson 1982), pois quase a totalidade dos artigos discorre sobre a prevalência do hemangiossarcoma em um determinado órgão e não o contrário. Para vários autores (Kleine et al. 1970, Hirsch et al. 1981, Brown et al. 1985), hemangiossarcoma é considerado como sendo um neoplasma primário, frequentemente metastático, enquanto para outros (Goldschmidt & Hendrick 2002) ocorre principalmente de forma multicêntrica. Essa divergência na classificação quanto ao sítio anatômico dos hemangiossarcomas, que possivelmente se deve a inexistência de subsídios na literatura, faz com que alguns trabalhos abordem o neoplasma como primário de um determinado órgão com possibilidade de metástase(s) em outro(s), enquanto outros consideram casos semelhantes ou idênticos como multicêntricos. Dessa forma, não é incomum entre patologistas surgirem as seguintes dúvidas: 1) “Quantos órgãos necessitam ser afetados para um hemangiossarcoma ser considerado multicêntrico?”; 2) “Quais órgãos precisam estar acometidos para um hemangiossarcoma ser considerado multicêntrico?”; e 3) “Quais os órgãos mais afetados em casos de hemangiossarcoma?”.

Com base nessa problemática, os objetivos principais deste trabalho são: 1) determinar a prevalência dos órgãos afetados por hemangiossarcoma, a fim de definir quais os mais acometidos e quais aqueles que apenas ocasionalmente estão envolvidos, e 2) subdividir os casos de hemangiossarcoma com base nos sítios anatômicos, a fim de propor uma forma de separação entre essas apresentações (solitário *versus* primário com metástase *versus* multicêntrico). Esse estudo visa também comparar os aspectos epidemiológicos e os achados macroscópicos, histológicos e imuno-histoquímicos dos casos de hemangiossarcoma diagnosticados no LPV-UFSM com o que é descrito na literatura.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos de necropsias de cães realizadas entre 1965 e 2012 no LPV-UFSM foram revisados em busca de casos de hemangiossarcoma. O método de inclusão dos casos neste estudo foi o diagnóstico definitivo do tumor através de critérios histológicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores mesenquimais de tecidos moles (Weiss 1974) e pela *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP) para tumores mesenquimais da pele e dos tecidos moles (Hendrick et al. 1998) e aplicados durante esse período a partir de consultas a diferentes edições do principal



livro-texto de patologia de tumores em animais domésticos (Meuten 2002). Esses diagnósticos foram realizados por oito patologistas veterinários pertencentes ao LPV-UFSM em diferentes períodos de tempo, quatro dos quais são autores desse trabalho (G.D.K., L.F.I., C.S.L.B. e R.A.F.).

Os protocolos de necropsia referentes a esses casos foram separados e examinados. Desses protocolos de necropsia foram retiradas informações referentes ao sexo, à idade, às raças e aos achados macroscópicos. Os cães foram classificados apenas como macho e fêmea, independentemente de serem castrados ou não. Foram ainda divididos em três categorias de idade, conforme publicado anteriormente (Figuera et al. 2008): filhotes (até 1 ano de idade), adultos (de 1 a 9 anos de idade) e idosos (10 anos de idade ou mais). Quanto às raças, os cães foram classificados em sem raça definida (SRD) ou de raça pura (RP). Cães mestiços, do cruzamento de duas RP, foram considerados como SRD. Todos os casos incluídos ocorreram no Município de Santa Maria, localizado na Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense, popularmente conhecida como Região Central do RS. Para fins de comparação, foram calculados os mesmos dados epidemiológicos (idade, sexo e raça) de toda a população de cães necropsiada no LPV-UFSM nesse mesmo período.

Foram considerados para este estudo apenas casos em que o hemangiossarcoma foi a causa da morte ou a razão para eutanásia do cão (n=40). A apresentação macroscópica dos hemangiossarcomas foi classificada em: 1) pápula (aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito com menos de 1 cm de diâmetro), 2) nódulo (aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito com 1 a 10 cm de diâmetro), 3) massa (aumento de volume sólido, irregular, não circunscrito e de qualquer tamanho ou aumento de volume sólido, redondo e bem circunscrito [nódulo], porém, com mais de 10 cm de diâmetro), 4) mácula/mancha (áreas focais, não elevadas, bem ou mal circunscritas, respectivamente, e com menos ou mais de 1 cm de diâmetro, respectivamente) e 5) organomegalia difusa (aumento de volume difuso de um órgão sem ocorrência de tumorações).

Foram reavaliados histologicamente todos os casos em que os blocos de parafina foram encontrados no Arquivo do LPV-UFSM (n=25). Os achados histológicos reavaliados incluíram: 1) grau de diferenciação (bem diferenciados ou pouco diferenciados), 2) índice mitótico (baixo grau [ $\leq 2$  mitoses/cga] ou alto grau [ $\geq 3$  mitoses/cga]), 3) padrão estromal (escasso ou abundante) e 4) ocorrência de pleomorfismo celular, 5) atipia e 6) necrose, hemorragia e trombose. Para essa reavaliação foram utilizados diferentes tecidos afetados e que constavam no arquivo. Com exceção de um caso (n=24), pelo menos um tecido de cada um desses casos reavaliados histologicamente foi escolhido e submetido à imuno-histoquímica. A reavaliação histológica e a interpretação imuno-histoquímica foram realizadas por dois (M.M.F. e R.A.F.) e três (M.M.F., G.D.K. e R.A.F.) patologistas veterinários, respectivamente.

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) empregada foi a imunomarcagem para o fator de von Willebrand, conforme protocolo descrito a seguir. Após a desparafinização e reidratação dos tecidos, foi realizada a recuperação antigênica com solução de TRIS-EDTA (pH 9,0) em forno micro-ondas, em potência máxima, por dez minutos. Como anticorpo primário, foi utilizado anticorpo policlonal anti-fator de von Willebrand humano produzido em coelho<sup>5</sup>, diluído 1:400 em PBST, e incubado por 60 minutos a 37°C. O anticorpo secundário biotilado e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase<sup>6</sup> foram utilizados consecutivamente, incubados a 25°C por 30 minutos e marcados através da adição do cromógeno de tetracloro de 3-3' diaminobenzidina (DAB)<sup>7</sup>. A contra-coloração foi com hematoxilina de Mayer. Como controle positivo foram utilizados os vasos sanguíneos normais de áreas não afetadas pelo tumor nas mesmas seções histológicas (controle interno). Como controle negativo, as mesmas seções foram utilizadas, com substituição do anticorpo primário por PBST. A imunomarcagem para o fator de von Willebrand foi classificada como leve, moderada ou acentuada, conforme estudos prévios realizados (von Beust et al. 1988, Sabbatini & Bettini 2009).

## RESULTADOS

### Achados epidemiológicos

Entre 1965 e 2012 foram realizadas 7.063 necropsias de cães no LPV-UFSM. Dessas, 53,5% correspondiam a machos e 46,5% a fêmeas. Do total de cães, 35,8% foram incluídos como filhotes, 49,6% como adultos e 14,6% como idosos. Dos cães em que dados sobre raça foram encontrados nos protocolos, 62,6% tinham raça definida e 37,4% eram SRD. Para fins de comparação, as raças a seguir

<sup>5</sup> Dako Cytomation A0082®, Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

<sup>6</sup> Dako Cytomation K0690®, Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

<sup>7</sup> Dako Cytomation K3468®, Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

correspondiam as seguintes prevalências: Pastor Alemão (10,1%), Poodle (4,9%), Boxer (3,8%), Dachshund (3,1%), Rottweiler (2,9%), Cocker Spaniel (2,4%), Pointer (2,4%), Fila Brasileiro (1,5%), Dogue Alemão (0,8%), Husky Siberiano (0,7%), Chow-Chow (0,5%), Akita (0,4%) e Pit Bull (0,4%).

Dos 7.063 protocolos de necropsia, 771 (10,9%) correspondiam a tumores. Dessas, em 40 (5,2% do total de cães que morreram por tumores e 0,6 do total de cães que morreram por qualquer causa) havia evidências morfológicas de hemangiossarcoma. Dos 40 cães com hemangiossarcoma, a idade não estava anotada nos protocolos de quatro cães. Dos 36 cães em que a idade constava dos protocolos, 26 (72,2%) foram incluídos como idosos e 10 (27,8%) como adultos. Dos 40 cães com hemangiossarcoma, 24 (60%) eram machos e 16 (40%) eram fêmeas. Dos 40 cães com hemangiossarcoma, 11 (27,5%) eram SRD e 29 (72,5%) eram de raça pura, principalmente Pastor Alemão (8/40 [20%]), Boxer (4/40 [10%]), Rottweiler (4/40 [10%]), Dachshund (2/40 [5%]), Cocker Spaniel (2/40 [5%]) e Fila Brasileiro (2/40 [5%]), mas também várias outras raças (Akita, Chow-Chow, Dogue Alemão, Husky Siberiano, Pointer, Poodle e Pit Bull) (1/40 [2,5%]). Dos 40 cães afetados, 19 (47,5%) morreram espontaneamente e 21 (52,5%) foram submetidos à eutanásia.

### Achados de necropsia

Na necropsia (n=40), independentemente da forma de apresentação, os órgãos afetados incluíram, em ordem decrescente de frequência: baço (25/40 [62,5%]) (Fig.1), pulmão (24/40 [60%]) (Fig.2), fígado (21/40 [52,5%]) (Fig.3), peritônio (17/40 [42,5%]), rim (15/40 [37,5%]), encéfalo (12/40 [30%]), pleura (10/40 [25%]), coração (9/40 [22,5%]), intestino (8/40 [20%]), linfonodo (8/40 [20%]), adrenal (8/49 [20%]), músculo esquelético (6/40 [15%]), pele (6/40 [15%]), cavidade oral (5/40 [12,5%]), pâncreas (5/40 [12,5%]), osso (5/40 [12,5%]), tecido subcutâneo (5/40 [12,5%]), estômago (2/40 [5%]), ureter (2/40 [5%]), aorta (1/40 [2,5%]), bexiga (1/40 [2,5%]), esôfago (1/40 [2,5%]), faringe (1/40 [2,5%]), ovário (1/40 [2,5%]), próstata (1/40 [2,5%]), testículo (1/40 [2,5%]), traqueia (1/40 [2,5%]) e útero (1/40 [2,5%]). O número de órgãos afetados em cada cão variou entre 1-15.

Em alguns casos (6/40 [15%]), os cães afetados apresentavam apenas um órgão afetado; esses casos foram por nós denominados de hemangiossarcoma solitário. Na maior parte dos casos (22/40 [55%]), os cães afetados tinham vários órgãos acometidos e não era possível inferir sobre a origem primária do tumor; esses casos foram por nós denominados de hemangiossarcoma multicêntrico. No restante dos casos (12/40 [30%]), os cães tinham entre dois e quatro órgãos afetados e era possível deduzir qual dos órgãos era mais provavelmente o sítio primário e quais eram metástases; esses casos foram por nós denominados de hemangiossarcoma metastático.

Nos casos em que o tumor foi considerado solitário (6/40 [15%]), os órgãos afetados incluíram: baço (3/6 [50%]), fígado (1/6 [16,7%]), cavidade oral (1/6 [16,7%]) e osso (1/6 [16,7%]). Nos casos em que o tumor foi considerado metastático (12/40 [30%]), os órgãos afetados foram (sítio primário e metástase): baço e fígado (2/12 [16,7%]), pele e pulmão (1/12 [8,3%]), tecido subcutâneo e pulmão (1/12 [8,3%]), baço e cavidade oral (1/12 [8,3%]), fígado e peritônio (1/12 [8,3%]), fígado e linfonodo (1/12 [8,3%]), coração e pulmão (1/12 [8,3%]), baço, pulmão e peritônio (1/12 [8,3%]), fígado, linfonodo e peritônio (1/12 [8,3%]), fígado, pulmão e peritônio (1/12 [8,3%]) e pele, pulmão e pleura (1/12 [8,3%]). Nos casos em que o tumor foi considerado multicêntrico (22/40 [55%]), a frequência com que cada órgão foi afetado foi a seguinte: baço (18/22 [81,8%]), pulmão (18/22 [81,8%]), rim (15/22 [68,2%]), fígado (14/22 [63,6%]), peritônio (13/22 [59,1%]), encéfalo (12/22 [54,5%]), pleura (9/22 [40,9%]), adrenal (8/22 [36,4%]), coração (8/22 [36,4%]), intestino (8/22 [36,4%]), linfonodo (6/22 [27,3%]), músculo esquelético (6/22 [27,3%]), pâncreas (5/22 [22,7%]), pele (4/22 [18,2%]), tecido subcutâneo (4/40 [18,2%]), osso (4/22 [18,2%]), cavidade oral (3/22 [13,6%]), estômago (2/22 [9,1%]), ureter (2/22 [9,1%]), aorta (1/22 [4,5%]), bexiga (1/22 [4,5%]), esôfago (1/22 [4,5%]), faringe (1/22 [4,5%]), ovário (1/22 [4,5%]), próstata (1/22 [4,5%]), testículo (1/22 [4,5%]), traqueia (1/22 [4,5%]) e útero (1/22 [4,5%]).

Os hemangiossarcomas ocorreram como tumores em todos os casos (40/40 [100%]), principalmente na forma de nódulos (37/40 [92,5%]), menos frequentemente como massas (15/40 [37,5%]) e raramente como pápulas (1/40 [2,5%]). Alguns desses neoplasmas foram também vistos como máculas/manchas (8/40 [20%]) e outros na forma de organomegalia difusa (5/40 [12,5%]). Com frequência os cães afetados demonstravam, concomitantemente, dois ou mais desses padrões macroscópicos de apresentação, como por exemplo, nódulos e massas, que ocorreram ao mesmo tempo e em diferentes órgãos de muitos cães (15/40 [37,5%]).

Nódulos (Fig.4) ocorreram em todos os tecidos acometidos pelos hemangiossarcomas e o número de órgãos afetados sincronicamente variou de 1 a 12. O número de nódulos por órgão foi classificado como contável (até quatro) ou incontável (múltiplos). Em 21 casos (52,5%), havia um ou

mais órgãos com número contável de nódulos. Em 31 casos (77,5%), o número de nódulos em um ou mais órgãos era incontável. Os nódulos apresentavam dimensões variadas, entre 0,1 a 10 cm e foram classificados como multifocais ou coalescentes. Foram descritas as seguintes colorações para os nódulos: vermelho-escuro (20/40 [50%]), vermelho (9/40 [22,5%]), vermelho com focos brancos (5/40 [12,5%]), branco (4/40 [10%]), enegrecido (4/40 [10%]) e azulado (2/40 [5%]). Sempre que descrita, a superfície natural dos nódulos foi citada como lisa e brilhante. Ao corte, os nódulos eram macios (10/40 [25%]), císticos (6/40 [15%]), friáveis (3/40 [7,5%]) ou firmes (2/40 [5%]). Em alguns poucos casos (3/40 [7,5%]), os nódulos foram descritos como umbilicados. Oito (20%) nódulos tinham coágulos em seu interior ou aderidos externamente a eles.

Dos casos em que ocorreram massas (Fig.5), um ou mais órgãos foram afetados, e incluíam: baço (4/40 [10%]), coração (4/40 [10%]), fígado (2/40 [5%]), peritônio (2/40 [5%]), cavidade oral (1/40 [2,5%]) e tecido subcutâneo (1/40 [2,5%]). Estas massas variaram de 1 a 32 cm em seu maior eixo. As massas eram citadas como solitárias e extensas. Foram descritas as seguintes colorações para as massas: vermelho-escuro (6/40 [15%]), vermelho (5/40 [12,5%]), moteado de vermelho, branco e amarelo (2/40 [5%]), marrom-claro (2/40 [5%]) e azulado (1/40 [2,5%]). Sempre que descrita, a superfície natural dos nódulos foi citada como lisa e brilhante. Ao corte, as massas eram friáveis (5/40 [12,5%]), macias (5/40 [12,5%]), císticas (4/40 [10%]) ou firmes (1/40 [2,5%]). Em pelo menos um caso (2,5%) a massa foi descrita como umbilicada. Duas (5%) massas tinham coágulos em seu interior e rupturas facilmente perceptíveis.

Máculas e/ou manchas (Fig.6) foram descritas para os seguintes órgãos: encéfalo (3/40 [7,5%]), fígado (2/40 [5%]), músculo esquelético (2/40 [5%]) e pulmão (1/40 [2,5%]). Estas áreas variaram de 0,5 a 5 cm em seu maior eixo, eram multifocais e descritas como vermelhas ou vermelho-escuras. Organomegalia difusa afetou apenas os linfonodos. Em todos esses casos, os demais órgãos afetados apresentavam nódulos e/ou massas. Os linfonodos afetados eram grandes (linfadenomegalia) e túrgidos. Ao corte eram macios e deixavam fluir líquido vermelho-claro ou róseo e turvo (sangue misturado com linfa). A superfície de corte era difusamente ou multifocalmente vermelha.

Achados de necropsia diretamente relacionados ao tumor incluíram principalmente hemoperitônio (17/40 [42,5%]) (Fig.7), anemia (9/40 [22,5%]) e, menos frequentemente, hemotórax (5/40 [12,5%]), icterícia (2/40 [5%]), insuficiência cardíaca congestiva (2/40 [5%]) e desvios porto-sistêmicos (1/40 [2,5%]). A quantidade de sangue acumulado nas cavidades abdominal e torácica variou de 10 a 4.500 ml e de 50 a 560 ml, respectivamente. Dos casos em que havia achados que permitiram o diagnóstico de anemia durante a necropsia (mucosas [Fig.8] e vísceras pálidas e sangue aquoso), a perda continuada de sangue foi o único mecanismo que pode ser comprovado. Nesses casos, a perda ocorreu por hemoperitônio (5/40 [12,5%]) como consequência de ruptura dos tumores em órgãos parenquimatosos abdominais (baço e/ou fígado), por hemotórax (1/40 [2,5%]) como consequência de ruptura dos tumores em órgãos parenquimatosos torácicos (pulmões) ou por ambos (1/40 [2,5%]). Perda para o terceiro espaço (fáscias musculares) e hemorragia a partir de tumores cutâneos múltiplos foi uma causa incomum de anemia (1/40 [2,5%]). Hemoperitônio estava presente em um (2,5%) dos dois cães com icterícia e a metabolização da hemoglobina pelo sistema monocítico-macrofágico foi a explicação sugerida para esse caso. O outro cão com icterícia (2,5%) também tinha acometimento do fígado pelo hemangiossarcoma. Insuficiência cardíaca congestiva foi secundária à presença de massas tumorais, frequentemente trombosadas, que se originavam do átrio direito. Lesões associadas à síndrome incluíram fígado de noz-moscada (1/40 [2,5%]), ascite (1/40 [2,5%]) e hidrotórax (1/40 [2,5%]).

### **Achados histopatológicos**

Na histologia (n=25), todos os hemangiossarcomas caracterizaram-se por uma proliferação celular variavelmente diferenciada, porém com características morfológicas suficientes para um possível reconhecimento de sua origem apenas através desse método, ou seja, um arranjo na forma de vasos sanguíneos de diferentes calibres, que variavam desde capilares (Fig.9) até grandes espaços cavernosos (Fig.10). Com base nessa diferenciação, os hemangiossarcomas foram divididos em: bem diferenciados (21/25 [84%]) e pouco diferenciados (4/25 [16%]). Em vários casos (10/25 [40%]), as células neoplásicas demonstravam marcado pleomorfismo. Em alguns poucos casos (3/25 [12%]), havia áreas bem diferenciadas intercaladas com áreas pouco diferenciadas. Presença de células que quando observadas isoladamente não permitiam inferir sobre sua origem (atipia celular) (Fig.11) também foi um achado comum (17/25 [68%]), incluindo alguns poucos casos em que tais células tinham aspecto epitelióide (3/25 [12%]). Mesmo nesses 17 casos era possível determinar com facilidade a origem vascular do neoplasma. O índice mitótico foi classificado em alto grau (9/25

[36%]) ou baixo grau (16/25 [64%]). Presença de colágeno intercalado entre feixes de células neoplásicas foi um achado constante e quantificado como: escasso (21/25 [84%]) ou abundante (4/25 [16%]). Áreas de trombose (Fig.12), hemorragia e necrose foram observadas em todos os casos. Adicionalmente, foram vistos focos de hematopoiese extramedular (7/25 [28%]) (Fig.13), aglomerados de neutrófilos intravasculares (4/25 [16%]) e acúmulo de células endoteliais neoplásicas no interior de vasos linfáticos (1/25 [4%]). Em alguns poucos casos (3/25 [12%]), foram observadas áreas de proliferação angiomasiosa benigna (Fig.14) ao redor ou entre áreas de formação neoplásica na pele, coração e baço, respectivamente.

### **Achados imuno-histoquímicos**

Na imuno-histoquímica, dos 24 casos testados, todos foram positivos. Quanto à intensidade, a maior parte dos casos foi considerada como leve (12/24 [50%]) ou moderada (10/24 [41,7%]). Marcação acentuada (2/24 [8,3%]) foi bem menos comum. Quanto ao padrão de imunomarcagem, as células positivas tinham citoplasma finamente granular (Fig.15). A quantidade de grânulos era variável e foi o critério utilizado para considerar as intensidades anteriormente descritas. O endotélio de vasos sanguíneos normais e os megacariócitos demonstraram marcação idêntica. Em alguns desses casos, houve reações inespecíficas, incluindo nas áreas de necrose e nos lúmens vasculares, principalmente sobre trombos de fibrina.

### **DISCUSSÃO**

A prevalência do hemangiossarcoma em diferentes órgãos pode variar muito de um estudo para outro (Kleine et al. 1970, Hirsch et al. 1981, Brown et al. 1985), devido principalmente a divergências na definição dos sítios anatómicos (solitário, metastático ou multicêntrico). Em um estudo retrospectivo antigo, por exemplo, alguns autores (Kleine et al. 1970) concluíram que seus casos de hemangiossarcoma cardíaco de cães eram mais frequentemente primários do que metastáticos, devido à sua localização e apresentação macroscópica. Consequentemente, como o coração foi considerado como o sítio primário nesse estudo, ele foi o órgão mais afetado. Com base no estudo anterior, anos mais tarde, outros autores (Hirsch et al. 1981) também classificaram grande parte dos tumores cardíacos incluídos em seu estudo como primários, obtendo resultados muito semelhantes. Diferentemente, alguns autores (Brown et al. 1985) definiram o acometimento cardíaco como metastático, o que resultou em uma menor prevalência de hemangiossarcomas como tumores cardíacos primários.

A fim de evitar os problemas previamente discutidos, a distribuição dos hemangiossarcomas por órgão feita neste estudo não levou em conta a origem do neoplasma e nem a quantidade de órgãos afetados em cada caso. Dessa forma, reunimos todos os casos (n=40), independentemente de serem solitários, metastáticos ou multicêntricos e analisamos a prevalência de cada órgão afetado sem subdividi-los de acordo com um possível sítio primário. Com isso, acreditamos estar apresentando resultados mais fidedignos do que nesses outros estudos. Os resultados por nós encontrados demonstram que os órgãos mais acometidos por hemangiossarcoma incluem, em ordem decrescente de frequência: baço, pulmão, fígado, peritônio, rim, encéfalo, pleura e coração. Esta prevalência é muito semelhante à observada no estudo de Hirsch et al. (1981), exceto, obviamente, pelo menor número de tumores cardíacos. Na literatura internacional, o baço é frequentemente descrito como o órgão mais afetado pelo hemangiossarcoma (Hirsch et al. 1981, Brown et al. 1985, Schultheiss 2004, Sabattini & Bettini 2009), exceto, é claro, no estudo de Kleine et al. (1970), como já discutido previamente. Semelhante ao que observamos, apenas esporadicamente outros órgãos são descritos na literatura como estando envolvidos em casos de hemangiossarcoma (Brown et al. 1985, Hayden et al. 1992, Sabattini & Bettini 2009).

O frequente envolvimento concomitante de órgãos como coração e baço em cães afetados por hemangiossarcoma tem levado muitos autores a discutirem uma possível origem multicêntrica para esse neoplasma (Goldschmidt & Hendrick 2002). Tumores multicêntricos são frequentes em cães e o hemangiossarcoma é, em nossa rotina, o segundo mais diagnosticado nessa espécie, atrás apenas do linfoma (Figuera 2008). Devido ao fato de não haver critérios na literatura consultada para a utilização do termo multicêntrico, definimos, para uso nesse estudo, que tumores multicêntricos são aqueles que acometem vários órgãos de um mesmo indivíduo, ao ponto de tornar impossível estabelecer um sítio primário. Na maior parte dos casos, tumores multicêntricos originam-se em um único órgão e posteriormente metastatizam para vários outros, tornando impossível saber qual deles foi inicialmente afetado, ou seja, são proliferações celulares que possuem um sítio primário, porém não detectado. Menos frequentemente, tumores multicêntricos podem originar-se ao mesmo tempo em vários órgãos diferentes. Com base nessa definição, podemos depreender que quando vários

órgãos são afetados por um neoplasma e não é possível saber qual deles foi primeiramente acometido, a multicentricidade pode ser aventada, independentemente se isso ocorreu sequencialmente ou sincronicamente. Além dessas aplicações, em medicina humana, cada vez mais se utiliza o adjetivo multicêntrico para expressar múltiplos tumores em um único órgão, principalmente para tumores mamários, tireoidianos e intestinais, mas também em outros órgãos.

O exposto no parágrafo anterior é diferente da situação em que mais de um órgão é acometido, mas um deles é mais frequentemente descrito na literatura como sítio metastático preferencial, como por exemplo, em casos de tumores hepatoesplênicos ou cardiopulmonares, nos quais o baço e o coração são sempre considerados como os locais primários e o fígado e o pulmão como os sítios metastáticos, respectivamente. Esse fato é particularmente verdadeiro para tumores mesenquimais, como o hemangiossarcoma, que metastatizam principalmente por via sanguínea e, portanto, o padrão de metastatização “tende a respeitar” a circulação sanguínea (Cullen et al. 2002). Com base nessas definições e nos achados por nós encontrados nestes 40 casos de hemangiossarcoma, consideramos como solitários aqueles casos em que apenas um órgão foi afetado e como primários com metástases aqueles casos em que: 1) havia apenas dois órgãos afetados, 2) caso pelo menos um desses órgãos fosse cavitário, houvesse metastatização transcelômica, 3) caso o terceiro órgão fosse algum ou vários linfonodos drenantes e 4) havendo mais de dois órgãos (desconsiderando os linfonodos e mesotélis [Critérios 2 e 3]), fosse plausível inferir sobre um possível padrão de metastatização, por exemplo, hemangiossarcoma esplênico com metástases no fígado e pulmão. Quando mais de dois órgãos estiveram afetados e nenhum dos critérios anteriormente descritos foi preenchido, os casos foram considerados como multicêntricos.

Os aspectos epidemiológicos e os achados macroscópicos e histológicos observados nos 40 casos de hemangiossarcoma revisados são semelhantes aos descritos na literatura (Goldschmidt & Hendrick 2002). Para a maior parte dos autores (Culbertson 1982, Hargis et al. 1992, Schultheiss 2004), hemangiossarcomas ocorrem mais comumente em cães idosos, menos frequentemente em cães adultos e apenas raramente em filhotes. Em alguns estudos, há maior número de machos afetados (Culbertson 1982, Ward et al. 1994), embora a maior parte dos autores não tenham relatado predisposição sexual (Kleine et al. 1970, Hirsch et al. 1981, Hargis et al. 1992). A influência hereditária é bastante discutida por alguns autores, pois se acredita haver forte predisposição de cães das raças Pastor Alemão (Kleine et al. 1970, Hirsch et al. 1981, Brown et al. 1985), Labrador Retriever (Schultheiss 2004) e Golden Retriever (Tamburini et al. 2009). Neste estudo, a prevalência do tumor em cães da raça Pastor Alemão foi de 20%, semelhante à frequência encontrada por Kleine et al. (1970). Apesar de termos observado maior número de hemangiossarcomas em cães idosos e dessa raça, devemos ter cautela ao interpretar tais resultados, visto o desconhecimento dos dados referentes à faixa etária, ao sexo e às raças de uma população poder alterar a interpretação. Para evitar isso, comparamos os dados referentes à epidemiologia desses 40 casos de hemangiossarcoma com aqueles oriundos da população de cães necropsiada no LPV-UFSM durante o mesmo período, pois assumimos que ela possivelmente corresponde a uma amostra fidedigna da população local de nossa região. Assim, se compararmos a prevalência de cães idosos e da raça Pastor Alemão na população geral (14,6% e 10,1% dos casos, respectivamente) com aquela observada nos cães com hemangiossarcoma (72,2% e 20% dos casos, respectivamente), podemos afirmar com mais segurança que tais aspectos epidemiológicos correspondem a fatores de risco no desenvolvimento desse tumor.

Histologicamente, a maioria dos hemangiossarcomas analisados foi classificada em bem diferenciado (84%) e de baixo grau (64%), apesar do comportamento marcadamente agressivo de grande parte deles. Semelhantemente ao que é descrito na literatura (Schultheiss 2004), não houve correlação entre o grau de diferenciação e a agressividade do tumor, considerando apenas como mais ou menos agressivos aqueles casos em que havia mais ou menos órgãos afetados, respectivamente. Provavelmente por este motivo, o número de mitoses comumente não é parâmetro avaliado em vários estudos sobre hemangiossarcoma (Culbertson 1982, Hargis et al. 1992, Pirie et al. 2006, Sabattini & Bettini 2009). Segundo Sabattini & Bettini (2009), o nível de proliferação celular do tumor seria muito melhor avaliado pela imunomarcagem para Ki-67, e não pela contagem de mitoses. Neste estudo, a classificação dos tumores quanto ao grau de diferenciação, índice mitótico e pleomorfismo celular teve utilidade apenas na interpretação dos casos de imuno-histoquímica, e será discutida mais adiante. A presença de necrose, hemorragia e trombose foi um achado consistente em todos os casos e, portanto, não possui relação com os outros parâmetros avaliados.

A presença de hematopoiese extramedular em meio ao tumor foi observada em 28% dos casos aqui descritos. Este achado tem sido ocasionalmente observado por outros autores (Bertazzolo et al. 2005), com uma frequência de até 42%. Segundo Johns & Christopher (2012), a hematopoiese

extramedular no interior de neoplasmas é pouco relatada por ser um achado incidental e sem importância clínica. Acredita-se que a origem em comum das células endoteliais e sanguíneas a partir de uma mesma célula-tronco, somada ao envolvimento de grande número de citocinas na proliferação do endotélio neoplásico, possa estar envolvida no estímulo à hematopoiese extramedular intratumoral (Bertazzolo et al. 2005).

Em três casos, que afetaram baço, coração e pele, respectivamente, havia áreas de proliferação vascular benigna intercaladas com áreas neoplásicas pouco diferenciadas no mesmo tumor. Esta característica histológica assemelha-se muito ao que é descrito para os hemangiossarcomas cutâneos caninos induzidos pelo sol, que são frequentemente circundados por proliferações vasculares não neoplásicas (telangiectasia) ou neoplásicas benignas (hemangiomas) (Gross et al. 2009). A presença dessas formações angiomasas benignas em meio a um neoplasma maligno pode dificultar o diagnóstico do neoplasma quando frente a uma biópsia incisiva, visto que uma pequena amostragem do tumor pode não ser representativa.

Em três estudos prévios (von Beust et al. 1988, Ferrer et al. 1995, Warren & Summers 2007), a imunomarcagem positiva dos hemangiossarcomas caninos para o fator de von Willebrand foi de 73%, 89% e 100%, respectivamente. O fator de von Willebrand é uma proteína presente no interior dos corpúsculos de Weibel-Palade, organelas citoplasmáticas de células endoteliais. Essa proteína também está presente no citoplasma de megacariócitos. Nestes 40 casos aqui descritos, todos foram positivos para o fator de von Willebrand, sempre em um padrão granular e com intensidade variável, entretanto, mesmo naqueles casos fracamente positivos, a imunomarcagem das células neoplásicas era facilmente visualizada, à semelhança do que já havia sido descrito em um estudo prévio que utilizou esse marcador em casos de tumores vasculares vesicais de bovinos (Gabriel 2008).

Os três casos de hemangiossarcoma com padrão epitelióide marcaram fortemente, semelhantemente ao que foi observado por outros autores (Warren & Summers 2007) e isso parece ser uma característica destes neoplasmas, pois, semelhantemente ao que foi observado neste estudo, não houve correlação entre o grau de diferenciação das células neoplásicas epitelióides e a imunomarcagem citoplasmática para o fator de von Willebrand (Weiss & Enzinger 1982). Esse achado é importante, pois confirma a possibilidade da utilização desse marcador em caso de dúvida quanto à origem celular frente a um neoplasma epitelióide com padrão não obviamente vascular.

A partir da imuno-histoquímica foi possível observar que não há correlação linear positiva entre intensidade de imunomarcagem e diferenciação celular, grau de mitoses ou pleomorfismo, visto ter sido muito mais comum a ocorrência de casos bem diferenciados (84%) e com marcação leve ou moderada (91,7%) ou de casos pouco diferenciados (16%) e com marcação forte (8,3%) do que o contrário. Esse resultado é totalmente diferente daquele encontrado por outros autores (Sabattini & Bettini 2009), que justificam seus achados no fato de que ao se tornarem menos diferenciadas, as células endoteliais neoplásicas passam a ter menos corpúsculos de Weibel-Palade, e, assim, perdem a imunomarcagem para o fator de von Willebrand (Cerelli & Wick, 2006). Em nossa opinião, aqueles casos em que as células eram menos diferenciadas não necessariamente demonstravam marcação mais forte, mas a presença de células marcadamente atípicas, muitas das quais tinham citoplasma abundante para serem interpretadas como endoteliais com base apenas na morfologia, tornavam mais fácil a visualização dos grânulos.

## CONCLUSÕES

A partir dos achados encontrados nestes 40 casos de hemangiossarcoma em cães podemos concluir que: 1) independentemente do sítio anatômico inicial, os órgãos mais afetados incluem: baço, pulmão, fígado, peritônio, rim, encéfalo, pleura e coração; 2) a apresentação macroscópica mais comum são os tumores, que ocorrem principalmente como nódulos ou massas, variavelmente vermelhos e macios; 3) além da presença dos tumores, outros achados de necropsia incluem principalmente hemoperitônio e, conseqüentemente, anemia; 4) dentre os critérios microscópicos mais comumente avaliados na rotina do diagnóstico anatomopatológico (grau de diferenciação, índice mitótico, padrão estromal, pleomorfismo celular, atipia, necrose, hemorragia e trombose) nenhum demonstrou qualquer relação com o grau de agressividade; 5) com certa frequência ocorrem áreas de proliferação vascular benigna (angiomatose) e de hematopoiese extramedular intraneoplásicas; 6) a imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-fator de von Willebrand é invariavelmente positiva e auxilia inclusive no diagnóstico definitivo daqueles casos menos diferenciados; e 7) cães idosos e da raça Pastor Alemão possuem risco aumentado para o desenvolvimento dessa forma de câncer.

Com base nas combinações de órgãos afetados e a fim de evitar divergências entre patologistas, recomendamos que os tumores sejam separados em: solitário, primário com

metástase(s) e multicêntrico. Nesse ponto, lembramos que solitário é aquele caso em que há apenas um órgão afetado, multicêntrico é aquele caso em que vários órgãos são acometidos sem que seja plausível estabelecer um sítio anatômico inicial e primário com metástase(s) são aqueles casos que preenchem um dos quatro critérios discutidos neste artigo.

**Agradecimentos.-** Mariana Martins Flores é bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### REFERÊNCIAS

- Bertazzolo W., Dell'Orco M., Bonfanti U., Ghisleni G., Caniatti M., Masserdotti C., Antoniazzi E., Crippa L. & Roccabianca P. 2005. Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations. *Vet. Clin. Pathol.* 34(1):28-34.
- Brown O., Patnaik A.K., MacEwen G. 1985. Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186(1):56-58.
- Cerelli L.A. & Wick M.R. 2006. Immunohistology of soft tissue and osseous neoplasms, p.65-120. In: Dabbs D.J. (Ed.), *Diagnostic immunohistochemistry*. Elsevier, Pittsburgh.
- Culbertson M.R. 1982. Hemangiosarcoma of the canine skin and tongue. *Vet. Pathol.* 19(5):556-558.
- Cullen J.M., Page R. & Misdorp W. 2002. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management, p.3-44. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumours in domestic animals*. 4th ed. Iowa state press, Ames.
- Ferrer L., Fondevila D., Rabanal R.M. & Vilafranca M. 1995. Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *J. Comp. Pathol.* 112(4):319-326.
- Figuera R.A. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 172p.
- Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesq. Vet. Bras.* 28:223-230.
- Gabriel A.L. 2008. Aspectos epidemiológicos, clínicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 92p.
- Goldschmidt M.H. & Hendrick M.J. 2002. Tumors of skin and soft tissues, p.45-118. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumours in domestic animals*. 4th ed. Iowa state press, Ames.
- Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J. & Affolter V.K. 2009. Doenças de pele do cão e do gato. 2nd ed. Roca, São Paulo, p.733-738.
- Hayden D.W., Bartges J.W., Bell F.W. & Klausner J.S. 1992. Prostatic hemangiosarcoma in a dog: clinical and pathologic findings. *J. Vet. Diag. Invest.* 4:209-211.
- Hargis A.M., Ihrke P.J., Spangler W.L. & Stannard A.A. 1992. A retrospective clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and hemangiosarcomas. *Vet. Pathol.* 29(4):316-328.
- Hendrick M.J., Mahaffey E.A., Moore F.M., Vos J.H. & Walder E.J. 1998. Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. Armed Forces Institute of Pathology, Washington.
- Hirsch V.M., Jacobsen J. & Mills J.H.L. 1981. A retrospective study of canine hemangiosarcoma and its association with acanthocytosis. *Can. Vet. J.* 22(5):152-155.
- Johns J.L. & Christopher M.M. 2012. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. *Vet. Pathol.* 49(3):508-523.
- Kleine L.J., Zook B.C. & Munson T.O. 1970. Primary cardiac hemangiosarcomas in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157(3):326-337.
- Meuten D.J. 2002. *Tumours in domestic animals*. 4th ed. Iowa state press, Ames.
- Monluxa W., Anderson W.A. & Davis C.L. 1956. A survey of tumors occurring in cattle, sheep and swine. *Am. J. Vet. Res.* 17:649-677.
- Pirie C.G., Knollinger A.M., Thomas C.B. & Dubielzig R.R. 2006. Canine conjunctival hemangioma and hemangiosarcoma: a retrospective evaluation of 108 cases (1989-2004). *Vet. Ophthalmol.* <sup>8</sup>



9(4):215-226.

Sabattini S. & Bettini G. 2009. An immunohistochemical analysis of canine hemangioma and hemangiosarcoma. *J. Comp. Pathol.* 140(2-3):158-168.

Schultheiss P.C. 2004. A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. *J. Vet. Diag. Invest.* 16(6):522-526.

Southwood L., Shott H.C., Henry C.J., Kennedy F.A., Hines M.T., Geor R.J. & Hassel D.M. 2000. Disseminated hemangiosarcoma in the horse: 35 cases. *J. Vet. Int. Med.* 14:105-109.

Souza T.M., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2006. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural* 36:555-560.

Tamburini B.A., Trapp S., Phang T.L., Schappa J.T., Hunter L.E. & Modiano J.F. 2009. Gene expression profiles of sporadic canine hemangiosarcoma are uniquely associated with breed. *Plos One.* 4:5549.

Von Beust B.R., Suter M.M. & Summers B.A. 1988. Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 25(4):251-255.

Ward H., Fox L.E., Calderwood-Mays M.B., Cammer A.S. & Couto C.G. 1994. Cutaneous hemangiosarcoma in 25 dogs: a retrospective study. *J. Vet. Int. Med.* 8:345-348.

Warren A.L. & Summers B.A. 2007. Epithelioid variant of hemangioma and hemangiosarcoma in the dog, horse and cow. *Vet. Pathol.* 44(1):15-24.

Weiss E. 1974. Tumours of the soft (mesenchymal) tissues. *Bull. World Health Organ.* 50(1-2):101-110.

Weiss S.W. & Enzinger F.M. 1982. Epithelioid hemangioendothelioma. *Am. Cancer Soc.* 50:970-981.

#### LISTA DE FIGURAS

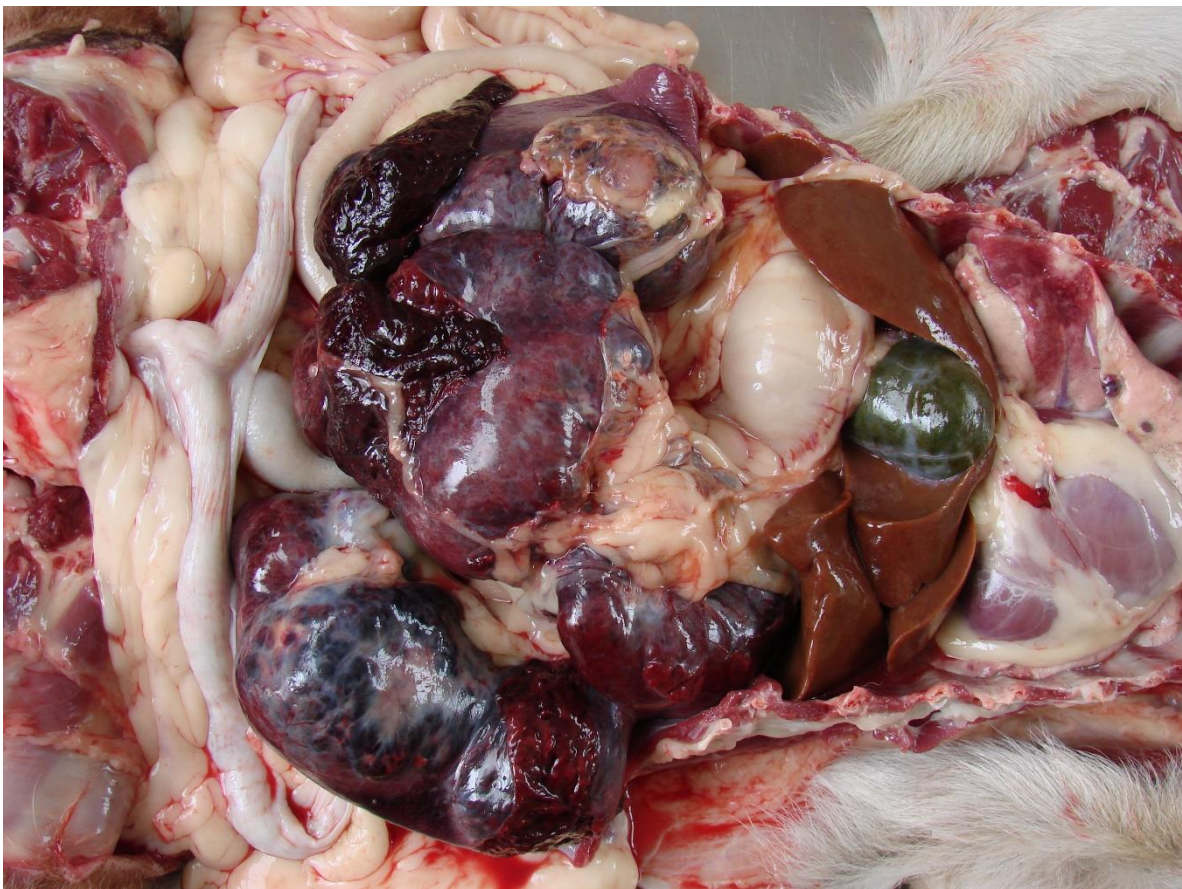


Fig.1.



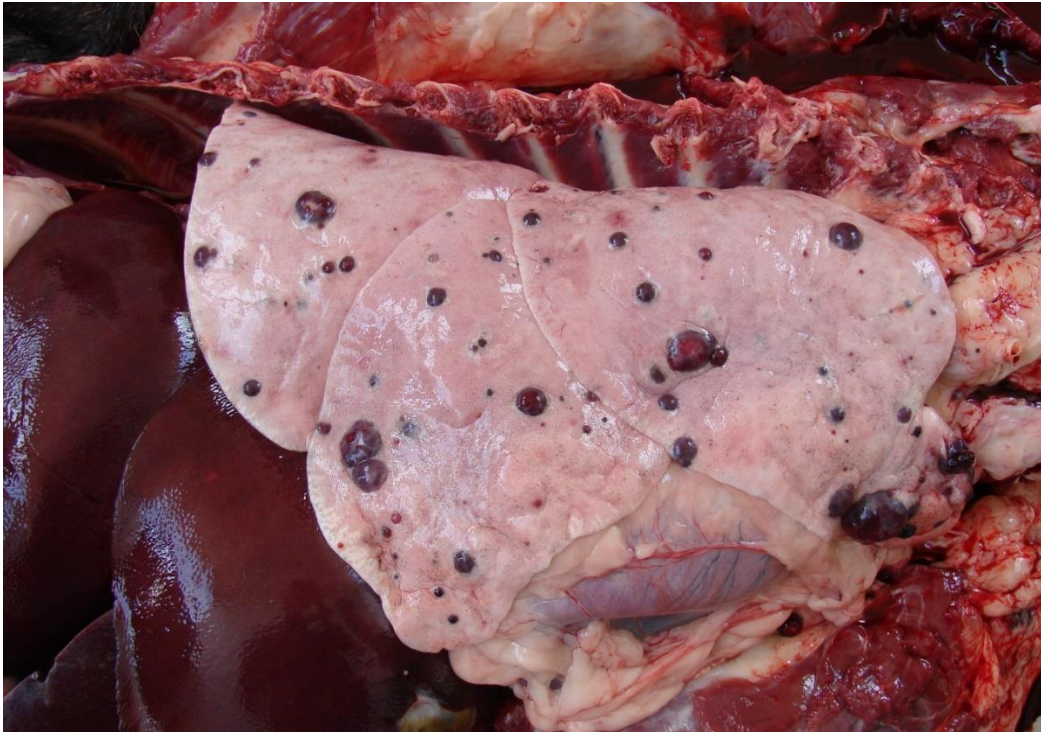


Fig.2.

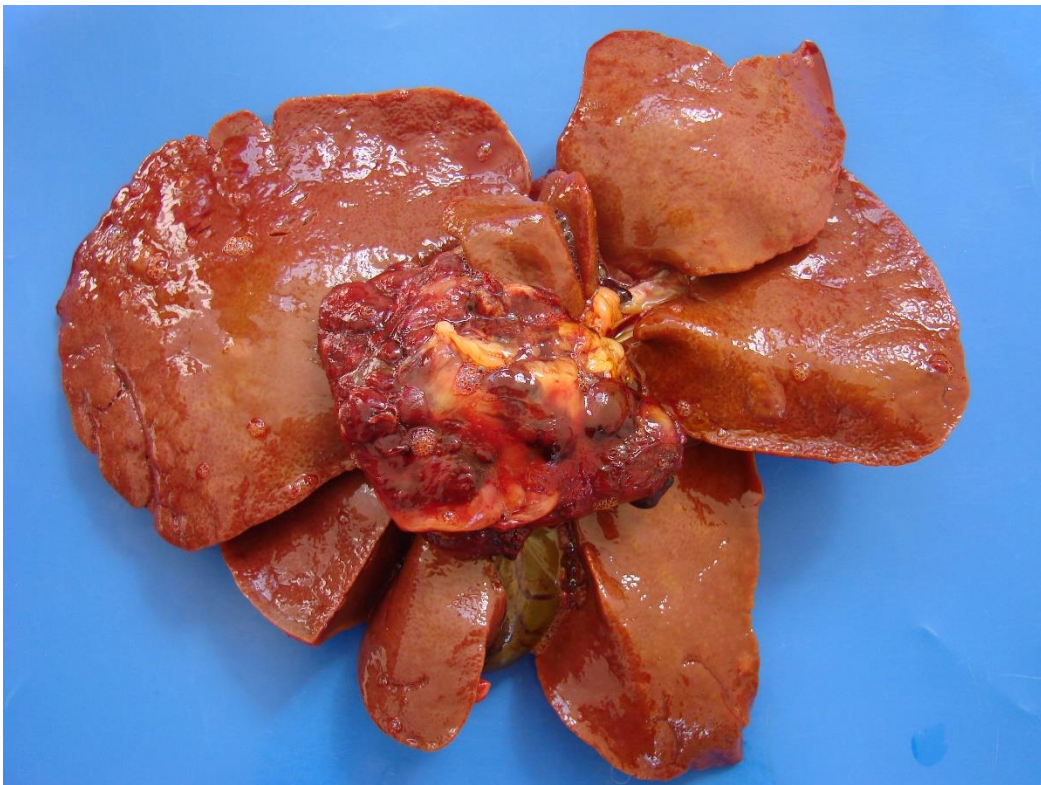


Fig.3.



Fig.4.

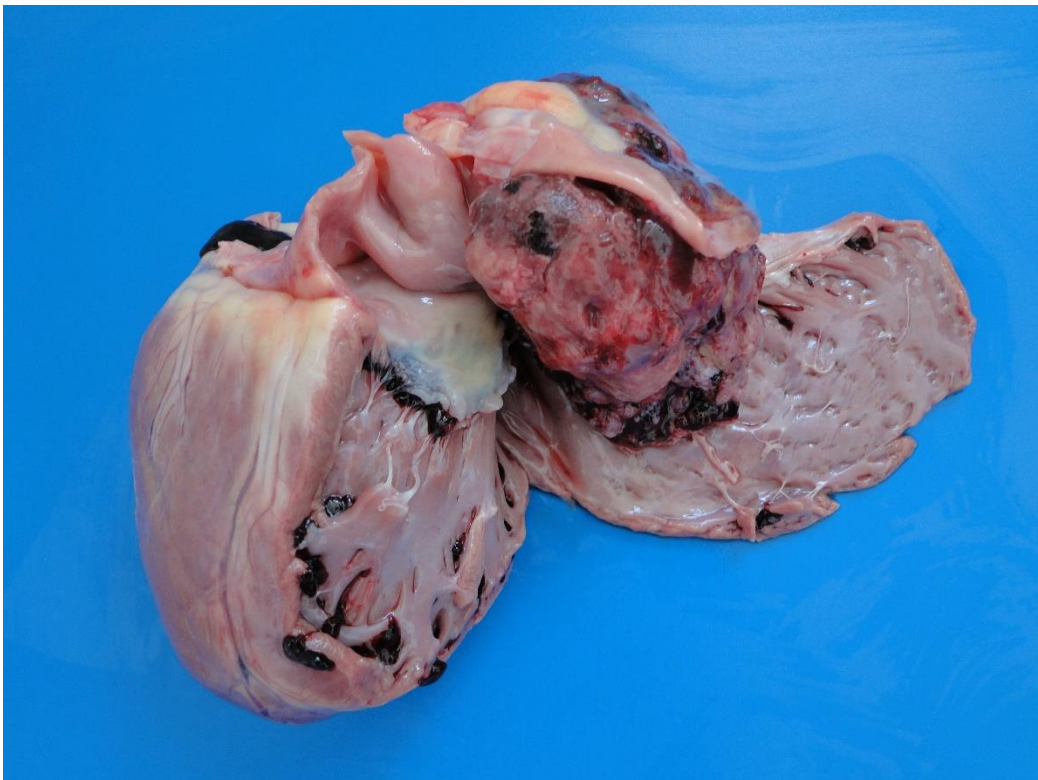


Fig.5.



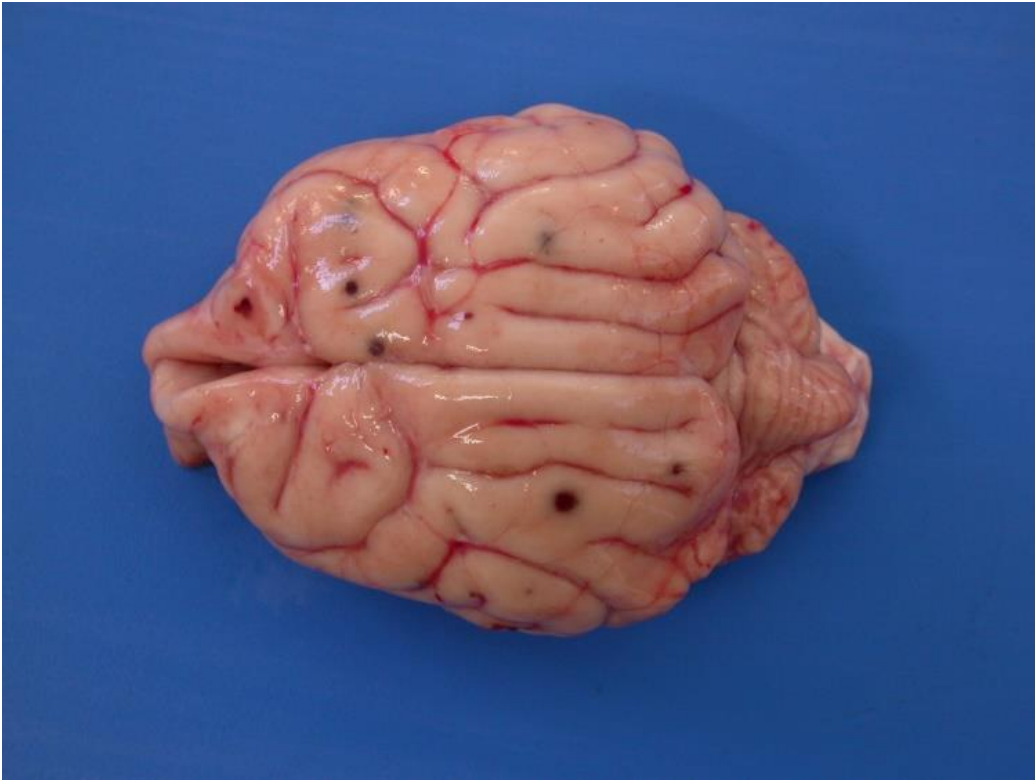


Fig.6.



Fig.7.



Fig.8.

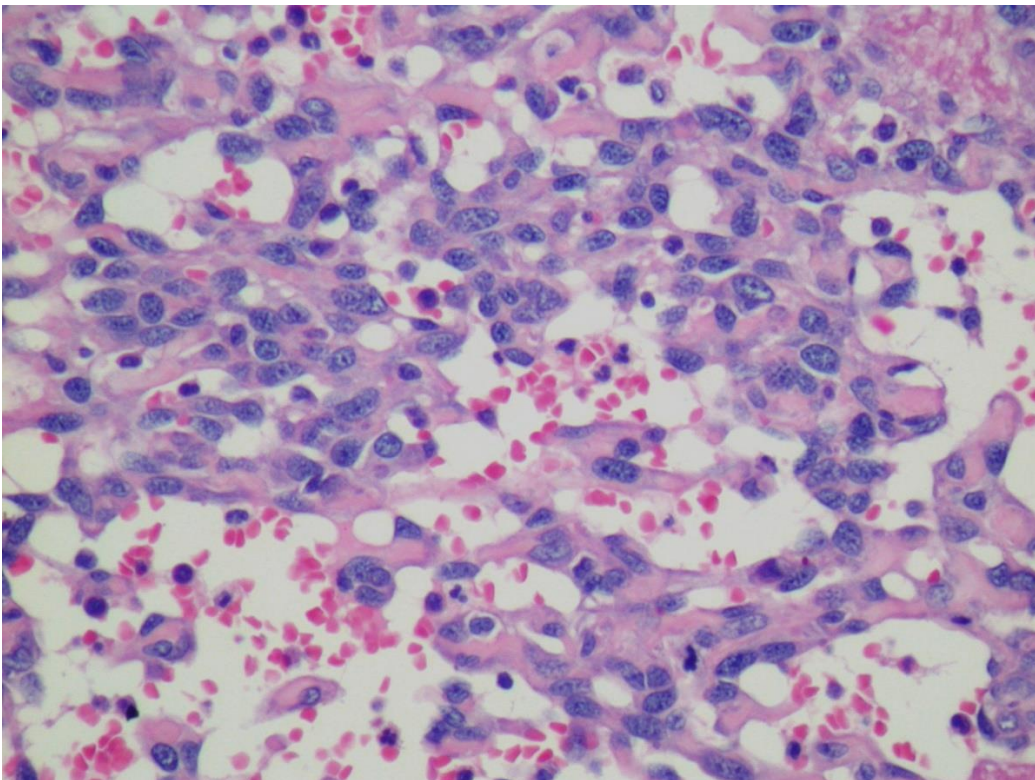


Fig.9.



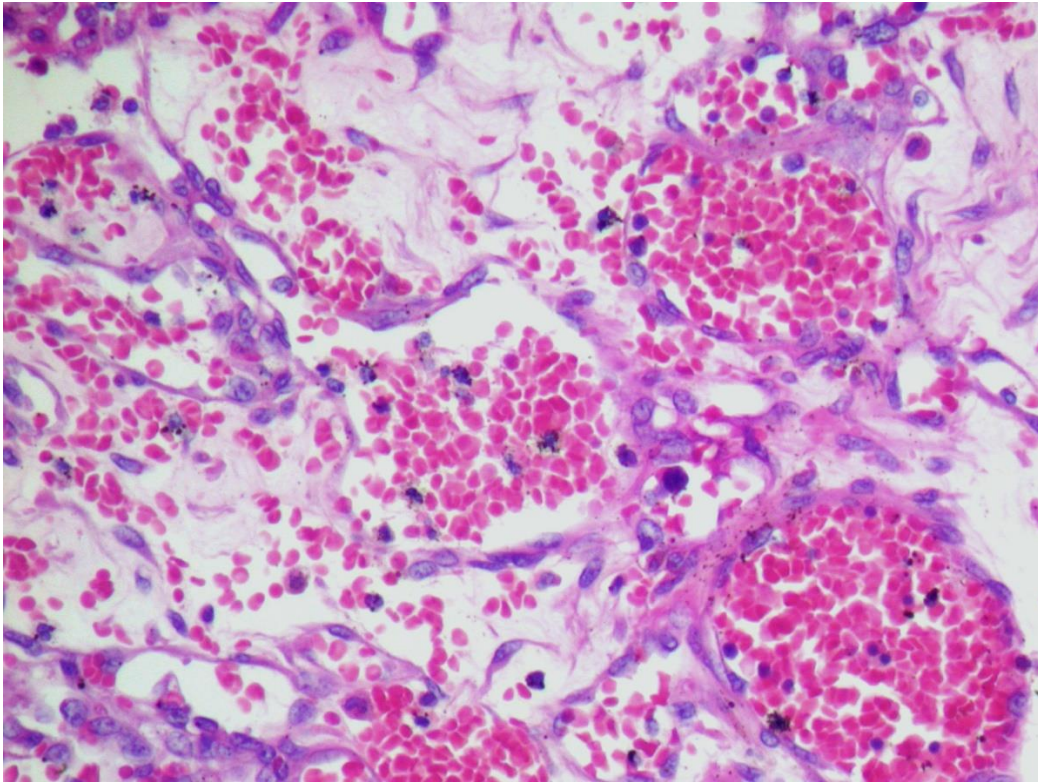


Fig.10.

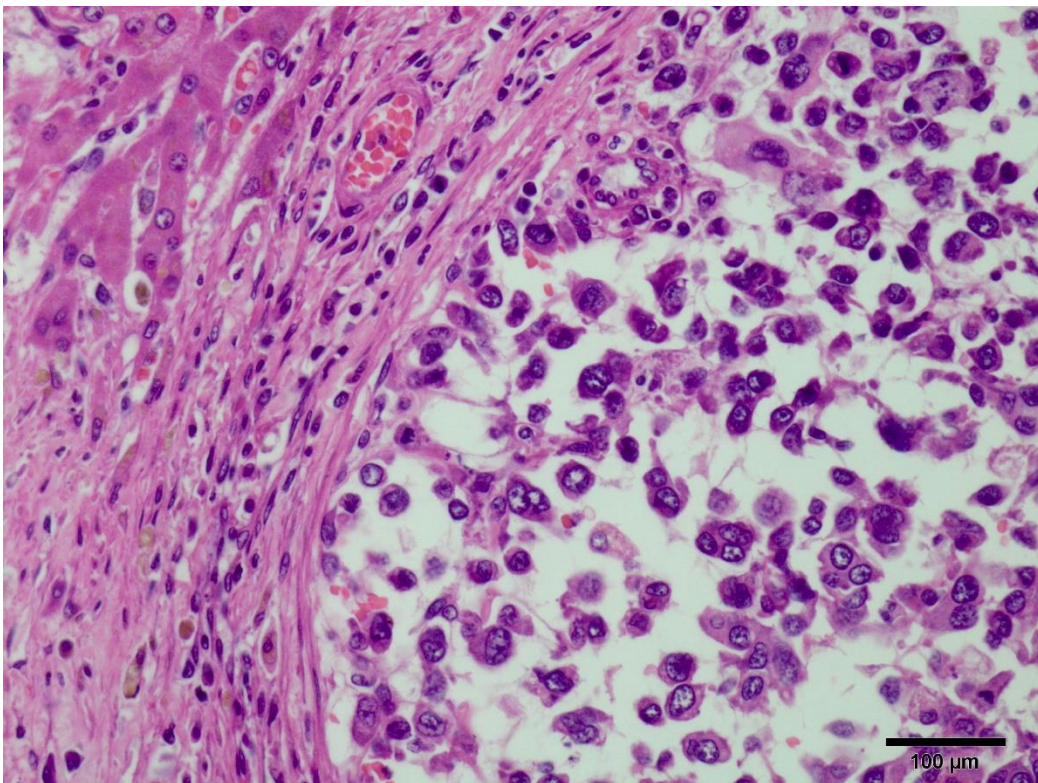


Fig.11.



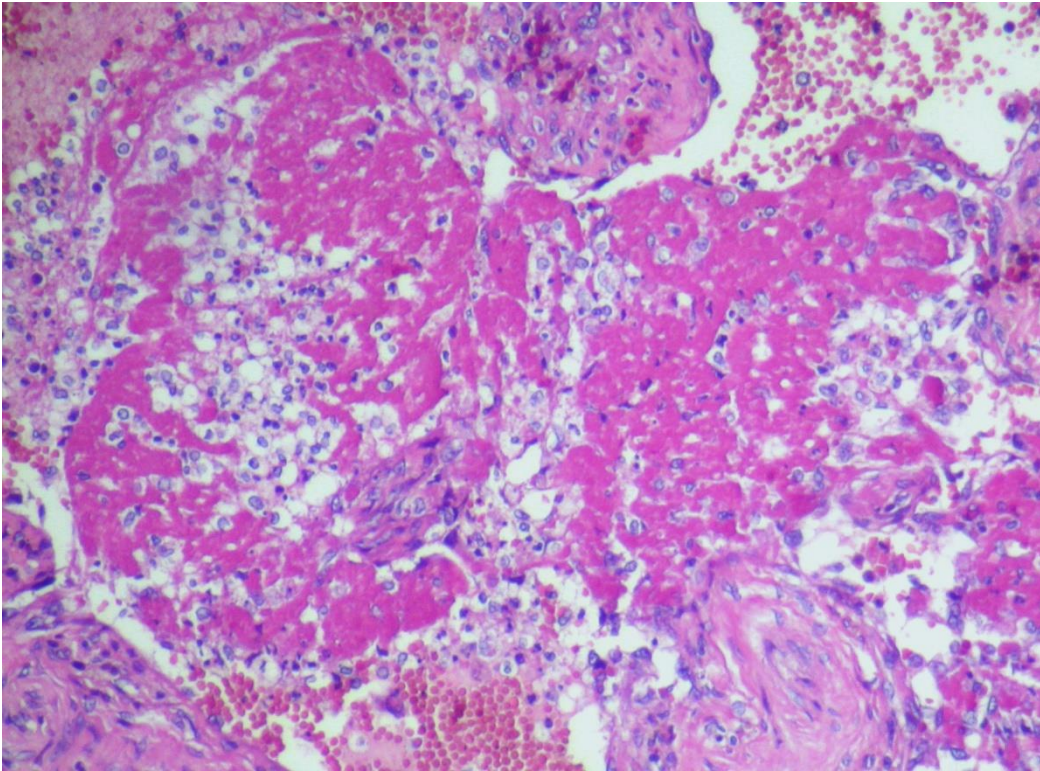


Fig.12.

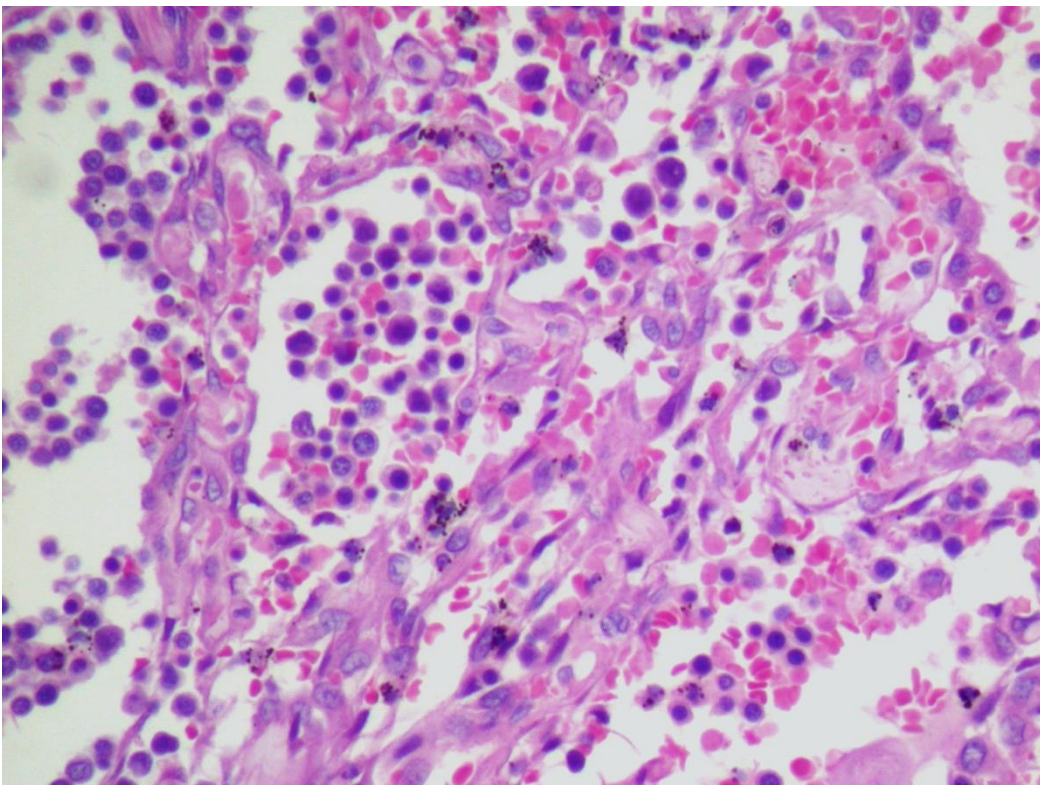


Fig.13.



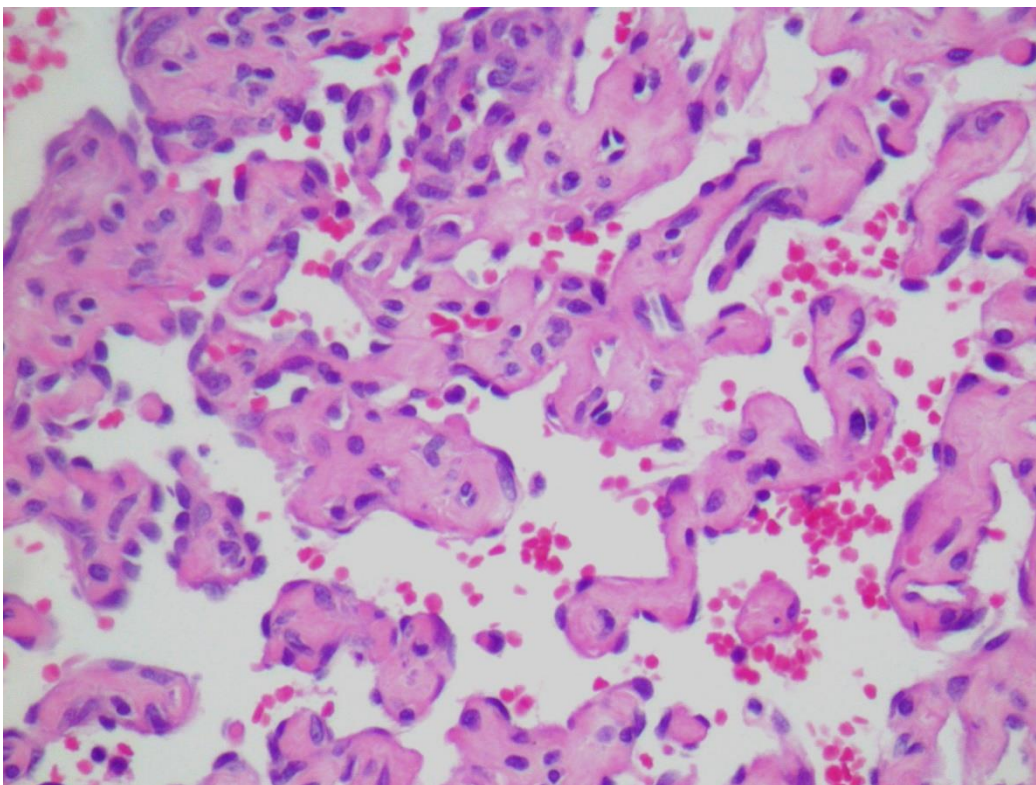


Fig.14.

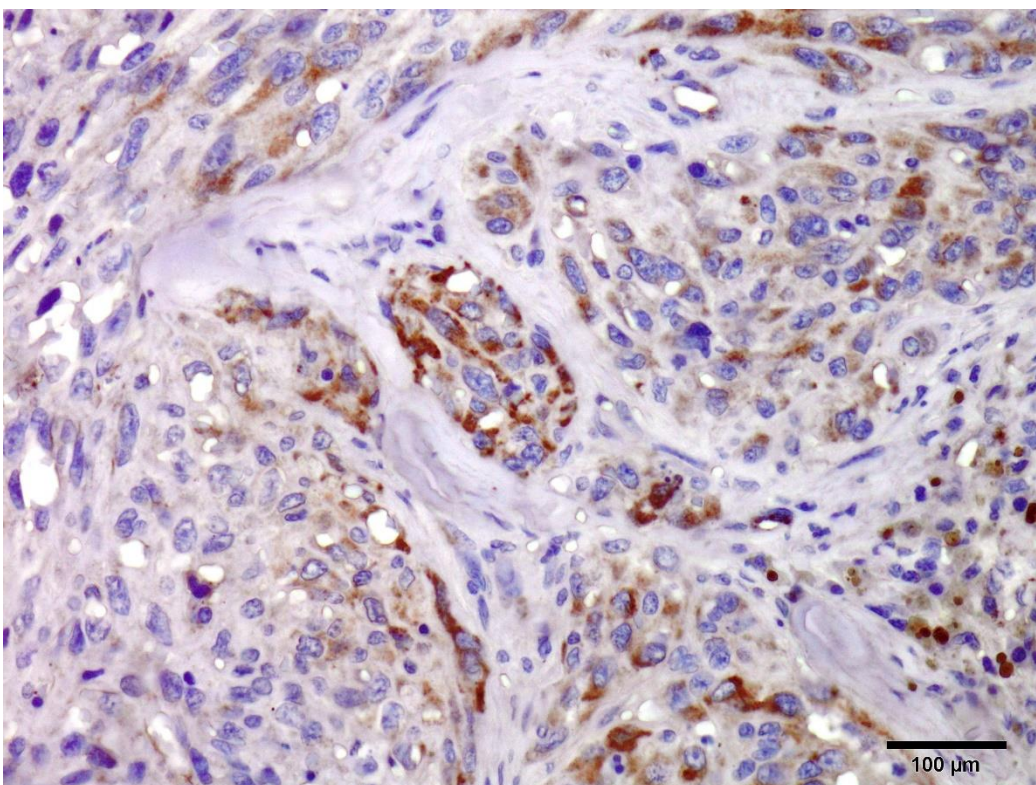


Fig.15.

## LISTA DE LEGENDAS

Fig.1. Múltiplas massas vermelho-escuras obliteram o parênquima esplênico e aumentam significativamente o volume do órgão (esplenomegalia). Note que uma das massas está rompida. O baço foi o órgão mais frequentemente acometido em casos de hemangiossarcoma canino, perfazendo quase um terço dos casos.

Fig.2. Pápulas e nódulos vermelho-escuros e multifocais que protraem hemisfericamente da superfície pleural do pulmão. O pulmão foi o segundo órgão mais frequentemente acometido em casos de hemangiossarcoma canino, perfazendo pouco mais da metade dos casos.

Fig.3. Massa tumoral focalmente extensa que emerge do lobo hepático quadrado. O fígado foi o terceiro órgão mais frequentemente acometido em casos de hemangiossarcoma canino, perfazendo cerca da metade dos casos.

Fig.4. Pápulas e nódulos cutâneos distribuídos disseminadamente na pele. Essa apresentação dramática do hemangiossarcoma cursou com perda crônica de sangue através de gotejamento de cada um dos tumores e morte do cão devido a complicações de anemia hemorrágica crônica.

Fig.5. Grande massa tumoral que ocupa o átrio direito. Note que boa parte do massa é constituída por um trombo, uma apresentação clássica do hemangiossarcoma cardíaco em cães.

Fig.6. Manchas vermelho-escuras que lembram contusões cerebrais. Essa é a típica apresentação do hemangiossarcoma no encéfalo de cães.

Fig.7. Hemoperitônio devido à ruptura de hemangiossarcoma esplênico em um cão. Nesses casos, o desenvolvimento de anemia aguda é um achado importante no histórico da necropsia.

Fig.8. Palidez das mucosas em um cão com hemangiossarcoma multicêntrico. Nesse, e na maioria dos casos, a causa básica é o acúmulo de sangue nas cavidades (hemoperitônio e/ou hemotórax) devido à ruptura dos tumores.

Fig.9. Proliferação de células ovais a variavelmente fusiformes formando capilares repletos de eritrócitos na pele de um cão, morfologia típica de hemangiossarcoma. HE, obj.20x.

Fig.10. Proliferação de células fusiformes formando espaços vasculares dilatados (espaços cavernosos) repletos de eritrócitos no omento de um cão, morfologia típica de hemangiossarcoma. HE, obj.20x.

Fig.11. Aglomerado de células neoplásicas variavelmente redondas, marcadamente descoesas e frequentemente binucleadas no fígado de um cão. Essa perda da diferenciação foi comum em muitos casos de hemangiossarcoma e interpretada como atipia celular. HE, obj.20x.

Fig.12. Trombo de fibrina infiltrado por neutrófilos degenerados obstruindo completamente o lúmen de um vaso neoformado no fígado de um cão. Trombose foi uma constante em todos os 40 casos de hemangiossarcoma descritos. HE, obj.10x.

Fig.13. Acúmulo de precursores hematopoiéticos, principalmente eritropoiéticos (metarrubricitos e rubricitos), na luz de vasos sanguíneos neoformados, no diafragma de um cão com hemangiossarcoma. HE, obj.20x.

Fig.14. Proliferação angiomatoide benigna caracterizada por uma redundância de células endoteliais dispostas sobre feixes de colágeno na forma de capilares hamartomatosos repletos de eritrócitos na pele de um cão com hemangiossarcoma. HE, obj.20x.

Fig.15. A imunorreatividade é observada na forma de múltiplos grânulos castanho-escuros dispersos no citoplasma das células neoplásicas no linfonodo de um cão com hemangiossarcoma. Imuno-histoquímica (método da estreptavidina-biotina-peroxidase), obj.20x.



#### 4.4 ARTIGO 4

Artigo submetido para a revista *Ciência Rural*

### **Use of ancillary techniques on the evaluation of canine cutaneous mast cell tumors from Brazil<sup>1</sup>**

### **Uso de técnicas auxiliares na avaliação de mastocitomas cutâneos caninos do Brasil**

Mariana M. Flores<sup>1\*</sup>, Renata D. Mazaro<sup>2</sup>, Ingeborg M. Langohr<sup>3</sup>, Alma Roy<sup>3</sup>, Keith Strother<sup>3</sup> e Rafael A. Fighera<sup>4</sup>

#### **ABSTRACT**

The use of histologic classification by a 2-tier grading system only, immunohistochemistry (IHC) for KIT and Ki-67 and polymerase chain reaction (PCR) for internal tandem duplications (ITD) on exon 11 has been improving the prognostication of canine cutaneous mast cell tumors (CCMTs) particularly in the United States. However, these techniques are not commonly used in most Brazilian laboratories. Likewise, no studies, to date, have investigated the occurrence of ITD in CCMTs from the country. Thus, this study tested the 2-tier grading system, the immunohistochemistry for KIT and Ki-67 and the PCR for exon 11 in a group of Brazilian CCMTs with the goal of investigating the applicability of these tests in a Brazilian laboratory. Of the 39 CCMTs, 69.2% (27/39) were identified as low-grade and 30.8% (12/39) as high-grade by a 2-tier grading system. All tumors had a KIT expression pattern II, and 30.6% (11/36) had a high growth fraction (Ki-67). PCR amplification was successful in six of the 11 tumors examined. Two of these (33.3%) were positive for ITD. This study highlights the

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

<sup>2</sup> Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS, Bolsista PIBIC/CNPq/UFSM.

<sup>3</sup> Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory (LADDL), Department of Pathobiological Sciences (PBS), Louisiana State University (LSU), Baton Rouge, LA 70803, Estados Unidos.

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS, 97105-900. \*Autor para correspondência: marianamflores@yahoo.com.br

importance of using auxiliary techniques in the CCMT evaluation, identifies limitations and confirms the applicability of these methods on a routine diagnostic basis in Brazil. Our results will help improve the prognostication of CCMTs in Brazilian diagnostic laboratories, encouraging the use of supplementary methods.

**Key Words:** immunohistochemistry, cellular proliferation index, internal tandem duplications, polymerase chain reaction, histological grading system

## **RESUMO**

O uso de classificação histológica por um novo sistema de graduação que utiliza apenas duas categorias, imuno-histoquímica (IHQ) para KIT e Ki-67 e reação de polimerase em cadeia (PCR) para mutações (duplicações internas) no éxon 11 tem melhorado a avaliação do prognóstico de mastocitomas cutâneos caninos (MCCs) particularmente nos Estados Unidos. No entanto, estas técnicas são ainda pouco utilizadas em laboratórios brasileiros, e até então, nenhum estudo investigou a prevalência de duplicações internas (DIs) em MCCs do país. Este estudo testou o novo sistema de graduação histológica de duas categorias, a imuno-histoquímica para KIT e Ki-67 e o PCR para éxon 11 em um grupo de MCCs brasileiros, com o objetivo de investigar a aplicabilidade destes métodos em um laboratório brasileiro. De 39 MCCs, 69,2% foram identificados como sendo de baixo grau e 30,8% como de alto grau. Todos tiveram um padrão II de expressão de KIT, e 30,6% (11/36) tiveram uma alta contagem para Ki-67. A amplificação foi bem-sucedida em seis dos 11 tumores examinados. Dois destes (33,3%) foram positivos para DIs. Este estudo ressaltou a importância do uso de técnicas auxiliares na avaliação de MCCs, identificou limitações e confirmou a aplicabilidade destes métodos em uma rotina de diagnósticos no Brasil. Estes resultados irão auxiliar na melhor avaliação prognóstica dos MCCs em laboratórios brasileiros, encorajando o uso de métodos suplementares neste processo.

**Palavras-chave:** imuno-histoquímica, índice de proliferação celular, duplicações internas em sequência, reação de polimerase em cadeia, sistema de graduação histológica

## INTRODUCTION

The cutaneous mast cell tumor is a common skin cancer of dogs, known by its highly variable biological behavior (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005). Identifying biologically aggressive canine cutaneous mast cell tumors (CCMTs) is quite challenging. Histopathology is one of the most consistent tools used for this purpose, among which the most commonly used grading system is the one proposed by PATNAIK et al. (1984). Despite of the fact of being the most known grading method, the Patnaik System (PS) has been strongly criticized for its subjective criteria (VASCELLARI et al., 2012; SABATTINI et al., 2015) and the poor prognostic value of its intermediate category (grade II) (VASCELLARI et al., 2012). Recently, a 2-tier grading system has been proposed (KIUPEL et al., 2011) which divides the CCMTs solely in low-grade and high-grade tumors. Despite of the noticeable improvement in the histological grading provided by the Kiupel system (KS), to date, no grading system is able to predict the prognosis of most CCMTs.

A set of mutations termed “internal tandem duplications” (ITD) affecting the exon 11 of the *c-kit* gene has been associated with the development of some mast cell tumors in dogs (LONDON et al., 1999; DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002). The affected tumors seem to be more aggressive (DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002), but also respond more effectively to specific therapies (PRYER et al., 2003). These aspects have stimulated the inclusion of a PCR for exon 11 as a new prognostic test for CCMTs. The use of immunohistochemistry for the tyrosine kinase receptor (KIT) and for Ki-67 as other prognostic indicators for MCCT has also been established (KIUPEL et al., 2004;

WEBSTER et al., 2007; VASCELLARI et al., 2012). In recent years, the pattern of KIT expression by neoplastic mast cells (KIUPEL et al., 2004) as well as the Ki-67 count (SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007, VASCELLARI et al., 2012) have been shown to correlate to prognostic indicators such as survival time and neoplastic recurrence.

In the United States, the PCR for exon 11 and the IHC for KIT and Ki-67 are used on a routine diagnostic basis to increase the chances of identifying biologically aggressive tumors. Nevertheless, supplementary techniques for MCCTs evaluation are still little used in most Brazilian laboratories. This study tested the new 2-tier grading system (KIUPEL et al., 2011), the immunohistochemistry for KIT and Ki-67 and the PCR for exon 11 in a group of CCMTs diagnosed in a Brazilian laboratory, with the main goal of investigating the applicability of these different techniques in a routine diagnostic basis in Brazil, thus, encouraging the use of auxiliary methods in the prognostication of CCMTs in this country.

## **MATERIAL AND METHODS**

The biopsy archive (2010-2015) of the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) was searched for canine cutaneous mast cell tumors. Only cases that have been diagnosed as cutaneous mast cell tumors and classified as grade II according to PS (PATNAIK et al., 1984) by the same pathologist (R.F.) were included. The paraffin blocks and hematoxylin and eosin slides from these tumors were retrieved and sent to the Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory (LADDL), Louisiana State University (LSU), Baton Rouge, Louisiana, United States. At the LADDL, a second pathologist (I.L.) graded the CCMTs following the novel 2-tier grading system proposed by KIUPEL et al. (2011). Thereafter, all cases were submitted to immunohistochemistry (IHC) for KIT and Ki-67, and, based on the IHC results, a

subset of cases was selected for PCR for exon 11 of the *c-kit* gene. The amplicons with mutations were sent for sequencing.

The IHC protocol for KIT and Ki-67 was similar to those previous publications (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al. 2007). Slides were incubated with primary antibodies against KIT (pAb, 1:200, Dako, A4502)<sup>5</sup> and Ki-67 (MIB-1 mAb, 1:50, Dako, M7240)<sup>5</sup> for 30 minutes at 37°C. A streptavidin-immunoperoxidase staining procedure was used for immunolabeling. The 3,3'-diaminobenzidine substrate (Dako)<sup>5</sup> was used as chromogen. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Anatech)<sup>6</sup>.

According to KIUPEL et al. (2004), the KIT IHC slides were divided into: pattern I, characterized by membrane staining; pattern II, characterized by focal or stippled cytoplasmic staining; or pattern III, characterized by diffuse cytoplasmic staining. The Ki-67 IHC slides were interpreted according to WEBSTER et al. (2007). After identifying areas with the highest number of labeled neoplastic cells, the number of positive cells present in a 10 x 10 mm grid area was manually counted using a 1 cm<sup>2</sup> (10 x 10) grid reticle at 400X magnification. The number of positive cells per grid area was counted over 5 high-power fields (hpf) and averaged. This number was termed "growth fraction" (WEBSTER et al., 2007). CCMTs were divided into two groups: tumors with a low growth fraction (<23) and tumors with a high growth fraction (≥23). Based on previous criteria (KIUPEL et al., 2004, WEBSTER et al. 2007), only the cases most likely positive for ITD were submitted to PCR, namely those with KIT expression patterns II or III and with a high growth fraction.

Extraction was performed using a commercially available kit (*Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*®, Quiagen, 56404)<sup>7</sup>. Four 5 μm sections of each block were cut and

---

<sup>5</sup> Dako, Carpinteria, California, United States

<sup>6</sup> Anatech, Battle Creek, Michigan, United States

<sup>7</sup> Qiagen, Valencia, California, United States.

placed in 2 ml tubes. Paraffin was removed by treatment with xylene and ethanol. Samples were dried and 180 µl of ATL buffer and 20 µl of proteinase K were added. The samples were incubated in 56°C for an hour and subsequently in 90°C for another hour. The tubes were placed inside the *QIAcube*<sup>7</sup> and the protocol "Isolation of genomic DNA from FFPE tissue sections" was selected. After the extraction, the samples were stored in a -20°C refrigerator. A negative extraction control (NEC) was included in the extraction procedure.

The PCR protocol for exon 11 and intron 11 was performed using the following primers: PE1/PE2 (**PE1:CCCATGTATGAAGTACAGTGGAAG;PE2:GTTCCCTAATCATTGTTACACG**) (JONES et al., 2004). A non-diluted sample and a 1:10 sample were tested. The PCR reaction was performed by use of PE1/PE2 for initial denaturation at 98°C for 20 seconds, followed by 40 cycles of 98°C for 20 seconds, 65.7°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds and then a 72°C for 10 minutes step. The PCR product was analyzed by use of agarose gel electrophoresis (agarose gel in Tris-acetate-EDTA buffer, 4%). The gel amplifications from the positive cases for ITD were sent to Genelab (LSU) for sequencing. GeneLab performs sequence analysis using the Applied Biosystems® (ABI) 3130 Genetic Analyzer (ABI standard protocols). The sequences were analyzed using the DNASTAR Lasergene® 12 software. A positive CCMT (PCR+) and a negative CCMT (ITD-) for mutations were included as controls. A negative PCR control was also used (PCR-).

This study used as a statistical analysis the simple regression model to determine the relationship between the histologic grade and the growth rate. The correlation between these variables was assessed through the Pearson correlation coefficient. The analyses were done using Statgraphics Centurion® XV version 15.1.

## **RESULTS**

A total of 39 CCMTs met the inclusion criteria in this study. According to the 2-tier grading system (KIUPEL et al., 2011), 69.2% (27/39) of these were identified as low-grade and 30.8% (12/39) as high-grade tumors. The most frequent malignancy criteria seen in the high-grade tumors was the presence of 7 or more mitotic figures in 10 hpf (8/12 [66.7%]) (Figure 1a). In the four high-grade tumors with a low mitotic index, karyomegaly (n=3) (Figure 1b), bizarre nuclei (n=1) and multinucleated cells (n=1) were seen.

The IHC for KIT and Ki-67 failed in one (KIT) and three (Ki-67) cases, due to loss of the tissue during processing (n=2) or failure of immune labeling (n=2). All the other KIT IHC cases (38/38) were considered as having an expression pattern II (Figure 1c). From the Ki-67 IHC slides, 69.4% (25/36) had a low growth fraction (Figure 1d). Of these, 80% (20/25) were low-grade tumors. About a third of the cases (11/36 [30.6%]) had a high growth fraction (Figure 1d), 63.6% (7/11) of which were high-grade tumors. With the statistical analysis, a moderate correlation ( $r=0.43$ ) between the histologic grade and the growth fraction was established. Eleven cases were selected for PCR.

The PCR was considered well succeeded when at least one band was seen in the agarose gel electrophoresis. Cases with two bands were considered positive for ITD: the lower band corresponding to the normal *c-kit* gene while the upper band corresponding to the *c-kit* gene containing the internal tandem duplication (LONDON et al., 1999, ZEMKE et al., 2002). The exon 11 from the *c-kit* gene was successfully amplified in six samples (6/11[54.5%]). Of these, four (4/6[66.7%]) were negative for mutations and two (2/6[33.3%]) were positive (Figure 2). Of the two positive cases, one was a low-grade and the other was a high-grade tumor.

## **DISCUSSION**

This study investigated the histological grade, growth fraction and KIT expression pattern of 39 CCMTs previously classified as intermediate grade, allowing the identification of a group of potentially aggressive tumors. Additionally, the PCR for exon 11 identified two positive tumors for internal tandem duplications (ITD). These mutations have been extensively investigated in the United States (LONDON et al., 1999; DOWNING et al, 2002; ZEMKE et al, 2002; WEBSTER et al., 2007), but they have not been explored in Brazil. We also investigated the applicability of IHQ and PCR for MCCTs in Brazil and recognized important limitations on the use of these techniques in this country.

The grading system proposed by KIUPEL et al. (2011) (KS) is currently considered as one of the best histological grading systems for CCMT (VASCELLARI et al, 2012; TAKEUCHI et al, 2013; MAULDIN & PETERS-KENNEDY, 2015; SABATTINI et al, 2015), although it is not consistently applied in the diagnostic routine of many Brazilian laboratories. This system includes more objective criteria and has been associated with a significant prognostic value, mainly when compared to the grading system proposed by PATNAIK et al. (1984) (PS) (VASCELLARI et al., 2012; TAKEUCHI et al., 2013; SABATTINI et al., 2015). Therefore, many North American laboratories have been using the KS in their diagnostic routine, frequently together with the PS. The KS was essential for the identification of potentially aggressive tumors in this study: 30.8% of the mast cell tumors were considered high-grade based on this new grading system and these high-grade tumors had a moderate correlation with a high growth fraction, another prognostic indicator.

Despite being considered the main tool in the evaluation of CCMTs for at least 40 years (BOSTOK et al., 1973; PATNAIK et al., 1984; KIUPEL et al., 2011), the sole use of histopathology has been proven ineffective for the prognostication of CCMTs



(KIUPEL et al., 2004; KIUPEL et al., 2011). This has motivated the use of auxiliary techniques on the MCCTs evaluation. The canine mast cells contain a membrane tyrosine kinase receptor (KIT) encoded by a gene called *c-kit* (YARDEN et al., 1987). In 1999, a research group described a series of mutations termed ITD affecting the juxtamembrane domain (mainly exon 11) of this gene in CCMTs (LONDON et al., 1999) and enrolled in the development and progression of these tumors. It is determined that 15-40% of CCMTs are positive for ITD, and that their presence is related to an aggressive biological behavior (DOWNING et al., 2002; ZEMKE et al., 2002; WEBSTER et al., 2006) and to an increased responsiveness to therapy with the so-called "tyrosine kinase inhibitors" (PRYER et al., 2003). Due to the relatively high prevalence, strong prognostic value and great influence on therapeutic approach associated with the presence of ITD in CCMTs, the investigation of these mutations by means of PCR has become a routine protocol in the CCMT evaluation particularly at North America. In Brazil, however, the PCR for exon 11 is still rarely used. In this study, only two (33.3%) tumors were positive for ITD. The limitation on the number of samples submitted to PCR (due to low budget), the failure in the PCR amplification of five samples and the low number of positive cases for mutations prevented the authors from this study to determine a reliable prevalence for ITD in this study and to correlate the presence of these mutations with the other prognostic indicators tested here.

KIUPEL et al. (2004) have recently correlated the loss of membrane expression and concurrent gain of cytoplasmic labeling of KIT to a shorter survival time and higher risk of recurrence. Ever since, this supplementary technique has been incorporated as a new variable in the assessment of the biological behavior of CCMTs. WEBSTER et al. (2006) have shown a positive correlation between the increased cytoplasmic expression of KIT and the presence of ITD *c-kit* mutations, suggesting that these mutations may play a role

in the aberrant cytoplasmic KIT location in some of these tumors. All CCMTs included in this study showed a KIT expression pattern II, which suggests a worse prognosis (KIUPEL et al., 2004). These results were already expected, since this study included only intermediate tumors (grade II).

The use of Ki-67, a nuclear protein expressed in cycling cells (YARDEN et al., 1987), as a cellular proliferation marker in CCMTs is well established in the literature (SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007; VASCELLARI et al., 2012). The number of Ki-67-positive cells appears to be an important prognostic indicator in different studies (SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007; VASCELLARI et al., 2012), but the cut-off point to determine which tumors are likely more benign and which are likely more aggressive is extremely variable from one article to another. WEBSTER et al. (2007) identified a statistically significant cut-off value of 23 when comparing the growth rate to several prognostic indicators. This article is referred by one of the most famous veterinary pathology textbooks (MAXIE, 2015), and its cut-off value has been chosen to be used in this study.

The failure of the IHC in two samples represented a minor limitation of this study, and is probably related to the long formalin-fixation period, a common issue in Brazilian laboratories. The major limitation of this study was the failure of the DNA amplification in five samples submitted to PCR. There are several pitfalls that prevent or hinder the DNA extraction from formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tissues (MAES et al., 2014). The identification of sample-processing issues and use of good laboratory practices may help overcoming these obstacles. This includes adequate sample cleavage (0.5 to 1 cm thick), quality and quantity control of the formaldehyde, short fixation time, and quality and temperature control of the paraffin (MAES et al. 2014).

## **CONCLUSION**

The histologic and immunohistochemical techniques used in this study were easily applicable and when used together, improved the identification of potentially aggressive tumors. The failure on the DNA amplification of several samples was the major limitation of this study. Enforcing good laboratory practices in Brazilian laboratories might help overcome this kind of issue. This study was important to identify limitations and to confirm the applicability of these different techniques on a routine diagnostic basis in Brazil, thus, encouraging the use of these methods on the prognostication of CCMTs from this country.

### **AGNOWLEGMENTS**

This research was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq)* – Brazil. We thank Ms. Del Philips and Dr. Alejandra Baudena for their technical help. Mariana M. Flores holds a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **REFERENCES**

- BOSTOK, D.E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.14, p.27–41, 1973. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1973.tb06891.x/abstract>>. Acesso em: 03 dez. 2015. Doi: 10.1111/j.1748-5827.1973.tb06891.x
- DOWNING, S. et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.1718-1723, 2002. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2002.63.1718>>. Acesso em: 27 nov. 2015. Doi: 10.2460/ajvr.2002.63.1718<sup>8</sup>

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Ames: Iowa State. Cap.2, p.44-117, 2002

GROSS, T.L. et al. Mesenchymal neoplasms and other tumors. In:\_\_\_\_\_. **Skin Diseases of the dog and cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2005

JONES, C.L.R. et al. Detection of *c-kit* mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.95-100, 2004. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/16/2/95.full.pdf+html>>. Acesso em: 9 de jun. de 2015. Doi: 10.1177/104063870401600201

KIUPEL, M. et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v.48, p.147-155, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/48/1/147.short>>. Acesso em: 9 de jun. de 2015. Doi: 10.1177/0300985810386469

KIUPEL, M. et al. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**. v.41, p.371-377, 2004. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/41/4/371.short>>. Acesso em: 9 de jun. de 2015. Doi: 10.1177/0300985810386469

LONDON, C.A. et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. **Experimental Hematology**, v.27, p.689-697, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X98000757>>. Acesso em: 9 de jun. de 2015. Doi:[10.1016/S0301-472X\(98\)00075-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(98)00075-7)

MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2015. v.3, p.57-59

MAES et al. Beyond H&E: Integration of nucleic acid-based analyses into diagnostic pathology. **Veterinary Pathology**, v.5, p.238-256, 2014. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/51/1/238.short>>. Acesso em: 20 de dez. de 2015. Doi: 10.1177/0300985813505878

MAULDIN, E.A.; PETERS-KENNEDY, J. Integumentary system. In: MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2015. v.3, p.57-59

PATNAIK, A.K. et al. Canine cutaneous mast cell tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v.21, p.469-474, 1984. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/21/5/469.full.pdf+html>>. Acesso em: 02 de Jan. de 2015. Doi: 10.1177/030098588402100503

PRYER, N.K. et al. Proof of target for SU11654: Inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumor. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.5729-5734, 2003. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/15/5729.short>>. Acesso em: 02 de Dec. 2015. Doi:10.1007/s00432-014-1664-9

SABATTINI et al. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? **Veterinary Pathology**, v.52, p.70-73, 2015. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/52/1/70.short>>. Acesso em: 05 de Dez. 2015. Doi: 10.1177/0300985814521638

SCASE, T.J. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.151-158. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02835.x/pdf>>. Acesso em: 07 de jan. 2016. Doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[151:CMCTCO]2.0.CO;2

TAKEUCHI, Y. et al. Validation of the prognostic value of histopathological grading or *c-kit* mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. **The Veterinary Journal**, v.196, p.492-498, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312005229>>. Acesso em: 18 de Jun. 2015. Doi: [10.1016/j.tvjl.2012.11.018](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.11.018)

VASCELLARI, M. et al. Expression of cKi67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. **Veterinary Pathology**, v.50, p.110-121, 2012. Disponível em: < >. Acesso em: 02 de Dez. 2015. Doi: 10.1177/0300985812447829

WEBSTER, J.D. The role of *c-KIT* in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v.8, p.104-111, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476558606800199>>. Acesso em: 02 de Dez. 2015. Doi:[10.1593/neo.05622](https://doi.org/10.1593/neo.05622)

WEBSTER, J.D. et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with *c-Kit* and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v.44, p.-298-308, 2007. Disponível em: < <http://vet.sagepub.com/content/44/3/298.short> >. Acesso em: 09 de Jun. 2015. Doi:10.1354/vp.44-3-298

YARDEN, Y. et al. Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. **The EMBO Journal**, v.6, p.3341-3351, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC553789/pdf/emboj00251-0138.pdf>>. Acesso em: 06 de Jan. 2016.

ZEMKE, D. et al. Mutations in the juxtamembrane domain of *c-KIT* are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**. v.39, p.529-535, 2002.

Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/39/5/529.short>>. Acesso em: 09 de Jun.

2015. Doi: 10.1354/vp.39-5-529

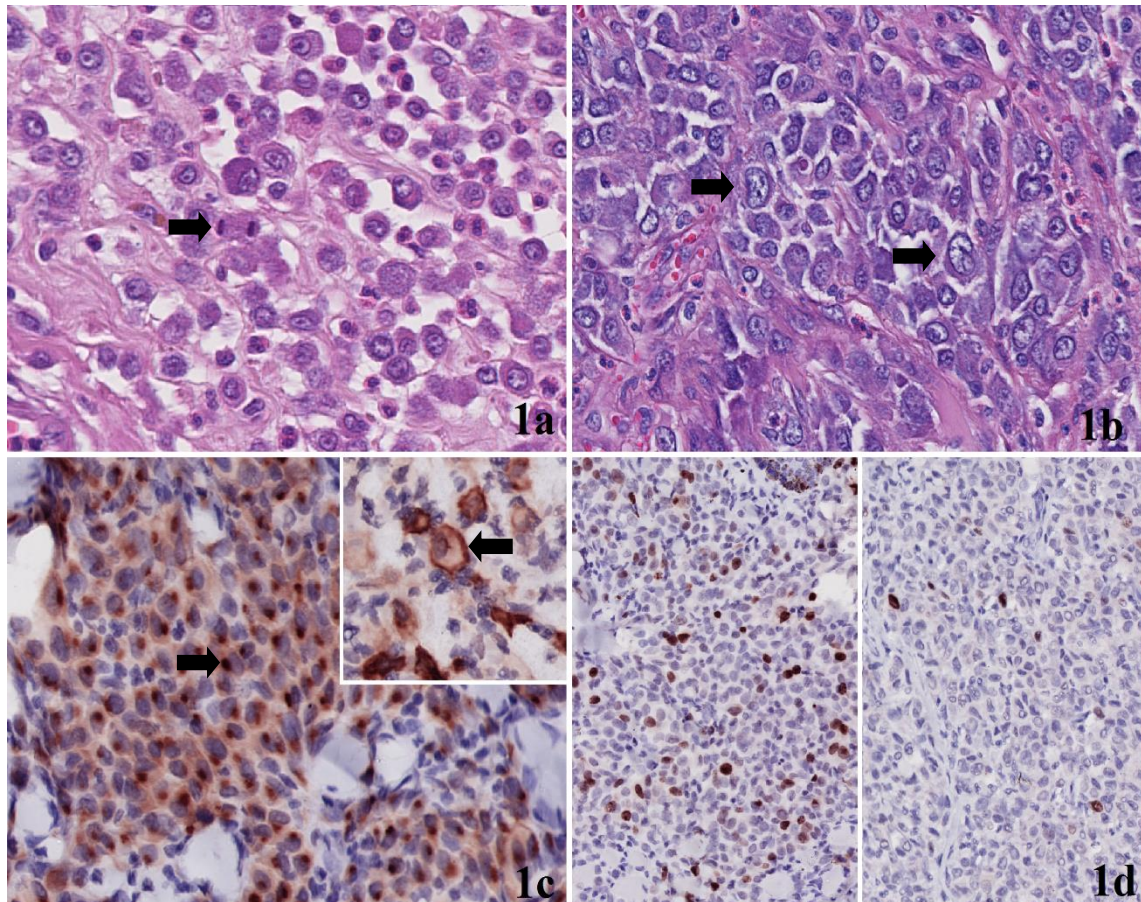
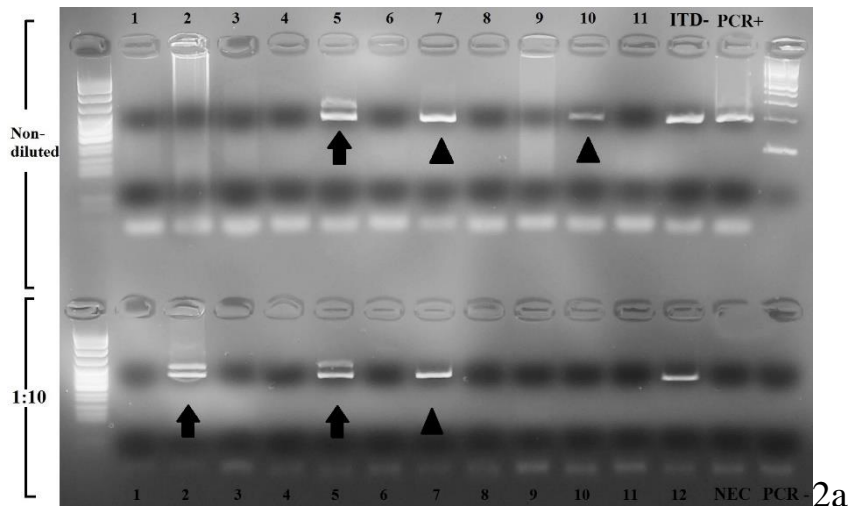


Figure 1a. Mitotic figure in a high-grade mast cell tumor (arrow). Hematoxylin and eosin (H&E), obj. 40X. Figure 1b. Neoplastic mast cells with severe karyomegaly (arrows). H&E, obj. 40X. Figure 1c. The majority of neoplastic mast cells show a focal cytoplasmic staining with loss of the membrane staining (arrow). Inset: mast cell with membrane staining (arrow). Immunohistochemistry (IHC) for KIT, obj. 20X; obj. 40X (inset). Figure 1d. The left picture shows several immunopositive cells in a tumor with a high growth fraction. The right picture shows rare immunopositive cells in a tumor with a low growth fraction. IHC for Ki-67, obj. 10X.





#### Genomic sequence of the exon 11 of canine *c-Kit*

```
cccatgtatgaagtacagtggaaggtgttgaggagatcaatggaacaattatgtttacatagacc
aacacagcttccttacgatcacaatgggagttccagaacaggctgagctttggtcagatgaaa
taggggctttccatgtaaccttttgtgtacgtgtaacaatgactttagggaac
```

#### Sample 2

```
Cccatgtatgaagtacagtggaaggtgttgaggagatcaatggaacaattatgtttacatagacc
acacagcttccttacgatcacaatgggagttccagaacaggctgagctttggtcagatgaaat
aggggctttccatgtaaccttttgtgtacgtgtaacaatgactttaggg---ACAAMCCYT
TTTTTkkkNBkkNNAAAAATTTT WRGGAIAAAAAA
```

#### Sample 5

```
CCCATGTATGAAGTACAGTGAAGGTTGTTGAGGAGATC
AATGGAAACAATYAYGTTTACATAGRCCCAACACAGCTT
CSTKASGATCWCAAkGGGAGTTCCAGAAACAGGCT
—cccatgtatgaagtacagtggaaggtgttgaggagatcaatggaacaattatgtttacatagac
ccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttccagaacaggctgagctttggtcagatga
aataggggctttccatgtaaccttttgtgtacgtgtaacaatgactttagggaac
```

2b

Figure 2a. PCR amplification of genomic DNA for exon 11 of *c-kit* from 11 CCMTs (samples 1 to 11). The ITD positive cases (samples 2 and 5) show two bands (arrow). The ITD negative cases (7 and 10) show one band (arrow head). The amplification failed in the remaining samples (1,3,4,6,8,11). Figure 2b. Sequencing results of the two ITD positive cases. Lowercase: normal sequence of the *c-kit*. Capital letters: inserts. Underlined sequences: overlapping (internal tandem duplications). The letters M, Y, C, K, B, N and R indicate that there is more than one base in the respective point.

#### 4.5 DISCUSSÃO

Por meio da realização do presente estudo, foi possível inferir que o câncer tem se tornado mais comum como causa de morte ou razão para eutanásia em cães no LPV-UFSM. Apesar de não podermos afirmar que a incidência desta doença está aumentando em cães vivos, estes resultados sugerem que isto possa estar ocorrendo. Afirmer que o câncer aumentou na população analisada foi possível por três motivos principais: (1) foram analisados dados de um período extenso (50 anos), uma metodologia diferente do que tem sido publicado em artigos de prevalência do câncer (BONNETT et al., 2005; FLEMING et al., 2011); (2) foi incluído um “n” significativo, o que tem sido feito em outros estudos de prevalência (BONNETT et al., 2005; FLEMING et al., 2011; PROSCHOWSKY et al., 2003) e reduz a chance ocorrerem interpretações equivocadas de prevalência; (3) foi estudada a população “controle”, neste caso, a população total de necropsias. Sem os dados referentes a esta população, nenhum dado relacionado à prevalência poderia ter sido obtido. Apesar de alguns autores afirmarem que o câncer é mais comum nos dias de hoje, não há, até o momento, dados que comprovem tal observação (PAOLONI e KHANNA, 2007; WITHROW et al., 2013). Estudos semelhantes a este são necessários para começar a solidificar tal hipótese. O estudo do hemangiossarcoma descreveu os diferentes aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos destes tumores na região de abrangência do LPV-UFSM. Estudos locais como este, à semelhança dos estudos anteriormente publicados neste laboratório (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; FIGHERA et al., 2006; TROST et al., 2012; FLORES et al., 2013; RECK et al., 2004; INKELMANN et al., 2011) não só para a investigação de peculiaridades locais mas também aumentam o conhecimento de clínicos e patologistas regionais acerca de lesões e doenças importantes em nossa região, o que contribui principalmente para o diagnóstico na clínica veterinária e na sala de necropsia. Como um quarto estudo, optou-se pelo trabalho direcionado às técnicas auxiliares de diagnóstico dos mastocitomas cutâneos caninos. Estes tumores correspondem aos tumores de pele mais diagnosticados no LPV-UFSM (SOUZA et al., 2006; FIGHERA et al., 2008), e apesar dos grandes avanços feitos internacionalmente em relação à identificação dos mastocitomas biologicamente agressivos e à escolha da melhor terapia para os cães afetados, são raros os laboratórios brasileiros que oferecem técnicas como a imuno-histoquímica para Ki-67 e KIT em conjunto com a PCR para exon 11. Lembramos, neste contexto, do ponto exposto no início deste trabalho: as técnicas diagnósticas, prognósticas e terapêuticas estão tornando-se cada vez mais importantes na clínica veterinária, principalmente pelo interesse cada vez maior dos proprietários pelo tratamento dos seus cães (NELSON e COUTO, 1998; WITHROW et al.,

2013). Este novo perfil de proprietários de pequenos animais também já é observado no Brasil, principalmente em grandes cidades brasileiras, e a demanda por técnicas cada vez mais avançadas cresce a cada ano. É preciso estar preparado para este cenário.

## 5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, pôde-se chegar à conclusão de que o câncer tem se tornado mais comum como causa de morte ou razão para eutanásia nos cães necropsiados no LPV-UFSM nos últimos 50 anos de diagnóstico. Isto pode sugerir que a incidência desta doença está realmente aumentando, mas há outros fatores envolvidos neste aumento, como foi discutido no artigo 3. Embora estes resultados sejam importantes e significativos para a área de patologia e clínica veterinária, é importante interpretá-los com cautela, para que não ocorram equívocos. Espera-se que este estudo contribua para o entendimento da epidemiologia do câncer em outros países e regiões geográficas, e que possa auxiliar no diagnóstico de casos futuros dos diferentes tipos de tumores em cães da nossa região. Acredita-se que o artigo 1, relacionado ao estudo das características da população total, possa servir como um “banco de dados” para futuros estudos de prevalência de doenças no LPV-UFSM. No trabalho dos hemangiossarcomas, sugeriu-se uma nova forma de classificação macroscópica destes tumores de acordo com a distribuição do tumor na necropsia. Espera-se que esta nova classificação venha a facilitar o diagnóstico e estudo desses tumores, principalmente na sala de necropsias. O quarto trabalho deste estudo teve o principal objetivo de testar a aplicabilidade de técnicas de auxílio ao diagnóstico e determinação do prognóstico dos mastocitomas cutâneos caninos. Espera-se que ele seja de valia para a clínica e patologia veterinária no Brasil, e que possa contribuir para o aumento no uso destas técnicas auxiliares por clínicos e patologistas brasileiros.

## REFERÊNCIAS

EHRHART, E.J. et al. **The pathology of neoplasia**. In.: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R.L. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5<sup>th</sup> edition. Saunders, Elsevier. St. Louis. 2013

MARCONATO, L. et al. **The dog as a possible model for human non-Hodgkin lymphoma: a review**. Hematological Oncology, v.31, p.1-9, 2012

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2<sup>a</sup> edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1998

PAOLONI, M.; KHANNA, C. **Comparative oncology today.** Veterinary Clinics Small Animal Practice, v.37, p.1023-1032, 2007

ROWELL, J.L.; et al. **Dog models of naturally occurring cancer.** Trends in Molecular Medicine, v.17, p.380-388, 2013

SHAFIEE, R. et al. **Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumour as a model to study human breast cancer: an clinic-cytohstopathological study with environmental factors influencing public health and medicine.** Cancer Cell International, v.13, p.1-11, 2013

SIMPSON, R.M. et al. **Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma.** Pigment Cell Melanoma Research, v.27, p.37-47, 2013