

JULIA ANTONGIOVANNI JOSELEVITCH

**Expressão de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA  
e SPARC em mastocitomas cutâneos caninos**

São Paulo

2024

JULIA ANTONGIOVANNI JOSELEVITCH

**Expressão de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA  
e SPARC em mastocitomas cutâneos caninos**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Departamento:**

Patologia

**Área de concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### Catálogo na Publicação

Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Joselevitch, Julia  
Expressão de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC  
em mastocitomas cutâneos caninos / Julia Joselevitch ; orientador  
Prof. Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi - versão corrigida.--  
São Paulo, 2024.  
130 f. : il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Experimental e Comparada - Departamento de Patologia) - Faculdade  
de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São  
Paulo, 2024.

1. Cão. 2. Câncer. 3. Imuno-histoquímica. 4. Mastocitoma. 5.  
Matriz extracelular. I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EXPRESSION DE ADAMTS2, BMP-1, LOX, LOXL2, MMP-14, PDGFRA e SPARC EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS", protocolada sob o CEUA nº 6686250717 (ID 004071), sob a responsabilidade de **Ricardo de Francisco Strefeizzi e equipe; JULIA ANTONGIOVANNI JOSELEVITCH** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/09/2017.

We certify that the proposal "EXPRESSION OF ADAMTS2, BMP-1, LOX, LOXL2, MMP-14, PDGFRA AND SPARC IN CANINE CUTANEOUS MAST CELL TUMORS", utilizing 50 Dogs (males and females), protocol number CEUA 6686250717 (ID 004071), under the responsibility of **Ricardo de Francisco Strefeizzi and team; JULIA ANTONGIOVANNI JOSELEVITCH** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/13/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 01/2019 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem: Amostras biológicas estocadas

Espécie: Cães

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 16 anos

Quantidade: 50

Linhagem: Diversas raças incluindo SRD

Peso: 1 a 40 kg

São Paulo, 02 de janeiro de 2024

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo



## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: JOSELEVITCH, Julia Antongiovanni

Título: Expressão de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC  
em mastocitomas cutâneos caninos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Finalizações de ciclos são sempre intensas, mas confiar no processo compensa. Agradeço à minha mãe, Lívia Maria Antongiovanni, por ter-me ensinado essa valiosa lição que foi fundamental para a conclusão da minha pesquisa. Obrigada por ser meu porto seguro e meu farol nas épocas de tormenta.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi, por ter despertado em mim o amor pela Patologia Veterinária e o interesse vitalício pela Oncologia Veterinária. Obrigada pela confiança, pelos anos de parceria e pela contribuição inestimável que os seus ensinamentos tiveram na construção do meu caráter e da minha ética profissional.

A todos os colegas da pós-graduação, professores e funcionários do Departamento de Patologia, agradeço pela cooperação e acolhimento nos momentos de dificuldade. Particularmente, agradeço à Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes pelo auxílio, aconselhamento e por ter-me aberto as portas do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia quando da necessidade de sua utilização. Aos membros da banca de forma geral, agradeço pelos apontamentos e sugestões que foram levadas cuidadosamente em consideração na elaboração do texto final. Um agradecimento especial ao meu namorado, Marcos Vinicius Cordeiro Vieira, por todo o suporte e apoio emocional neste período conturbado da minha vida.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2016/03862-1 e 2020/10582-0, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES) – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 303748/2021-4 pelo apoio na realização desse projeto.

*“In my view, all that is necessary for faith is the belief that by doing our best we shall succeed in our aims: the improvement of mankind.”*

— Rosalind Franklin

## RESUMO

JOSELEVITCH, J.A. **Expressão de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC em mastocitomas cutâneos caninos. 130p.** Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

O mastocitoma cutâneo canino (MCT) é um dos tumores de pele mais frequentes em cães. Seu comportamento biológico de difícil previsão costuma causar frustrações terapêuticas que intensificam as buscas por marcadores prognósticos e preditivos. Nas últimas décadas, avanços no entendimento do microambiente tumoral revelaram características moleculares e bioquímicas que possibilitam o desenvolvimento e a progressão do câncer. ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC são proteínas envolvidas na síntese, degradação e remodelamento da matriz extracelular que contribuem com a proliferação, migração, angiogênese invasão e transição epitelial-mesenquimal. O presente estudo teve como objetivos caracterizar a expressão imuno-histoquímica de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC em MCTs e comparar os dados obtidos aos métodos de graduação histológica, mortalidade em função do tumor e tempo de sobrevivência pós-cirúrgico para fins de avaliação prognóstica. Sessenta e dois tumores foram submetidos à imuno-histoquímica para avaliação da expressão de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC. Todas as amostras apresentaram positividade em graus variados para as proteínas de interesse. Nos mastócitos neoplásicos, a positividade nuclear e membranar de BMP1 e nuclear de MMP14, foram significativamente maiores em MCTs de grau III, enquanto que a positividade citoplasmática de LOX foi significativamente maior em MCTs de alto grau. Nos fibroblastos, a positividade nuclear de MMP14 foi significativamente maior em MCTs de grau III. A expressão membranar de ADAMTS2 em mastócitos neoplásicos foi significativamente menor em animais que vieram a óbito em função do tumor e menor expressão membranar de ADAMTS2 foi observada nos casos que tiveram menor sobrevivência. ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC apresentaram alta expressão em MCTs, podendo ser considerados enquanto alvos terapêuticos para estudos futuros.

Palavras-chave: cão, câncer, imuno-histoquímica, mastocitoma, matriz extracelular, prognóstico.



## ABSTRACT

JOSELEVITCH, J.A. **Expression of ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA and SPARC in canine cutaneous mast cell tumors. 130p.** Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Canine cutaneous mast cell tumor (MCT) is one of the most common skin tumors in dogs. Its biological behavior, which is difficult to predict, often causes therapeutic frustrations that intensify the search for prognostic and predictive markers. In recent decades, advances in understanding the tumor microenvironment have revealed molecular and biochemical characteristics that enable the development and progression of cancer. ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA and SPARC are proteins involved in the synthesis, degradation and remodeling of the extracellular matrix that contribute to proliferation, migration, angiogenesis, invasion and epithelial-mesenchymal transition. The present study aimed to characterize the immunohistochemical expression of ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA and SPARC in MCTs and compare the data obtained using histopathological grading methods, mortality due to the tumor and post-surgical survival time for prognostic assessment purposes. Sixty-two tumors were subjected to immunohistochemistry to evaluate the expression of ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA and SPARC. All samples were positive to varying degrees for the proteins of interest. In neoplastic mast cells, nuclear and membrane BMP1 and nuclear MMP14 positivity were significantly higher in grade III MCTs, while cytoplasmic LOX positivity was significantly higher in high-grade MCTs. In fibroblasts, MMP14 nuclear positivity was significantly higher in grade III MCTs. The membrane expression of ADAMTS2 in neoplastic mast cells was significantly lower in animals that died due to the tumor and lower membrane expression of ADAMTS2 was observed in cases that had shorter survival. ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA and SPARC showed high expression in MCTs and can be considered as therapeutic targets for future studies.

Keywords: dog, cancer, immunohistochemistry, mast cell tumor, extracellular matrix, prognosis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1	MASTÓCITOS .....	11
<b>2.1.1</b>	<b>Morfologia e distribuição</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Origem e desenvolvimento</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Função e heterogeneidade</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Mastócitos e câncer</b> .....	<b>14</b>
2.2	MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS .....	15
<b>2.2.1</b>	<b>Incidência</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Etiopatogenia</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Apresentação clínica</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Abordagem diagnóstica</b> .....	<b>19</b>
2.2.4.1	Diagnóstico definitivo .....	20
2.2.4.2	Estadiamento clínico .....	22
<b>2.2.5</b>	<b>Fatores prognósticos</b> .....	<b>23</b>
2.2.5.1	Graduação histológica .....	24
2.2.5.2	Avaliação dos linfonodos para estadiamento .....	26
2.2.5.3	Localização anatômica.....	28
2.2.5.4	Padrões marcação imuno-histoquímica de KIT .....	29
2.2.5.5	Marcadores de atividade proliferativa.....	29
2.2.5.6	Outros fatores .....	31
<b>2.2.6</b>	<b>Tratamento</b> .....	<b>32</b>
2.2.6.1	Cirurgia .....	32
2.2.6.2	Quimioterapia.....	34
2.2.6.3	Eletroquimioterapia .....	36
2.2.6.4	Radioterapia.....	37
2.2.6.5	Inibidores da tirosina quinase.....	37
2.3	MICROAMBIENTE TUMORAL.....	38
<b>2.3.1</b>	<b>Fibroblastos associados ao câncer</b> .....	<b>40</b>
2.4	MATRIZ EXTRACELULAR.....	41
<b>2.4.1</b>	<b>Estrutura e Função</b> .....	<b>41</b>
2.4.1.1	Proteínas Fibrosas .....	42
2.4.1.2	Proteínas Adesivas .....	44

2.4.1.3	Proteínas Não-fibrosas .....	45
2.4.1.4	Proteínas Matricelulares.....	46
<b>2.4.2</b>	<b>Envolvimento na carcinogênese.....</b>	<b>47</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Alterações da MEC conhecidas nos MCTs .....</b>	<b>48</b>
2.5	PROTEÍNAS DE INTERESSE .....	49
<b>2.5.1</b>	<b>ADAMTS2.....</b>	<b>49</b>
<b>2.5.2</b>	<b>BMP1 .....</b>	<b>53</b>
<b>2.5.3</b>	<b>MMP14.....</b>	<b>56</b>
<b>2.5.4</b>	<b>LOX .....</b>	<b>59</b>
<b>2.5.5</b>	<b>LOXL2 .....</b>	<b>62</b>
<b>2.5.6</b>	<b>PDGFRA.....</b>	<b>62</b>
<b>2.5.7</b>	<b>SPARC.....</b>	<b>64</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE E OBJETIVOS .....</b>	<b>66</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>66</b>
4.1	ORIGEM DOS MATERIAIS .....	66
4.2	CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO .....	66
4.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	67
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	67
4.5	WESTERN BLOT .....	70
4.6	ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES.....	71
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	71
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL .....	72
5.2	ADAMTS2.....	77
5.3	BMP1 .....	81
5.4	MMP14.....	83
5.5	LOXL2.....	87
5.6	PDGFRA.....	90
5.8	LOX.....	99
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os mastocitomas cutâneos caninos (MCTs) são tumores malignos que se desenvolvem a partir da proliferação errática de mastócitos neoplásicos na derme. O mais recente consenso brasileiro aponta os MCTs como o segundo tumor de pele mais diagnosticado em cães, perdendo apenas para os carcinomas mamários (DE NARDI, 2022). A alta incidência de MCTs associada às frequentes frustrações terapêuticas que estes tumores causam incita a necessidade de melhores ferramentas prognósticas e preditivas para o manejo clínico do paciente acometido (BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020; DE NARDI, 2022).

Nas últimas décadas, avanços no entendimento do câncer enquanto órgão especializado trouxeram à luz mecanismos através dos quais o microambiente tumoral é capaz de modular a carcinogênese. O papel de proteínas relacionadas à síntese, degradação e remodelamento da matriz extracelular (MEC) vem sendo analisado no contexto do câncer e vias complexas de sinalização que envolvem a proliferação, a migração, a angiogênese e a metástase vem sendo desvendadas (HANAHAN; COUSSENS, 2012; HANAHAN, 2022).

O presente trabalho teve como objetivos caracterizar a expressão imunohistoquímica de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC em MCTs e comparar os dados obtidos aos métodos de gradação histológica, mortalidade em função do tumor e tempo de sobrevivência pós-cirúrgico para fins de avaliação prognóstica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MASTÓCITOS

#### 2.1.1 Morfologia e distribuição

Os mastócitos são leucócitos funcionalmente versáteis derivados de precursores da medula óssea. Sua distribuição pelo tecido conjuntivo é ampla e são muito comumente encontrados em áreas de interface com o ambiente externo (Y KITAMURA *et al.*, 1977; L. C. YONG, 1997; HILL; MARTIN, 1998). Células

pleomórficas na histologia, os mastócitos podem ser redondos ou fusiformes, com 8 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e são comumente reconhecidos por seus grânulos metacromáticos citoplasmáticos que desempenham um papel fundamental em sua extensa gama funcional. Os mastócitos e seus grânulos podem ser melhor visualizados com técnicas de fixação apropriadas. Os métodos de coloração com azul de toluidina, orceína ácida-Giemsa e tipo Romanowsky fornecem excelente observação granular, enquanto as soluções de Carnoy ou Mota provaram ser mais eficazes do que a técnica de fixação de formalina para observação de mastócitos (SIMÕES; SCHONING, 1994a; WERNERSSEON; PEJLER, 2014; RIBATTI, 2018).

O amplo espectro de mediadores produzidos, armazenados e liberados pelos mastócitos depende de condições específicas de ativação dos receptores de superfície e exercem uma grande variedade de papéis biológicos fundamentais. Os principais receptores envolvidos na ativação dos mastócitos são o receptor IgE de alta afinidade (FceRI), o receptor do fator de crescimento de células-tronco (SCFR, também conhecido como KIT, receptor c-kit e CD117), os receptores IgG (Fc $\gamma$ RI, RIIA 7e RIII), os receptores Toll-like (TLR1-9) e uma grande quantidade de receptores de quimiocinas. Os mastócitos também são grandemente influenciados pelo microambiente circundante, permitindo que diferentes características do tecido induzam a expressão de uma ampla gama de mediadores biológicos (GALLI; SUSUMU NAKAE; MINDY TSAI, 2005; MOON *et al.*, 2010; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012).

Os mastócitos geralmente residem na pele e superfícies mucosas, pulmões, fígado, e trato gastrointestinal estrategicamente próximos aos alvos potenciais de seus mediadores, como glândulas, células musculares lisas, fibroblastos, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (MOON *et al.*, 2010). Em cães, a pele, o intestino, o fígado e o interdígito abrigam grandes quantidades de mastócitos enquanto que, em gatos, contagens mais altas de mastócitos foram encontradas nos pulmões, fígado, língua e trato gastrointestinal, especialmente na mucosa gástrica. Tanto em cães quanto em gatos, os mastócitos são numerosos na pele da orelha. A pele normal de cães geralmente apresenta 4 a 12 mastócitos por campo microscópico de alta potência (HPF) enquanto que, em gatos, a contagem de mastócitos varia entre 4 a 20 por HPF. Em ambos os casos, é comum encontrar mastócitos nas proximidades dos vasos sanguíneos superficiais da derme (KUBE *et al.*, 1998; AUXILIA; HILL, 2000; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

### 2.1.2 Origem e desenvolvimento

Diferentemente de outras células hematopoiéticas, os mastócitos não circulam nos vasos sanguíneos como células maduras. Os progenitores de mastócitos (MCP) se originam a partir de progenitores de granulócitos/macrófagos (GMP) ou diretamente de células-tronco hematopoiéticas (HSC) na medula óssea e migram através da circulação sistêmica até os tecidos periféricos onde se diferenciam. Os mastócitos maduros têm uma meia-vida mais longa do que outras células hematopoiéticas, permanecendo ativos por semanas e até meses, e mantêm sua capacidade de proliferar. O crescimento e a maturação dos mastócitos são amplamente influenciados pelo fator de células-tronco (SCF), fator de crescimento nervoso (NGF) e uma grande variedade de interleucinas (IL-3, 4, 9 e 10), especialmente IL-3. Além disso, a ativação do receptor c-kit inicia várias vias de sinalização envolvidas na proliferação, sobrevivência e migração celular (DVORAK, 1997; PITTONI *et al.*, 2011; GURISH; AUSTEN, 2012; DAHLIN; KRITAS *et al.*, 2013; KRITAS *et al.*, 2014; HALLGREN, 2015).

### 2.1.3 Função e heterogeneidade

Ativados por estímulos físicos (como o calor, a luz solar e o trauma físico), agentes infecciosos (como vírus, bactérias e fungos), substâncias imunogênicas (IgE, IgG, componentes do complemento, citocinas e fatores de crescimento), estímulos neurogênicos e diversos hormônios, os mastócitos estão intimamente envolvidos na defesa do hospedeiro contra patógenos, nas respostas imunes inata e adaptativa, na manutenção da homeostase, na resposta inflamatória, na remodelação tecidual, na proliferação de elementos celulares e na angiogênese. Essas habilidades notórias, no entanto, ocorrem tanto em eventos fisiológicos quanto patológicos e podem ser destrutivas para o hospedeiro, uma vez que os mastócitos podem também promover anafilaxia e crescimento do câncer (FROSSI; DE CARLI; PUCILLO, 2004; MARSHALL, 2004; THEOHARIDES; KALOGEROMITROS, 2006; THEOHARIDES *et al.*, 2012; KRITAS *et al.*, 2014; SHMUEL; CORTES, 2015; RIGONI; COLOMBO; PUCILLO, 2015; METCALFE *et al.*, 2016).

As diversas substâncias que são produzidas pelos mastócitos são as responsáveis pelo desempenho eficaz de suas funções biológicas. Os mediadores dos

mastócitos podem ser divididos em duas categorias básicas: (I) substâncias ativas pré-formadas estocadas em grânulos e liberadas por degranulação fragmentada (PMD) ou anafilática (AND) e (II) mediadores *de novo*, produzidos sob estimulação específica e liberados por vias alternativas, incluindo exocitose constitutiva e secreção exossômica (DVORAK *et al.*, 1994; METCALFE *et al.*, 2016; GAUDENZIO *et al.*, 2016). As substâncias biologicamente ativas pré-formadas consistem em aminas biogênicas (histamina e serotonina), enzimas, citocinas, peptídeos e proteoglicanos. Os mediadores recém-sintetizados incluem metabólitos do ácido araquidônico, como leucotrienos e prostaglandinas, fator de ativação plaquetária, quimiocinas, fatores de crescimento e diversas citocinas (DVORAK *et al.*, 1994; MOON; BEFUS; KULKA, 2014).

O conteúdo específico de cada grânulo de mastócitos depende da natureza do tecido onde os mastócitos amadureceram e de outras características ambientais, como a espécie, o estado de saúde e até mesmo a idade do organismo. A mesma regra é aplicável à produção e liberação de mediadores recém-sintetizados. Os mastócitos consistem em uma população heterogênea, cuja heterogeneidade pode ser gerenciada através de condições microambientais – citocinas, hormônios, células adjacentes – que influenciam diretamente a sua expressão genética, maturação e proliferação (ABRAHAM; ST. JOHN, 2010; MOON; BEFUS; KULKA, 2014).

Da mesma forma que acontece em humanos, os mastócitos felinos e caninos podem ser classificados pelo seu conteúdo de proteases como: mastócitos somente triptase, mastócitos somente quimase ou mastócitos ambos triptase e quimase (MCTC). Os cães carregam uma grande população de MCTC, que consiste em cerca de 70% de seus mastócitos cutâneos e pode ser subdividida pela sua interação com a formalina como sensíveis e resistentes à formalina (CAUGHEY *et al.*, 1988a; CAUGHEY *et al.*, 1988b; MOON *et al.*, 2010; CAUGHEY, 2011).

#### **2.1.4 Mastócitos e câncer**

Juntamente com uma grande variedade de células inflamatórias, os mastócitos são amplamente encontrados no microambiente tumoral. Embora o seu papel complexo no câncer ainda não esteja completamente elucidado, hipóteses sugerem os mastócitos promovam o crescimento tumoral principalmente através da estimulação da angiogênese, remodelação tecidual e proliferação celular. Mediadores

como (I) histamina e TNFA (TNF- $\alpha$ ) contribuiriam para a proliferação tumoral e imunossupressão do hospedeiro, (II) fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento transformador beta TGFB (TGF- $\beta$ ) e algumas interleucinas estariam intimamente envolvidas na progressão do câncer e na angiogênese (III) e a secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) poderia promover tanto a angiogênese quanto o potencial metastático (RIBATTI *et al.*, 2001; SYDNEY CH'NG *et al.*, 2006; DYDYCH; KACZMARCZYK; OKÓN, 2012;).

Além disso, alguns modelos experimentais sugerem um comportamento ambíguo dos mastócitos na sua atividade neoplásica: uma resposta anticancerosa poderia ser realizada através da redução da motilidade celular, estimulação imunológica e restrição do crescimento. O papel dos mastócitos na promoção ou inibição tumoral, portanto, dependeria do tipo de estímulo recebido e do estabelecimento de uma resposta apropriada (KHAZAIE *et al.*, 2011; RIBATTI, 2013; HODGES *et al.*, 2012).

## 2.2 MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

Os mastocitomas são um dos tipos mais comuns de tumores de células redondas em cães. São decorrentes da proliferação descoordenada de mastócitos neoplásicos nos tecidos conjuntivos e podem ocorrer na forma visceral, cutânea e subcutânea. Existe grande divergência em relação às abordagens de tratamento e prognóstico entre as formas conhecidas da doença e, atualmente, os critérios aplicados para predição prognóstica e formulação de tratamento foram estabelecidos para a forma cutânea (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; TAKAHASHI, 2000; THOMPSON *et al.*, 2011).

### 2.2.1 Incidência

Na literatura internacional, os mastocitomas cutâneos caninos (MCTs) representam até 21% de todos os tumores de pele que afetam cães e quase um terço de todas as malignidades caninas. No Brasil, esses tumores ocupam o segundo lugar entre as neoplasias malignas mais comumente diagnosticadas em cães, com uma incidência documentada de até 22,4% (DE NARDI *et al.*, 2022). Os animais



acometidos são principalmente idosos, com 7,5 a 9 anos de idade – embora poucos casos tenham sido relatados em cães com apenas 3 semanas de idade – e o comportamento biológico do tumor é extremamente variável. A extensão da sua malignidade não pode ser prevista sem exames diagnósticos complementares (LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004; BLACKWOOD *et al.*, 2012).

Embora a maioria dos MCTs se apresentem como nódulos únicos, até 14% de todos os cães afetados apresentam múltiplos tumores primários, especialmente para MCTs pouco diferenciados (LONDON; THAMM, 2020). A maioria das lesões ocorre no tronco e região posterior do corpo dos cães (50-60%), com destaque para região perineal e prepúcio. Afetam também os membros (25-40%), cabeça e pescoço (10-15%) e, menos comumente, locais extra cutâneos como conjuntiva, glândula salivar, nasofaringe, laringe, cavidade oral, trato gastrointestinal, ureter e medula espinhal (N. IWATA *et al.*, 2000; TAKAHASHI, 2000; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; OZAKI *et al.*, 2002; BAKER-GABB; HUNT; FRANCE, 2003; SFILIGOI *et al.*, 2005; WELLE *et al.*, 2008; GARRETT, 2014; FIFE *et al.*, 2011; MOORE *et al.*, 2017).

As taxas metastáticas dos MCTs podem chegar a 96% particularmente no caso de MCTs pouco diferenciados. As metástases ocorrem principalmente em linfonodos regionais, baço e fígado, podendo ainda envolver a medula óssea (LONDON; THAMM, 2020; DE NARDI *et al.*, 2022). Alguns estudos descrevem maior potencial metastático e comportamento especialmente agressivo para MCTs da região posterior e sítios extra cutâneos (HOTTENDORF; NIELSEN, 1968; NELSON; COUTO, 2009; HILLMAN *et al.*, 2010; BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020; DE NARDI *et al.*, 2022).

Os MCTs podem afetar cães de qualquer raça. Entretanto, cães braquicefálicos têm sido relatados como altamente predispostos, especialmente Boxers, Boston terriers, Bulldogs, Bullmastiffs, Pugs e Shar-peis. Da mesma forma, American Pit Bull Terrier, Bernese Mountain Dog, Cocker Spaniel, Dachshund, Doberman, Setter Inglês, Setter Irlandês, Golden Retriever, Labrador Retriever, Weimaraner e diferentes tipos de pastores foram relatados como propensos a desenvolver a doença. Outros estudos também incluem Australian Cattle Dog, Austrian Smooth-haired hound, Beagle, Beauceron, Dogo Argentino, Fox Terrier, Dogue Alemão, Parson Russel Terrier, Pyrenean Mountain Dog, Rhodesian Ridgeback, Schnauzer, Stanffordshire Bull terrier, Swiss Mountain Dog, Spaniel Tibetano e Vizsla na lista de raças predispostas (ROTHWELL *et al.*, 1987; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; BAKER-GABB; HUNT;

FRANCE, 2003; LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004; DOBSON; SCASE, 2007; WHITE *et al.*, 2011; BLACKWOOD *et al.*, 2012; WARLAND, J; DOBSON, 2013; LEIDINGER *et al.*, 2014; GRUNTZIG *et al.*, 2016; MOCHIZUKI *et al.*, 2016).

Pug, Boxer, Weimaraner, Golden Retriever e Shar-pei são relatados como predispostos a apresentar lesões múltiplas. Os Shar-pei também são propensos a desenvolver a doença em idade jovem (MILLER, 1995). Além disso, o Labrador Retriever e o Shar-pei são comumente afetados por MCTs cutâneos agressivos de alto grau (MILLER, 1995; MURPHY *et al.*, 2006; ŠMIECH *et al.*, 2017), enquanto o Pug e o Boxer são frequentemente afetados por tumores de baixo grau (DOBSON, 2013; ŠMIECH *et al.*, 2017; ŠMIECH *et al.*, 2017). Nenhuma predisposição sexual foi descrita para MCTs, mas ainda não está claro se os hormônios sexuais podem influenciar o comportamento do tumor (LONDON; THAMM, 2020).

### 2.2.2 Etiopatogenia

Embora os MCTs tenham sido intensamente investigados nas últimas décadas, uma etiologia definitiva ainda não foi estabelecida e a doença ainda é considerada multifatorial. Em alguns casos raros, inflamação crônica da pele, formação de cicatrizes, aplicação de irritantes cutâneos e carcinógenos tópicos foram associados ao desenvolvimento de MCTs. Poucos autores sugeriram ainda uma etiologia viral. No entanto, nunca foram encontradas partículas virais ou evidências de transmissão horizontal e as alterações genéticas demonstraram ser um aspecto etiológico mais confiável (DUNN; POTTER, 1957; GOVIER, 2003).

O receptor tirosina quinase transmembrana tipo III (KIT) está envolvido em uma variedade de funções biológicas celulares, como proliferação, sobrevivência, diferenciação, quimiotaxia, degranulação e migração, e é geralmente encontrado e restrito à membrana celular dos mastócitos normais (YARDEN *et al.*, 1987; WEBSTER *et al.*, 2007). Entretanto, alguns MCTs cutâneos caninos, principalmente os pouco diferenciados, superexpressam o receptor KIT e/ou apresentam imunomarcagem citoplasmática anormal para esta proteína (WEBSTER *et al.*, 2006; VUČIĆEVIĆ *et al.*, 2016). A expressão aberrante do *KIT* pode ou não estar associada a mutações. Mutações no domínio justamembrana do *KIT*, mais especificamente nos éxons 8, 11 ou 12, são capazes de promover a ativação constitutiva do KIT e, portanto, têm um papel na etiologia dos MCT cutâneos caninos (LONDON *et al.*, 1999; ZEMKE; YAMINI;

YUZBASIYAN-GURKAN, 2002; KIUPEL *et al.*, 2004; WEBSTER *et al.*, 2006; WEBSTER *et al.*, 2007; CASAGRANDE *et al.*, 2013; COSTA, 2015; VUČIĆEVIĆ *et al.*, 2016).

Maior incidência de mutações do *KIT* foi documentada em MCTs de grau III do que em graus I ou II, sugerindo que estão relacionadas a tumores pouco diferenciados (ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002). Além disso, as mutações foram associadas a um índice metastático mais elevado e ao aumento da expressão de Ki67 e de regiões organizadoras de nucleolares argirofílicas (AgNORs) (ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002; WEBSTER *et al.*, 2007). No entanto, pelo menos 60% de todos os MCTs não apresentam mutações no *KIT*, sugerindo que estas alterações genéticas não são a principal causa do desenvolvimento de MCTs e que outros fatores etiológicos – genéticos ou não – estejam envolvidos no crescimento e progressão dos MCTs (DOWNING *et al.*, 2002; ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2002; WEBSTER *et al.*, 2006; COSTA, 2015).

### **2.2.3 Apresentação clínica**

Como os MCTs se desenvolvem a partir da derme, sua aparência macroscópica se assemelha a vários tipos de doenças cutâneas primárias e secundárias, incluindo outros tumores. A manifestação comum dos MCTs é como uma doença de pele primária que pode se apresentar como nódulos solitários ou múltiplos, afetando menos frequentemente outros órgãos (O'KEEFE, 1990; MORRIS; DOBSON, 2001; LONDON; SEGUIN, 2003; MISDORP, 2004; WELLE *et al.*, 2008; NELSON; COUTO, 2009; LONDON; THAMM, 2020).

Embora os MCTs apresentem comportamento biológico altamente variável e sua aparência macroscópica não tenha significado prognóstico, a taxa de crescimento do tumor e outros aspectos clínicos associados estão frequentemente relacionados ao grau de diferenciação histológica (MULLINS *et al.*, 2006). Os MCTs bem diferenciados geralmente se apresentam como nódulos únicos, eritematosos e alopecicos, de crescimento lento, variando de 1 a 4 cm de diâmetro. Já os MCTs anaplásicos são geralmente lesões pruriginosas e eritematosas, muitas vezes ulceradas, circundadas por nódulos menores e de rápido crescimento (MACY, 1985; O'KEEFE, 1990; GOLDSCHMIDT; MORRIS; DOBSON, 2001; HENDRICK, 2002; WELLE *et al.*, 2008; NELSON; COUTO, 2009; BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON;

THAMM, 2020; GARRETT, 2014). Esses MCTs pouco diferenciados são invasivos e propensos a metastização (SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2016).

Os cães acometidos são geralmente encaminhados para avaliação clínica devido à própria massa cutânea. Entretanto, sinais clínicos locais causados pela liberação de mediadores dos mastócitos, como histamina, heparina e enzimas proteolíticas, ocorrem em até 50% dos casos. Coçar, esfregar, manipular ou causar qualquer tipo de trauma ao tumor pode causar reação inflamatória, irritação periférica, edema e desenvolvimento de pápula eritematosa nos tecidos circundantes, denominada sinal de Darier. Esses sinais são encontrados principalmente em tumores grandes e pouco diferenciados, mas não se restringem a eles (MACY, 1985; MORRIS; DOBSON, 2001; HENDRICK, 2002; LONDON; SEGUIN, 2003; NELSON; COUTO, 2009; BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020).

Além de efeitos locais, a degranulação dos mastócitos também pode causar comprometimento sistêmico. O hemograma completo dos pacientes costuma ser normal e anormalidades bioquímicas séricas são incomuns. Entretanto, eosinofilia, basofilia, mastocitemia, neutrofilia, trombocitose e anemia podem estar presentes. Coagulopatias, hemorragia, hipergamaglobulinemia e doença glomerular podem ocorrer à medida que a heparina e outras proteases começam a circular pela corrente sanguínea (DOBSON, 2001; HENDRICK, 2002; MISDORP, 2004; WELLE *et al.*, 2008; BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020). Em casos raros, o choque também pode ocorrer como consequência da liberação maciça de histamina. A liberação de histamina também pode resultar em ulceração gástrica e duodenal, levando a sinais clínicos secundários, como anorexia, vômito, hemorragia gastrointestinal, melena, dor abdominal e anemia. Embora tais complicações sistêmicas sejam restritas a MCTs agressivos, pouco diferenciados ou extensos, a ulceração gastrointestinal é um achado patológico presente em até 83% dos cães necropsiados e pode até ser acompanhada de peritonite em consequência de perfuração gástrica ou duodenal (DOBSON; SCASE, 2007).

#### **2.2.4 Abordagem diagnóstica**

O diagnóstico dos MCTs deve incluir três objetivos: (1) diagnóstico definitivo, (2) estadiamento clínico com documentação clara da presença ou ausência de doença

metastática e (3) documentação de qualquer sinal clínico de síndrome paraneoplásica (OWEN, 1980; BILLER *et al.*, 2016).

#### 2.2.4.1 Diagnóstico definitivo

Os MCTs podem ser facilmente diagnosticados por exame citológico de punção por agulha fina (PAFs) ou mesmo lâminas de *imprint*, uma vez que os mastócitos neoplásicos caninos podem assemelhar-se aos normais. Procedimentos de coloração corretos – como o tipo Romanowsky e o Novo Azul de Metileno – são capazes de revelar células redondas de tamanho pequeno a médio com núcleos ligeiramente excêntricos e grânulos citoplasmáticos metacromáticos. No entanto, os grânulos citoplasmáticos, características essenciais para o reconhecimento dos mastócitos, podem ser raros e/ou difíceis de corar, especialmente em MCT pouco diferenciados. Nestes casos, outras técnicas de coloração, como Wright-Giemsa ou azul de toluidina, podem ser úteis para revelar os grânulos (BAKER-GABB; HUNT; FRANCE, 2003; GOVIER, 2003; SLEDGE; WEBSTER; KIUPEL, 2006; STREFEZZI *et al.*, 2009; MACNEILL, 2011; BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020; BILLER *et al.*, 2016).

As PAFs devem ser sempre realizadas antes da excisão cirúrgica do tumor, pois o correto diagnóstico pré-operatório influencia no tipo e extensão da intervenção cirúrgica (BILLER *et al.*, 2016). A citologia é capaz de fornecer um diagnóstico preciso em até 96% dos casos de MCT cutâneos caninos (BAKER-GABB; HUNT; FRANCE, 2003) e até sugerir o grau de diferenciação celular com base na morfologia e nas características de coloração (SCARPA; SABATTINI; BETTINI, 2016; HERGT *et al.*, 2016; CAMUS, 2016). Scarpa *et al.* (2016) avaliaram a aplicabilidade do sistema de classificação de Kiupel na citologia aspirativa por agulha fina de 50 MCTs. Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos à excisão cirúrgica do tumor para classificação histológica e os resultados obtidos foram comparados. Ao final do estudo, a classificação citológica foi capaz de prever corretamente o grau histológico de 47 tumores. No entanto, dois casos (4%) de MCTs de alto grau foram subestimados pela técnica, o que representa uma limitação para a utilidade geral da classificação citológica (SCARPA; SABATTINI; BETTINI, 2016). Resultados semelhantes foram obtidos em estudo retrospectivo realizado por Hergt *et al.* (2016). Cinco dos 141 tumores tiveram seu grau histológico subestimado pela classificação citológica,

fazendo com que os autores questionassem a confiabilidade da técnica e a chamassem de “inadequada” para a avaliação do grau de diferenciação dos MCTs (HERGT *et al.*, 2016).

Em 2016, Camus *et al.* (2016) tiveram como objetivo criar um novo sistema de classificação citológica para MCTs com base nas características morfológicas das células neoplásicas. O novo sistema classificou como de alto grau os tumores com mastócitos apresentando poucos grânulos ou aqueles que apresentavam pelo menos 2 dos outros 4 achados: figuras mitóticas, células bi- ou multinucleadas, pleomorfismo nuclear ou anisocariose com variação de mais de 50% no tamanho nuclear. Cento e cinquenta e dois tumores foram avaliados e cães apresentando MCTs de alto grau foram 39 vezes mais propensos a morrer em um período de 2 anos, respectivamente, do que cães com MCTs de baixo grau. Tumores de alto grau também foram associados ao aumento da probabilidade de recorrência e de MCTs de novo. Embora os resultados tenham sido promissores, 31,8% dos tumores de baixo grau foram erroneamente classificados como de alto grau pela análise citológica, enquanto 1,6% dos tumores de alto grau foram considerados de baixo grau pela mesma técnica. Além disso, o novo sistema de classificação apresentou 88% de sensibilidade e 94% de especificidade, resultados que levantam dúvidas sobre a confiabilidade do método (CAMUS, 2016). De Nardi *et al.* (2022) sugerem que a classificação citológica é uma ferramenta promissora e fornece informações pré-operatórias importantes, mas que validações adicionais da técnica ainda são necessárias (DE NARDI *et al.*, 2022). A utilização do sistema de classificação proposto por Camus *et al.* é recomendado (CAMUS, 2016).

Quando necessária, a biópsia incisional permite um melhor planejamento de um procedimento cirúrgico definitivo após a obtenção de um prognóstico mais confiável (STREFEZZI *et al.*, 2009). Esta técnica é frequentemente realizada quando o tumor não pode ser completamente excisado de uma só vez, seja pela sua localização ou por outros aspectos clínicos, e deve ser realizada evitando áreas inflamadas ou necróticas. No entanto, um procedimento de biópsia incisional é bem mais caro que a citologia por PAF e pode ocorrer deiscência. É importante ter em mente também que a área da biópsia incisional deve ser totalmente removida numa eventual cirurgia definitiva (BLACKWOOD *et al.*, 2012).

Sempre que o diagnóstico de MCT for confirmado através de citologia e o tumor estiver em localização favorável para remoção cirúrgica, a biópsia excisional deve ser

realizada. A maioria dos MCTs bem ou moderadamente diferenciados podem ser curados por excisão cirúrgica. Após a ressecção, a classificação histológica e outras avaliações prognósticas são consideradas obrigatórias (GOVIER, 2003; BLACKWOOD *et al.*, 2012; DE NARDI *et al.*, 2022).

#### 2.2.4.2 Estadiamento clínico

O estadiamento apropriado deve ser realizado para definir o tratamento nos casos de MCT. Apesar do estadiamento pré-tratamento poder ser entendido como uma abordagem opcional para tumores bem diferenciados e tumores pequenos que apresentam crescimento lento, os MCTs pouco diferenciados podem metastatizar para linfonodos regionais, fígado, baço e medula óssea. Portanto, o estadiamento clínico é altamente recomendado, especialmente se um tratamento de longo prazo e de alto custo tiver sido planejado ou se um tumor pouco diferenciado tiver sido diagnosticado (ROGERS, 1996; MORRIS; DOBSON, 2001; HENDRICK, 2002; WELLE *et al.*, 2008; STREFEZZI *et al.*, 2009; BLACKWOOD *et al.*, 2012; GARRETT, 2014).

O processo de estadiamento clínico inicia-se com exame físico abrangente e análises clínicas com o objetivo de avaliar o estado geral do paciente, bem como procurar qualquer sinal de doença metastática. Devem ser realizados hemograma completo, perfil bioquímico, urinálise e exames complementares (BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020). O método de estadiamento mais usual para MCTs é o proposto pela Organização Mundial da Saúde (Quadro 1). O sistema de estadiamento da OMS exige os seguintes testes (OWEN, 1980): (I) citologia de linfonodos, (II) ultrassom abdominal seguido de citologia do baço e fígado sempre que estiverem aumentados ou houver evidência de metástase em linfonodos, presença de sinais sistêmicos e/ou MCT de grau III for diagnosticado, (III) radiografia torácica em três projeções, (IV) biópsia aspirativa de medula óssea caso haja suspeita de envolvimento.

É importante enfatizar que metástases nodais podem estar presentes mesmo que alterações no tamanho e na consistência do órgão não sejam detectáveis. Além disso, as citologias dos linfonodos podem ser difíceis de interpretar, uma vez que na maioria das vezes é difícil diferenciar mastócitos normais ou reativos dos neoplásicos. Porém, sempre que a estrutura histológica dos linfonodos estiver alterada, ou for visualizado um grande número de mastócitos, principalmente quando dispostos em

aglomerados e lençóis, ou apresentando alguma anormalidade morfológica, é muito provável que esteja ocorrendo doença metastática (FINORA *et al.*, 2006; WELLE *et al.*, 2008; BOOK *et al.*, 2011; BLACKWOOD *et al.*, 2012; GARRETT, 2014; WARLAND *et al.*, 2014).

Quadro 1 – Sistema de estadiamento para MCTs da OMS.

Estadio	Descrição
0	Um tumor incompletamente excisado da derme identificado histologicamente, sem envolvimento do linfonodo regional
	0a Sem sinais sistêmicos.
	0b Com sinais sistêmicos.
I	Um tumor confinado à derme sem envolvimento do linfonodo regional.
	Ia Sem sinais sistêmicos.
	Ib Com sinais sistêmicos.
II	Um tumor confinado à derme com envolvimento do linfonodo regional.
	IIa Sem sinais sistêmicos.
	IIb Com sinais sistêmicos.
III	Múltiplos tumores na derme, grandes/infiltrativos com ou sem envolvimento do linfonodo regional.
	IIIa Sem sinais sistêmicos.
	IIIb Com sinais sistêmicos.
IV	Qualquer tumor quando houver presença de metástase distante, incluindo medula óssea ou osso.

Fonte: Owen (1980).

### 2.2.5 Fatores prognósticos

É impossível indicar um único fator prognóstico para prever a resposta dos MCTs ao tratamento e desfecho geral da doença (WELLE *et al.*, 2008; BLACKWOOD *et al.*, 2012; GARRETT, 2014; LONDON; THAMM, 2020). Diversas informações precisam ser levadas em consideração como raça, idade e estado clínico geral do



paciente, localização do tumor, grau histológico do tumor e estadiamento clínico (DE NARDI *et al.*, 2018; KIUPEL *et al.*, 2011). Além disso, a má compreensão dos mecanismos de malignidade dos MCTs leva a constantes frustrações terapêuticas, o que tem estimulado a pesquisa sobre fatores prognósticos. Atualmente, os principais critérios para formulação prognóstica de MCTs são a classificação histológica e os índices de atividade proliferativa (KIUPEL *et al.*, 2011; SCASE *et al.*, 2006; ROMANSIK *et al.*, 2007; MARCONATO *et al.*, 2008; BELARTO *et al.*, 2015; CUYLEN *et al.*, 2016).

#### 2.2.5.1 Graduação histológica

O grau histológico ainda é o fator prognóstico mais confiável para MCTs. O sistema de classificação de Patnaik é o método mais comumente utilizado para esse fim. Através da avaliação de critérios histológicos como celularidade, morfologia celular e nuclear, atividade mitótica, invasividade e reação estromal, o sistema de classificação de Patnaik divide os MCTs em três grupos: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado) (Quadro 2). A maioria dos MCTs grau I apresenta comportamento benigno e bom prognóstico a longo prazo, acompanhado de baixa taxa de metástases. Os MCTs de grau I são frequentemente curados apenas pela excisão cirúrgica e dificilmente causam a morte do paciente. Por outro lado, os tumores grau III apresentam comportamento extremamente agressivo e taxa metastática de até 96%, causando, frequentemente, a morte do paciente (PATNAIK *et al.*, 1984; KIUPEL *et al.*, 2004; SCASE *et al.*, 2006; ROMANSIK *et al.*, 2007; MARCONATO *et al.*, 2008; WELLE *et al.*, 2008; KIUPEL *et al.*, 2011; BLACKWOOD *et al.*, 2012; GARRETT, 2014; LONDON; THAMM, 2020).

Quadro 2 – Critérios de graduação histológica segundo Patnaik *et al.* (1984).

Grau	Descrição
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bem diferenciado;</li> <li>• Mastócitos restritos à derme superficial, de formato arredondado, população homogênea, presença de grânulos citoplasmáticos;</li> <li>• Ausência de figuras de mitose;</li> <li>• Ausência ou presença mínima de edema e/ou necrose;</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moderadamente diferenciado;</li> <li>• Mastócitos infiltrados na derme superficial/profunda ou tecido subcutâneo, formato redondo a ovoide, presença de células gigantes e anisocariose, poucos grânulos citoplasmáticos, alguns aumentados e hiper Cromáticos;</li> <li>• Raras figuras de mitose (0 a 2 por campo de maior aumento);</li> <li>• Edema difuso e necrose são comuns;</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pouco diferenciado</li> <li>• Alta celularidade, invasão e substituição dos tecidos profundos e circundantes. Anisocariose intensa, pleomorfismo e presença de células gigantes. Muito poucos ou nenhum grânulo;</li> <li>• Figuras de mitose comuns (3 a 6 por campo de maior aumento);</li> <li>• Edema difuso e necrose são comuns;</li> </ul>

Fonte: Patnaik *et al.* (1984).

O comportamento dos MCTs moderadamente diferenciados, entretanto, é muito mais difícil de prever. Embora a maioria dos MCTs de grau II possam ser curados apenas com excisão cirúrgica, 5 a 22% metastatizam e até 56% podem causar a morte (BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020; DE NARDI *et al.*, 2018). Como a classificação histológica é uma ferramenta prognóstica muito subjetiva, o comportamento discrepante dos MCTs de grau II pode derivar do comprometimento da precisão diagnóstica causada pela falta de concordância entre os patologistas (STREFEZZI; XAVIER; CATÃO-DIAS, 2003; NORTHROP *et al.*, 2005). O sistema de classificação de Patnaik foi estabelecido em 1984 e não considerou MCTs subcutâneos primários. Com o passar dos anos, um grande número de MCTs subcutâneos caninos foram diagnosticados como grau II devido à sua localização. Entretanto, está comprovado que a maioria dos MCTs subcutâneos caninos

apresentam melhor prognóstico do que a maioria dos MCTs cutâneos caninos (THOMPSON *et al.*, 2011; MACNEILL, 2011; NORTHROP *et al.*, 2005; STEFANELLO *et al.*, 2015).

Em 2011, um sistema de classificação de dois níveis foi proposto por Kiupel *et al.* a fim de aumentar a concordância entre os patologistas, bem como melhorar a relevância prognóstica dos sistemas de classificação histológica dos MCTs. Este sistema de classificação divide os MCTs em dois grupos: alto e baixo grau (Quadro 3) (KIUPEL *et al.*, 2011).

Quadro 3 - Critérios de graduação histológica segundo Kiupel *et al.* (2011).

Grau	Descrição
Alto	<p>Tumores de alto grau são caracterizados pela presença de um ou mais dos seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Figuras mitose <math>\geq 7</math> em 10 campos de maior aumento;</li> <li>• Células multinucleadas com 3 ou mais núcleos <math>\geq 3</math> em 10 campos de maior aumento;</li> <li>• Núcleos aberrantes altamente atípicos <math>\geq 3</math> em 10 campos de maior aumento;</li> <li>• Cariomegalia em no mínimo 10% das células neoplásicas;</li> </ul>

Fonte: Kiupel *et al.* (2011).

O sistema de Kiupel aumentou a concordância entre patologistas em até 97% e muitos autores têm incentivado a utilização de ambos os sistemas de forma concomitante, visando melhorar a caracterização dos tumores grau II (NORTHROP *et al.*, 2005; BLACKWOOD *et al.*, 2012; STEFANELLO *et al.*, 2015). Vale lembrar que o grau histológico nunca deve ser utilizado isoladamente para avaliação prognóstica dos MCTs (WELLE *et al.*, 2008; BLACKWOOD *et al.*, 2012; GARRETT, 2014; LONDON; THAMM, 2020; DE NARDI *et al.*, 2022; BILLER *et al.*, 2016).

#### 2.2.5.2 Avaliação dos linfonodos para estadiamento

Considerando que os estadios 0 e 1 apresentam melhor prognóstico, a avaliação citológica e histológica dos linfonodos regionais deve ser sempre realizada.

A citologia dos linfonodos regionais fornece informações úteis sobre o *status* metastático dos MCTs, já que evidências apontam para o fato de que nenhuma metástase à distância ocorre em casos de MCT sem envolvimento preliminar do linfonodo local (WARLAND *et al.*, 2014). Além disso, a metástase nodal correlaciona-se com o grau do tumor, sendo classificada como indicador de pior prognóstico (KRICK *et al.*, 2009; WARLAND *et al.*, 2014; MUTZ *et al.*, 2017). Krick *et al.* (2009) relataram critérios citológicos que podem ser úteis para determinar metástases nodais (Quadro 4) (KRICK *et al.*, 2009).

Quadro 4 – Critérios citológicos para determinação da metástase de MCT em linfonodos regionais.

Grau	Descrição
Normal	Ausência de mastócitos
Hiperplasia linfoide reativa	> 50% de linfócitos pequenos com uma população mista de prolinfócitos, linfoblastos, células plasmáticas e/ou número pequeno a moderado de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos e/ou mastócitos individuais raros.
Possível metástase	2-3 mastócitos em agregados de 2-3 células em pelo menos uma lâmina.
Provável metástase	> 3 focos de mastócitos em agregados de 2-3 células e/ou 2-5 cinco agregados de mais de 3 mastócitos em pelo menos uma lâmina.
Metástase confirmada	Eliminação do tecido linfoide por mastócitos e/ou presença de mastócitos agregados e pouco diferenciados com pleomorfismo, anisocitose, anisocariose e/ou granulação diminuída ou variável e/ou > de 5 agregados de mais de 3 mastócitos em pelo menos um slide.

Fonte: KRICK *et al.* (2009).

A avaliação histológica dos linfonodos regionais pode ser importante para confirmar a ocorrência de metástase em casos de citologia sugestiva. Esta avaliação deve ocorrer mediante excisão cirúrgica do linfonodo suspeito e envio da amostra para análise da quantidade de mastócitos e grau de alteração morfológica do tecido (LONDON; THAMM, 2020). Weishaar *et al.* (2014) propuseram um sistema de classificação histológica conforme quadro abaixo (Quadro 5). Neste sistema, os

linfonodos suspeitos de metástase nos casos de MCT são classificados como não-metastáticos (HN0), pré-metastáticos (HN1), metástase incipiente (HN2) e metástase evidente (HN3). Neste estudo, cães com classificações mais elevadas apresentaram tempo de sobrevivência mais curtos em relação a cães com classificações mais baixas (WEISHAAR *et al.*, 2014).

Quadro 5 – Novo sistema de classificação para avaliação microscópica de metástase em linfonodo de cães com MCTs.

Classificação	Critérios histopatológicos	Interpretação proposta
HN0	0 a 3 mastócitos dispersos, individualizados (isolados) em seios (subcapsulares, paracorticais ou medular) e/ou no parênquima por campo no aumento de 400x, ou não atende aos critérios para qualquer outra classificação abaixo.	Não-metastático
HN1	Mais de 3 mastócitos individualizados (isolados) em seios (subcapsulares, paracorticais ou medulares) e/ou no parênquima em um mínimo de quatro campos no aumento de 400x.	Pré-metastático
HN2	Agregados (aglomerados) de mastócitos (3 ou mais células associadas) em seios (subcapsulares, paracorticais ou medulares) e/ou camadas parenquimatosas ou sinusoidais de mastócitos.	Metástase incipiente
HN3	Ruptura ou apagamento da arquitetura nodal normal por focos discretos, nódulos, camadas ou massas evidentes cuja composição seja mastócitos	Metástase evidente

Fonte: WEISHAAR *et al.* (2014).

### 2.2.5.3 Localização anatômica

A doença visceral e o envolvimento da medula óssea estão comumente associados a um mau prognóstico (TAKAHASHI, 2000; MARCONATO *et al.*, 2008). Também foi relatado que MCTs no focinho, região inguinal e áreas mucocutâneas são mais agressivos e estão associados a maior taxa metastática e pior prognóstico (GIEGER *et al.*, 2003; FIFE *et al.*, 2011; GARRETT, 2014).

#### 2.2.5.4 Padrões marcação imuno-histoquímica de KIT

MCTs que apresentam expressão aberrante da proteína KIT, duplicações internas em tandem de *KIT* ou mutações no domínio justamembranar estão associados a pior prognóstico (LONDON *et al.*, 1999; ZEMKE *et al.*, 2002; KIUPEL *et al.*, 2004; HILTON, 2005; WEBSTER *et al.*, 2006; WEBSTER *et al.*, 2007; CASAGRANDE *et al.*, 2013; COSTA, 2015; VUČIĆEVIĆ *et al.*, 2016; DOWNING *et al.*, 2002; LONDON *et al.*, 1996; ZEMKE; YAMINI; YUZBASIYAN-GURKAN, 2001; FONSECA-ALVES *et al.*, 2015). Os padrões de imunomarcação citoplasmática KIT (padrões KIT II e III) estão significativamente associados a metástases, recorrência tumoral e diminuição das taxas de sobrevida global e livre de doença (Quadro 6) (KIUPEL *et al.*, 2004).

Quadro 6 – Critérios para avaliação dos padrões de imunomarcação de KIT.

Padrão	Descrição
I	Padrão predominantemente membranar de localização da proteína KIT, com mínima presença no citoplasma.
II	Padrão de localização da proteína KIT citoplasmático focal a pontilhado.
III	Padrão de localização da proteína KIT citoplasmático difuso.

Fonte: KIUPEL *et al.* (2004).

#### 2.2.5.5 Marcadores de atividade proliferativa

A contagem de figuras mitóticas (FM) por 10 campos de maior aumento, usualmente referida como índice mitótico (IM), é uma ferramenta muito útil para predição prognóstica de MCTs. O IM se correlaciona com o grau histológico do tumor e também atua como um fator prognóstico independente, uma vez que o tempo médio de sobrevivência para cães com  $IM > 5$  muito menor (2 meses) do que para cães com  $IM \leq 5$  (70 meses) (ROMANSIK *et al.*, 2007). Recentemente, Bertram *et al.* (2022) desenvolveram um algoritmo de alta performance capaz de mitigar as discrepâncias inter e intraobservacionais no estabelecimento do índice mitótico, com uma redução

de falso-negativos de até 38% (BERTRAM *et al.*, 2022). Além disso, a relevância prognóstica da presença de figuras de mitose atípicas (FMA) foi estabelecida para MCTs. Bertram *et al.* (2023) estabeleceram um limiar prognóstico significativo de  $\geq 3$  por  $2,37 \text{ mm}^2$  para a contagem de FMA (sensibilidade: 76,9%, especificidade: 98,8%) e  $> 7,5\%$  para a relação FMA:MF (sensibilidade: 76,9%, especificidade: 100%) (BERTRAM *et al.*, 2022; BERTRAM *et al.*, 2023).

A detecção imuno-histoquímica da proteína Ki67, por sua vez, é amplamente utilizada para avaliação da atividade proliferativa em pesquisas básicas e de câncer. Essa fosfoproteína é necessária para manter os cromossomos dispersos no citoplasma durante a mitose e pode ser detectada em todas as fases ativas do ciclo celular (CUYLEN *et al.*, 2016; MACCALLUM, 2000; LIAN TAO LI *et al.*, 2015). Além disso, o índice de Ki67 provou ser um fator prognóstico independente do grau histológico para MCTs, e sua alta expressão (cut-off 1,8%) está associada à diminuição da sobrevida global, recorrência tumoral e metástase (WEBSTER *et al.*, 2007; SCASE *et al.*, 2006; MAGLENNON *et al.*, 2008; VASCELLARI *et al.*, 2012). Scase *et al.* (2006) observaram um risco aumentado de morte devido ao tumor em cães afetados por MCTs cujo índice de Ki67 foi superior a 1,8% (SCASE *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Maglennon *et al.* (2008).

As Regiões Argirofílicas Organizadoras Nucleolares (AgNORs) são subestruturas associadas à proliferação celular que transcrevem o RNA ribossômico e são demonstradas em cortes histológicos através de um método de coloração à base de prata (BLACKWOOD *et al.*, 2012). Em relação à avaliação prognóstica dos MCTs, Bostock *et al.* (1989) observaram que 73% dos cães apresentando uma contagem média elevada de AgNORs ( $> 4,9$ ) morreram em decorrência do tumor após intervenção cirúrgica, enquanto nenhum cão com uma contagem baixa de AgNORs ( $< 1,7$ ) morreu nem apresentou recorrência do tumor (BOSTOCK *et al.*, 1989). Outro estudo correlacionou a contagem de AgNORs superior a 2,25 com menor tempo de sobrevivência (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994). Bergman *et al.* (2004) e Scase *et al.* (2006) demonstraram que a contagem de AgNORs se correlaciona positivamente com os graus histológicos de Patnaik, índices de Ki67 e de PCNA, sugerindo aumento da atividade proliferativa com o grau e pode ser preditivo do comportamento clínico do tumor para MCTs caninos (BERGMAN *et al.*, 2004; SCASE, *et al.* 2006). A falta de padronização do protocolo e o fato de este ser um método trabalhoso de avaliação e de não fornecer informações adicionais às da graduação

histológica, levaram-no ao desuso (SCASE *et al.*, 2006; STREFEZZI *et al.*, 2009; BLACKWOOD *et al.*, 2012; DE NARDI *et al.*, 2022).

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) é uma proteína essencial envolvida na síntese de DNA cuja expressão aumentada está associada a alta taxa de mortalidade em MCTs (SCASE *et al.*, 2006; SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994). Simões *et al.* (1994) compararam três métodos prognósticos para avaliação de MCTs e atestaram que em um período de 6 meses, o PCNA foi o melhor fator prognóstico para recorrência tumoral, seguido pela classificação histológica e AgNORs (SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994). Scase *et al.* (2006) encontraram taxas de expressão mais altas de PCNA em MCTs de cães que morreram devido à doença e em tumores recorrentes/metastáticos, mas atestaram falha do PCNA em prever a sobrevivência do paciente (SCASE *et al.*, 2006). Além disso, as taxas de PCNA não foram independentes do grau histológico (BLACKWOOD *et al.*, 2012; SCASE *et al.*, 2006; SIMOES; SCHONING; BUTINE, 1994). Por ser expresso ao longo do ciclo celular em quantidades variáveis, os “cut-offs” necessários à sua quantificação introduzem certa subjetividade na avaliação, fazendo com que o PCNA fosse preterido pelo Ki67 na avaliação da atividade proliferativa tumoral (BLACKWOOD *et al.*, 2012; SCASE *et al.*, 2006; STREFEZZI *et al.*, 2010).

#### 2.2.5.6 Outros fatores

Vários outros fatores prognósticos têm sido estudados nas últimas décadas. Embora alguns tenham falhado no seu propósito de prever o desfecho da doença, outros apresentaram resultados muito interessantes. A análise morfométrica nuclear de mastócitos neoplásicos foi avaliada pela primeira vez por Strefezzi, Xavier e Catão-Dias (2003) em vinte e quatro esfregaços citológicos nos quais foram analisadas diferenças nos valores de área, diâmetro médio e perímetro nuclear de mastócitos neoplásicos. Os resultados obtidos se correlacionaram positivamente com o grau histológico dos tumores. Pacientes com mastócitos neoplásicos apresentando área nuclear média  $\geq 62,39 \mu\text{m}^2$  apresentaram menor sobrevida e maiores chances de morte em função da doença (STREFEZZI *et al.*, 2009). Além disso, a avaliação da variabilidade intra- e interobservador não detectou falhas no método, concluindo que a análise morfométrica nuclear em MCTs utilizando esfregaços citológicos é



reprodutível e pode ser usada como técnica auxiliar para classificação de tumores (BARBOSA; PARAVENTI; STREFEZZI, 2014).

NANOG e OCT4 são fatores-chave de pluripotência que são normalmente expressos em células-tronco embrionárias, frequentemente associados à carcinogênese e ao mau prognóstico quando expressos em células-tronco cancerosas (XIN YIN *et al.*, 2015). Os MCTs apresentaram imunomarcagem positiva para ambos os fatores. No entanto, a sua expressão não apresentou correlação com atividade proliferativa, grau histológico, sobrevivência pós-cirúrgica ou mortalidade em função da doença. Dessa forma, tanto NANOG quanto OCT4 não são considerados fatores prognósticos confiáveis para MCTs. Ainda assim, poderiam ser utilizados como alvo terapêutico (VARGAS *et al.*, 2015; JOSELEVITCH *et al.* 2018).

A invasão tecidual dos MCTs depende de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são enzimas proteolíticas capazes de degradar a MEC (LEIBMAN *et al.*, 2000; GIANTIN *et al.*, 2012; PULZ; STREFEZZI, 2017). A expressão de MMP2, MMP9, TIMP2 e VEGFA já foi determinada e correlacionada positivamente com o grau histológico dos MCTs, sugerindo sua interdependência com o status de malignidade do tumor (LEIBMAN *et al.*, 2000; GIANTIN *et al.*, 2012). Alta expressão de TIMP1 (cut-off 22,9%) também foi observada em cães com MCT e foi associada a maior tempo de sobrevida, sugerindo o papel do TIMP1 como fator prognóstico para este tipo de neoplasia (PULZ; STREFEZZI, 2017; PULZ, *et al.*, 2017).

## 2.2.6 Tratamento

A tomada de decisão para o tratamento de MCTs é um assunto crítico, uma vez que estes tumores são conhecidos por causarem grandes frustrações terapêuticas. A abordagem do tratamento deve considerar a presença de fatores prognósticos negativos, a condição clínica do paciente, o grau histológico e o estadiamento do tumor, e a localização para definir se a excisão cirúrgica é possível ou não, e se algum outro tipo de terapia é adequado e necessário (BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020; DE NARDI *et al.*, 2022).

### 2.2.6.1 Cirurgia

A excisão cirúrgica ainda é considerada o tratamento de escolha para MCTs, embora a terapia adjuvante seja apropriada para MCT com alto risco de metástase. Considerando que os mastócitos podem degranular devido à manipulação cirúrgica, a administração perioperatória de bloqueadores H1 e H2 é recomendada para a ressecção de grandes tumores, com o objetivo de reduzir os efeitos locais e sistêmicos (BLACKWOOD *et al.*, 2012). Apesar de nem todos os veterinários indicarem cirurgia em casos de metástases nodais ou viscerais confirmadas, um estudo recente sugere que a excisão ou redução do volume do tumor primário acompanhada de tratamento adjuvante é benéfica para pacientes que apresentam doença metastática, sendo capaz de prolongar o tempo médio de sobrevivência em até 10 meses quando comparado com pacientes submetidos apenas ao tratamento medicamentoso (MILLER *et al.*, 2016).

A recomendação clássica para margens cirúrgicas adequadas é de excisão com margem de 3 cm de tecido circundante e remoção de pelo menos um plano fascial profundo (GOVIER, 2003; BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020). No entanto, Fulcher *et al.* (2006) observaram que a excisão cirúrgica de MCTs de grau I e II com margens laterais de 2 cm acompanhada pela remoção dos planos fasciais profundos resultou na excisão completa de 91% dos tumores e proporcionou resultados clínicos semelhantes aos encontrados em cães tratados com excisão cirúrgica mais ampla MCTs de baixo grau (FULCHER *et al.*, 2006). A técnica de Fulcher é a abordagem cirúrgica mais comumente utilizada para MCTs de grau I e II atualmente (PRATSCHKE *et al.*, 2013).

Após a excisão cirúrgica, as margens laterais e profundas devem ser avaliadas para definir se as células cancerosas são encontradas nas bordas da ferida cirúrgica ou não. A avaliação histológica das margens cirúrgicas classifica a excisão tumoral em três categorias: completa, completa mas próxima e incompleta (Quadro 7). A localização do tumor pode dificultar a excisão completa do tumor, bem como o aumento do tamanho do tumor, a diminuição do peso corporal do paciente e a falta de habilidade dos cirurgiões (MONTEIRO; BOSTON; MONTEITH, 2011).

Quadro 7 – Avaliação histológica das margens cirúrgicas.

Excisão cirúrgica completa	Os mastócitos não podem ser encontrados dentro de 1 mm da margem cirúrgica;
Excisão cirúrgica completa com margens próximas	Os mastócitos podem ser encontrados dentro de 1 mm da margem cirúrgica;
Excisão cirúrgica incompleta	Os mastócitos podem ser encontrados na margem cirúrgica;

Fonte: BLACKWOOD *et al.* (2012)

De acordo com os resultados da avaliação histológica das margens cirúrgicas, tratamento complementar adicional pode ser recomendado. A abordagem cirúrgica tem valor curativo para MCTs de grau I e II e nenhuma terapia adjuvante é necessária sempre que a excisão cirúrgica é completa, a menos que doença metastática pré-existente ou fatores prognósticos negativos sejam detectados. Quando as margens cirúrgicas são incompletas, recomenda-se uma segunda excisão da cicatriz cirúrgica (margens laterais de 2 cm) e/ou terapia adjuvante, como radio- e quimioterapia, uma vez que a taxa de recorrência de MCTs excisados incompletamente varia de 18 a 23% (BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020; MILLER *et al.*, 2016). No entanto, nenhuma melhoria nos resultados foi associada ao tratamento de MCT grau II não metastático com qualquer terapia adjuvante, sugerindo que monitorar o local da cirurgia para detectar quaisquer sinais de recorrência local é mais apropriado do que submeter o paciente a tratamentos, procedimentos e custos desnecessários (VINCENZI; FINDJI, 2017).

#### 2.2.6.2 Quimioterapia

A quimioterapia pode ser indicada como tratamento adjuvante após a excisão cirúrgica de MCTs para prevenir, tratar ou retardar a progressão da doença metastática (KITAMURA *et al.*, 1977; L. C. YONG, 1997). Para margens cirúrgicas incompletas, deve ser utilizada apenas quando for detectada recorrência da doença ou quando doença metastática prévia já estiver estabelecida (VINCENZI; FINDJI,

2017). MCTs grau III ou MCTs que apresentam fatores prognósticos negativos devem ser tratados com terapia adjuvante, incluindo quimioterapia (BLACKWOOD *et al.*, 2012; LONDON; THAMM, 2020; VINCENTI; FINDJI, 2017).

Os medicamentos mais utilizados para tratamento de MCTs são vimblastina, lomustina e prednisona/prednisolona, geralmente em associação, ou em combinação com ciclofosfamida, clorambucil, vincristina e hidroxiureia (WELLE *et al.*, 2008; BLACKWOOD *et al.*, 2012; GARRETT, 2014; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; MORRIS; DOBSON, 2001; NELSON; COUTO, 2009; LONDON; THAMM, 2020; GOVIER, 2003; TAYLOR *et al.*, 209; RASSNICK *et al.*, 2010). Embora o tratamento de primeira linha frequentemente consista na associação de vimblastina e prednisolona seguida pela administração de lomustina como tratamento de segunda linha, protocolos que alternam vimblastina e lomustina também são amplamente utilizados (BLACKWOOD, 2011).

Foi comprovado que a prednisona oral (1mg/kg PO SID por 28 dias) tem alguma atividade para o tratamento de MCTs de grau II e grau III, já que cinco dos 25 tumores inscritos (20%) responderam à abordagem terapêutica sistêmica (MCCAW *et al.*, 1994). Outro estudo envolveu quarenta e um pacientes com MCT grau II e grau III tratados com um protocolo combinando prednisona oral com vimblastina injetável. Prednisona oral foi administrada por 12-26 semanas (2mg/kg diários) e um bolus intravenoso de vimblastina foi administrado a cada 1-2 semanas (2mg/m<sup>2</sup>). A taxa de resposta global foi de 47% para doenças macroscópicas e 57% para doenças microscópicas. Os resultados sugeriram a eficácia da combinação prednisona e vimblastina e também reforçaram a importância da excisão cirúrgica para o tratamento de MCTs, uma vez que a taxa de resposta e o intervalo livre de doença foram maiores quando o protocolo foi utilizado como terapia adjuvante (grupo de doença microscópica) (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999). O mesmo protocolo também aumentou o intervalo livre de doença e o tempo de sobrevivência quando aplicado como terapia adjuvante para MCTs de alto risco (THAMM; TUREK; VAIL, 2006).

A lomustina foi administrada a 19 cães com doença mensurável em dose oral única de 90 mg/m<sup>2</sup> a cada 3 semanas. Cada paciente recebeu de uma a doze administrações (média de 3 administrações) e a taxa de resposta global foi de 42%. O protocolo foi bem tolerado por todos os pacientes, exceto quatro, que tiveram que reduzir a dosagem de lomustina para 70 mg/m<sup>2</sup> devido a efeitos adversos como neutropenia e febre (RASSNICK *et al.*, 1999). A associação de lomustina e vimblastina

foi administrada a cada 2 semanas durante 4 a 6 ciclos, alternando entre os dois medicamentos (lomustina por via oral, dose média de 59 mg/m<sup>2</sup>; vimblastina por via intravenosa, 2 mg/m<sup>2</sup>). Como a taxa de resposta (57%) e o tempo de sobrevida global (35 semanas) foram favoráveis para a doença macroscópica, a associação foi considerada adequada e promissora para o tratamento de MCTs cutâneos caninos (COOPER, M; XINRU TSAI; BENNETT, 2009). Em um estudo retrospectivo mais recente, pacientes com MCTs de grau II foram tratados com prednisona (40 mg/m<sup>2</sup> PO a cada 24 horas por 2 semanas, 20 mg/m<sup>2</sup> PO a cada 24 horas por 2 semanas e depois 20 mg/m<sup>2</sup> PO a cada 48 horas até o final do protocolo) e vimblastina (2 mg/m<sup>2</sup> IV) alternadas com lomustina (60-80 mg/m<sup>2</sup> PO a cada 2 semanas), e apresentaram boa tolerância ao protocolo. Neste estudo, o intervalo livre de doença e o tempo médio de sobrevida foram superiores a 3 anos (LEJEUNE *et al.*, 2015).

A associação de vimblastina, ciclofosfamida e prednisona (VCP) foi avaliada em um estudo retrospectivo que envolveu 35 cães (CAMPS-PALAU *et al.*, 2007). A prednisona (1 mg/kg SID PO) foi reduzida gradualmente e descontinuada ao longo de 24-32 semanas. Vimblastina (2-2,2 mg/m<sup>2</sup> em bolus IV rápido) foi administrada a cada 3 semanas, no dia 1 do protocolo de 21 dias, e ciclofosfamida (200-250 mg/m<sup>2</sup> PO ou bolus rápido IV) foi administrada a cada 3 semanas, a partir de dia 8 a 11, ou 8 apenas no protocolo de 21 dias. Um bolus de furosemida (2,2 mg/kg IV) foi administrado juntamente com cada administração intravenosa de ciclofosfamida. Cães com MCT grau III e doença macroscópica tiveram uma taxa de resposta de 64% e sobrevida global de 145 dias, enquanto cães com doença microscópica sobreviveram por mais de 2.092 dias (CAMPS-PALAU *et al.*, 2007).

#### 2.2.6.3 Eletroquimioterapia

A eletroquimioterapia (ECT) baseia-se na combinação de pulsos elétricos com administração de quimioterápicos, como cisplatina e bleomicina, para o tratamento de tumores, visando aumentar o efeito citotóxico local (SPUGNINI *et al.*, 2006; KODRE *et al.*, 2009; SPUGNINI *et al.*, 2011). O papel da ECT no tratamento de MCTs já foi avaliado por alguns autores, que relataram respostas completas e parciais após administração de bleomicina como terapia adjuvante após excisão cirúrgica incompleta, e cisplatina após excisão cirúrgica incompleta e como tratamento de primeira linha (KODRE *et al.*, 2009; SPUGNINI *et al.*, 2011). Os efeitos da

eletroquimioterapia (ECT) em MCTs caninos foram avaliados como tratamento de primeira linha ou como terapia adjuvante com bleomicina (15.000 UI IV/m<sup>2</sup>) (LOWE *et al.*, 2017). Quinze casos foram tratados apenas com ECT, 11 casos receberam ECT transoperatório, 14 casos foram tratados com ECT como terapia adjuvante após a cirurgia e 11 casos receberam ECT após recorrência do tumor. Não foram relatados sinais de toxicidade significativa e a taxa de resposta completa foi maior para cães que receberam ECT como terapia adjuvante após a cirurgia (93%). No entanto, foram observadas respostas satisfatórias e favoráveis em todos os grupos estudados, reforçando a ideia de que a ECT deve ser levada em consideração para o tratamento de MCTs caninos (LOWE *et al.*, 2017).

#### 2.2.6.4 Radioterapia

Historicamente, a radioterapia tem sido utilizada como abordagem terapêutica para pacientes com MCT como terapia adjuvante antes da intervenção cirúrgica visando redução tumoral, para controle local de tumores de grau II alto grau e grau III excisados incompletamente e para o tratamento de metástases nodais regionais (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999; MAYER, 2006). Foi relatado que a radioterapia adjuvante apresenta resultados muito favoráveis. O uso de radiação de cobalto (54 Gy) para o tratamento de 32 MCTs grau II estadio 0 resultou em uma taxa livre de doença de 94% no primeiro ano de tratamento e 86% após 2-5 anos (LOWE *et al.*, 2017). Em outro estudo, 19 MCTs de estadio 2 foram tratados com radioterapia adjuvante antes da cirurgia e irradiação do linfonodo regional (48-57 Gy), resultando em uma sobrevida média livre de doença de 1240 dias (CHAFFIN; THRALL, 2002).

#### 2.2.6.5 Inibidores da tirosina quinase

Os receptores tirosina quinases (RTK) são receptores de membrana celular responsáveis pela ligação específica às proteínas tirosina quinase, ativando uma variedade de genes que promovem a proliferação, crescimento, sobrevivência, angiogênese e motilidade celular (BLACKWOOD *et al.*, 2012; BLACKWOOD, 2011). Além de suas funções fisiológicas, os RTKs também promovem carcinogênese e metástase, especialmente quando estão presentes mutações que aumentam sua função. Como afirmado anteriormente, mutações no gene c-KIT levam à ativação

independente do ligante do receptor tirosina quinase KIT e esta ativação anormal está associada ao desenvolvimento de MCTs cutâneos caninos. Os inibidores de tirosina quinase de baixo peso molecular (TKIs) competem com o ATP no seu sítio de ligação dentro do domínio TK, impedindo a ativação da via de sinalização RTK envolvida na proliferação celular e na angiogênese (BLACKWOOD *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2026; TAKEUSHI; ITO, 2011). Fosfato de toceranibe (Palladia®) e Masitinibe (Masivet® e Kinavet®) são os TKIs mais comumente usados para o tratamento de MCTs.

### 2.3 MICROAMBIENTE TUMORAL

Nas últimas décadas, pesquisas a respeito do desenvolvimento e progressão do câncer vêm revelando características moleculares, bioquímicas e celulares que são compartilhadas por grande parte dos tumores e possibilitam seu desenvolvimento (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN, 2022). Diversas linhas de pesquisa apontam que o desenvolvimento tumoral é um processo de múltiplas etapas que se traduzem em alterações genéticas que transformam progressivamente células normais em células malignas. Além disso, os tumores vem sendo cada vez mais reconhecidos como estruturas extremamente complexas que se comparam ou até mesmo superam a complexidade dos tecidos normais. A partir dessa perspectiva, podemos entender o câncer como um conjunto de células especializadas suportadas por um microambiente tumoral construído durante o curso da carcinogênese.

Atualmente, são apontadas oito características biológicas marcantes que, adquiridas durante a transformação celular maligna, culminam no desenvolvimento das neoplasias: (I) sinalização proliferativa sustentada; (II) evasão de supressores de crescimento; (III) resistência à morte celular; (IV) potencial de imortalidade replicativa; (V) indução da angiogênese; (VI) ativação da habilidade de invadir e metastatizar; (VII) reprogramação do metabolismo energético; e (VIII) evasão da destruição imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN, 2022). O desbloqueio da plasticidade fenotípica e a senescência celular foram recentemente propostos como características biológicas marcantes emergentes (HANAHAN, 2022).

A sustentação da sinalização proliferativa remete ao fato de que, durante o processo de transformação maligna, as células cancerosas tornam-se capazes de

estimular o microambiente tumoral a produzir mais fatores de crescimento necessários para o seu crescimento e proliferação, além de gerar estímulo proliferativo autócrino a partir da ativação de oncogenes codificadores de fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimentos, proteínas transdutoras de sinais e proteínas reguladoras nucleares. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (ILGF1), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de transformação de crescimento beta (TGFB) e a interleucina-2 (IL-2) são proteínas promotoras da proliferação celular intimamente relacionadas com a progressão do câncer. Os receptores de fatores de crescimento, por sua vez, pertencem à categoria dos receptores transmembrana tirosina quinase (RTKs) e ativam suas respectivas cascatas de sinalização intracelular. O receptor de PDGF (PDGFR) e o receptor do fator de células-tronco (KIT) fazem parte deste grupo (HANAHAN, 2011).

O potencial de imortalidade replicativa das células cancerosas, por sua vez, resulta de mecanismos de evasão da apoptose e de evasão da senescência através da atividade acentuada da telomerase. Uma vez que a proliferação errática das células cancerosas depende do adequado aporte de oxigênio e nutrientes, é justo sugerir que a indução da angiogênese caminha lado a lado com o potencial replicativo ilimitado. A neovascularização do microambiente tumoral ocorre principalmente em resposta à hipóxia, que estimula a ação do fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF1A) e promove a ação de diversas citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA). A indução da angiogênese no contexto do câncer também pode ocorrer pela ação de proteases que degradam a matriz extracelular, como é o caso da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) (KUSEWITT, 2013; ALBERTS, 2017).

Além da proliferação e da angiogênese, as interações entre as células cancerosas e o microambiente tumoral também pode levar à ativação da habilidade de invadir e metastatizar. Uma característica muito importante das células cancerosas no que diz respeito à invasão tecidual é a perda da capacidade adesão intercelular, que ocorre principalmente pela perda da E-caderina. Esta incapacidade de adesão geralmente está relacionada com um processo chamado transição epitelial-mesenquimal (EMT), no qual células de origem epitelial desregulam seus sistemas de adesão e adquirem um fenótipo mesenquimal, que aumenta sua capacidade de migração. Diversos fatores transcricionais de ação pleiotrópica encontram-se envolvidos na EMT, com o é o caso de Snail, Slug, Twist e Zeb1/2. Além disso,



diversas enzimas da classe das metalopeptidases – como adamalinas, metaloproteinases de matriz e astacinas – e da classe das amina oxidases – como as lisil oxidases – já foram identificadas como promotoras da EMT (KALLURI, 2009; PIL-GU PARK *et al.*, 2017; XIJIA ZHU *et al.*, 2020; XUEQIAN HU *et al.* 2023).

As neoplasias originam-se da proliferação indiscriminada das células cancerosas. Este comportamento de proliferação e resistência à morte propicia e sustenta a transformação maligna das células cancerosas, tendo início a partir de alterações genéticas e epigenéticas. Entretanto, é a partir das interações estabelecidas entre as células cancerosas e o microambiente tumoral que o desenvolvimento e progressão do câncer alcançam sucesso. O microambiente tumoral é definido como o espaço no qual uma extensa população celular – como fibroblastos associados ao tumor e células imunológicas – e a matriz celular coexistem com as células cancerosas. Este é considerado um ambiente especializado, que responde às demandas apresentadas pelo câncer inibindo ou promovendo sua progressão (PIL-GU PARK *et al.*, 2017; XIJIA ZHU *et al.*, 2020; HANAHAN, 2022; XUEQIAN HU *et al.*, 2023).

### **2.3.1 Fibroblastos associados ao câncer**

Dentre os constituintes celulares encontrados no microambiente tumoral, os fibroblastos se sobressaem como a maior população encontrada. Esse grupo heterogêneo de células estromais realiza funções bastante importantes no processo da carcinogênese, sobretudo a subpopulação com fenótipo miofibroblástico que é conhecida como “fibroblastos associados ao câncer” (do inglês “*cancer associated fibroblasts*” ou CAFs) (HANAHAN; COUSSENS, 2012). Embora outros tipos celulares como adipócitos e células endoteliais possam dar origem aos CAFs, é comum que estes sejam advindos de fibroblastos residentes no leito tumoral. A injúria é o gatilho principal para a transformação dos fibroblastos em miofibroblastos e as células tumorais estimulam essa secreção através de fatores secretados como TGFB, PGDF e FGF2. Muitos reguladores associados à malignidade tumoral encontram-se superexpressos nos CAFs como os receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs), a gelatinase e a vimentina (ANDERSON; SIMON, 2020). Os CAFs produzem a maior parte dos componentes extracelulares no microambiente tumoral, influenciando diretamente na proliferação, metástase, angiogênese,

remodelamento da matriz extracelular e imunossupressão. Além disso, os CAFs colaboram com a transição epitelial-mesenquimal e metástase através da superexpressão de TGFB e MMP3 (HANAHAN; COUSSENS, 2012; ANDERSON; SIMON, 2020).

## 2.4 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (MEC) consiste em uma elaborada rede tridimensional de macromoléculas responsável pela manutenção da homeostasia tecidual. Constituída essencialmente por proteínas reticuladas e glicosiladas embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídeos, a MEC promove suporte físico fundamental para a preservação da integridade funcional e mecânica dos tecidos (HYNES, 2009; ROZARIO; DESIMONE, 2010; HYNES; NABA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Além disso, por atuar como reservatório de diversos fatores de crescimento e moléculas biologicamente ativas, a MEC é capaz de modular um amplo espectro de funções celulares, como a diferenciação, o crescimento, a aderência, a proliferação, a migração e a apoptose (DAVIS; SENGER, 2005; FREEDMAN *et al.*, 2015; SMITH; CHO; DISCHER, 2018).

### 2.4.1 Estrutura e Função

Devido à sua natureza dinâmica, as propriedades bioquímicas e biomecânicas da MEC se adequam à necessidade das células, tecidos e regiões aos quais pertence (YUE, 2014). Em contrapartida, interações entre a MEC e as células circundantes são capazes de alterar o comportamento celular, uma vez que sinalizam mudanças de ordem físico-químicas que ocorrem no ambiente extracelular (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Vale ressaltar que o equilíbrio estrutural da MEC, bem como suas particularidades morfológicas, moleculares e funcionais, dependem de um delicado balanço entre síntese, depósito e degradação, que resulta da atividade das células circundantes e de sua resposta às modificações ambientais (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; NEVE *et al.*, 2014).

Há dois tipos de MEC: (I) a matriz intersticial, que é menos especializada e promove suporte estrutural, sendo majoritariamente composta por colágenos, fibronectina, elastina e proteoglicanas; e (II) a membrana basal, que consiste em um

tapete molecular complexo geralmente associado a células epiteliais e endoteliais, cuja função primordial é separar o epitélio do estroma circundante, controlando a organização e diferenciação celular. É basicamente constituída por colágeno do tipo IV, lamininas, entactina, sulfato de heparana e fibras de colágeno contínuas ao tecido conjuntivo, e exerce suas funções através de diferentes receptores que se ligam às proteínas da MEC (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; NEVE *et al.*, 2014).

Além de atuar como alicerce mecânico para desenvolvimento e organização celular, a MEC exerce ainda uma grande variedade de funções essenciais à manutenção da viabilidade funcional e estrutural dos tecidos: (I) previne a ocorrência lesões, conferindo aos tecidos propriedades elásticas e alta resistência à tração; (II) atua como barreira química, tamponando o meio extracelular, e física, retendo umidade e retardando a entrada de microrganismos devido à sua consistência viscosa; e (III) atua diretamente nas vias de reparação celular e tecidual, regulando as funções metabólicas das células e transmitindo informações essenciais para a sobrevivência (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; FILIPE; CHITTY; COX, 2018).

Nas últimas décadas, o sequenciamento genômico de diversas espécies do reino animal possibilitou a identificação e a análise dos componentes moleculares presentes na MEC (HYNES, 2009; ROZARIO; HYNES; NABA, 2012). Em mamíferos, algo em torno de 300 proteínas já foram identificadas, além de uma grande diversidade de receptores e fatores solúveis. As proteínas que compõem a MEC podem ser classificadas em: (I) proteínas fibrosas; (II) proteínas adesivas, (III) proteínas não-fibrosas; e (IV) proteínas não-estruturais, também conhecidas como proteínas matricelulares (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; NEVE *et al.*, 2014; FILIPE; CHITTY; COX, 2018).

#### 2.4.1.1 Proteínas Fibrosas

Os colágenos são proteínas fundamentais à constituição da MEC, sendo responsáveis por boa parte de suas atribuições físicas (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Nos organismos vertebrados, a superfamília dos colágenos é formada por 28 tipos proteicos, que chegam a representar até 30% do total das proteínas encontradas em mamíferos. Produzidos por fibroblastos e diversos outros tipos celulares, os colágenos possuem uma estrutura alongada, formada por três

subunidades de cadeias polipeptídicas. Essas subunidades unem-se através de pontes de hidrogênio e sua estabilidade sofre influência de outras pequenas interações químicas. Organizados no formato de tripla hélice, todos os membros da superfamília dos colágenos possuem uma sequência que se repete – Gly-X-Y – composta por uma glicina (Gly, G) e por resíduos de prolina (Pro, P – na posição X) e 4-hidroxiprolina (Hyp – na posição Y) (KADLRE *et al.*, 2007; GORDON; HAHN, 2010; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; RICARD-BLUM, 2011).

Os colágenos presentes nos organismos vertebrados são denominados por de numerais romanos (I à XXVIII) e classificados de acordo com sua função e organização supramolecular (RICARD-BLUM, 2011). Os colágenos formadores de fibrilas (I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII) são a principal fonte de resistência à tração nos tecidos animais. Em mamíferos, sua síntese proteica envolve a participação de 11 genes que dão origem a pró-colágenos contendo pró-peptídeos em suas porções N- e C-terminais. Esses pró-colágenos necessitam ser clivados por N- e C-proteinases (como a BMP1 e a ADAMTS2, por exemplo) para tornarem-se de fato colágenos (KADLRE *et al.*, 2007). Os colágenos associados a fibrilas (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII), por outro lado, não formam fibrilas, mas associam-se à superfície dos colágenos formadores de fibrilas através de ligações covalentes, formando conexões (GORDON; HAHN, 2010). Por fim, os colágenos formadores de redes (IV, VI, VIII e X) constituem estruturas tridimensionais e redes hexagonais, enquanto outros tipos de colágeno formam filamentos esféricos (VI), fibrilas de ancoragem (VII) ou domínios transmembrana (XIII, XVII) (RICARD-BLUM, 2011).

A elastina, por sua vez, é uma proteína fibrosa extremamente dinâmica e flexível, cuja estrutura é rica em glicina, prolina, alanina, leucina e resíduos de valina. Frequentemente associada aos colágenos e composta por pequenas sequências repetidas de três a nove aminoácidos, a elastina é comumente sintetizada por fibroblastos e queratinócitos, sendo responsável pela formação das fibras elásticas (KADLRE *et al.*, 2007; WEIHERMANN *et al.*, 2014). As fibras elásticas são estruturas complexas encarregadas por conferir a elasticidade fisiológica da MEC e são basicamente compostas por dois elementos: (I) uma forma amorfa de elastina reticulada no centro e (II) um manto externo composto por microfibrilas glicoproteicas (WEIHERMANN *et al.*, 2014). Essa forma amorfa de elastina é obtida a partir da reticulação de diversas moléculas solúveis de tropoelastina secretada (a proteína precursora da elastina), que se tornam insolúveis e estáveis pela ação enzima lisil

oxidase (LOX) ou outros membros desta família (LOXL1-4) (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; KADLRE *et al.*, 2007; WEIHERMANN *et al.*, 2014).

#### 2.4.1.2 Proteínas Adesivas

A fibronectina é a principal glicoproteína dimérica constitutiva da MEC e envolve-se intimamente na organização e direcionamento das fibras que compõe a matriz intersticial (PANKOV; YAMADA, 2002; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Estruturalmente, a fibronectina é composta por duas subunidades praticamente idênticas, de aproximadamente 250kDa, sintetizadas a partir de um único gene. Cada subunidade, por sua vez, é formada por um arranjo de 12 módulos do tipo I (FNI), 2 módulos do tipo II (FNII) e entre 15 e 17 módulos do tipo III (FNIII). Mais de 90% da estrutura da fibronectina é composta pela repetição dos módulos FNI, FNII e FNIII, e o *splicing* alternativo permite a existência de até 20 variantes da proteína, que pode ser subdividida em dois grupos, de acordo com a sua origem (PANKOV; YAMADA, 2002; MAURER; MA; MOSHER, 2016; YIMING WANG; NAADIYA CARRIM; HEYU NI, 2015).

A fibronectina plasmática consiste na menor e mais solúvel isoforma da fibronectina. Produzida por hepatócitos e secretada na corrente sanguínea, exibe um padrão de *splicing* relativamente simples. As fibronectinas celulares, por sua vez, consistem em um grupo grande e heterogêneo de proteínas pouco solúveis, produzidas localmente por diversos tipos celulares, que resultam de padrões de *splicing* espécie-específicos (PANKOV; YAMADA, 2002; MAURER; MA; MOSHER, 2016; YIMING WANG; NAADIYA CARRIM; HEYU NI, 2015). Responsável por promover a interação entre a MEC e as células circundantes, a fibronectina atua como ligante de diversos membros da família das integrinas, mediando a adesão, o crescimento, a diferenciação e a migração celular. Além disso, a fibronectina também possui domínios de ligação à heparina e ao colágeno e desempenha uma grande variedade de funções biológicas, atuando na resolução dos processos inflamatórios e infecciosos, na reparação tecidual, na angiogênese e na transformação maligna (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; PANKOV; YAMADA, 2002; MAURER; MA; MOSHER, 2016; YIMING WANG; NAADIYA CARRIM; HEYU NI, 2015).

As lamininas são um grupo de grandes glicoproteínas heterotriméricas amplamente distribuídas pela MEC e especialmente importantes para a membrana

basal. Compostas por três cadeias polipeptídicas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , as lamininas geralmente apresentam-se em formato de cruz e seu peso molecular chega a 900 kDa. Nos animais vertebrados, 16 isoformas de lamininas já identificadas. Entretanto, estima-se que a permutação entre cinco cadeias  $\alpha$ , quatro cadeias  $\beta$ , e três cadeias  $\gamma$  geneticamente distintas, possibilite a existência de até 60 isoformas. Assim como a fibronectina, as lamininas participam de diversos eventos biológicos, contribuindo para a estabilidade estrutural da MEC e promovendo a adesão, diferenciação, migração, estabilidade fenotípica e resistência à apoptose das células associadas, através da estimulação dos receptores de membrana, como é o caso das integrinas e do colágeno tipo IV (DOMOGATSKAYA; RODIN; TRYGGVASON, 2012; YAO, 2017).

#### 2.4.1.3 Proteínas Não-fibrosas

As glicosaminoglicanas (GAGs) são polímeros lineares longos, com cadeias não ramificadas e compostos por unidades dissacarídicas repetidas, contendo uma molécula de radical amino e um ácido urônico (ROZARIO; DESIMONE, 2010; HYNES; NABA, 2012). Essas moléculas polianiónicas são capazes de sequestrar fatores de crescimento presentes na MEC e possuem propriedades eletrostáticas que as tornam “osmoticamente ativas”, uma vez que sua elevada carga negativa é capaz de atrair uma grande diversidade de cátions. Ao atrair água para o espaço intersticial, as GAGs possibilitam a formação do gel hidrofílico característico da MEC, criando um ambiente propício à migração celular, aos processos de reparação tecidual e à interação com o colágeno. O ácido hialurônico, o sulfato de dermatana, o sulfato de condroitina e o sulfato de heparana são os principais componentes da família das GAGs (HYNES; NABA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

As proteoglicanas, por sua vez, são compostas por GAGs (à exceção do ácido hialurônico) covalentemente ligadas a núcleos proteicos específicos e são divididas em três famílias principais: as proteoglicanas pequenas ricas em leucina, as modulares e as de superfície celular (HYNES; NABA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; NEVE *et al.*, 2014). As proteoglicanas pequenas ricas em leucina são responsáveis pela ativação de diversos receptores e vias de sinalização, atuando ativamente na regulação da resposta inflamatória. As proteoglicanas modulares (percelana, agrina e colágeno tipo XVIII), por sua vez, encontram-se quase sempre entremeadas às fibrilas de colágeno e promovem a adesão, migração e

proliferação celular, atuando como fatores pró e anti-angiogênicos na membrana basal. E as proteoglicanas de superfície celular (sindecanas e glicopicanas), por fim, são capazes de atuar como âncoras de ligação, facilitando o encontro das moléculas ligantes com os receptores de sinalização (COUCHMAN; PATAKI, 2012).

#### 2.4.1.4 Proteínas Matricelulares

As proteínas matricelulares compreendem um extenso conjunto de glicoproteínas moduladoras, tais como tenascinas, trombospondinas e osteonectina, entre outras, que são essenciais à homeostasia do ambiente extracelular. Embora não contribuam diretamente para a manutenção da integridade estrutural da MEC, estes moduladores biológicos são responsáveis por ativar diversas funções celulares, estimulando a produção de outras proteínas extracelulares e propiciando interações intercelulares e entre as células circundantes e a MEC (BORNSTEIN, 1995; BORNSTEIN, 2001; BORNSTEIN; SAGE, 2002; ALFORD; HANKENSON, 2006). Expressas abundantemente em situações que requerem o remodelamento do ambiente extracelular, como é o caso do desenvolvimento e do reparo tecidual, as proteínas matricelulares exercem suas funções através da ligação com receptores de membrana, fatores de crescimento, citocinas, proteases e outras proteínas da MEC, induzindo, nas células circundantes, um estado de adesão intermediário capaz de afetar as vias de sinalização intracelular que estimulam a proliferação, migração, diferenciação, sobrevivência e angiogênese (SANGALETTI; COLOMBO, 2008; BORNSTEIN, 2009; CHIODONI; COLOMBO; SANGALETTI, 2010).

A família das tenascinas é composta por grandes glicoproteínas multiméricas estruturalmente constituídas por domínios repetidos semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF), domínios de fibronectina tipo III (FNIII) e domínios relacionados ao fibrinogênio (FReD) na região C-terminal. Nos animais tetrápodes, quatro genes encontram-se relacionados com a expressão proteica das tenascinas: tenascina-C, tenascina-R, tenascina-X e tenascina-W. Embora suas funções sejam homólogas, baseando-se na promoção de um estado de adesão fraco e na modulação da migração celular, através de interações com fibronectina e proteoglicanas, cada tenascina possui um padrão de expressão característico, principalmente por parte das células pertencentes ao tecido conjuntivo (CHIQUET-EHRISMANN, 2010; CHIQUET-EHRISMANN; TUCKER, 2011; ADAMS; CHIQUET-EHRISMANN; TUCKER, 2015).

As trombospondinas compreendem uma pequena família de glicoproteínas moduladoras oligoméricas, que consiste em cinco membros homólogos: TSP1, TSP2, TSP3, TSP4 e TSP5 ou COMP (proteína oligomérica da matriz cartilaginosa). Sua estrutura é basicamente composta por uma série de repetições de domínios semelhantes à EGF nas regiões carboxi-terminal não variáveis, diversos domínios de ligação de cálcio e um domínio carboxi-terminal estruturalmente homólogo ao domínio de lectina do tipo L. Secretadas no meio extracelular, as trombospondinas exercem uma série de funções que envolvem interações com os demais componentes da MEC, principalmente as integrinas e as glicosaminoglicanas, como o reparo tecidual, a angiogênese, a indução da disseminação e da migração celular, a indução da desadesão celular focal, o estímulo ou inibição da proliferação celular e da apoptose, o estímulo à sinaptogênese por células neuronais e o antagonismo da sinalização do óxido nítrico em células vasculares (ADAMS; LAWLER, 2011; STENINA-ADOGNRAVI, 2013).

Expressa por diversos tipos celulares e amplamente relacionada com o remodelamento tecidual e a rotatividade celular, a osteonectina, também conhecida como "proteína secretada, ácida e rica em cisteína" (SPARC) ou proteína 40 da membrana basal (BM-40), é uma glicoproteína matricelular única, cujas interações com fatores de crescimento, receptores de membrana e outras proteínas da MEC protagonizam distúrbios no padrão de adesão celular, alteram o formato das células, inibem o ciclo celular, inativam as respostas celulares a determinados fatores de crescimento, e são responsáveis por regular a produção de diversas metaloproteinases de matriz (QI YAN; SAGE, 1999).

#### **2.4.2 Envolvimento na carcinogênese**

Embora a MEC possa ser considerada protagonista da homeostasia tecidual, sua composição e atividade biomecânica estão sujeitas às demandas fisiológicas dos tecidos aos quais pertencem. Desta forma, alterações celulares que comprometam o exercício de suas funções primordiais também são capazes de modificar a organização e composição proteica da MEC, de modo a contemplar as novas exigências da condição patológica (KUMAR; RAO; GE, 2012; KAZUHIRO YAMAMOTO; MURPHY; TROEBERG, 2015; VADON-LE GOFF; HULMES; MOALI, 2015; YICHEN DONG *et al.*, 2015). O comportamento tumoral e o desenvolvimento



das neoplasias malignas estão diretamente relacionados com a influência das células cancerosas sobre o seu microambiente uma vez que estas são capazes de modificar o estroma e a vascularização local através da produção e secreção de fatores biologicamente ativos (XIAO; GE, 2012). Através das modificações microambientais, as células cancerosas são capazes de corromper a MEC, modificando sua constituição e estabilidade. Em contrapartida, o microambiente modificado passa a moderar a atividade proliferativa e o comportamento invasivo tumoral. Além disso, a destruição da MEC protagonizada por diversas proteinases extracelulares constitui um processo crucial para a invasão celular e a ocorrência de metástases tumorais (XIAO; GE, 2012; CHIH-HAU CHANG *et al.*, 2017).

### 2.4.3 Alterações da MEC conhecidas nos MCTs

A expressão de MMPs já foi identificada em MCTs (LEIBMAN *et al.*, 2000; OZBEK *et al.*, 2010; PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014). Giantin *et al.* (2012) demonstraram a existência de uma correlação positiva entre MMP9, TIMP2, VEGFA e o grau histológico em 35 amostras de MCTs cutâneos caninos, sugerindo seu valor enquanto indicadores de malignidade (GIANTIN *et al.*, 2012). Seguindo a mesma linha, Pulz *et al.* (2017) caracterizaram a expressão de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em MCTs cutâneos caninos e a alta expressão de TIMP-1 foi observada nos animais com maior tempo de sobrevida, sugerindo seu papel enquanto fator prognóstico independente para MCTs (PULZ; STREFEZZI, 2017; PULZ, *et al.*, 2017).

Pulz *et al.* (2019) abordaram o perfil genômico dos MCTs de alto grau. Neste estudo, 15 MCTs provenientes de 15 cães foram classificados quanto à sua agressividade em escores, considerando-se grau histológico, tempo de sobrevida pós-cirúrgico, índice de Ki67 e morte devido à doença. A soma dos valores atribuídos a cada característica resultou em escores que variaram entre 3 e 11. As amostras com escores acima de 6 foram classificadas como de “alto risco” e submetidas à análise de coexpressão gênica com auxílio de um *software* de bioinformática (WGCNA – Weighted Correlation Network Analysis – no ambiente R). A análise de coexpressão pode definir módulos gênicos que se encontravam positivamente correlacionados entre estas amostras (PULZ *et al.*, 2019). Dentre os oitenta e cinco genes descritos no módulo referente à matriz extracelular, sete sugeriram possuir uma relação mais estreita com a malignidade tumoral. Desta forma, ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2,

MMP14, PDGFRA e SPARC foram selecionados para o presente estudo visando, primeiramente, validar suas expressões proteicas por meio da técnica imunohistoquímica e, em um segundo momento, identificar e quantificar os tipos celulares responsáveis por sua expressão dentro do microambiente tumoral.

## 2.5 PROTEÍNAS DE INTERESSE

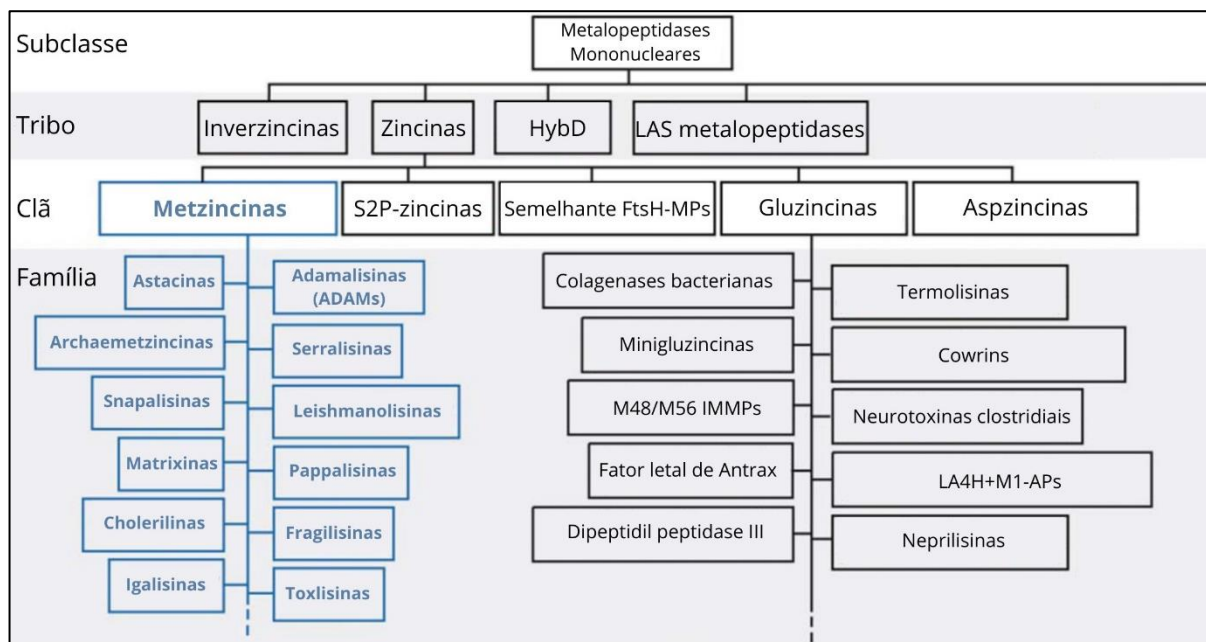
### 2.5.1 ADAMTS2

As ADAMTS – do inglês "*A Desintegrin and Metaloproteinase with Thrombospondin motif*", traduzido como "uma desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina" – são metaloendopeptidases secretadas que possuem múltiplos domínios e são associadas comumente ao controle da estrutura e função da matriz extracelular (MEC) (Fig. 1) (B. L. TANG, 2001; APTE, 2004). Assim como as metaloproteinases de matriz, as ADAMTS também são dependentes de zinco e cálcio e desempenham diversas funções na morfogênese tecidual, na remodelação fisiopatológica dos tecidos, nos processos inflamatórios e na biologia vascular (HOFER *et al.*, 2008; KELWICK *et al.*, 2015).

Em mamíferos, a família das ADAMTS é composta por 19 peptidases e 20 símbolos atribuídos aos genes codificadores. Atualmente, o símbolo ADAMTS11 não é mais utilizado pois ADAMTS5 e ADAMTS11 codificam a mesma peptidase (APTE, 2009). Todos os membros da família ADAMTS são compostos por um domínio protease e um domínio auxiliar. O domínio protease localiza-se na região N-terminal e é conservado entre os membros da família, sendo composto por um sinal de peptídeo, um pró-domínio, um domínio metaloproteinase (também chamado de domínio catalítico, dependente de zinco), um domínio semelhante a desintegrina, um domínio de trombospondina, um domínio de cisteína e uma região espaçadora. Na região C-terminal há maior variabilidade estrutural, podendo haver domínios de protease e lacunina, domínios Gon-1, domínios semelhantes à mucina e domínios Cub, em diferente ordem e quantidade em cada membro da família (NICHOLSON, 2005; NAGASE; KAZUNARI, 2008). Com exceção da ADAMTS4, todas as ADAMTS possuem um motivo de trombospondina (TSP) adicional no domínio auxiliar. Além das diferenças na região C-terminal, as ADAMTS também podem apresentar uma

quantidade variável de domínios de trombospondina na região N-terminal (APTE, 2016).

Figura 1 – Classificação das metalopeptidases.

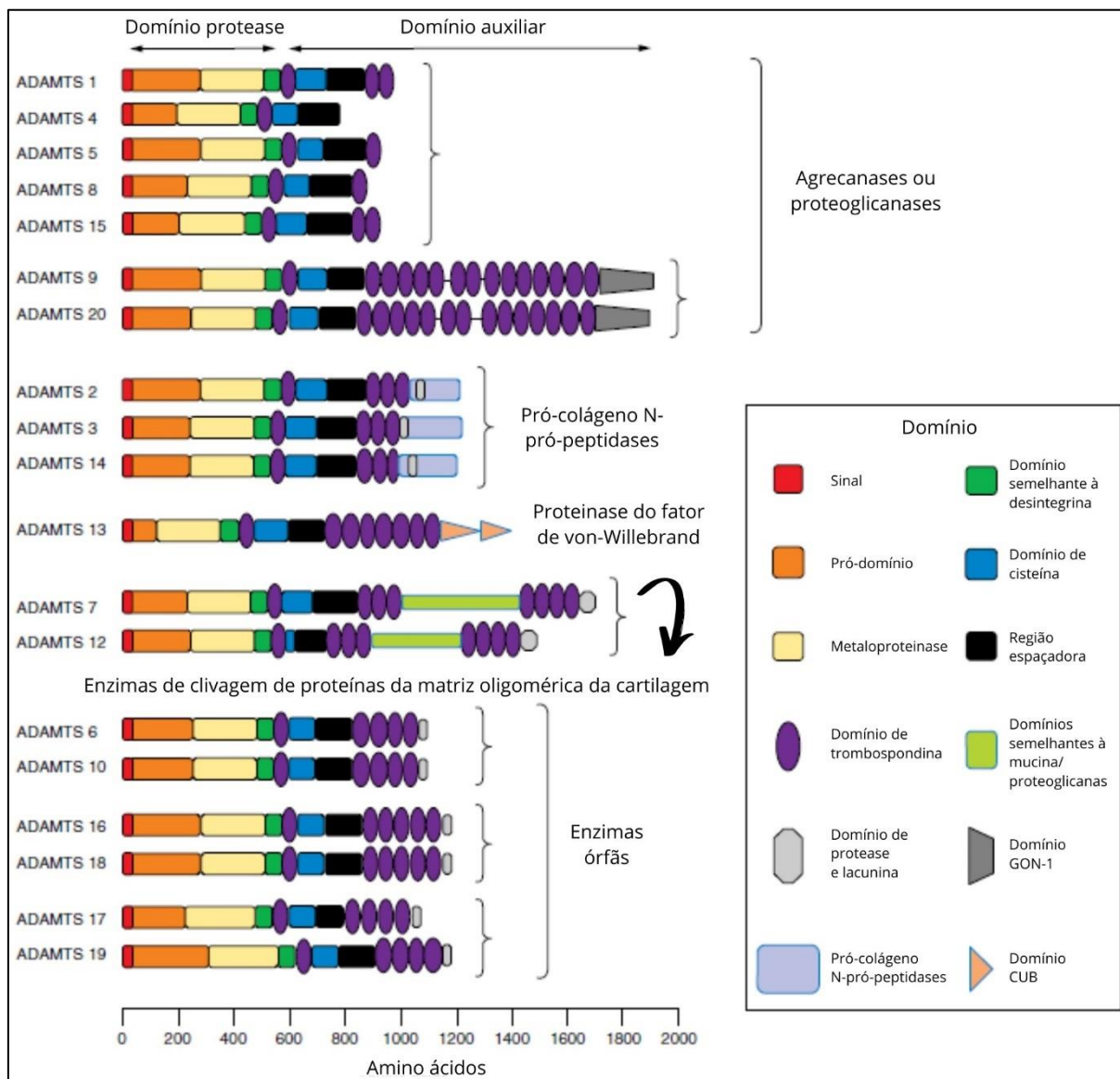


Fonte: Adaptado de CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH (2014).

De acordo com sua estrutura e função, as ADAMTS podem ser subagrupadas da seguinte forma: (I) as agrecanases ou proteoglicanases (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 e 20) atuam na clivagem e na modificação de proteoglicanos na MEC e também são conhecidas como angiostatinas, principalmente em decorrência da atuação das ADAMTS1 e 8 (NAGASE; KAZUNARI, 2008); (II) as pró-colágeno N-pró-peptidases (ADAMTS2, 3 e 14) estão intimamente relacionadas com a montagem da estrutura tridimensional de tripla hélice das fibrilas e fibras de colágeno através da remoção proteolítica de amino-pró-peptídeos estruturais das pró-moléculas secretadas (BEKHOUCHE; COLIGE, 2015); (III) as enzimas de clivagem de proteínas da matriz oligomérica da cartilagem (ADAMTS7 e 12) são as únicas ADAMTS a serem consideradas proteoglicanos por possuírem um domínio de mucina que permite a sua ligação a cadeias de sulfato de condroitina (SOMERVILLE *et al.*, 2004); (IV) a proteinase do fator de von-Willebrand (ADAMTS13) que é a responsável pela clivagem do precursor deste fator de forma a otimizar o processo de coagulação sanguínea; e, por fim, as enzimas conhecidas como órfãs (ADAMTS6, 10, 16, 17, 18

e 19), que são as ADAMTS cujos substratos e funções ainda não foram completamente identificados (KELWICK *et al.*, 2015) (Fig. 2).

Figura 2 – A família ADAMTS.



Fonte: Adaptado de KELWICK *et al.* (2015).

As ADAMTS são sintetizadas como proteínas inativas e necessitam de clivagem e remoção do pró-peptídeo para se tornarem ativas. A ocorrência do evento de clivagem do pró-peptídeo já foi identificada no complexo de Golgi (ADAMTS 1, 4 e 7), no meio extracelular após a secreção da proteína (ADAMTS5) e até mesmo na membrana citoplasmática (ADAMTS7, 9), sempre mediado pelo processamento da

furina. Curiosamente, a remoção do pró-peptídeo não parece ser necessária para o exercício da função no caso da ADAMTS9 (ROSE, 2021). Assim como outras metzincinas, as ADAMTS requerem um pH de neutro a levemente básico, combinado com a presença de zinco e cálcio, para o melhor exercício de suas funções. Além disso, são suscetíveis à ação de inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs). Alguns TIMPs parecem ser mais eficazes para inibir determinadas ADAMTS, como é o caso do TIMP-3 com a ADAMTS2, por exemplo (KELWICK *et al.*, 2015). Além de TIMP-3, a papilina também parece ser eficaz na inibição da atividade de ADAMTS2, embora o mecanismo específico dessa inibição ainda não tenha sido elucidado (BEKHOUCHE; COLIGE, 2015).

ADAMTS2 é a pró-colágeno N-pró-peptidase mais bem caracterizada. O gene responsável pela codificação de ADAMTS2 em humanos localiza-se no cromossomo 5 na região q35.3. A proteína é composta por 1211 aminoácidos e tem um peso molecular de 134,755 kDa. Sua expressão é abundante em fibroblastos e células de origem mesenquimal, estando altamente expressa em tecidos ricos em colágeno tipo I – como pele, ossos, tendões e coração – e também em macrófagos e monócitos periféricos. As pró-colágeno N-pró-peptidases são enzimas classicamente conhecidas por serem responsáveis pelo processamento do pró-peptídeo amino-terminal dos pró-colágenos I, II e III levando a formação dos colágenos fibrilares, que são os principais constituintes da matriz extracelular. Entretanto, também participam de outros eventos biológicos, como a cascata de sinalização de TGFB e a ativação da linfangiogênese. A deficiência de ADAMTS2 está associada a infertilidade em camundongos machos, ao passo que a superexpressão correlaciona-se com infarto agudo do miocárdio (B. L. TANG, 2001; APTE, 2004; KELWICK *et al.*, 2015; CHUNYI JIANG *et al.*, 2019; LEDUC *et al.*, 2021; DUPONT, *et al.* 2022).

Além de sua ação direta no processamento dos precursores de colágeno, ADAMTS2 também colabora com a reticulação de colágeno e elastina através da proteólise e ativação da enzima lisil oxidase (LOX). Outra função de ADAMTS2 que vem sendo estudada é a sua atividade antiangiogênica. Resultados *in vitro* demonstraram que ADAMTS2 é capaz de induzir a apoptose de células endoteliais por mecanismos relacionados à interação com receptores de membrana. Posteriormente, experimentos *in vivo* correlacionaram a alta expressão de ADAMTS2 com a diminuição da vascularização intratumoral em camundongos (BEKHOUCHE;

COLIGE, 2015; ROSELL-GARCÍA *et al.*, 2019; DUBAIL *et al.*, 2010; LEDUC *et al.*, 2021; DUPONT, *et al.* 2022).

A ausência de atividade da ADAMTS2 em decorrência de mutação leva ao desenvolvimento do tipo dermatosparaxis da Síndrome de Ehlers-Danlos, um grupo heterogêneo de doenças que se caracteriza pela fragilidade do tecido conjuntivo com manifestações na pele, nos ligamentos, nas articulações, nos vasos sanguíneos e em diversos órgãos internos. Clinicamente, a intensidade das manifestações varia desde hiperflexibilidade moderada da pele e articulações até deficiência física grave com complicações vasculares potencialmente fatais (APTE, 2016).

No contexto do câncer, as ADAMTS atuam tanto na promoção quanto na inibição do desenvolvimento e progressão tumoral. Os mecanismos pelos quais essas funções são exercidas ainda não estão completamente elucidadas, porém estudos *in vitro* demonstram que ADAMTS2 é capaz de bloquear a fosforilação de ERK em células HUVEC. ERK costuma estar superexpresso em células cancerosas, e sua expressão nuclear de ERK contribui para proliferação celular, transformação oncogênica e migração (MEAD; APTE, 2018; CHUNYI JIANG *et al.*, 2019). Por outro lado, a alta expressão de ADAMTS2 em fibroblastos e células cancerosas correlacionou-se com pior prognóstico em casos de carcinoma gástrico humano (CHUNYI JIANG *et al.*, 2019). A aparente contradição acerca dos efeitos das ADAMTS no contexto do cancer pode ser explicada pelo papel dessas enzimas no microambiente tumoral, afetando a interação entre as células cancerosas, o estroma local e o sistema imunológico (KELWICK *et al.*, 2015).

### **2.5.2 BMP1**

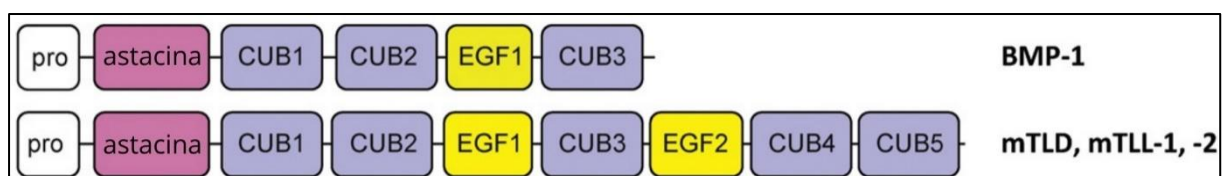
As proteínas BMP – do inglês “*Bone Morphogenetic Protein*”, traduzido como “proteína morfogenética óssea” – foram descobertas em 1971 por Marshall R. Urist (GRGUREVIC; PECINA; VUKICEVIC, 2017). Na ocasião, o pesquisador identificou que este conjunto de proteínas era capaz de induzir a formação ectópica de ossos. Mais tarde, as BMPs foram classificadas como membros da chamada “superfamília TGF-beta”, composta por proteínas capazes de regenerar diversos tecidos, incluindo o tecido ósseo. Uma dessas proteínas, entretanto, não era como as outras. Em 1995, os genes responsáveis pela codificação das BMPs foram caracterizados e uma classificação baseada nas sequências de aminoácidos foi formulada. BMP1 foi

excluída dessa classificação: sua sequência de aminoácidos era muito diferente do restante e a função osteoindutora, característica mais marcante das BMPs àquela altura, também estava ausente. Dessa forma, é possível dizer que BMP1 não pertence à família das BMPs. A ausência de similaridade com as outras BMPs corrobora com o fato de que BMP1 não é uma proteína semelhante à TGFB e não pertence à superfamília das TGFB (WOZNEY, 1989; RICHARD N. WANG *et al.*, 2014).

Atualmente, BMP1 é classificada como uma pró-colágeno C-proteinase pertencente à subfamília das astacinas, grupo de metaloproteases que também inclui proteínas “tolloid-like” (TLLs) e meprinas. Em mamíferos, existem quatro proteinases BMP1/TLL – BMP-1 e mTLD, que são *splicings* alternativos do mesmo gene e mTLL1 e mTLL2, que são codificados por genes distintos – que são geneticamente distintas (HUXLEY-JONES *et al.*, 2007; MUIR, 2016) (Fig. 1).

A estrutura de BMP1 e TLLs é bastante similar, consistindo de um pró-domínio amino-terminal seguido por um domínio protease conservado dependente de zinco, um domínio C-terminal CUB (responsável pela interação entre proteínas) e domínios de ligação ao cálcio semelhante a EGF. Sua função está intimamente correlacionada com o processamento de precursores funcionais e estruturais da matriz extracelular, envolvendo-se particularmente na fibrilogênese do colágeno. Além disso, as BMP1/TLLs são conhecidas por ativarem TGFB1 por meio da clivagem da proteína de ligação latente do TGFB (do inglês, “latent TGFbeta-binding protein), LTBP (HOPKINS; KELES; GREENSPAN, 2007) (Fig. 3).

Figura 3 – Estrutura das proteinases BMP1/TLL.

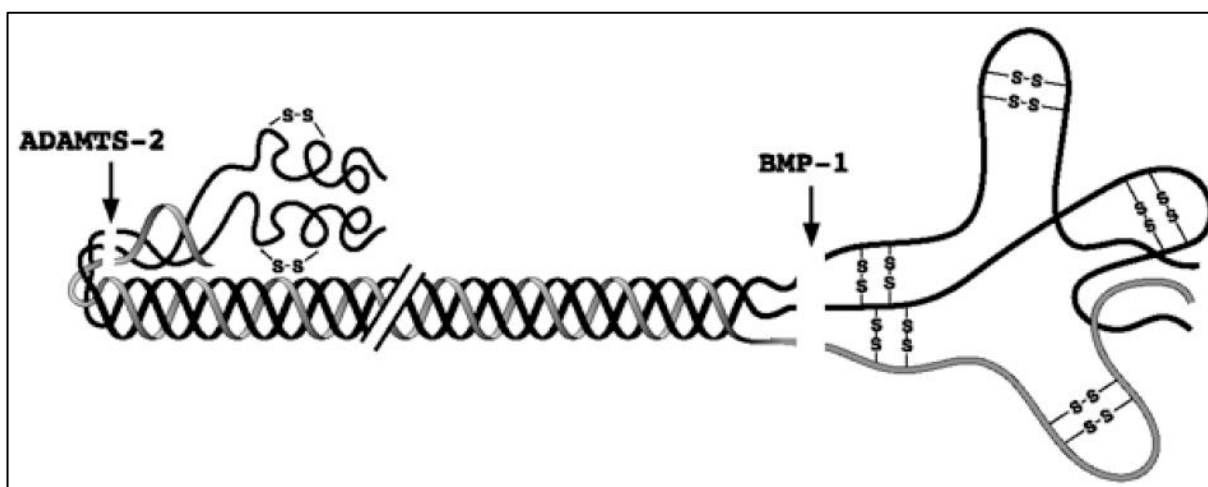


Fonte: Adaptado de KELWICK *et al.* (2015).

O gene responsável pela codificação de BMP1 em humanos localiza-se no cromossomo 8 na região p21.3. A proteína é composta por 986 aminoácidos e tem como peso molecular 111 kDa. Em termos funcionais, BMP1 participa de vários processos fisiológicos como formação de cartilagem e ossos, crescimento e

homeostase muscular, cicatrização de feridas, e reparação de tecidos. Essa ampla gama de atuação deve-se ao fato de BMP1 ser responsável por clivar os C-pró-peptídeos de pró-colágenos tipo I, II, III, V e XI (o que ocorre tanto do meio extracelular quanto intracelular) (Fig. 4) e promover a maturação de diversas proteínas na matriz extracelular, como os pequenos proteoglicanos ricos em leucina e a lisil-oxidase (LOX). A otimização de sua função proteolítica está associada com pH alcalino (8,0 - 8,5) e à ação de uma proteína conhecida como “potenciador de pró-colágeno C-proteinase-1” (do inglês “procollagen C-proteinase enhancer-1”) ou PCPE1, uma agonista das proteinases BMP1/TLL que é capaz de acelerar a maturação dos pró-colágenos e acionar a fibrilogênese de colágeno (HUXLEY-JONES *et al.*, 2007; HOPKINS; KELES; GREENSPAN, 2007; MARIANO *et al.*, 2022; YUJIA LIU *et al.*, 2022).

Figura 4 – Processamento do pró-colágeno tipo I por ADAMTS2 e BMP1.



Fonte: HOPKINS; KELES; GREENSPAN (2007).

Assim como as ADAMTS, BMP1 é sintetizado com um pró-domínio N-terminal, cuja proteólise ocorre por ação da convertase semelhante à subtilisina (do inglês, "subtilisin-like convertase") no compartimento trans-Golgi. Essa proteólise é considerada como um evento de ativação da BMP1, embora existam evidências de que a proteína precursora possa ser secretada antes de ser clivada sem prejuízo funcional. A inibição de sua função pode ocorrer pela ação da proteína  $\alpha 2$ -



Macroglobulina ( $\alpha_2M$ ), que é capaz de inibir diversas outras proteases incluindo as MMP e as ADAM (HUXLEY-JONES *et al.*, 2007).

No contexto da câncer, a BMP1 encontra-se intimamente relacionada com a metástase tumoral em casos de câncer de cólon e atua como marcador confiável da desmoplasia nos tumores colorretais. Além disso, sua superexpressão correlaciona-se com pior prognóstico e diminuição do tempo de sobrevida em pacientes com câncer gástrico, câncer pulmonar, osteossarcoma e carcinoma renal (VADON-LE GOFF; HULMES; MOALI, 2015; YUNG-YU HSIEH *et al.*, 2018; WEN XIAO *et al.*, 2020; RAFI *et al.*, 2021).

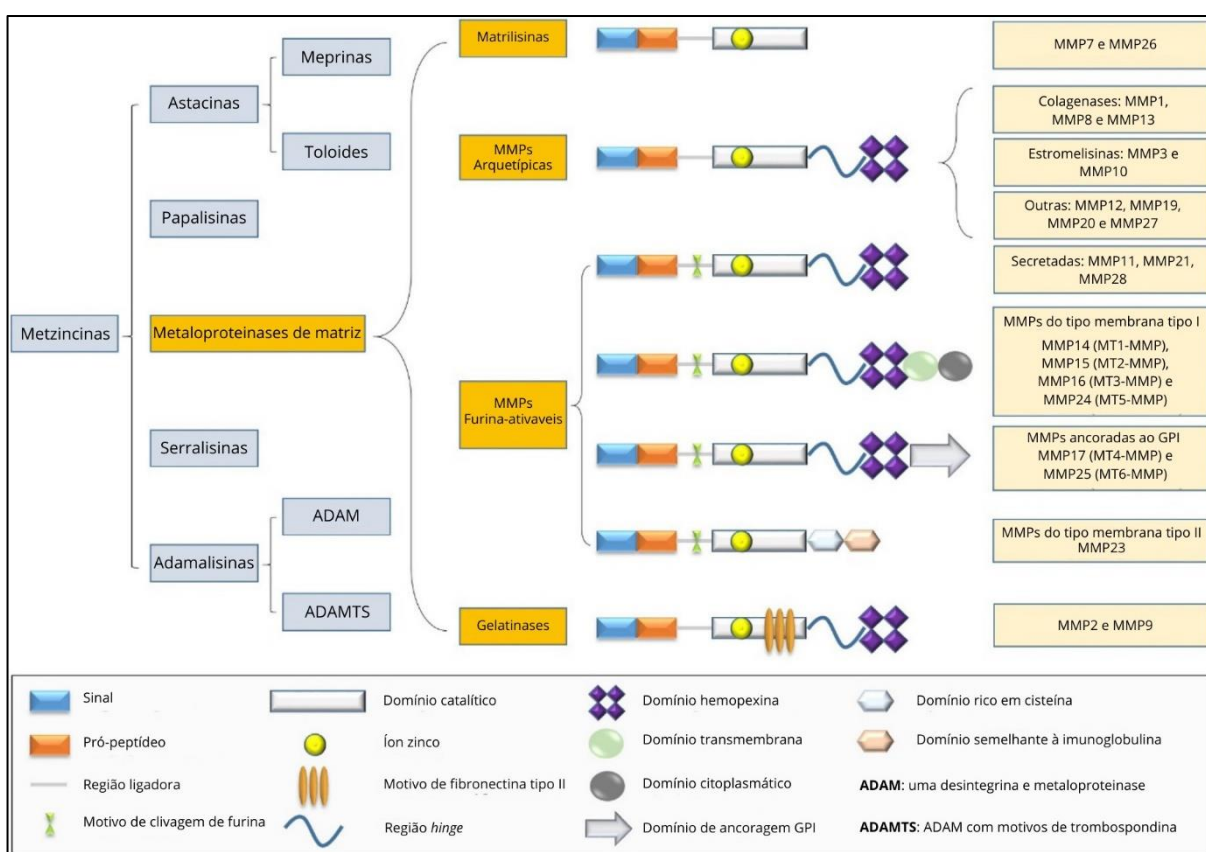
### 2.5.3 MMP14

As MMPs – do inglês “*Matrix metalloproteinases*”, traduzido como “metaloproteinases de matriz” – são proteases multidomínio dependentes de zinco, pertencentes à família das metaloendopeptidases e ao clã das metzincinas, assim como ADAMTS e BMP1 (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020) (Fig. 1). Atuam, principalmente, no remodelamento tecidual e degradação de componentes da matriz extracelular, exercendo suas funções a partir do espaço extracelular, no caso das MMPs solúveis, ou a partir de seu ancoramento na membrana plasmática, no caso das MMPs do tipo membrana, também conhecidas como MT-MMPs (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; KANG LI; FRANKLIN R. TAY; CYNTHIA KAR YUNG YIU, 2020). Em humanos, vinte e três MMPs já foram identificadas e são classificadas de acordo com seu substrato em diferentes categorias: (I) colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13); (II) gelatinases (MMP2 e MMP9); (III) estromelinas (MMP3, MMP10 e MMP11); (IV) matrilisinas (MMP7 e MMP26), (V) MMPs do tipo membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 e MMP25); e (VI) outras (MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP23, MMP27 e MMP28) (KUMAR *et al.*, 2022; DE ALMEIDA *et al.* 2022).

As MMPs são compostas de três domínios estruturais distintos: um pró-peptídeo N-terminal se aproximadamente 80 aminoácidos que contém um domínio de sinalização, um domínio catalítico metaloproteinase com cerca de 170 amino ácidos, uma região peptídica ligante de tamanho variável e um domínio hemopexina na região C-terminal composto por 200 amino ácidos, em média. Pequenas particularidades estruturais são encontradas nas diferentes categorias de MMPs: a MMP7 e a MMP26

não possuem a região *hinge* e o domínio hemopexina; a MMP2 e a MMP9 contêm três motivos de fibronectina (domínio de ligação ao colágeno) no sítio catalítico; as MMPs ativáveis por furina têm um motivo de clivagem de furina entre o pró-peptídeo e domínio catalítico; as MT-MMPs têm um domínio transmembrana – ou âncora de glicosfosfatidilinositol (GPI) – em sua região C-terminal; e a MMP23 não possui a região *hinge* e o domínio hemopexina, mas possui domínio rico em cisteína e domínio semelhante à imunoglobulina em sua região C-terminal (CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2013; AROLAS *et al.*, 2018; ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020) (Fig.5).

Figura 5 – Classificação estrutural das MMPs.



Fonte: Adaptado de KANG LI; FRANKLIN R. TAY; CYNTHIA KAR YUNG YIU (2020).

Produzidas por diversos tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, e células imunes, as MMPs são capazes de afetar moléculas bioativas na superfície celular e modular diversas vias de sinalização, como a proliferação e diferenciação celular, além de colaborar com processos de apoptose, angiogênese, migração

celular, reparo tecidual e resposta imunológica (NING CUI; MIN HU; KHALIL, 2017; KANG LI; FRANKLIN R. TAY; CYNTHIA KAR YUNG YIU, 2020). As MMPs são sintetizadas e secretadas na sua forma inativa e necessitam de atividade proteolítica para ativação. A clivagem do resíduo de cisteína realizada por furinas ou outras MMPs é fundamental nesse processo. As MT-MMPs, particularmente, necessitam de ativação intracelular pela furina e só então ocupam seu lugar na membrana celular, onde podem ativar outras pro-MMPs. Proteínas conhecidas como inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) são inibidores endógenos importantes na renovação da matriz extracelular, remodelamento tecidual e comportamento celular por, de fato, modularem a função das MMPs. Os TIMP1 a 4 são proteínas homólogas que exibem preferências em sua capacidade inibitória. Por exemplo, TIMP1 e 2 inibem de forma seletiva as MMPs9 e 2, respectivamente. Além da atividade inibitória, os TIMPs também compõem complexos não-inibitórios pro-MMP/TIMP/MT-MMP. A ampla distribuição de TIMPs por diversos tecidos e órgãos pode alterar a proporção entre MMP e TIMP, levando a regulação mútua da atividade proteica (AROLAS *et al.*, 2018; ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; ALMUTAIRI *et al.*, 2023).

A MMP14 (também chamada de MT1-MMP) é uma metaloproteinase de matriz do tipo membrana cujo gene codificador em humanos se localiza no cromossomo 14 na região q11-q12. A MMP14 foi a primeira MMP do tipo membrana identificada, e é mais conhecida por sua atividade colagenolítica, podendo também degradar o proteoglicano da cartilagem, a fibronectina, a laminina-1, a vitronectina, inibidor de  $\alpha$ 1-proteinase e  $\alpha$ 2-macroglobulina. Sua atividade é sinergicamente aumentada pela MMP2: a MMP14 se liga a TIMP2, ativa MMP2 e estimula a migração celular em vários tipos celulares.

Associada à membrana celular, a MMP14 tem grande impacto na migração celular, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. Estudos recentes revelam que a MMP14 costuma estar superexpressa e ativa em casos de câncer humano, e que essa superexpressão costuma estar relacionada com aumento da invasão e metástase (KANG LI; FRANKLIN R. TAY; CYNTHIA KAR YUNG YIU, 2020). Por outro lado, a deleção de MMP14 em fibroblastos da derme resulta em prejuízo do desenvolvimento do melanoma devido à formação de pele com aspecto fibroso. A alteração da composição da MEC peritumoral pela ausência de MMP-14 leva ao acúmulo de colágeno do tipo XIV e aumento da rigidez que prejudica o crescimento do tumor e a migração das células cancerosas (PACH *et al.*, 2021).

A superexpressão de MMP14 e PKM2 mediada por mutações em KRAS, TP53 ou deleções em CDKN2A foi associada com pior prognóstico em casos de câncer pancreático humano (HAIWEI WANG *et al.*, 2020). Nos carcinomas ovarianos, a superexpressão de MMP14 foi compatível com melhor prognóstico e menor progressão da doença (TRUDEL *et al.*, 2014). Em células de carcinoma gástrico, a superexpressão de MMP14 foi identificada, e o seu silenciamento inibiu a proliferação e invasão através da regulação da expressão de vimentina e E-caderina (BO LI; GUOCHUN LOU; JUYING ZHOU, 2019). A ambiguidade do papel de MMP14 no câncer suporta a ideia de que mais estudos são necessários para identificação dos mecanismos associados.

#### 2.5.4 LOX

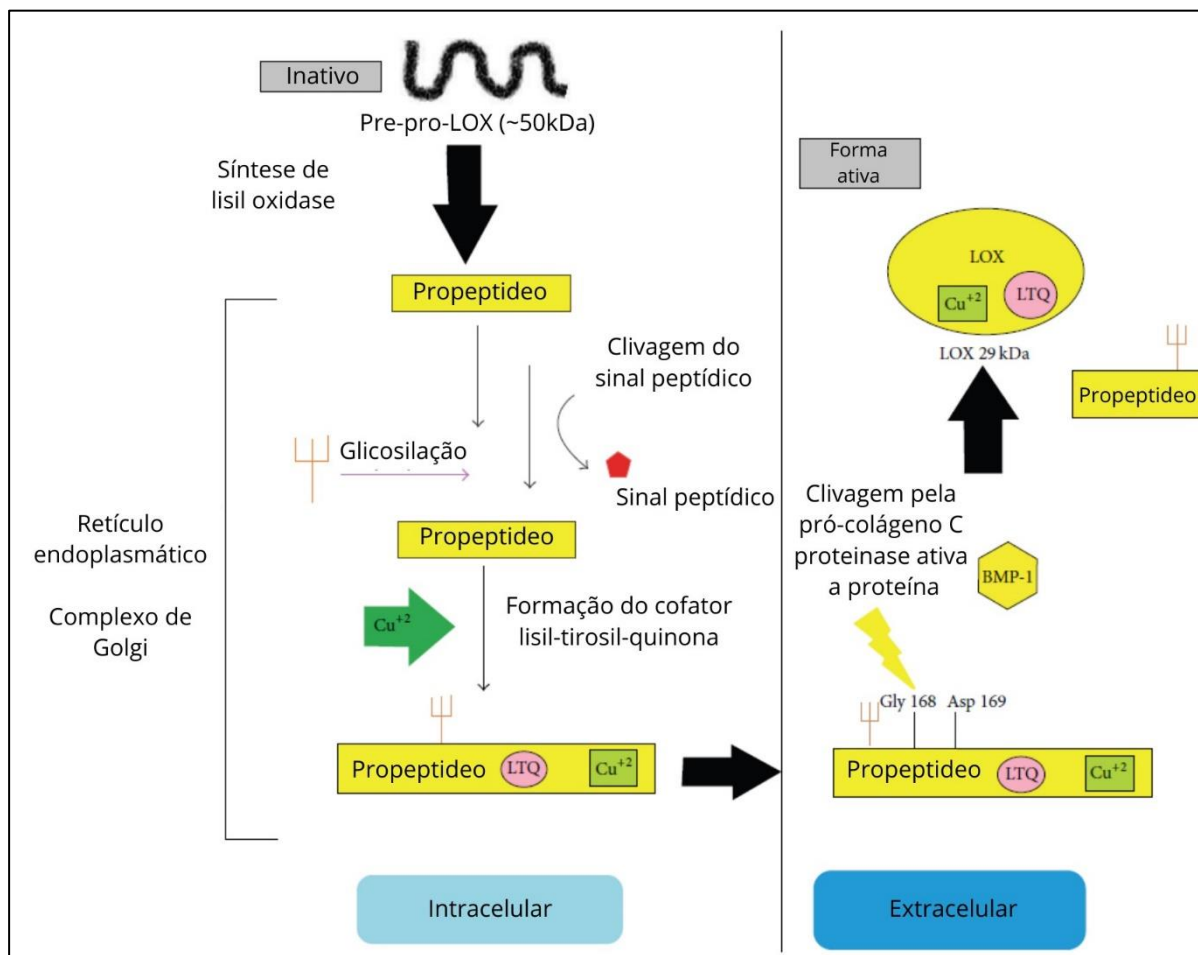
As LOX – do inglês “*lysyl oxidases*”, traduzido como lisil-oxidases – são amina-oxidases de cobre responsáveis por promover a estabilidade estrutural da MEC através da atuação direta na reticulação dos colágenos e na formação das fibras elásticas (GRAU-BOVÉ; RUIZ-TRILLO; RODRIGUEZ-PASCUAL, 2015). As amina-oxidases de cobre (CAOs) são uma classe de enzimas dependentes de cobre que catalisam a desaminação oxidativa de grupos amina em aldeídos, produzindo concomitantemente peróxido de hidrogênio e amônia. A família das lisil oxidases corresponde a um subgrupo de amina oxidases que utilizam como substrato a lisina tirosilquinona (LTQ) e é composta por seis membros: LOX e LOXL1 a 5. Com base na similaridade estrutural das moléculas, as seis enzimas são agrupadas em duas subfamílias: (I) LOX, LOXL1 e LOXL5; e (II) LOXL2, LOXL3 e LOXL4. É importante destacar que LOXL5 não é encontrado em mamíferos (FINNEY *et al.* 2014; HAJDÚ *et al.*, 2018; VALLET; RICARD-BLUM, 2019).

Estruturalmente, os integrantes da família LOX compartilham um domínio C-terminal que abrange o domínio enzimático catalítico. O domínio enzimático possui um sítio de ligação para o cobre e uma LTQ. A região N-terminal, por sua vez, apresenta variabilidade de composição entre os membros da família. Todas as proteínas da família LOX são secretadas como pró-enzimas glicosiladas, que precisam ser proteoliticamente processadas. Embora a principal função das lisil-oxidases seja promover a estabilidade estrutural da MEC através da reticulação covalente catalítica de colágeno e elastina Seu envolvimento no desenvolvimento e



ADAMTS2 e 14 (TAKESHI NISHIOKA; EUSTACE; WEST, 2012; QIAN XIAO; GAOXIANG GE, 2012; ROSELL-GARCÍA *et al.*, 2019).

Figura 7 – Síntese do LOX ativo.



Fonte: Adaptado de SMITH *et al.* (2016)

A expressão aberrante da proteína LOX já foi relatada em diversas doenças que acometem o tecido conjuntivo. Sua baixa expressão está presente na *cutis laxa*, Síndrome de Menkes, em doenças cardíacas e prolapso de órgãos pélvicos, ao passo que a superexpressão ocorre em casos de cirrose hepática, doença de Alzheimer e diversas alterações relacionadas ao câncer (FINNEY *et al.*, 2014; SALEEM *et al.*, 2019; SALEEM; RAJPUT, 2020). A superexpressão de LOX encontra-se intimamente relacionada com piores prognósticos em paciente oncológicos (QIAN XIAO; GAOXIANG GE, 2012). Além do processamento de proteínas na MEC, LOX está

envolvida em diversos outros processos, como a migração celular, a angiogênese e a transição epitelial-mesenquimal (EMT). Apesar de ser uma proteína secretada pelas células e células e processada na MEC, LOX pode ser parcialmente translocada para o núcleo das células, onde afeta a expressão gênica e o ciclo celular (NELLAIPPAN *et al.*, 2000; KAGAN *et al.*, 2003). Especula-se que a atividade de LOX sobre a expressão gênica e o ciclo celular deve-se à oxidação de grupamentos lisina em proteínas nucleares, tais como histonas H1, levando a ocorrência de alterações epigenéticas (KAGAN *et al.*, 2003).

### 2.5.5 LOXL2

Da mesma forma que a proteína LOX, LOXL2 – do inglês “*lysyl oxidase-like*”, traduzido como “proteína semelhante à lisil oxidase 2” – é uma amina-oxidase de cobre pertencente à família das lisil oxidases. Em humanos, o gene que codifica LOXL2, com seus 774 aminoácidos, está posicionado no cromossomo 8 na região p21-22 (JOURDAN-LE SAUX *et al.*, 1998; LINGHONG WU; YING ZHU, 2015). Estruturalmente, LOXL2 se difere da proteína LOX pela presença de quatro domínios ricos em cisteína em sua região N-terminal (do inglês *Scavenger Receptor Cysteine-Rich* ou SRCR) (FINNEY *et al.* 2014) (Fig. 6). Entretanto, em termos funcionais, LOXL2 se assemelha à LOX, participando da reticulação de colágeno, dos processos que levam à rigidez da MEC, do estímulo à migração celular, angiogênese e transição epitelial-mesenquimal (EMT). Geralmente, a LOXL2 encontra-se superexpressa em situações de superexpressão de TIMP1 e MMP9, como também acontece com LOX.

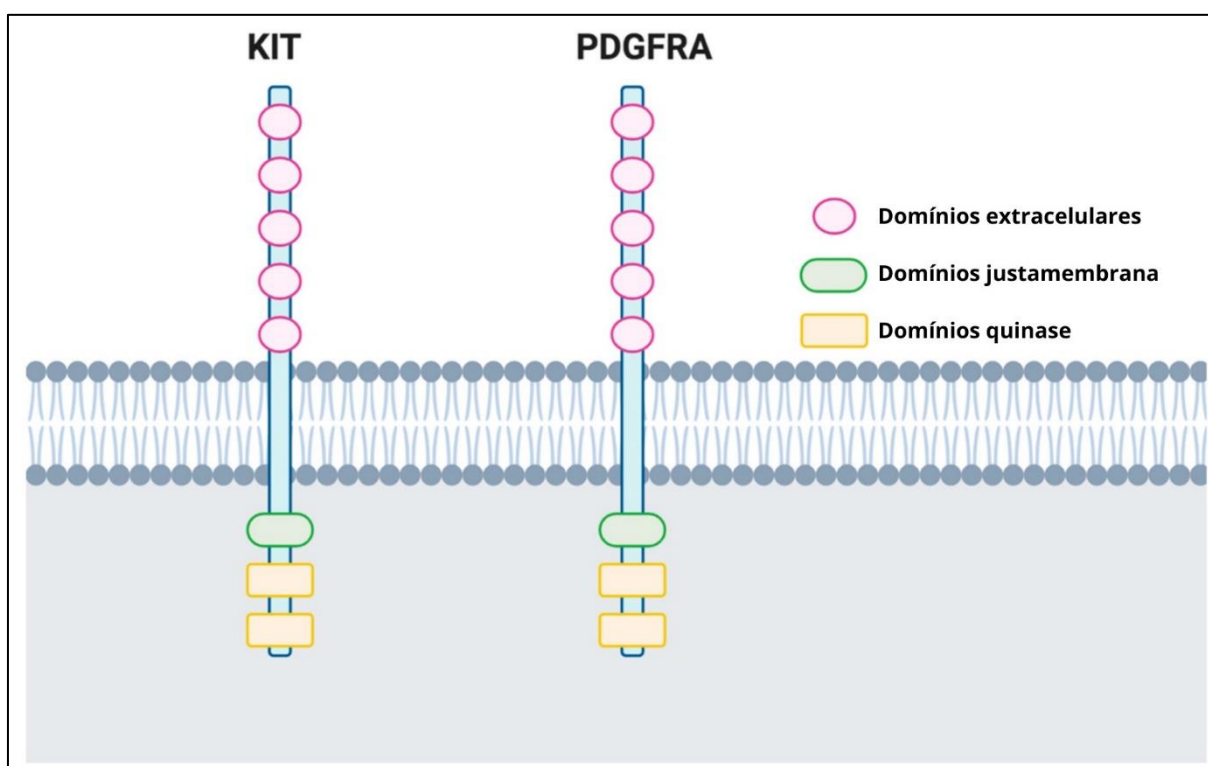
No contexto do câncer, superexpressão de LOXL2 está relacionada com pior prognóstico e menor tempo de sobrevida em diversos tipos de tumor como carcinoma mamário (AKIRI *et al.*, 2003), carcinoma de cabeça e pescoço (PEINADO *et al.*, 2008), câncer de pulmão (PING ZHAN *et al.*, 2018), cancer de cólon (TORRES *et al.*, 2015), câncer gástrico (PENG *et al.*, 2009), cancer cervical (JING TIAN *et al.*, 2019), cancer hepático (JIWOON CHOI *et al.*, 2019) e câncer de esôfago (TIAN-YU LI *et al.*, 2012).

### 2.5.6 PDGFRA

Os receptores tirosina-quinase (RTKs) são receptores transmembrana responsáveis pela ativação de cascatas de sinalização intracelulares relacionadas

com a diferenciação, proliferação, sobrevivência, metabolismo e migração celular. Em humanos, a família dos RTKs é composta por 58 membros divididos em 20 subfamílias (CRAMER; MIKO, 2016). Os RTKs são formados por um domínio de ligação extracelular, uma alfa-hélice transmembrana, um domínio justamembrana, um domínio tirosina-quinase (TKD) e uma cauda C-terminal (Fig. 8). Os receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) são RTKs de classe III que se ligam aos fatores de crescimento derivados de plaqueta (PDGFs), uma família de fatores de crescimento composta por quatro membros (PDGFA, B, C e D). Os RTKs de classe III são um clã composto por cinco membros: PDGFRA, PDGFRB, KIT, FMS e FLT3 (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008).

Figura 8 – Estrutura esquemática de KIT e PDGFRA.



Fonte: Adaptado de RIZZO *et al.* (2021).

Os PDGFR estão presentes em fibroblastos e musculatura lisa. Facilitam a cicatrização por estimular o remodelamento vascular, a migração de musculatura lisa e a produção de colágeno pelos fibroblastos (PIERCE, 1991). Em humanos, o gene codificador de PDGFRA localiza-se no cromossomo 4, na região q12, e controla o



desenvolvimento de diversos órgãos como pulmão, intestino e pele, dentre outros (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008). Assim como outros RTKs, PDGFRA é envolvido na progressão de uma variedade de cânceres, como é o caso da leucemia, tumores estromais gastrointestinais, glioblastoma, e carcinoma hepatocelular, seja por superexpressão, seja por mutação ou rearranjo cromossomal (OSEINI; ROBERTS, 2009; OSTMAN; HELDIN, 2007; OZAWA *et al.*, 2010; JONES; CROSS, 2004).

### 2.5.7 SPARC

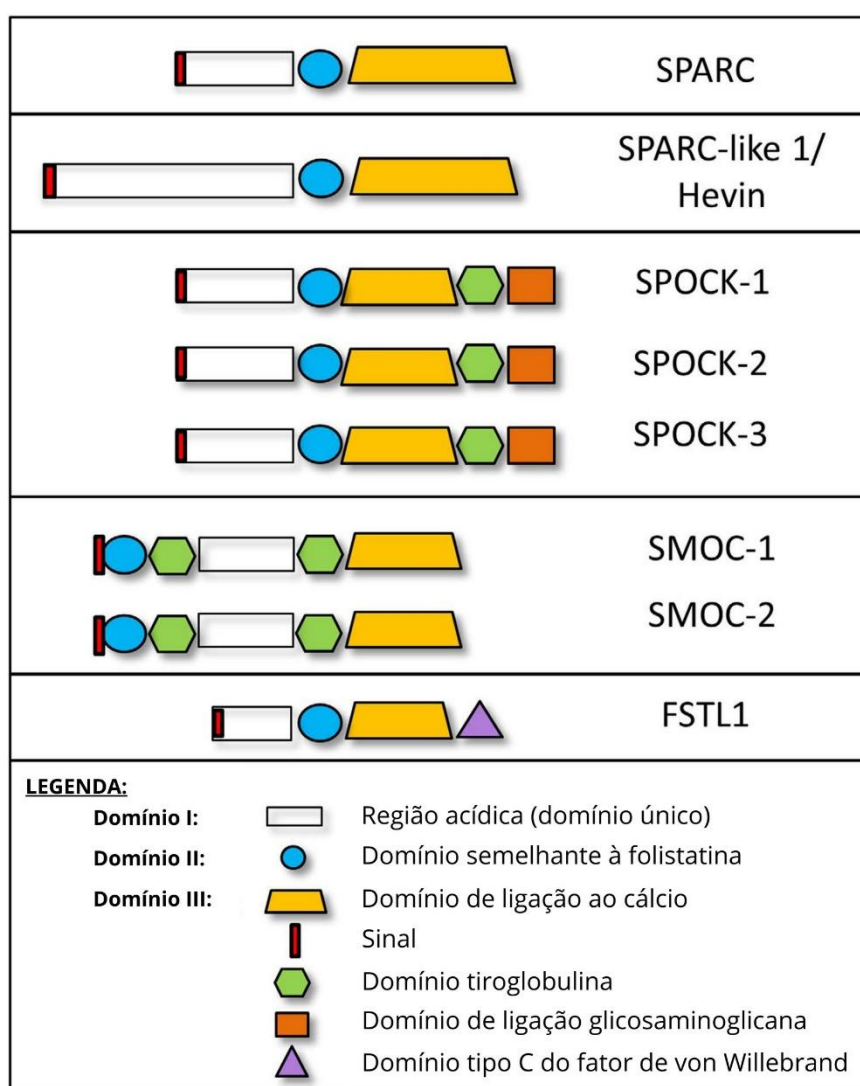
A proteína SPARC – do inglês “*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*”, traduzido para “proteína secretada, acídica e rica em cisteína” – é uma glicoproteína não estrutural da MEC dependente de cálcio, que pertence à categoria das proteínas matricelulares, e está diretamente envolvida na EMT, e cuja superexpressão já foi identificada em diversos tipos de tumores humanos (CHIH-HAU CHANG *et al.*, 2017; JOGLEKAR-JAVADEKAR *et al.*, 2017). Há oito membros na família das proteínas SPARC, que são subdivididas em quatro grupos de acordo com sua estrutura e composição: (I) SPARC e SPARCL1; (II) proteína 1 relacionada à folistatina (FSTL1); (III) proteína de ligação modular ao cálcio relacionada ao SPARC (SMOC) 1 e 2; e (IV) SPOCK1, 2, 3 (ISABELLA T TAI; MICHELLE J TANG, 2008), compostas basicamente por três domínios funcionais que contribuem para suas distintas propriedades biológicas: um domínio N-terminal que contém um domínio ácido de ligação ao cálcio, um domínio relacionado à folistatina que contém resíduos de cisteína, e um domínio C-terminal (SHUANG CHEN *et al.*, 2020) (Fig. 9).

O gene responsável por codificar a proteína SPARC em humanos está localizado no cromossomo 5, nas regiões q31.2-q32. SPARC é uma proteína de 42 kDa que também conhecida como osteonectina ou BM-40 e encontra-se expressa primordialmente na MEC (BORNSTEIN, 2009; BRADSHAW, 2012). Por interagir com diversos fatores de crescimento, como VEGF e TGFB, e metaloproteinases de matriz, como MMP2, SPARC possui uma ampla gama de funções regulatórias, sendo capaz de influenciar na proliferação e sobrevivência celular, bem como na adesão, motilidade, EMT, angiogênese, invasão e metástase (CHLENSKI; COHN, 2010; NAGARAJU; SHARMA, 2011; CHONG *et al.*, 2012).

No câncer, SPARC apresenta expressão diferencial em diversos tipos de tumores e é capaz de inibir ou promover progressão tumoral (ARNOLD; BREKKEN,

2009). A superexpressão de SPARC promove a progressão tumoral e pior prognóstico em tumores de mama, esôfago, cérebro, próstata e melanomas, enquanto age como supressor tumoral em células de câncer de ovário e cânceres de pâncreas. Especula-se que essa contradição funcional possa ser explicada pelo tipo celular que expressa SPARC em diferentes tipos de tumores (ARNOLD E BREKKEN, 2009; GARY K. YIU *et al.*, 2001; CHLENSKI *et al.*, 2010; MARIA APARECIDA NAGAI *et al.*, 2011).

Figura 9 – Estrutura esquemática da família SPARC.



Fonte: VILORIA *et al.* (2016).

### 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Foram objetivos do presente estudo:

- Caracterizar a expressão imuno-histoquímica de ADAMTS2, BMP1, LOX, LOXL2, MMP14, PDGFRA e SPARC em mastocitomas cutâneos caninos;
- Comparar os dados obtidos aos métodos de graduação histológica, mortalidade em função do tumor e tempo de sobrevivência pós-cirúrgico para fins de avaliação prognóstica;

A hipótese é que as proteínas relacionadas à síntese, degradação e remodelamento da matriz extracelular (MEC) podem atuar como fatores prognósticos para os mastocitomas cutâneos caninos (MCTs).

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 ORIGEM DOS MATERIAIS

Os MCTs utilizados neste projeto foram provenientes do Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP). A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, aprovou os procedimentos realizados no presente estudo (CEUA 6686250717). Para inclusão das amostras no estudo, tutores foram devidamente orientados e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### 4.2 CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO

Foram incluídas no presente estudo amostras provenientes de cães portadores de MCTs desenvolvidos espontaneamente, que passaram por excisão cirúrgica com caráter curativo e cujo procedimento foi realizado com amplas margens. Não foram incluídas amostras provenientes de pacientes que receberam terapia adjuvante ou neoadjuvante. Todos os tumores foram submetidos ao diagnóstico e classificação

histológica segundo os sistemas de graduação de Patnaik *et al.* (1984) e Kiupel *et al.* (2011). O acompanhamento clínico dos pacientes foi realizado por um tempo mínimo de 180 dias para os casos censurados pela análise de sobrevivência. Informações a respeito do paciente como sexo, raça, idade, tempo de evolução da doença, localização do tumor, presença de metástases e quantidade de nódulos foram obtidas a partir da análise dos prontuários médicos. Dados clínicos complementares como opções de tratamento, ocorrência de recidivas, tempo de sobrevivência e eventual óbito dos pacientes foram obtidos através de contatos telefônicos com proprietários e conversas com os médicos veterinários responsáveis pelos casos, sendo tais informações também devidamente documentadas.

#### 4.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As amostras de MCT foram fixadas em solução de formalina a 10% por 48 horas e processadas histologicamente conforme as técnicas rotineiras de inclusão em parafina no Laboratório de Patologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP). Cortes de 4µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E) (PROPHET *et al.*, 1994) para confirmação do diagnóstico e graduação histológica pelos sistemas de classificação de Patnaik *et al.* (1984) e Kiupel *et al.* (2011).

#### 4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após o processamento histológico as amostras foram submetidas a protocolos imuno-histoquímicos individualizados realizados no Laboratório de Patologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), de acordo com S M HSU *et al.* (1981) com algumas alterações, para pesquisa da expressão de ADAMTS2, BMP-1, LOX, LOXL2, MMP-14, PDGFRA e SPARC (S M HSU; RAINE; FANGER, 1981). Cortes de 3µm de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas (Starfrost®) e incubadas em estufa a 60°C *overnight* após secagem. Na sequência, a desparafinização dos cortes foi realizada através da imersão em xilol 100% duas vezes por quinze minutos. Os cortes foram, então, reidratados através da imersão em bateria decrescente de álcoois (absoluto, 95% e 70%) por cinco minutos cada e, finalmente, em água destilada.

O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi obtido por meio de imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora em local escuro ou através da incubação com reagente de bloqueio fornecido em kit (Novolink polymer detection system, Leica®) por 30 minutos na bandeja de incubação. A recuperação antigênica foi realizada pelo método da recuperação de epítipo induzida por calor com tampão citrato 1X pH 6,0 em panela elétrica à vapor (*steamer*) com temperatura média de 95°C durante 25 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram realizadas lavagens com tampão de escolha para cada anticorpo.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com leite 5% – diluído com tampão ou água destilada – ou reagente de bloqueio Protein Block, fornecido pelo kit Novolink polymer detection system (Leica®). Mais informações sobre os protocolos de imuno-histoquímica estão presentes no Quadro 7. Os anticorpos utilizados no presente projeto foram: policlonal de coelho anti-ADAMTS2 humano (PA5-50539, ThermoFisher), policlonal de coelho anti-BMP1 humano (DF9280, Affinity Biosciences), policlonal de coelho anti-LOX murino (PA5-46020, ThermoFisher), policlonal de coelho anti-LOXL2 humano (LS-A9350, LSBios), policlonal de coelho anti-MMP14 humano (PA5-32500, ThermoFisher), policlonal de coelho anti-PDGFR humano (PA5-32545, ThermoFisher), policlonal de coelho anti-SPARC humano (PA5-13703, ThermoFisher). Os anticorpos foram escolhidos após a verificação da existência de pelo menos 85% de homologia entre as sequências genéticas codificadoras das proteínas com as correspondentes caninas.

Por fim, a incubação com o anticorpo secundário (Amplificador + Polímero HRP) foi realizada por 25 minutos à temperatura ambiente para o anticorpo de uma etapa (EasyLink One, Erviagas®) ou por 50 minutos para o anticorpo de duas etapas (Novolink polymer detection system, Leica®), sendo 25 minutos para cada reagente. A adição do cromógeno líquido DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris revelaram o resultado da imunomarcação. Cada um dos protocolos imuno-histoquímicos foi realizado com um par de lâminas controle de tecido canino, consistindo em pele normal (ADAMTS2, BMP1, MMP14, PDGFR e SPARC) ou carcinoma mamário (LOX e LOXL2). O controle da reação foi realizado com pele humana normal (ADAMTS2, BMP1, MMP14, PDGFR e SPARC) ou carcinoma ductal humano (LOX e LOXL2) e o controle negativo foi realizado com IgG de coelho na mesma concentração do anticorpo primário e processado sob as mesmas condições das lâminas-teste.

Quadro 8 – Padronização das reações IHQ dos anticorpos utilizados no presente estudo em MCTs caninos. São Paulo, 2023.

Anticorpo	Bloqueio da peroxidase endógena	Recuperação antigênica	Lavagem	Bloqueio das ligações inespecíficas	Anticorpo primário	Incubação	Anticorpo secundário	DAB
ADAMTS2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 1 hora em local escuro	HIER citrato pH 6 por 25 minutos em <i>steamer</i>	TBS 1X pH 7,6	Leite em pó desnatado 5% em TBS 1X por 30 minutos à temperatura ambiente	1:200 diluído em PBS + BSA 1%	Overnight à 4°C	Polímero-HRP em uma etapa (EasyLink One, Erviegas ®) por 25 minutos	1:100 por 5 minutos
BMP1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 1 hora em local escuro	HIER citrato pH 6 por 25 minutos em <i>steamer</i>	TBS 1X pH 7,6	Leite em pó desnatado 5% em TBS 1X por 30 minutos à temperatura ambiente	1:2000 diluído em PBS + BSA 1%	Overnight à 4°C	Polímero-HRP em uma etapa (EasyLink One, Erviegas ®) por 25 minutos	1:100 por 5 minutos
LOX	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 1 hora em local escuro	HIER citrato pH 6 por 25 minutos em <i>steamer</i>	TBST 1X pH 9	Leite em pó desnatado 5% em água destilada por 1 hora à 60°C	1:500 diluído em TBST + BSA 1%	1 hora à temperatura ambiente	Polímero-HRP em uma etapa (EasyLink One, Erviegas ®) por 25 minutos	1:100 por 5 minutos
LOXL2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 1 hora em local escuro	HIER citrato pH 6 por 25 minutos em <i>steamer</i>	TBS 1X pH 7,6	Sem bloqueio	1:500 diluído em PBS + BSA 1%	Overnight à 4°C	Polímero-HRP em uma etapa (EasyLink One, Erviegas ®) por 25 minutos	1:100 por 5 minutos
MMP14	Reagente Peroxidase Block fornecido em kit (Leica ®), por 30 minutos à temperatura ambiente na bandeja de incubação	HIER citrato pH 6 por 25 minutos em <i>steamer</i>	TBST 1X pH 7,6 (dia 1) e TBS 1X pH 7,6 (dia 2)	Reagente Protein Block fornecido no kit (Leica ®), por 30 minutos à 37°C na bandeja de incubação	1:400 diluído em TBST + BSA 1%	Overnight à 4°C	Polímero-HRP em duas etapas (Novolink polymer detection system, Leica ®) por 25 minutos cada	1:20 por 5 minutos
PDGFRA	Reagente Peroxidase Block fornecido em kit (Leica ®), por 30 minutos à temperatura ambiente na bandeja de incubação	HIER citrato pH 6 por 25 minutos em <i>steamer</i>	PBS 1X pH 7,4	Reagente Protein Block fornecido no kit (Leica ®), por 30 minutos à 37°C na bandeja de incubação	1:1000 diluído em PBS + BSA 1%	Overnight à 4°C	Polímero-HRP em duas etapas (Novolink polymer detection system, Leica ®) por 25 minutos cada	1:20 por 5 minutos
SPARC	Reagente Peroxidase Block fornecido em kit (Leica ®), por 30 minutos à temperatura ambiente na bandeja de incubação	HIER citrato pH 6 por 25 minutos em <i>steamer</i>	TBST 1X pH 7,6 (dia 1) e TBS 1X pH 7,6 (dia 2)	Reagente Protein Block fornecido no kit (Leica ®), por 30 minutos à 37°C na bandeja de incubação	1:400 diluído em TBST + BSA 1%	Overnight à 4°C	Polímero-HRP em duas etapas (Novolink polymer detection system, Leica ®) por 25 minutos cada	1:20 por 5 minutos

HIER = Heat Induced Epitope Retrieval (*recuperação antigênica induzida pelo calor*); TBS = Solução salina tamponada com Tris; TBST = TBS adicionado de Tween 20; PBS = Tampão fosfato salino; BSA = Bovine Serum Albumin (*albumina sérica bovina*); DAB = 3,3'-Diaminobenzidine (*cromógeno diamino benzidina*).  
Fonte: Elaboração própria.

#### 4.5 WESTERN BLOT

Western blot (SDS-PAGE) para LOX foi realizado como forma de validação da especificidade da ligação antígeno-anticorpo em tecidos caninos. Para realização do protocolo, uma amostra congelada de mastocitoma (grau II alto grau) foi selecionada do Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Brasil (LOCT-FZEA-USP). Amostras de pulmão e coração de camundongo foram utilizadas como controle positivo, enquanto o baço de camundongo foi usado como controle negativo.

A extração proteica foi realizada homogeneizando amostras em tampão RIPA (Thermo-Fisher). Inibidor de protease e fosfatase (Roche®) também foram adicionados à mistura de acordo com as instruções do fabricante. A quebra física das amostras foi realizada utilizando um agitador mecânico. O material foi levado à geladeira (4°C) por duas horas sob agitação constante. As amostras foram então centrifugadas a 16.000 G durante 20 minutos. O sobrenadante e o sedimento foram separados: o sobrenadante foi dividido em frações de 10 µL (extração regular) e o sedimento foi ressuspensão em 400 µL de RIPA (extração ressuspensa). As amostras foram armazenadas em temperatura de congelamento (-80°C) e a quantificação proteica foi realizada pelo ensaio BRADFORD®, utilizando BSA (2mg/ml) como diluição da curva (comprimento de onda utilizado = 595 nm).

Após extração e quantificação, as amostras foram adicionadas de Laemmli 4X e a desnaturação foi realizada em termociclador por 5 minutos a 95°C. A eletroforese foi então realizada num gel de empilhamento a 4% e num gel de corrida a 12% (50 µg de proteína de cada amostra foram adicionados a cada poço do gel). As amostras foram dispostas no gel conforme diagrama abaixo:

Extração Regular					Extração Ressuspensa (HUILEI WANG <i>et al.</i> 2021)				
Ladder	Pulmão	Coração	Baço	MCT	Ladder	Pulmão	Coração	Baço	MCT

A corrida foi realizada por 2 horas e 15 minutos a 100V. A transferência de proteínas foi realizada em membrana de PVDF, após bloqueio da membrana por 5 minutos em leite a 5%. A transferência úmida foi realizada em uma cuba de eletroforese por 2 horas a 80V em gelo. A membrana foi lavada com TBST e os

epítomos inespecíficos foram bloqueados com leite a 5% preparado com TBST por 1 hora em *shaker*.

As amostras foram então incubadas com o anticorpo policlonal primário anti-LOX (ThermoFisher, PA1-46010, 1:4000) durante a noite a 4°C num agitador. O anticorpo secundário (HRP anti-coelho, 1:5000, A0545, Sigma) foi diluído em leite 2,5% preparado com TBST e a incubação foi realizada por 1 hora. As proteínas foram detectadas por solução de quimioluminescência (Clarity, Biorad®) de acordo com as instruções do fornecedor e as bandas foram visualizadas e fotografadas com Chemidoc XRS+ (BIORAD).

#### 4.6 ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES

A análise das imunomarcações foi realizada em cinco fotomicrografias por caso, capturadas com microscópio ótico (Leica DM500 e câmera Leica ICC50 HD para LOX, Olympus BX50 e câmera Olympus SC100 para demais anticorpos) à objetiva de 40x em cinco campos de marcação intensa (“*hot spots*”) com o auxílio do *software* ImageJ. A área de cada campo analisado foi de 0,08mm<sup>2</sup> para o microscópio ótico Leica DM500 e câmera Leica ICC50 HD, e 0,14mm<sup>2</sup> para microscópio ótico Olympus BX50 e câmera Olympus SC100. Em cada imagem, foram contadas as células positivas e negativas para o marcador LOX. Os demais foram classificados semiquantitativamente usando um *score* de cinco pontuações: 0 (<10% de células positivas), 1+ (10-25% de células positivas), 2+ (25-50% de células positivas), 3+ (50-75% de células positivas) e 4+ (>75% de células positivas) (MCDONALD; PILGRAM, 1999). A intensidade foi avaliada através de um *score* de quatro pontuações: 0 (negativo), 1 (fraca), 2 (moderada) e 3 (forte).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de Kruskal-Wallis e de múltiplas comparações de Dunn foram utilizados para comparação da positividade de imunomarcação entre os graus histológicos estabelecidos segundo Patnaik et. al. (1984), e o teste de Mann-Whitney para graduação histológica como proposta por Kiupel et. al. (2011). A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier seguido de Mante-Cox (“*logrank test*”) e as associações com a mortalidade dos animais em função dos MCTs foram



analisadas pelo Teste Exato de Fisher. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad® Prism (versão 9.5.1 para MacOS, GraphPad Software®, Inc., EUA), com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL

Sessenta e duas amostras de MCT provenientes de cinquenta e seis cães foram selecionadas a partir do Banco de Amostras do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Doze (12/62, 20%) tumores eram de grau I, trinta e cinco (35/62, 56%) eram de grau II, quinze (15/62, 24%) eram de grau III de acordo com o sistema de classificação de Patnaik; e quarenta e três (43/62, 69%) eram de baixo grau e dezenove (19/62, 31%) eram de alto grau de acordo com o sistema de classificação de Kiupel. Correlacionando os dois sistemas de classificação, temos: doze (12/62, 20%) tumores de grau I baixo grau, trinta e um (31/62, 50%) tumores de grau II baixo grau, quatro (4/62, 6%) tumores de grau II alto grau, e quinze (15/62, 24%) tumores de grau III alto grau.

A maior parte dos MCTs ocorreu nas extremidades (25/62, 40%), seguido pelo tórax (18/62, 29%), região inguinal (8/62, 13%), abdômen (7/62, 11%) e cabeça e pescoço (3/62, 5%). Informações sobre localização não estavam disponíveis para um caso (1/62, 2%). A idade média dos cães foi de 9 anos e 32 eram machos (32/56, 57%). A população em estudo consistiu de 12 raças diferentes: cães sem raça definida (20/56, 36%), Labrador Retriever (7/56, 13%), Boxer (6/56, 11%), Poodle (4/56, 7%), American pitbull terrier (3/56, 5%), Dachshund (3/56, 5%), Fila-brasileiro (3/56, 5%), Golden Retriever (2/56, 3%), Shih-tzu (2/56, 3%), Dobermann (1/56, 2%), Dogue Alemão (1/56, 2%), Pinscher (1/56, 2%), São Bernardo (1/56, 2%), Schnauzer (1/56, 2%) e Scottish terrier (1/56, 2%). Cinquenta e um cães apresentaram 1 tumor, quatro cães apresentaram 2 tumores e um cão apresentou 3 tumores. Dos 56 cães, 18 vieram a óbito em função do tumor (18/56, 32%), 12 morreram por outras causas (12/56, 21%) e 26 permaneceram vivos ao final do acompanhamento (24/56, 46%) (Quadro 8).

Quadro 9 – Relação das amostras utilizadas nos protocolos de imuno-histoquímica. São Paulo, 2023.

Amostra	Animal	Raça	Sexo	Idade	Local	Patnaik	Kiupel	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOX	LOXL2	PDGFRA	SPARC
1	PA1	SRD	F	13	E	3	Alto	OK	OK	-	-	-	OK	-
2	PA2	SRD	F	5	T	2	Baixo	-	OK	-	-	-	-	-
3	PA3	Boxer	F	4	E	2	Baixo	OK	OK	-	OK	OK	-	-
4	PA4	Poodle	M	7	E	2	Baixo	OK	OK	-	OK	OK	-	-
5	PA5	SRD	M	7	C	3	Alto	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
6	PA6	SRD	F	7	E	2	Baixo	-	OK	-	-	-	-	-
7	PA7	Labrador retriever	M	3	E	2	Baixo	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
8	PA8	Fila-brasileiro	M	9	T	1	Baixo	OK	OK	-	-	OK	-	-
9	PA9	SRD	M	13	I	3	Alto	-	OK	OK	-	-	OK	OK
10	PA10	SRD	M	-	I	2	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
11	PA11	Fila-brasileiro	M	9	T	2	Baixo	-	OK	-	-	-	-	-
12	PA12	SRD	M	13	A	3	Alto	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
13	PA13	American pit bull terrier	F	12	I	2	Baixo	OK	OK	-	-	OK	-	-
14	PA14	Boxer	M	14	T	2	Baixo	OK	OK	-	OK	OK	-	-
15	PA15	Golden retriever	F	9	E	2	Baixo	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
16	PA16	American pit bull terrier	F	7	T	2	Alto	-	OK	OK	OK	OK	OK	OK
17	PA17	Poodle	F	15	T	1	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

## Continuação do Quadro 9 – parte I

Amostra	Animal	Raça	Sexo	Idade	Local	Patnaik	Kiupel	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOX	LOXL2	PDGFRA	SPARC
18	PA18	SRD	M	13	I	2	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
19	PA19	Shih-tzu	F	-	C	2	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
20	PA20	Labrador retriever	M	9	E	2	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
21	PA21	Labrador retriever	M	10	E	2	Baixo	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
22	PA22	Boxer	M	12	T	2	Alto	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
23	PA23	SRD	M	13	E	2	Baixo	-	OK	OK	OK	-	OK	OK
24	PA24	Dachshund	M	12	A	3	Alto	OK	OK	-	OK	OK	-	-
25	PA25	SRD	F	10	E	1	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
26	PA26	SRD	M	7	I	3	Alto	OK	-	-	OK	OK	-	-
27	PA27	Fila-brasileiro	M	10	T	1	Baixo	OK	-	-	OK	-	-	-
28	PA28	Dachshund	M	12	T	3	Alto	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
29	PA29	Poodle	F	4	E	1	Baixo	OK	OK	-	-	OK	-	-
30	PA29	Poodle	F	4	T	1	Baixo	OK	OK	-	-	OK	-	-
31	PA30	SRD	M	8	E	1	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	-	OK
32	PA30	SRD	M	8	E	1	Baixo	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
33	PA31	SRD	M	8	T	2	Baixo	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
34	PA31	SRD	M	9	E	2	Baixo	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK

## Continuação do Quadro 9 – parte II

Amostra	Animal	Raça	Sexo	Idade	Local	Patnaik	Kiupel	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOX	LOXL2	PDGFRA	SPARC
35	PA32	SRD	F	14	E	2	1	-	-	OK	-	-	OK	OK
36	PA33	Dachshund	M	10	E	2	2	OK	OK	-	OK	OK	-	-
37	PA34	Labrador	F	8	T	2	1	OK	-	OK	-	OK	OK	-
38	PA34	Labrador	F	8	T	3	2	OK	OK	-	OK	OK	-	OK
39	PA34	Labrador	F	8	T	3	2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
40	PA35	Boxer	F	9	A	3	2	-	OK	-	-	-	-	-
41	PA35	Boxer	F	9	A	3	2	-	OK	-	-	-	-	-
42	PA36	Pitbull	M	10	I	3	2	-	-	-	-	-	-	OK
43	PA37	SRD	F	4	A	2	2	-	-	OK	-	-	OK	OK
44	PA38	SRD	F	8	E	2	1	-	-	OK	-	-	OK	OK
45	PA39	Boxer	F	8	E	2	1	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
46	PA40	Boxer	F	9	T	1	1	-	OK	-	-	-	-	-
47	PA41	Doberman	M	9	E	3	2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
48	PA42	São Bernardo	F	8	A	2	1	-	-	OK	-	-	OK	OK
49	PA43	Schnauzer	M	16	E	2	1	-	-	OK	-	-	OK	OK
50	PA44	Labrador	F	11	T	1	1	-	-	-	-	-	OK	-
51	PA45	Scottish terrier	M	9	I	2	1	-	-	OK	-	-	OK	-

## Continuação do Quadro 9 – parte III

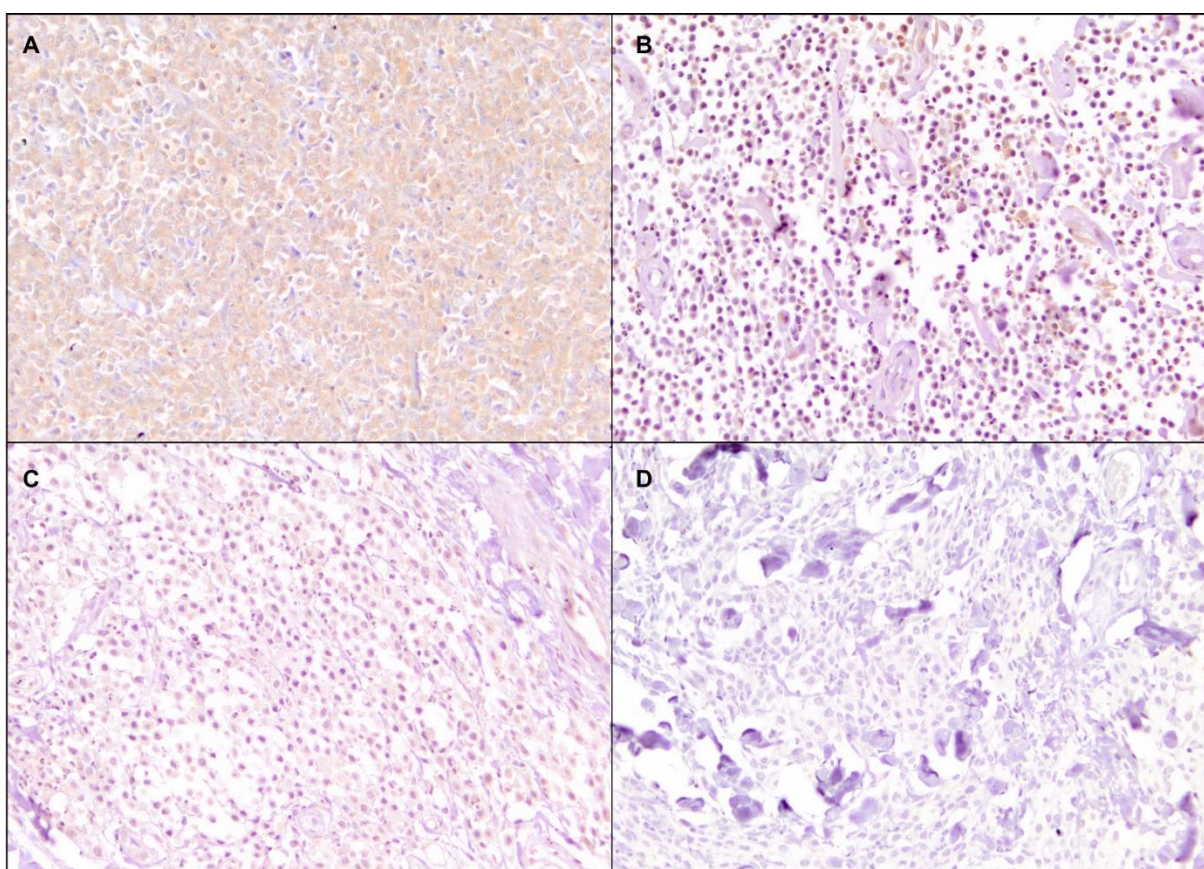
Amostra	Animal	Raça	Sexo	Idade	Local	Patnaik	Kiupel	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOX	LOXL2	PDGFRA	SPARC
52	PA46	SRD	M	-	-	3	2	-	-	OK	-	-	OK	OK
53	PA47	Shih Tzu	M	8	T	2	1	-	-	OK	-	-	OK	OK
54	PA48	Poodle	M	7	E	2	1	OK	OK	-	OK	OK	-	-
55	PA49	SRD	F	16	I	3	2	OK	OK	-	-	OK	OK	-
56	PA50	Dogue Alemão	M	6	E	2	1	OK	OK	-	-	-	-	-
57	PA51	Pinscher	F	7	E	1	1	-	OK	OK	-	OK	-	OK
58	PA52	SRD	F	5	E	1	1	-	-	-	OK	-	-	-
59	PA53	Golden retriever	F	3	A	2	1	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
60	PA54	labrador	M	9	T	2	1	-	OK	-	OK	-	-	-
61	PA55	labrador	F	8	C	2	1	-	OK	-	OK	-	-	-
62	PA56	SRD	f	9	E	2	1	-	-	-	OK	-	-	-
TOTAL DE AMOSTRAS UTILIZADAS POR ANTICORPO								38	47	34	28	37	35	30

SRD = sem raça definida; F = fêmea; M = macho; A = abdômen; C = cabeça e pescoço; E = extremidades; I = região inguinal; T = tórax; Patnaik = Grau histológico pelo sistema de Patnaik et al. (1984); Kiupel = Grau histológico pelo sistema de Kiupel (2011). Fonte: Elaboração própria.

## 5.2 ADAMTS2

Todas as amostras apresentaram positividade para ADAMTS2, com escore variável de positividade no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas, de fibroblastos, e também de intensidade (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Fig. 10, Fig. 11 e Fig. 12).

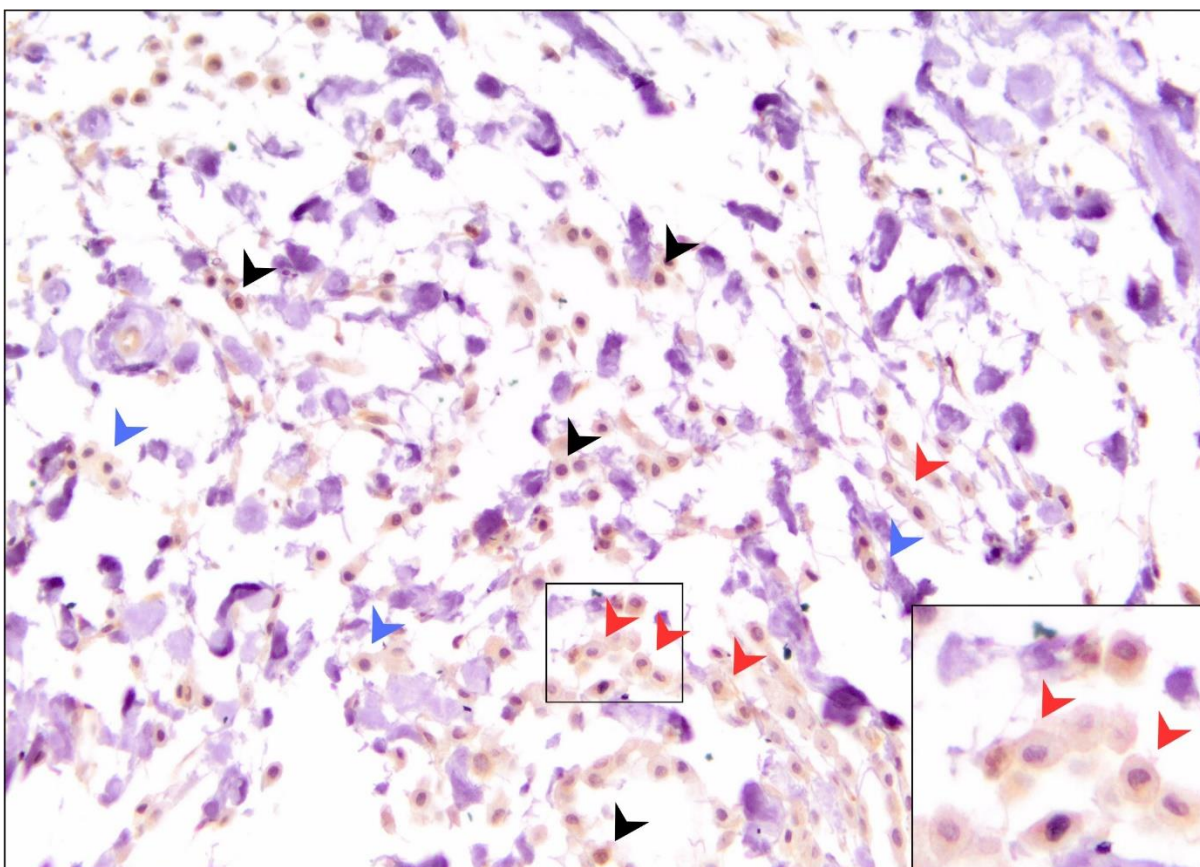
Figura 10 – Imunomarcacão para ADAMTS2 em MCTs.



**Figura 10.** Imunomarcacão para ADAMTS2 em mastocitomas cutâneos caninos. Fotomicrografias mostrando (A) intensidade de imunomarcacão forte (escore 3), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 0), mais de 75% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), menos de 10% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 0), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos (escore 0), mais de 75% de imunomarcacão citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcacão membranar em fibroblastos (escore 0); (B) intensidade de imunomarcacão moderada (escore 2), 50 a 75% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 3), 50 a 75% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 3), menos de 10% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 0), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos

(escore 0), 50 a 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 3) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (C) intensidade de imunomarcção fraca (escore 1), menos de 10% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 0), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 50 a 75% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 3), 10 a 25% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 1), 50 a 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 3) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (D) controle negativo para ADAMTS2. Imuno-histoquímica para ADAMTS2, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

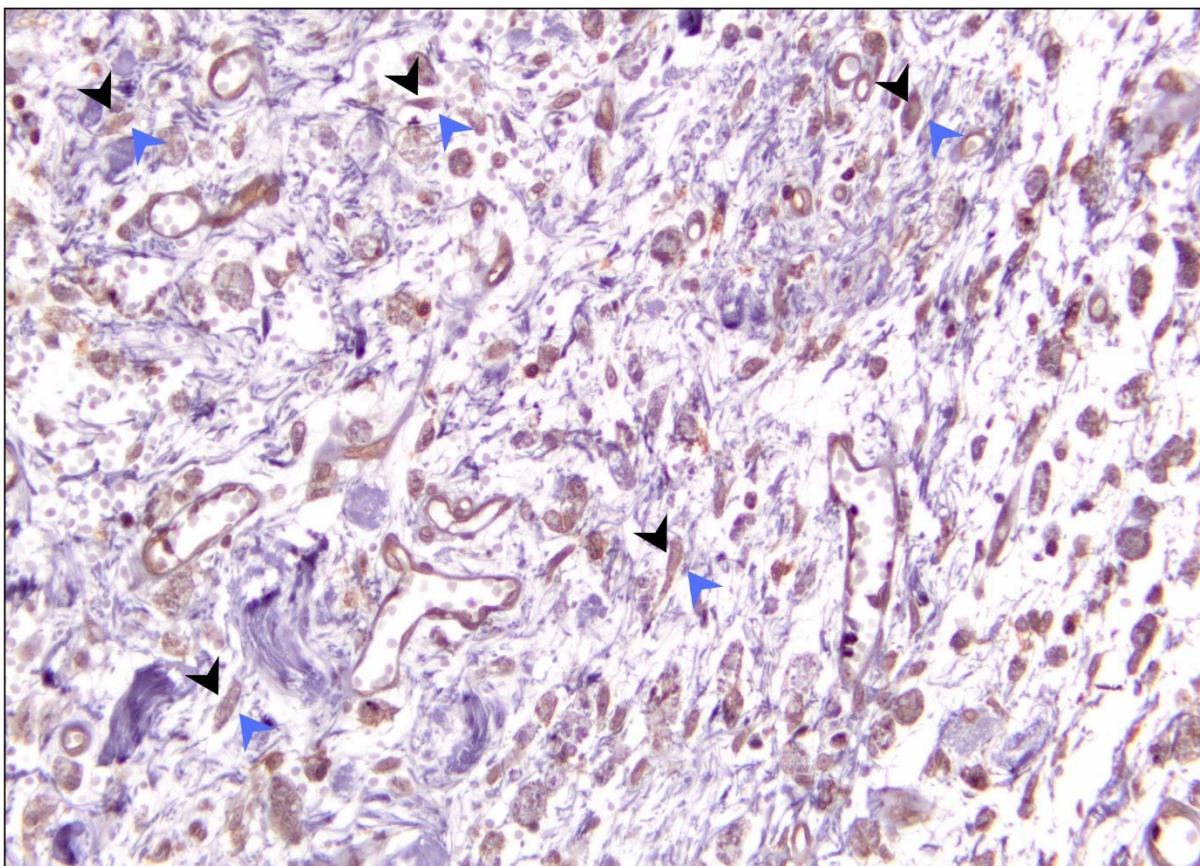
Figura 11 – Padrões de imunomarcção de ADAMTS2 em mastócitos neoplásicos.



**Figura 11.** Padrões de imunomarcção de ADAMTS2 em mastócitos neoplásicos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcção nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcção em citoplasma; cabeça de seta vermelha = exemplo de imunomarcção em membrana plasmática. Imuno-histoquímica para ADAMTS2, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.



Figura 12 – Padrões de imunomarcção de ADAMTS2 em fibroblastos.



**Figura 12.** Padrões de Imunomarcção de ADAMTS2 em fibroblastos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcção nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcção em citoplasma. Imuno-histoquímica para ADAMTS2, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Células endoteliais e leucócitos, também apresentaram positividade variável. Não houve diferenças significantes entre os graus histológicos quando comparados os escores de imunomarcção de ADAMTS2. Animais que vieram a óbito em função do MCT apresentaram menores escores de porcentagem de mastócitos neoplásicos imunomarcados para ADAMTS2 na membrana citoplasmática ( $P=0,0186$ ) (Fig. 13). Cães com escore 0 de para ADAMTS2 na membrana citoplasmática dos mastócitos neoplásicos tiveram uma sobrevida significativamente menor ( $P=0,0202$ ; mediana de sobrevida para o grupo negativo = 410 dias) (Fig. 14).



Figura 13 – Distribuição dos escores de positividade membranar para ADAMTS2 em mastócitos neoplásicos.

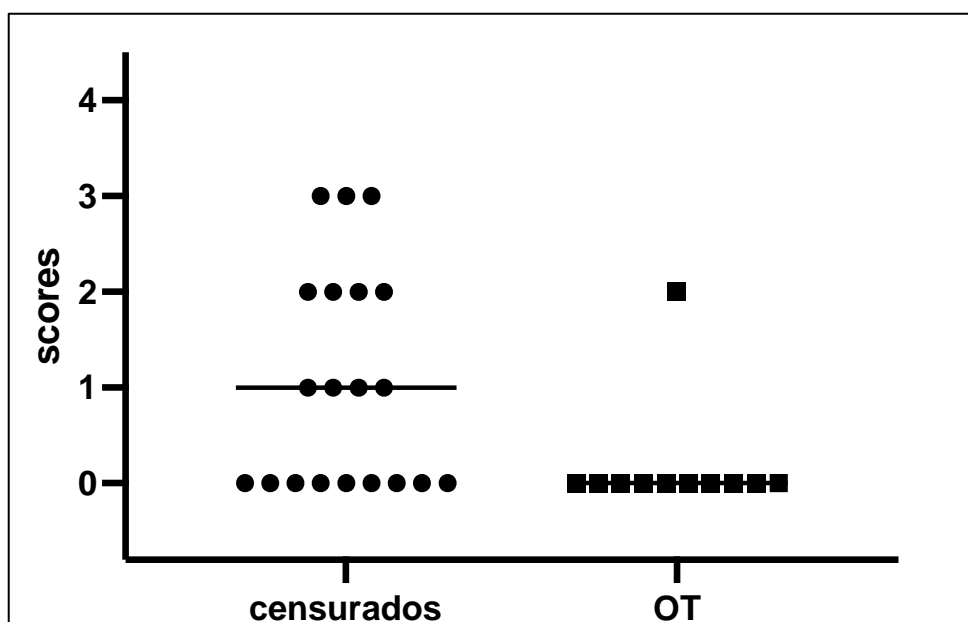


Figura 13. Distribuição dos escores de positividade membranar para ADAMTS2 em mastócitos neoplásicos de casos cesurados e óbito em função do tumor (OT) (Teste t não pareado,  $P = 0,0186$ ).

Figura 14 – Curvas de sobrevida da positividade membranar de ADAMTS2 em mastócitos neoplásicos.

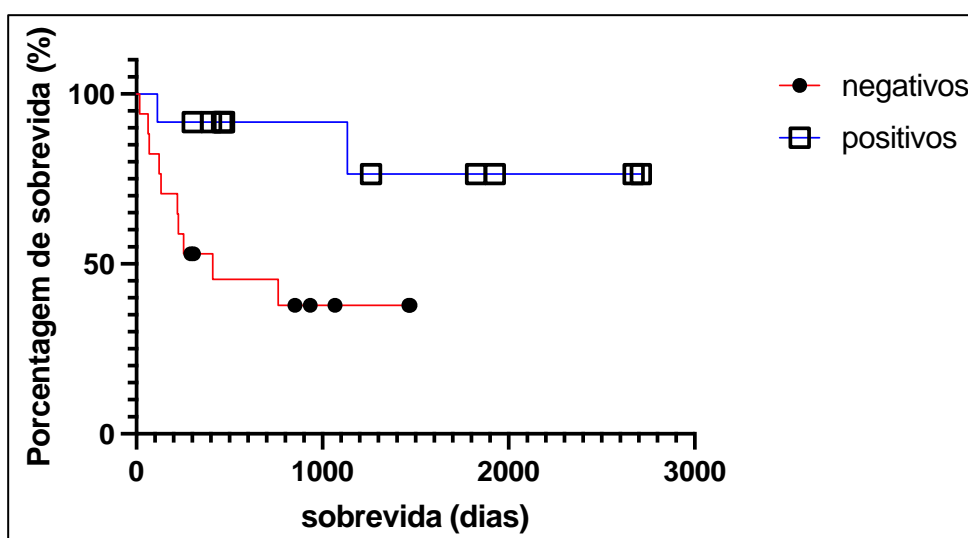


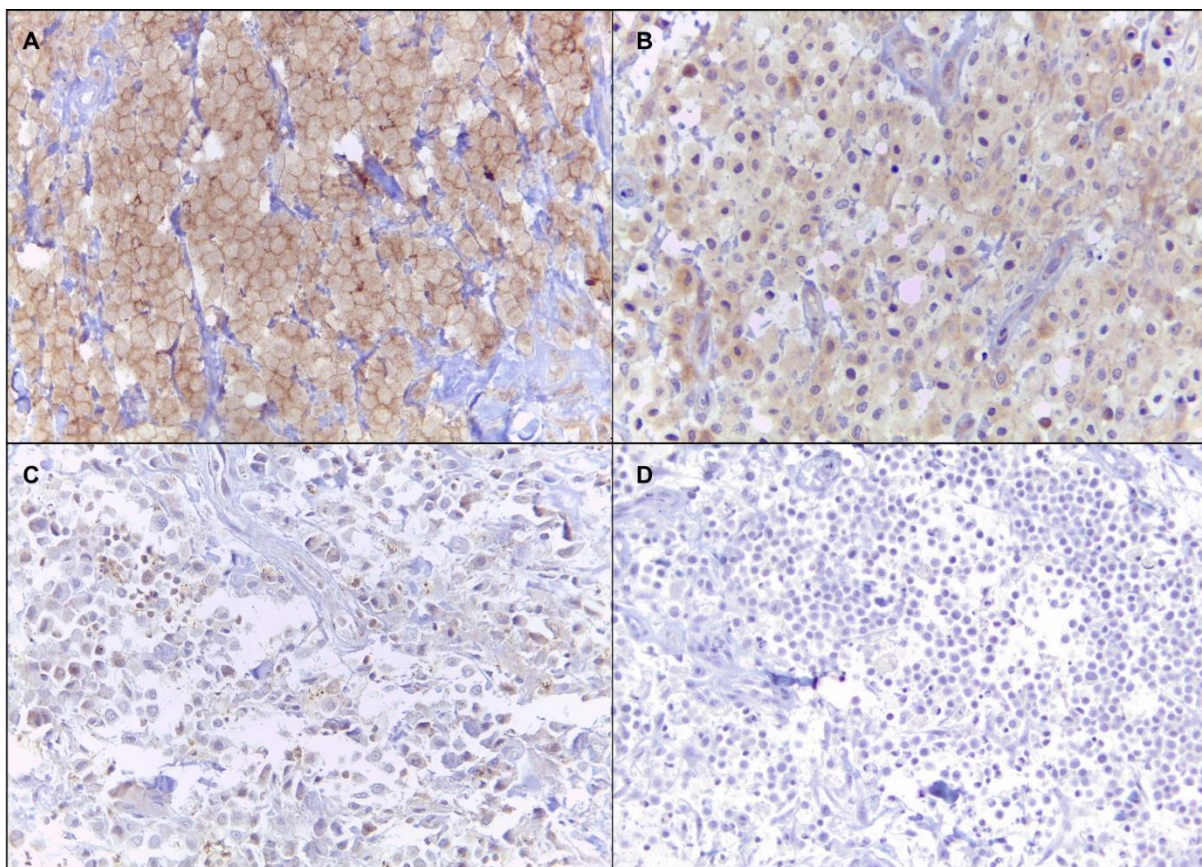
Figura 14. Curvas de sobrevida para cães com expressão negativa (escore 0) e positiva (escore 1 a 4) de ADAMTS2 na membrana de mastócitos neoplásicos (Kaplan-Meier seguido por log-rank test;  $P =$

0,0202,  $\chi^2 = 5,392$ ). Pontos indicam eventos censurados. Mediana de sobrevida = 410 dias para os casos negativos.

### 5.3 BMP1

Todas as amostras apresentaram positividade para BMP1, com *escore* variável de positividade no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas, de fibroblastos, e também de intensidade (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Fig. 15, Fig. 16 e Fig. 17)

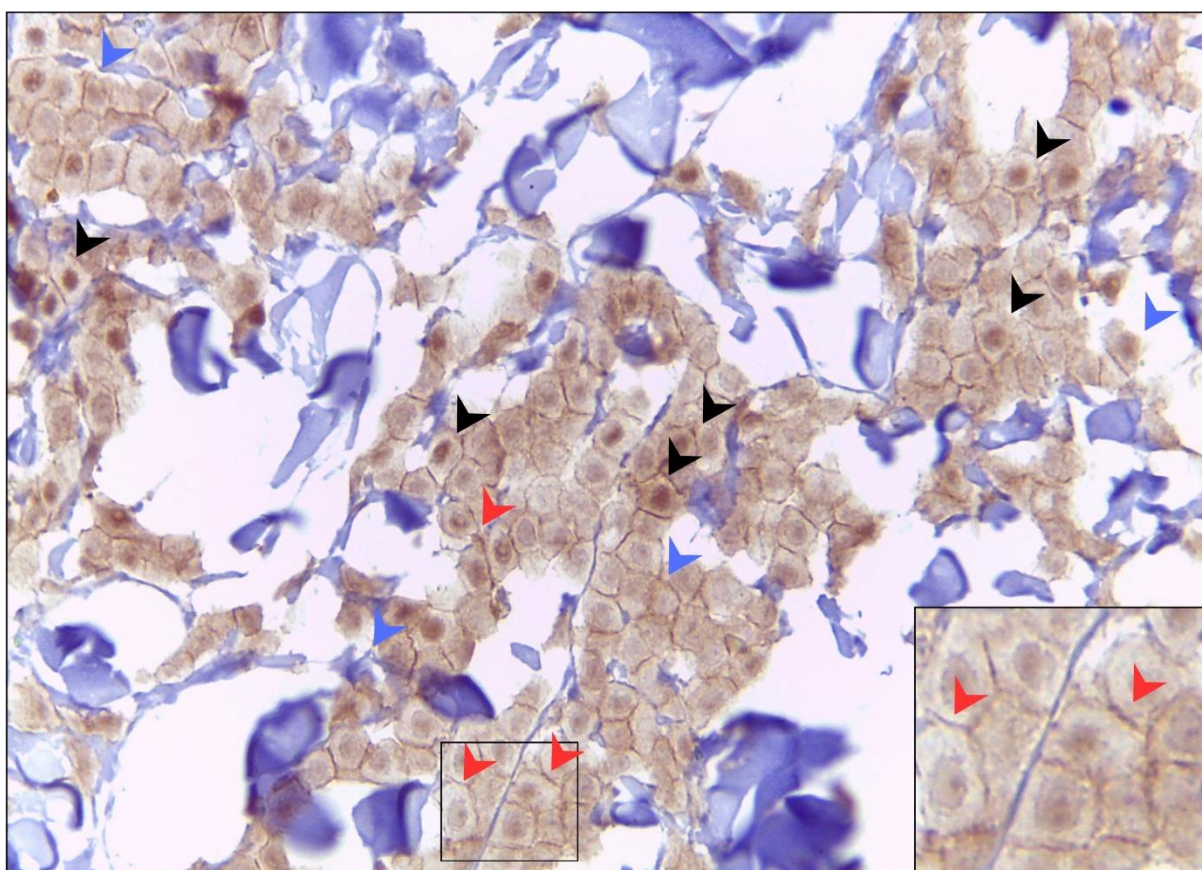
Figura 15 – Imunomarcção para BMP1 em MCTs.



**Figura 15.** Imunomarcção para BMP1 em mastocitomas cutâneos caninos. Fotomicrografias mostrando (A) intensidade de imunomarcção forte (*escore* 3), 10 a 25% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (*escore* 1), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (*escore* 4), mais de 75% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (*escore* 4), 50% a 75% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (*escore* 3), 50 a 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (*escore* 3) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (*escore* 0); (B) intensidade de imunomarcção moderada (*escore* 2), 50 a

75% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 3), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 50 a 75% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 3), mais de 75% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 4), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (C) intensidade de imunomarcção fraca (escore 1), 10 a 25% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 1), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 25 a 50% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 2), menos de 10% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 0), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (D) controle negativo para BMP1. Imuno-histoquímica para BMP1, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

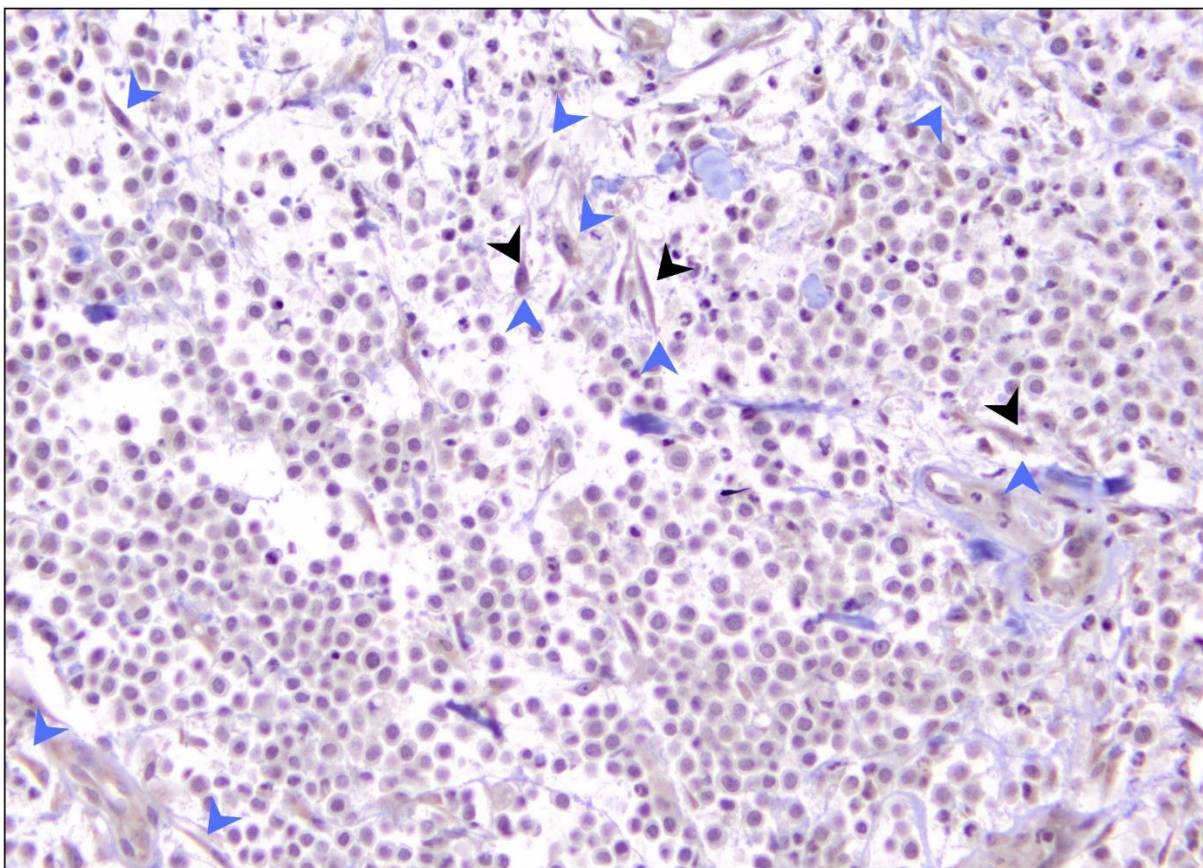
Figura 16 – Padrões de imunomarcção de BMP1 em mastócitos neoplásicos.



**Figura 16.** Padrões de Imunomarcção de BMP1 em mastócitos neoplásicos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcção nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcção em citoplasma; cabeça de seta vermelha = exemplo de imunomarcção em membrana plasmática. Imuno-histoquímica para BMP1, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.



Figura 17 – Padrões de imunomarcacão de BMP1 em fibroblastos.



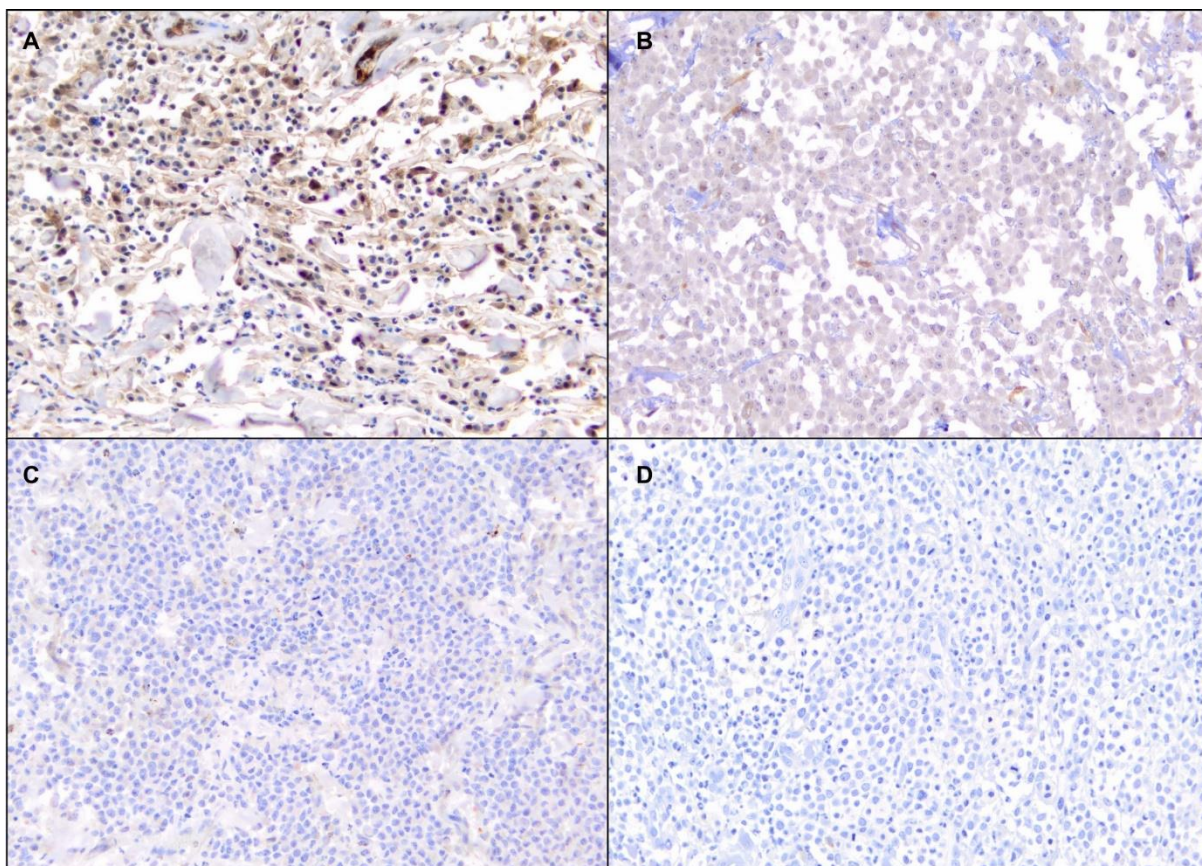
**Figura 17.** Padrões de Imunomarcacão de BMP1 em fibroblastos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcacão nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcacão em citoplasma. Imuno-histoquímica para BMP1, contracoloraçãocom hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Células endoteliais e leucócitos, também apresentaram positividade variável. A positividade nuclear em mastócitos neoplásicos foi significativamente maior em mastocitomas de grau III ( $P = 0,0342$ ), assim como a positividade membranar ( $P = 0,0447$ ). Não houve associaçãosignificante entre os escores de imunomarcacão de BMP1 e o sistema de graduaçãode Kiupel nem com a sobrevida.

#### 5.4 MMP14

Todas as amostras apresentaram positividade para MMP14, com *escore* variável de positividade no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas, de fibroblastos, e também de intensidade (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Fig. 18, Fig. 19 e Fig. 20).

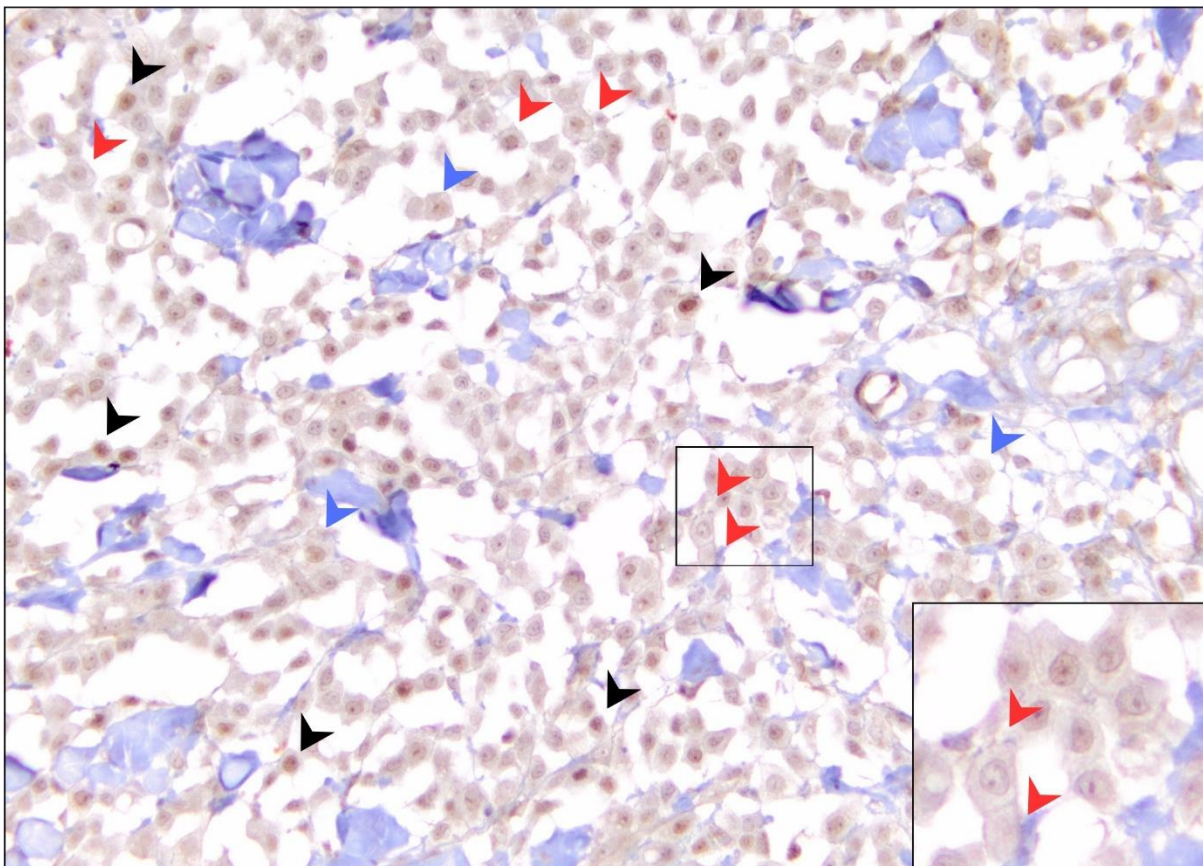
Figura 18 – Imunomarcacão para MMP14 em MCTs.



**Figura 18.** Imunomarcacão para MMP14 em mastocitomas cutâneos caninos. Fotomicrografias mostrando (A) intensidade de imunomarcacão forte (escore 3), 25 a 50% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 2), mais de 75% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 50 a 75% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 3), 25 a 50% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos (escore 2), 50 a 75% de imunomarcacão citoplasmática em fibroblastos (escore 3) e menos de 10% de imunomarcacão membranar em fibroblastos (escore 0); (B) intensidade de imunomarcacão moderada (escore 2), 10 a 25% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 1), mais de 75% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 10 a 25% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 1), 25 a 50% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos (escore 2), mais de 75% de imunomarcacão citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcacão membranar em fibroblastos (escore 0); (C) intensidade de imunomarcacão fraca (escore 1), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 0), 10 a 25% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 1), 10 a 25% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 1), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos (escore 0), 25 a 50% de imunomarcacão citoplasmática em fibroblastos (escore 2) e menos de 10% de imunomarcacão membranar em fibroblastos (escore 0); (D) controle negativo para MMP14. Imuno-histoquímica para MMP14, contracoloraçã com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

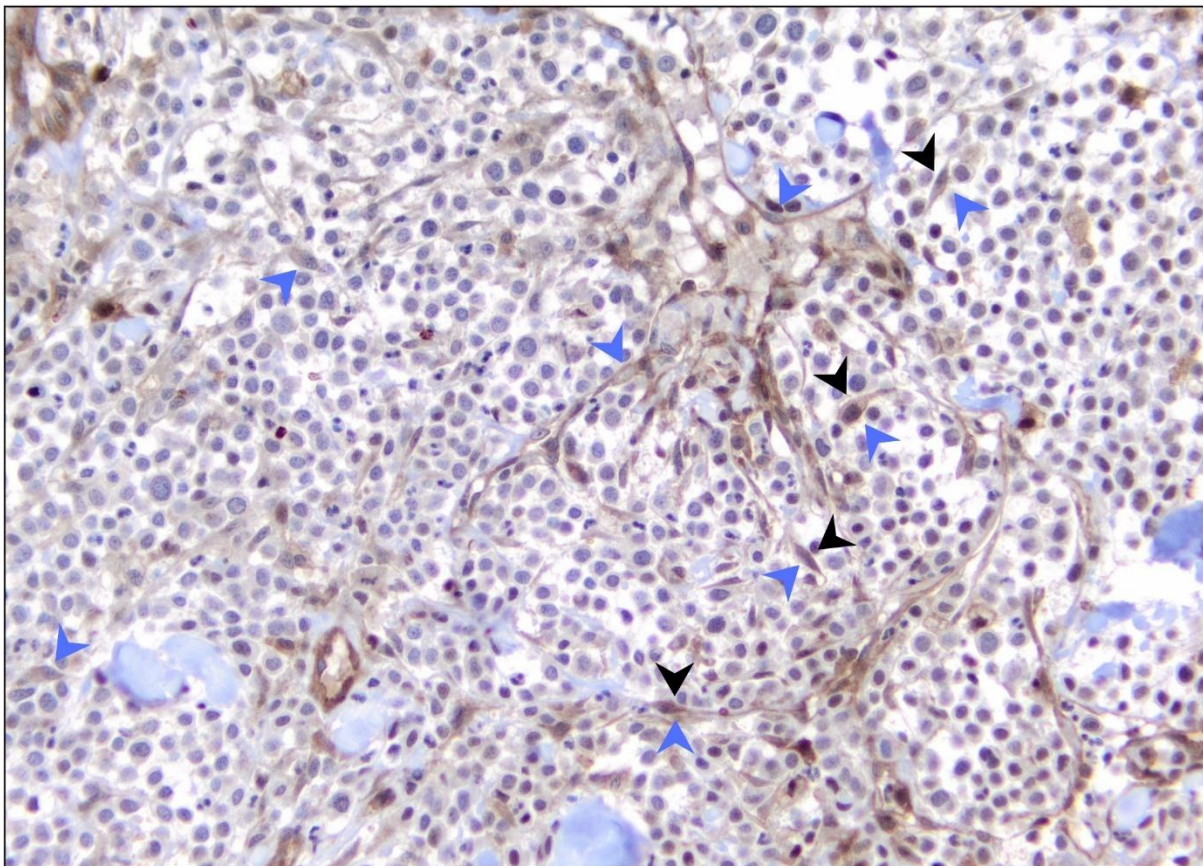


Figura 19 – Padrões de imunomarcacão de MMP14 em mastócitos neoplásicos.



**Figura 19.** Padrões de Imunomarcacão de MMP14 em mastócitos neoplásicos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcacão nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcacão em citoplasma; cabeça de seta vermelha = exemplo de imunomarcacão em membrana plasmática. Imuno-histoquímica para MMP14, contracoloraçao com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

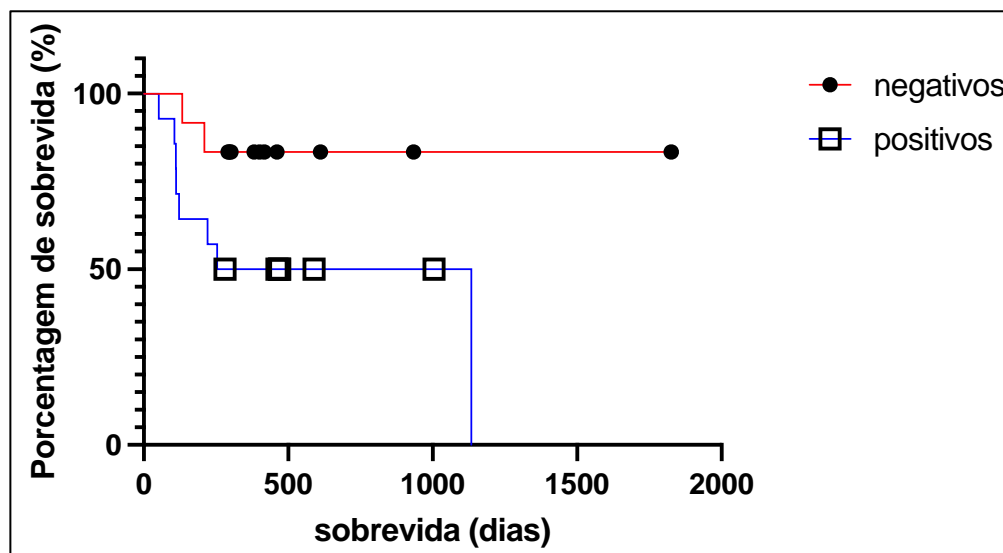
Figura 20 – Padrões de imunomarcacão de MMP14 em fibroblastos.



**Figura 20.** Padrões de Imunomarcacão de MMP14 em fibroblastos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcacão nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcacão em citoplasma. Imuno-histoquímica para MMP14, contracoloraçã com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Células endoteliais e leucócitos, também apresentaram positividade variável. A positividade nuclear em mastócitos neoplásicos e em fibroblastos foi significativamente maior em mastocitomas de grau III ( $P = 0,0423$  e  $0,0201$ , respectivamente). Além disso, a positividade nuclear de mastócitos neoplásicos foi significativamente maior em mastocitomas de alto grau ( $P = 0,0413$ ). Cães com maior positividade para MMP14 na membrana citoplasmática dos mastócitos neoplásicos tiveram uma sobrevida significativamente menor ( $P=0,0416$ ; mediana de sobrevida para o grupo negativo = 694 dias) (Fig. 21).

Figura 21 – Curvas de sobrevida para cães que apresentaram expressão membranar de MMP14 em mastócitos neoplásicos.



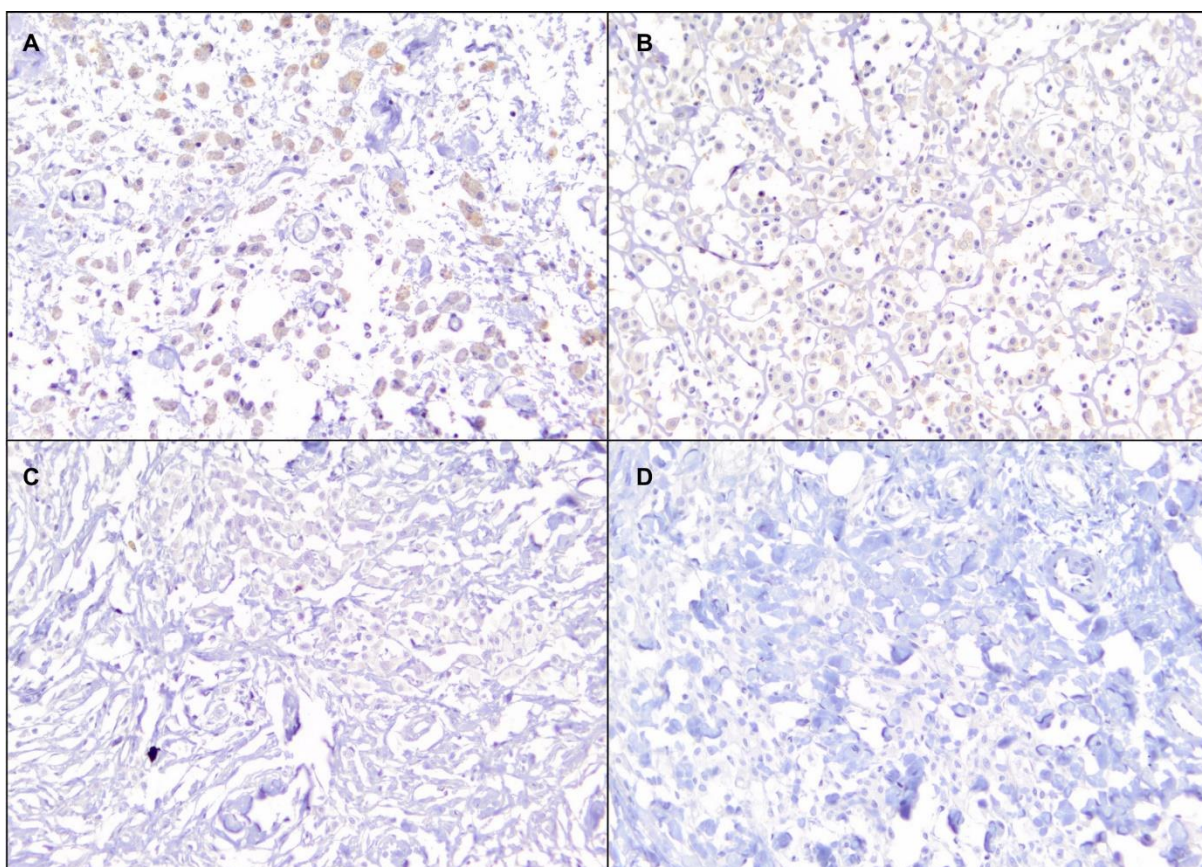
**Figura 21.** Curvas de sobrevida para cães com expressão negativa (escore 0) e positiva (escore 1 a 4) de MMP14 na membrana de mastócitos neoplásicos (Kaplan-Meier seguido por log-rank test;  $P = 0,0416$ ,  $\chi^2 = 4,153$ ). Pontos indicam eventos censurados. Mediana de sobrevida = 694 dias para os casos positivos.

## 5.5 LOXL2

Todas as amostras apresentaram positividade para LOXL2, com *escore* variável de positividade no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas, de fibroblastos, e também de intensidade (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Fig. 22, Fig. 23 e Fig. 24). Células endoteliais e leucócitos, também apresentaram positividade variável. Não houve associação significativa entre o *escore* de imunomarcacão de LOXL2, a graduação histológica e o tempo de sobrevida.



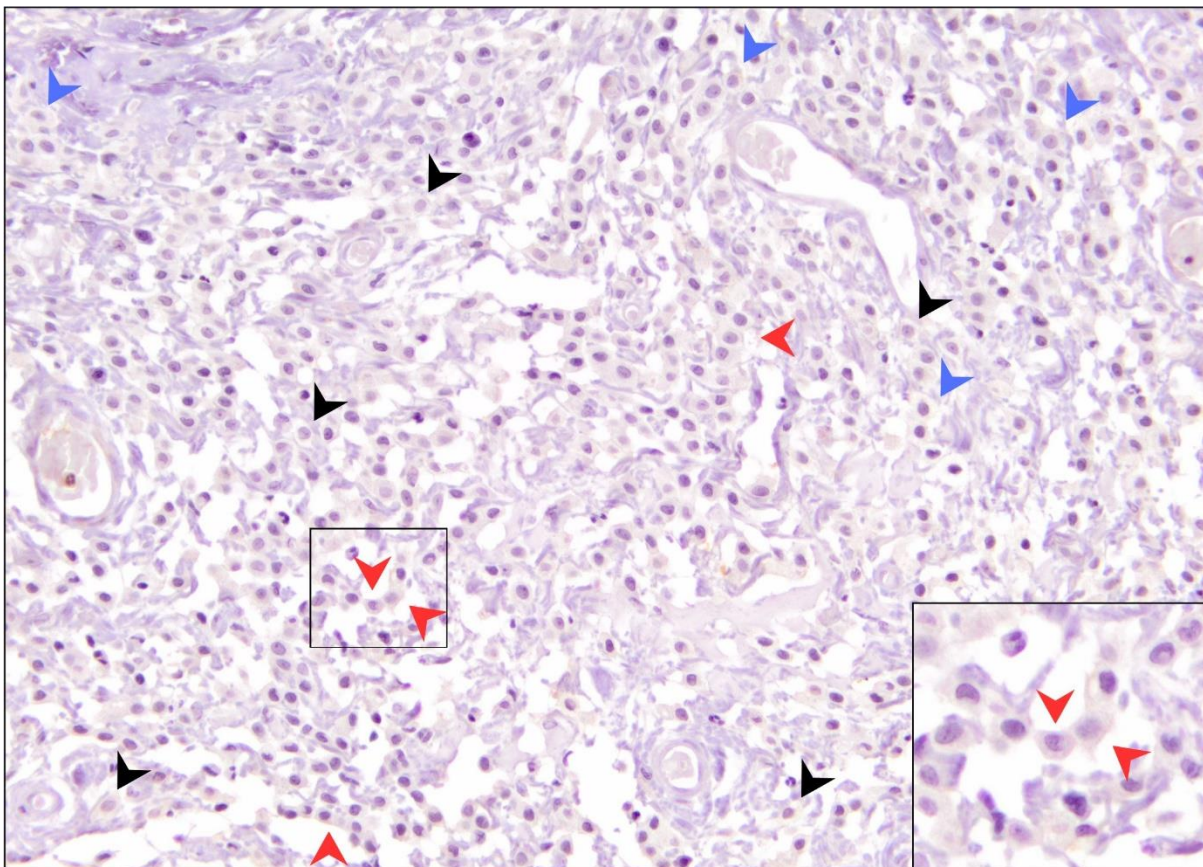
Figura 22 – Imunomarcacão para LOXL2 em MCTs.



**Figura 22.** Imunomarcacão para LOXL2 em mastocitomas cutâneos caninos. Fotomicrografias mostrando (A) intensidade de imunomarcacão forte (escore 3), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 0), mais de 75% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), menos de 10% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 0), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos (escore 0), menos de 10% de imunomarcacão citoplasmática em fibroblastos (escore 0) e menos de 10% de imunomarcacão membranar em fibroblastos (escore 0); (B) intensidade de imunomarcacão moderada (escore 2), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 0), mais de 75% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 50 a 75% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 3), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos (escore 0), 50 a 75% de imunomarcacão citoplasmática em fibroblastos (escore 3) e menos de 10% de imunomarcacão membranar em fibroblastos (escore 0); (C) intensidade de imunomarcacão fraca (escore 1), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 0), 50 a 75% de imunomarcacão citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 3), 25 a 50% de imunomarcacão membranar em mastócitos neoplásicos (escore 2), menos de 10% de imunomarcacão nuclear em fibroblastos (escore 0), 50 a 75% de imunomarcacão citoplasmática em fibroblastos (escore 3) e menos de 10% de imunomarcacão membranar em fibroblastos (escore 0); (D)

controle negativo para LOXL2. Imuno-histoquímica para LOXL2, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

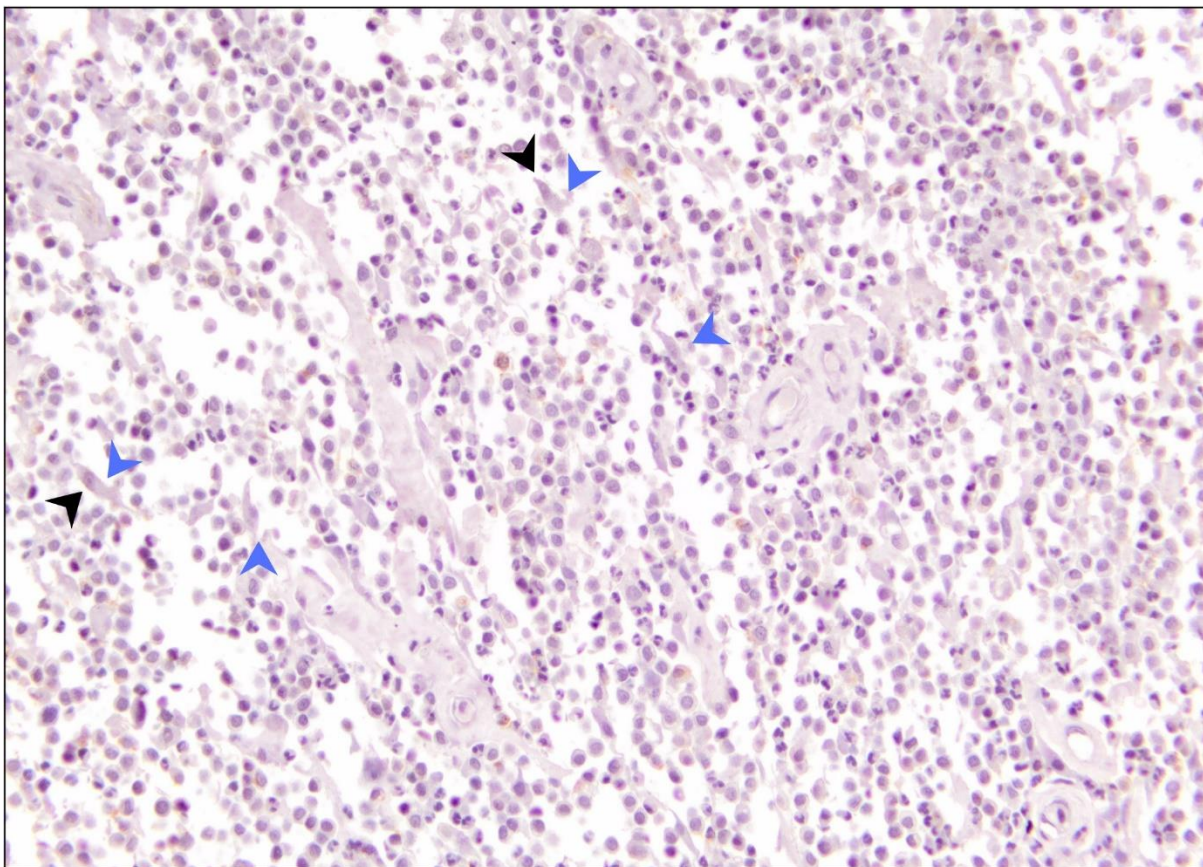
Figura 23 – Padrões de imunomarcção de LOXL2 em mastócitos neoplásicos.



**Figura 23.** Padrões de Imunomarcção de LOXL2 em mastócitos neoplásicos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcção nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcção em citoplasma; cabeça de seta vermelha = exemplo de imunomarcção em membrana plasmática. Imuno-histoquímica para LOXL2, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.



Figura 24 – Padrões de imunomarcacão de LOXL2 em fibroblastos.

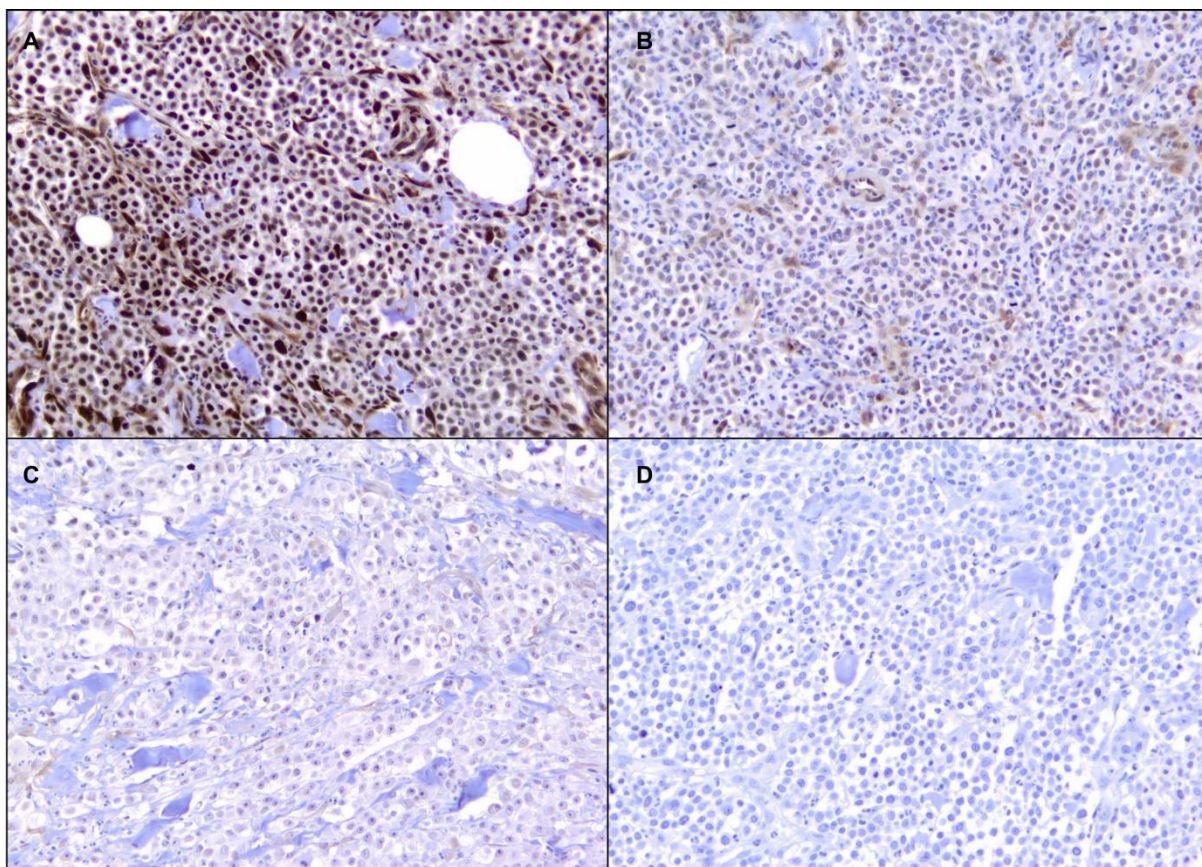


**Figura 24.** Padrões de Imunomarcacão de LOXL2 em fibroblastos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcacão nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcacão em citoplasma. Imuno-histoquímica para LOXL2, contracoloraçãocom hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

## 5.6 PDGFRA

Todas as amostras apresentaram positividade para PDGFRA, com escore variável de positividade no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas, de fibroblastos, e também de intensidade (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Fig. 25, Fig. 26 e Fig. 27). Células endoteliais e leucócitos, também apresentaram positividade variável. Não houve associaçãosignificante entre o escore de imunomarcacão de PDGFRA, a graduaçãohistológica e o tempo de sobrevida.

Figura 25 – Imunomarcção para PDGFRA em MCTs.

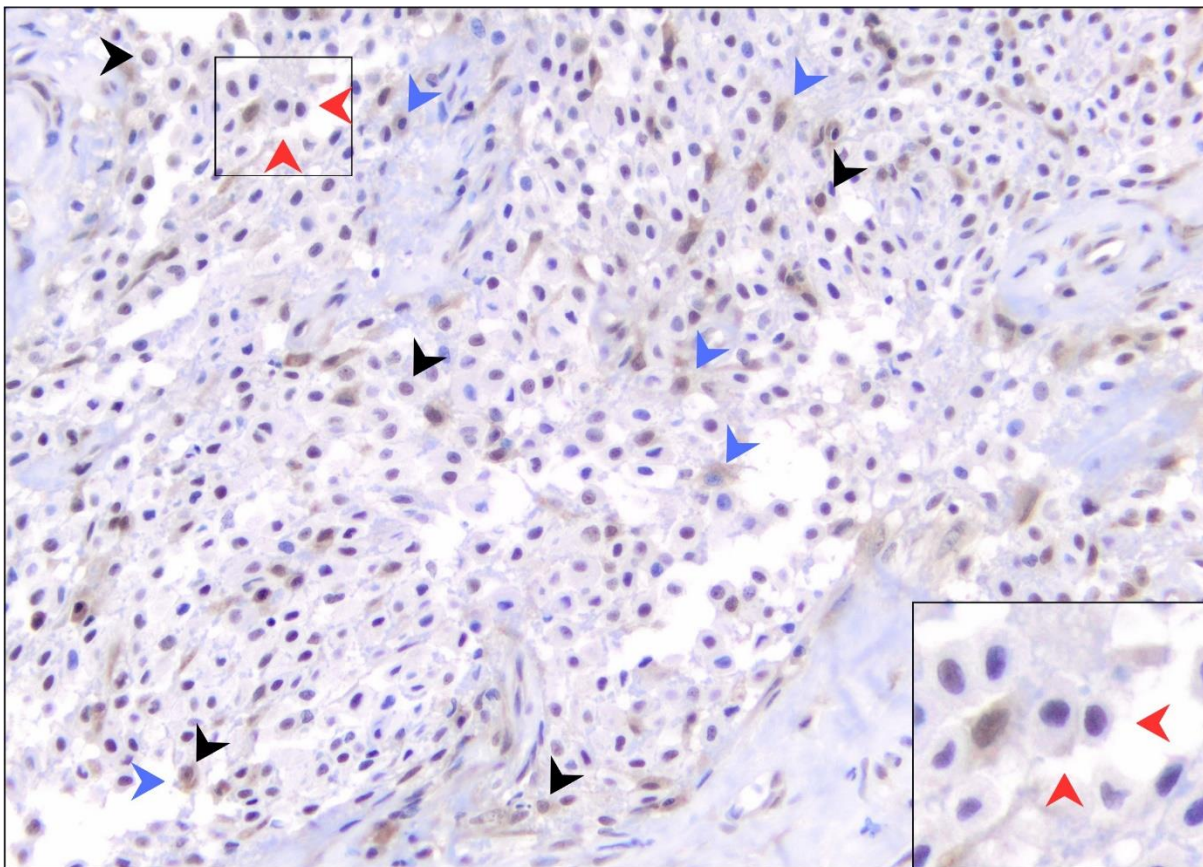


**Figura 25.** Imunomarcção para PDGFRA em mastocitomas cutâneos caninos. Fotomicrografias mostrando (A) intensidade de imunomarcção forte (escore 3), 25 a 50% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 2), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 10 a 25% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 1), menos de 10% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 0), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (B) intensidade de imunomarcção moderada (escore 2), 10 a 25% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 1), 10 a 25% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 1), menos de 10% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 0), menos de 10% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 0), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (C) intensidade de imunomarcção fraca (escore 1), 25 a 50% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 2), 50 a 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 3), menos de 10% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 0), menos de 10% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 0), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (D) controle



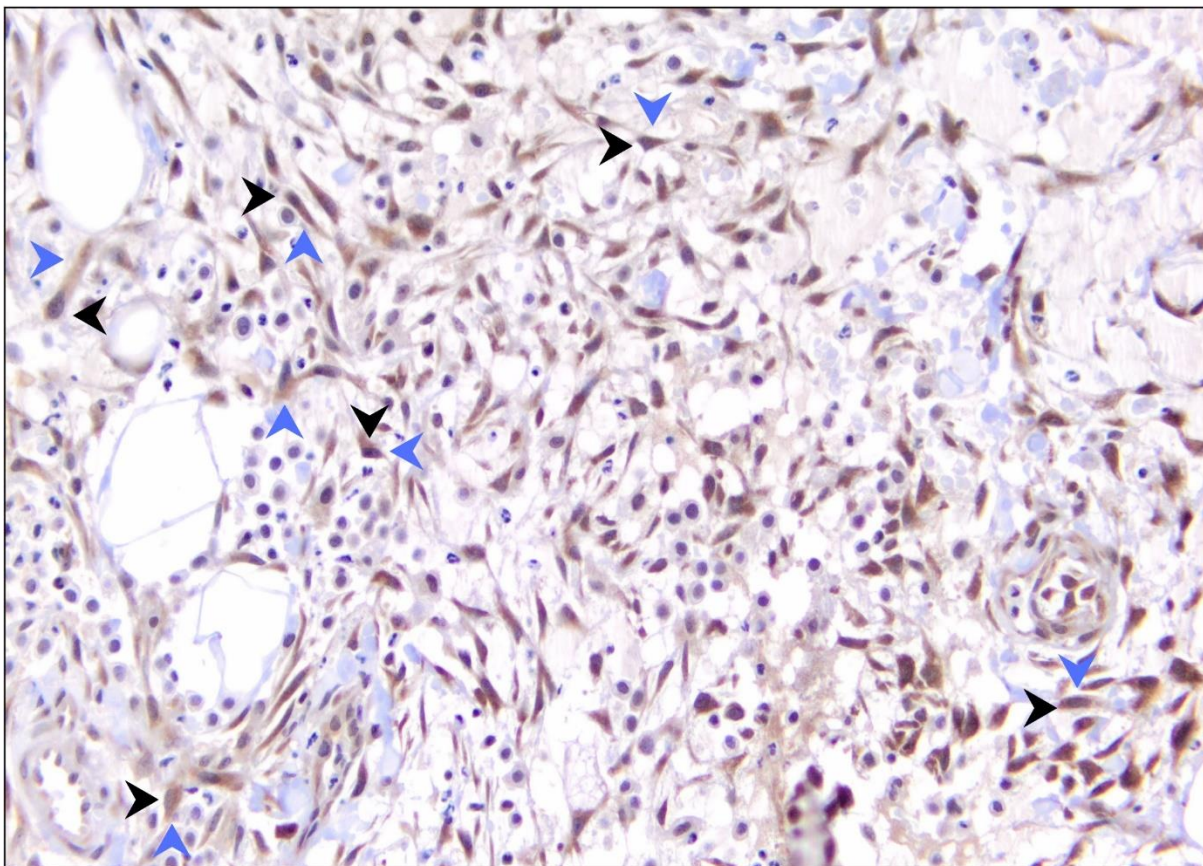
negativo para PDGFRA. Imuno-histoquímica para PDGFRA, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Figura 26 – Padrões de imunomarcção de PDGFRA em mastócitos neoplásicos.



**Figura 26.** Padrões de Imunomarcção de PDGFRA em mastócitos neoplásicos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcção nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcção em citoplasma; cabeça de seta vermelha = exemplo de imunomarcção em membrana plasmática. Imuno-histoquímica para PDGFRA, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Figura 27 – Padrões de imunomarcacão de PDGFRA em fibroblastos.



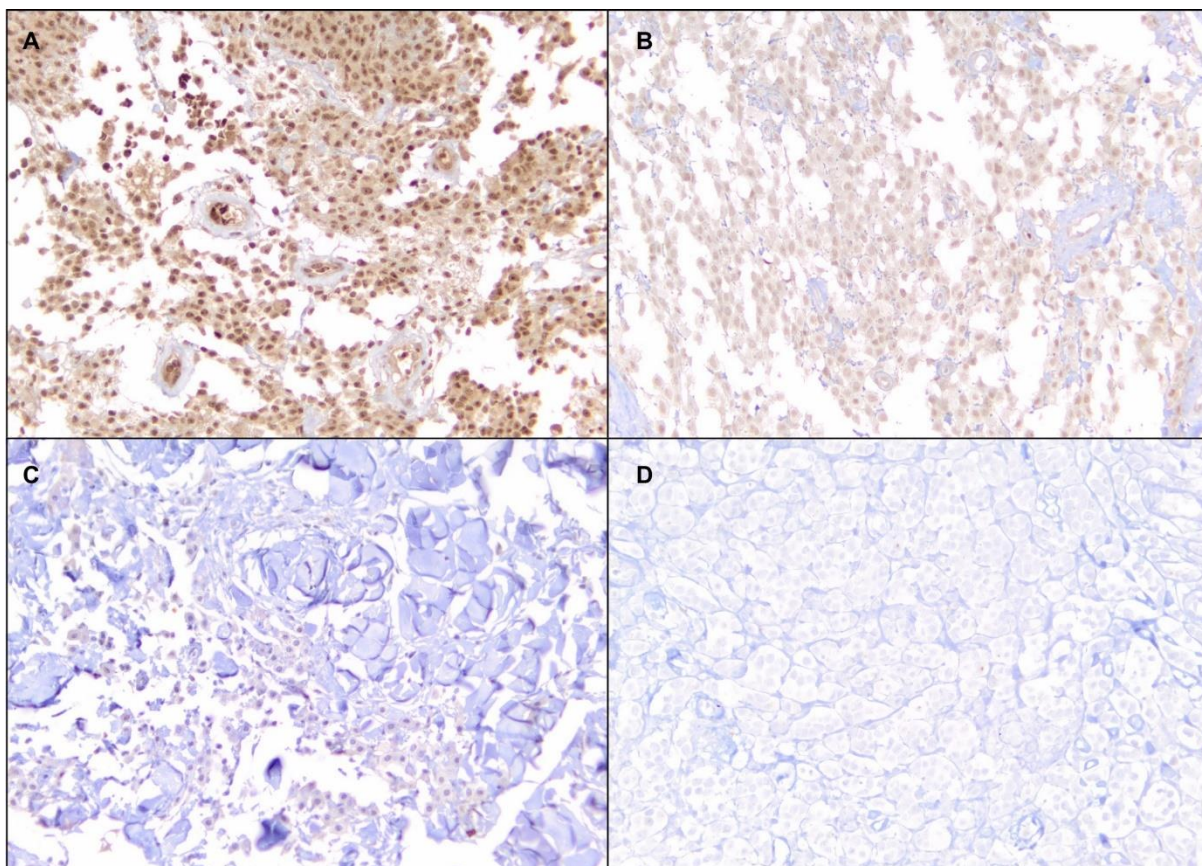
**Figura 27.** Padrões de Imunomarcacão de PDGFRA em fibroblastos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcacão nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcacão em citoplasma. Imuno-histoquímica para PDGFRA, contracoloraçã com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

## 5.7 SPARC

Todas as amostras apresentaram positividade para SPARC, com escore variável de positividade no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas, de fibroblastos, e também de intensidade (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Fig. 28, Fig. 29 e Fig. 30). Células endoteliais e leucócitos, também apresentaram positividade variável. Não houve associaçã significativa entre o escore de imunomarcacão de SPARC, a graduaçã histológica e o tempo de sobrevida.



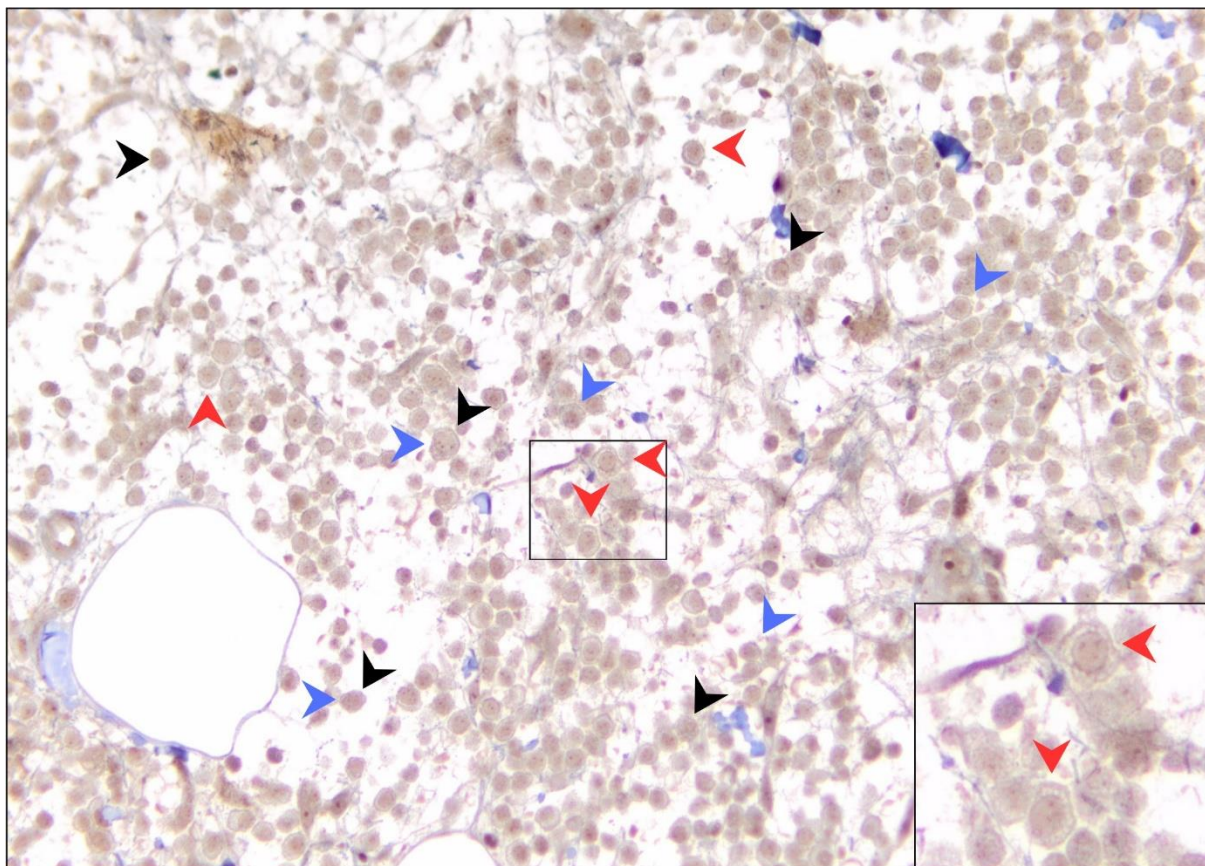
Figura 28 – Imunomarcção para SPARC em MCTs.



**Figura 28.** Imunomarcção para SPARC em mastocitomas cutâneos caninos. Fotomicrografias mostrando (A) intensidade de imunomarcção forte (escore 3), mais de 75% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 4), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), menos de 10% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 0), mais de 75% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 4), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (B) intensidade de imunomarcção moderada (escore 2), mais de 75% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 4), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 50 a 75% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 3), mais de 75% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 4), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 4) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (C) intensidade de imunomarcção fraca (escore 1), menos de 10% de imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos (escore 0), mais de 75% de imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos (escore 4), 25 a 50% de imunomarcção membranar em mastócitos neoplásicos (escore 2), 25 a 50% de imunomarcção nuclear em fibroblastos (escore 2), 25 a 50% de imunomarcção citoplasmática em fibroblastos (escore 2) e menos de 10% de imunomarcção membranar em fibroblastos (escore 0); (D)

controle negativo para SPARC. Imuno-histoquímica para SPARC, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

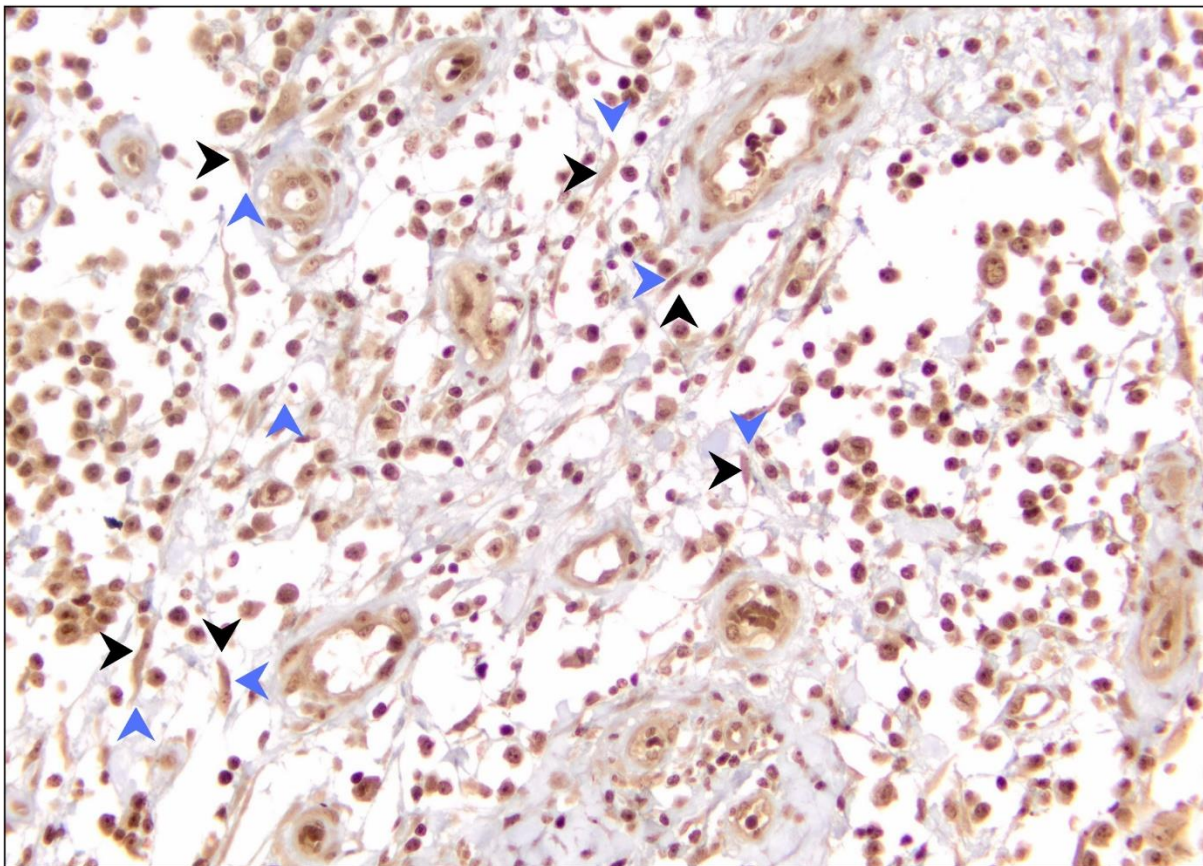
Figura 29 – Padrões de imunomarcção de SPARC em mastócitos neoplásicos.



**Figura 29.** Padrões de Imunomarcção de SPARC em mastócitos neoplásicos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcção nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcção em citoplasma; cabeça de seta vermelha = exemplo de imunomarcção em membrana plasmática. Imuno-histoquímica para SPARC, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.



Figura 30 – Padrões de imunomarcação de SPARC em fibroblastos.



**Figura 30.** Padrões de Imunomarcação de SPARC em fibroblastos. Cabeça de seta preta = exemplo de imunomarcação nuclear; cabeça de seta azul = exemplo de imunomarcação em citoplasma. Imuno-histoquímica para SPARC, contracoloração com hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Tabela 1 – Número de amostras por escore na análise da imunomarcção em mastócitos neoplásicos.

Imunomarcção nuclear em mastócitos neoplásicos						
ESCORE	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOXL2	PDGFRA	SPARC
0	26 (68%)	16 (34%)	14 (41%)	36 (97%)	8 (23%)	2 (7%)
1	2 (5%)	11 (24%)	2 (6%)	1 (3%)	8 (23%)	1 (3%)
2	8 (21%)	10 (21%)	6 (18%)	0 (0%)	13 (37%)	0 (0%)
3	1 (3%)	9 (19%)	4 (12%)	0 (0%)	5 (14%)	4 (13%)
4	1 (3%)	1 (2%)	8 (23%)	0 (0%)	1 (3%)	23 (77%)
Imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos						
ESCORE	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOXL2	PDGFRA	SPARC
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	11 (31%)	0 (0%)
1	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	3 (9%)	0 (0%)
2	0 (0%)	1 (2%)	1 (3%)	4 (10%)	2 (6%)	1 (3%)
3	10 (26%)	3 (6%)	7 (21%)	17 (46%)	13 (37%)	3 (10%)
4	28 (74%)	43 (92%)	25 (73%)	14 (38%)	6 (17%)	26 (87%)
Imunomarcção membranária em mastócitos neoplásicos						
ESCORE	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOXL2	PDGFRA	SPARC
0	23 (61%)	13 (28%)	11 (32%)	13 (35%)	29 (83%)	19 (63%)
1	5 (13%)	8 (17%)	3 (9%)	9 (24%)	6 (17%)	2 (7%)
2	6 (16%)	12 (25%)	13 (38%)	11 (30%)	0 (0%)	2 (7%)
3	4 (10%)	12 (25%)	6 (18%)	3 (8%)	0 (0%)	7 (23%)
4	0 (0%)	2 (5%)	1 (3%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 – Número de amostras por escore na análise da imunomarcção em fibroblastos\*.

Imunomarcção nuclear em fibroblastos						
ESCORE	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOXL2	PDGFRA	SPARC
0	36 (96%)	18 (38%)	8 (23%)	36 (97%)	16 (46%)	1 (3%)
1	0 (0%)	2 (4%)	7 (21%)	0 (0%)	3 (8%)	0 (0%)
2	0 (0%)	6 (13%)	7 (21%)	0 (0%)	3 (8%)	4 (14%)
3	1 (2%)	15 (32%)	2 (6%)	1 (3%)	6 (18%)	7 (23%)
4	1 (2%)	6 (13%)	10 (29%)	0 (0%)	7 (20%)	18 (60%)
Imunomarcção citoplasmática em fibroblastos						
ESCORE	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOXL2	PDGFRA	SPARC
0	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (14%)	2 (6%)	1 (3%)
1	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	1 (3%)	0 (0%)
2	2 (4%)	6 (13%)	5 (15%)	16 (44%)	2 (6%)	3 (10%)
3	17 (45%)	23 (49%)	9 (26%)	12 (32%)	10 (28%)	7 (23%)
4	17 (45%)	18 (38%)	20 (59%)	2 (5%)	20 (57%)	19 (64%)

\*Todas as amostras apresentaram escore 0 de imunomarcção membranar em fibroblastos para todos os anticorpos no presentes estudo. Por este motivo, essa informação foi omitida da tabela X. Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 – Número de amostras por escore na análise da intensidade de imunomarcação.

Intensidade de imunomarcação						
ESCORE	ADAMTS2	BMP1	MMP14	LOXL2	PDGFRA	SPARC
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)
1	2 (5%)	4 (9%)	2 (6%)	23 (62%)	2 (6%)	1 (3%)
2	9 (24%)	11 (23%)	3 (9%)	11 (30%)	3 (8%)	4 (13%)
3	27 (71%)	32 (68%)	29 (85%)	2 (5%)	30 (86%)	25 (84%)

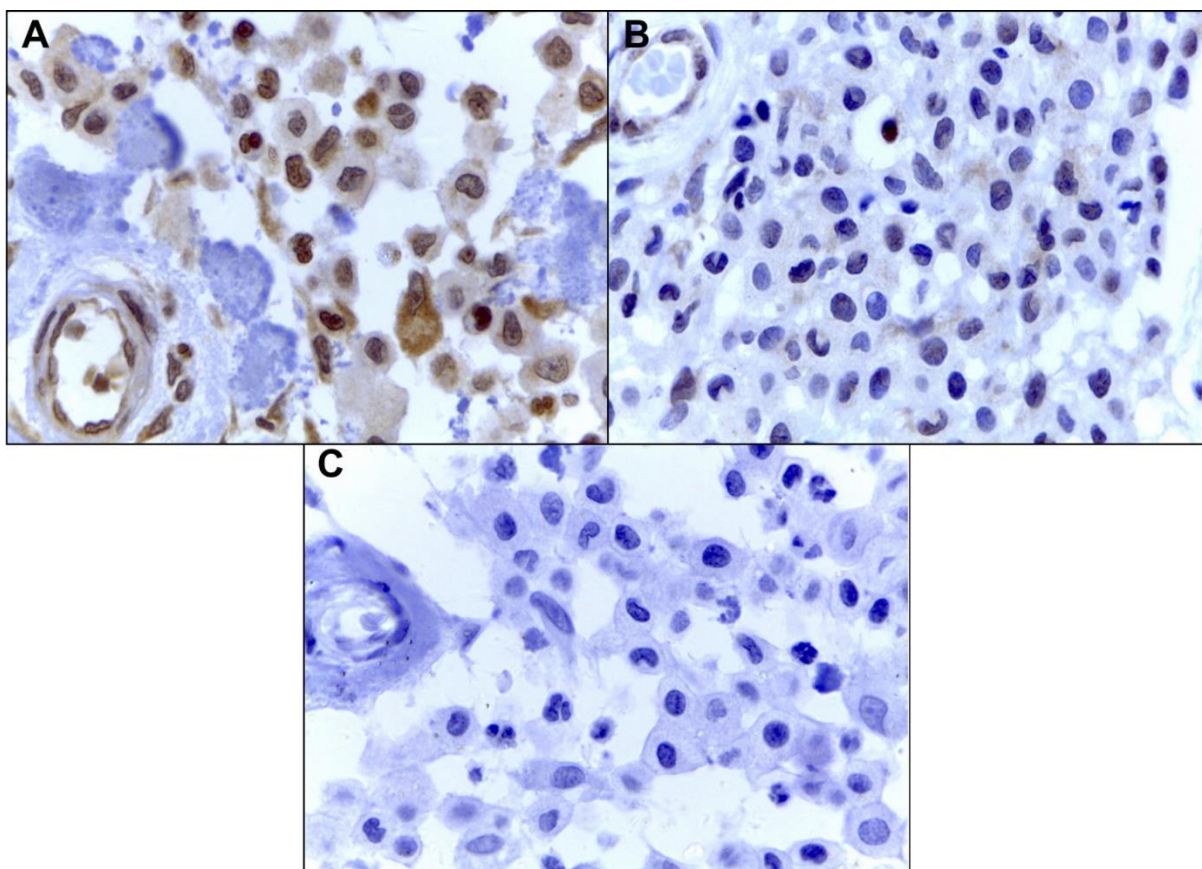
Fonte: Elaboração própria.

## 5.8 LOX

Todas as amostras foram positivas para LOX, com percentuais variáveis de positividade nuclear e citoplasmática em mastócitos neoplásicos. Outras células, como células endoteliais, fibroblastos e leucócitos, também foram variavelmente positivas (Fig. 31). As porcentagens médias de positividade nuclear e citoplasmática foram  $65,64\% \pm 22,17\%$  (média  $\pm$  DP) e  $57,38\% \pm 36,91\%$ , para tumores grau I;  $56,17 \pm 22,10\%$  e  $60,72\% \pm 25,41\%$ , para tumores grau II; e  $71,95\% \pm 26,36\%$  e  $75,61\% \pm 15,91\%$  para tumores grau III, respectivamente (Fig. 32).

As porcentagens médias de positividade nuclear e citoplasmática foram de  $56,30\% \pm 22,03\%$  e  $55,59\% \pm 27,79\%$ , para tumores de baixo grau; e  $72,62\% \pm 22,41\%$  e  $78,48\% \pm 13,67\%$  para tumores de alto grau, respectivamente. A positividade citoplasmática foi significativamente maior nos MCTs de alto grau ( $P = 0,0297$ ), enquanto não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a positividade nuclear ou entre os graus usando o sistema Patnaik.

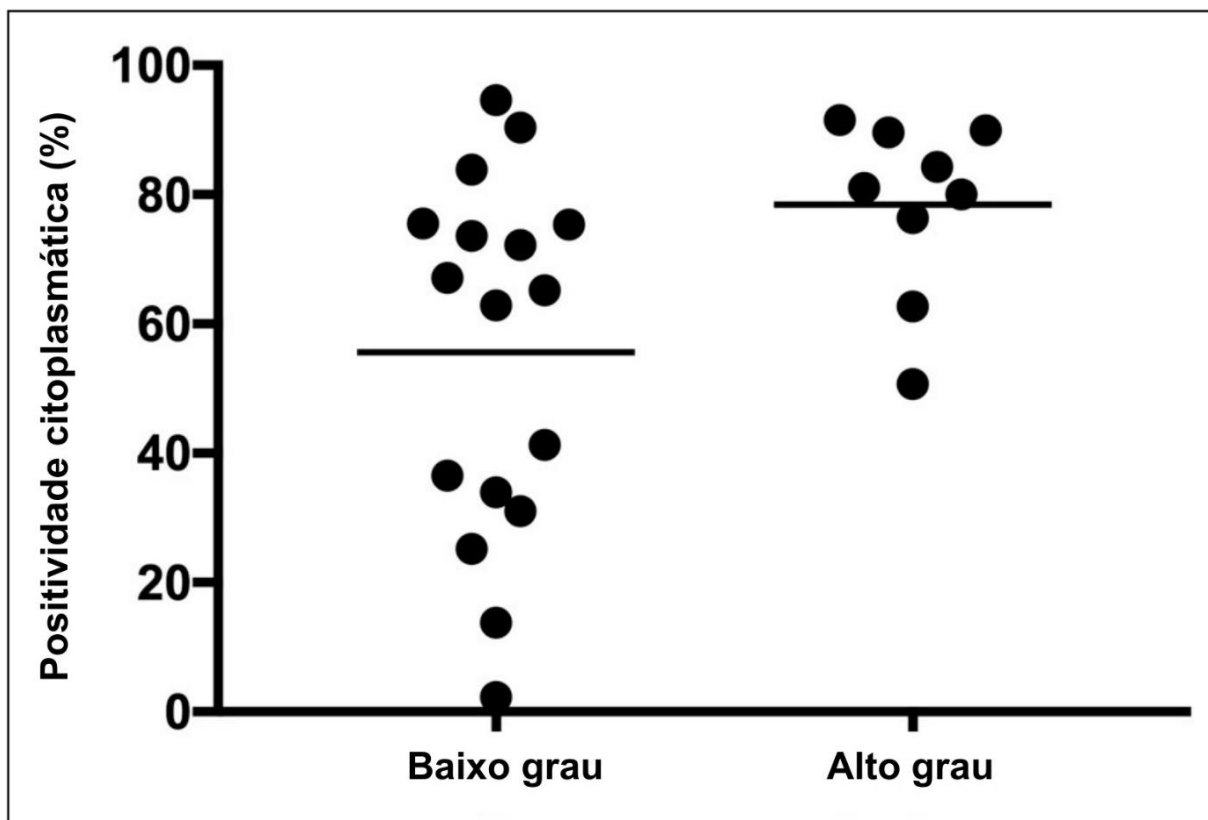
Figura 31 – Imunomarcacão para LOX em MCTs.



**Figura 31.** Imunomarcacão para LOX em mastocitomas cutâneos caninos. Fotomicrografias mostrando (A) alto percentual de imunomarcacão nuclear e citoplasmática para LOX, (B) baixo percentual de imunomarcacão nuclear e citoplasmática para LOX e (C) controle negativo para LOX. Imuno-histoquímica para LOX, contracoloraçãocom hematoxilina de Harris, objetiva de 100x.

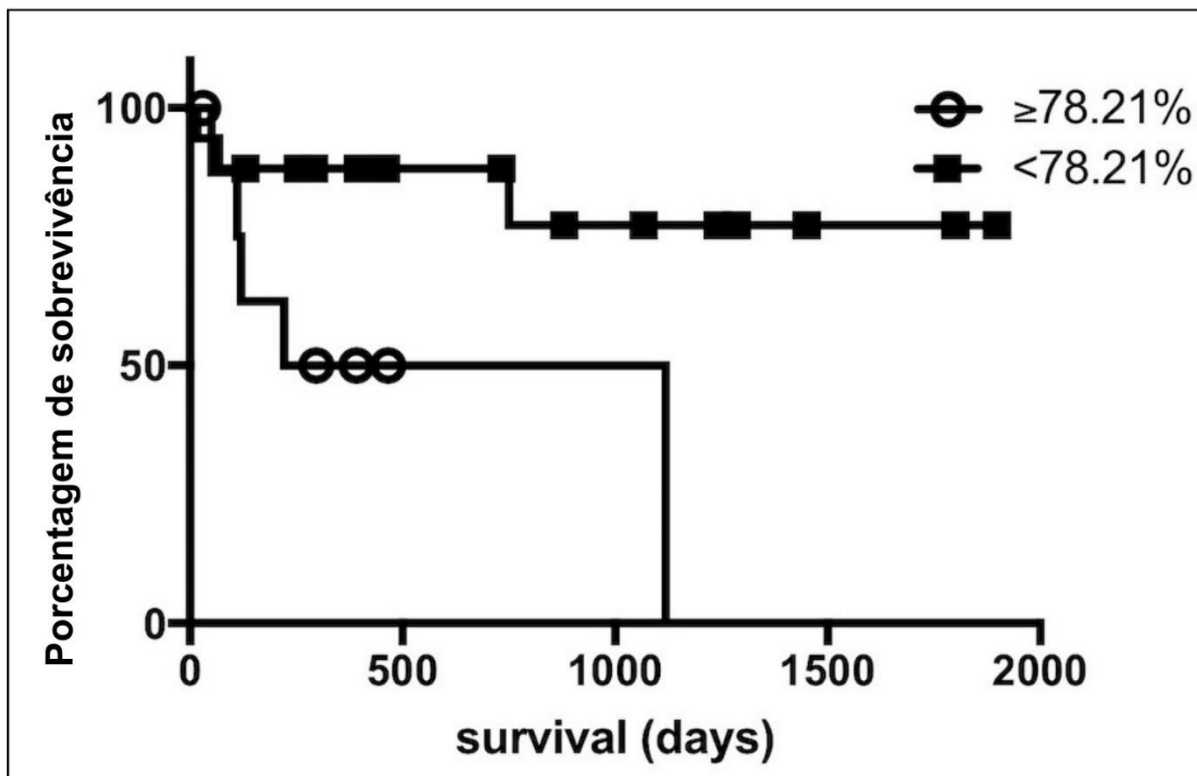
Um valor de corte de 78,21% para positividade citoplasmática foi estabelecido usando uma curva ROC e a análise de sobrevivência revelou que cães com maior porcentagem de células positivas tiveram sobrevida significativamente menor ( $P = 0,0197$ , sobrevida mediana = 670 dias) (Fig. 33).

Figura 32 – Distribuição dos percentuais de positividade citoplasmática para LOX em mastócitos neoplásicos.



**Figure 32.** Porcentagem de positividade citoplasmática para LOX em Mastócitos neoplásicos de MCTs de baixo e alto grau, de acordo com o sistema de classificação de Kiupel (Teste t não pareado,  $P = 0.0297$ ).

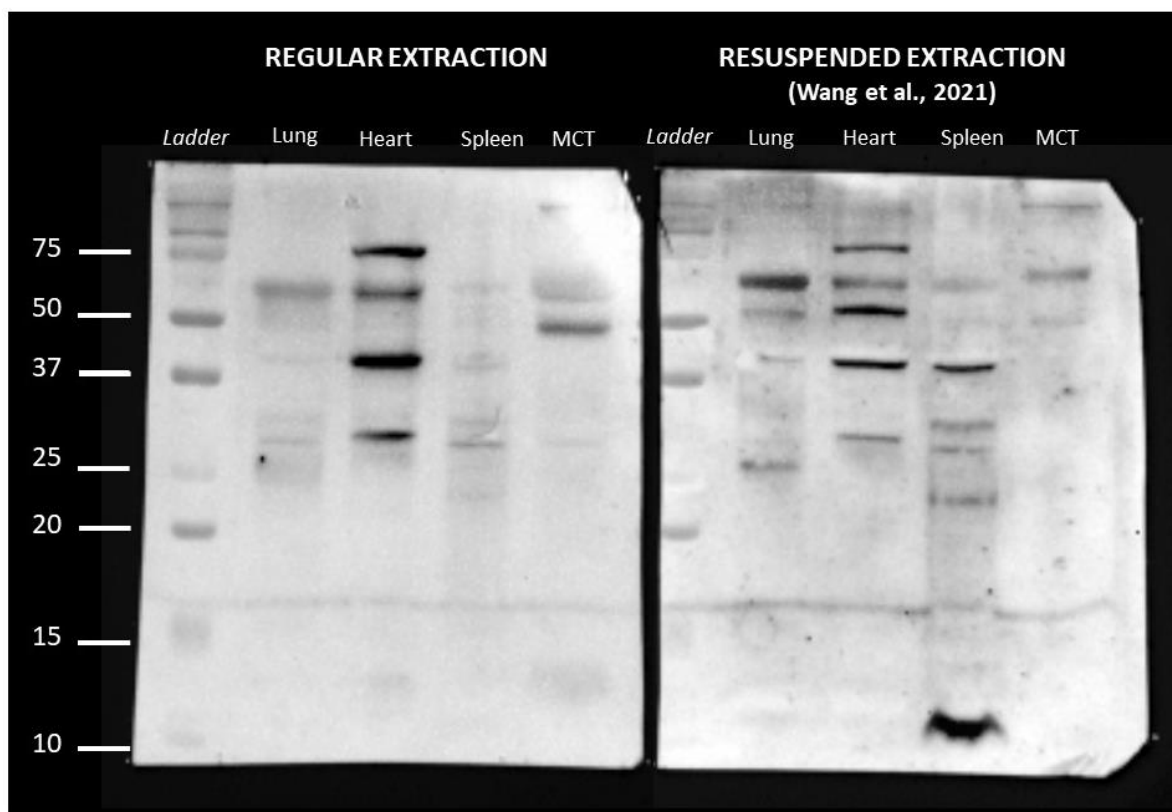
Figura 33 – Curvas de sobrevida da positividade citoplasmática de LOX em mastócitos neoplásicos.



**Figura 33.** Curvas de sobrevida para cães com baixa ( $< 78.21\%$ ) e alta ( $\geq 78.21\%$ ) positividade citoplasmática para LOX (Kaplan-Meier seguido por log-rank test;  $P = 0.0196$ ,  $\chi^2 = 5.45$ ). Pontos indicam eventos censurados. Média de sobrevida = 670 dias para os casos com alta positividade.

No Western blot, o seguinte resultado foi obtido (Fig.34):

Figura 34 – Western blot para detecção de LOX.



**Figura 34.** Detecção da proteína LOX através de Western Blot (SDS-PAGE). Revelação da membrada de PVDF. Pesos moleculares (à esquerda) indicados em kDa. 2023.

Comparando os resultados obtidos entre os dois métodos de extração (extração regular, à esquerda, e extração ressuspendida, à direita), é possível notar que, nas amostras de camundongos, a banda de 50 kDa que representa a forma imatura da proteína LOX só está presente nas amostras que passaram por um processo mais intenso de extração da proteína (extração ressuspendida). Isto pode ser atribuído ao fato da proteína LOX ser uma molécula com baixa solubilidade. Embora a forma imatura (~50kDa) da proteína seja mais solúvel que a forma madura (~32kDa), ela ainda apresenta baixa solubilidade em meio aquoso.



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho encontram-se sumarizados no Quadro 10. ADAMTS2, BMP1, MMP14 e LOX são enzimas que participam ativamente do metabolismo e remodelamento da MEC. A participação dessas proteínas é ambígua do contexto do câncer, podendo estar relacionada com a progressão da doença ou inibição do seu desenvolvimento. Estudos recentes demonstram que ADAMTS2 induz apoptose de células endoteliais por mecanismos relacionados à interação com receptores de membrana, e relaciona-se com a diminuição da vascularização intratumoral em camundongos (DUPONT *et al.*, 2022). Essa função anti-angiogênica e pró-apoptótica é uma explicação plausível do porquê a menor expressão de ADAMTS2 em mastócitos neoplásicos correlacionou-se com óbito em função do tumor e menor tempo de sobrevivência, considerando que o aumento da angiogênese está relacionado a maior malignidade (PREZIOSI *et al.*, 2004).

A superexpressão de BMP1 correlaciona-se de forma mais consistente com indução da metástase tumoral e remodelamento da matriz extracelular, o que corrobora com os achados no presente estudo (VADON-LE GOFF; HULMES; MOALI, 2015; YUNG-YU HSIEH *et al.*, 2018; WEN XIAO *et al.*, 2020; RAFI *et al.*, 2021). A MMP14, por sua vez, é uma metaloproteinase de matriz associada a membrana plasmática que promove a migração celular e encontra-se superexpressa em diversos tumores humanos (LI *et al.*, 2021). A expressão de MMP14 em fibroblastos, por outro lado, parece exercer um fator protetivo em melanomas, prejudicando o crescimento tumoral ao tornar a MEC mais rígida. Aqui, encontramos correlação entre a expressão nuclear de MMP14 – tanto em células cancerosas quanto em fibroblastos – e alto grau de malignidade tumoral, com conseqüente pior prognóstico. É possível que a expressão nuclear de MMP14 em fibroblastos nos MCTs esteja relacionada a ativação de vias de sinalização promotoras do desenvolvimento tumoral que ainda precisam ser elucidadas (TRUDEL *et al.*, 2014; PACH *et al.*, 2021).

Assim como ADAMTS2, BMP1 e MMP14, LOX também é um participante ativo no metabolismo da matriz extracelular cuja superexpressão está intimamente relacionada ao estabelecimento de pior prognóstico em diversos tipos de malignidades humanas, como câncer de ovário, mama, laringe, colorretal e gástrico, e carcinomas de cabeça e pescoço, boca, fígado e pulmão (TAKESHI NISHIOKA;

EUSTACE; WEST, 2012; QIAN XIAO; GAOXIANG GE, 2012; ROSELL-GARCÍA *et al.*, 2019; FINNEY *et al.* 2014; SALEEM *et al.*, 2019; SALEEM; RAJPUT, 2020).

Quadro 10 – Resumo dos resultados.

Mastócitos neoplásicos		
ADAMTS2	Expressão Membranar	Menor expressão (escore 0) = óbito em função do tumor
ADAMTS2	Expressão Membranar	Menor expressão (escore 0) = menor tempo de sobrevida
BMP1	Expressão Membranar	Maior expressão nos MCTs de grau III
BMP1	Expressão Nuclear	Maior expressão nos MCTs de grau III
MMP14	Expressão Membranar	Maior expressão (escore 1 a 3) = menor tempo de sobrevida
MMP14	Expressão Nuclear	Maior expressão nos MCTs de grau III
LOX	Expressão Citoplasmática	Maior expressão nos MCTs de grau III
LOX	Expressão Citoplasmática	Maior expressão ( $\geq 78,21\%$ ) = menor sobrevida
Fibroblastos		
MMP14	Expressão Nuclear	Maior expressão nos MCTs de grau III

Fonte: Elaboração própria.

A expressão de LOX está associada a várias citocinas e fatores de crescimento, sendo capaz, por exemplo, de inibir o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGFB) (WANDE LI *et al.*, 2003; ATSAWASUWAN, *et al.*, 2008). O TGFB e o fator de necrose tumoral alfa (TNFA) são conhecidos para promover a superexpressão de mRNA e proteínas de LOX em fibroblastos cardíacos, com o envolvimento das vias de sinalização PI3Kinase/Akt e Smad3: complexos ativos relacionados a Smad4 podem entrar no núcleo e ativar a

região promotora de LOX, causando aumento de expressão (VALLET; RICARD-BLUM, 2019; VOLOSHENYUK *et al.*, 2011; TENTI; VANNUCI, 2020). Zhao *et al.* (2020) demonstraram o papel anti-apoptótico de LOX em células nucleares pulpaes de ratos tratados com TNFA, suprimindo a via Fas/FasL e a fosforilação de p53 em nível nuclear (ZHAO *et al.*, 2020). Além disso, um estudo sobre cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos relatou a alta expressão de LOX e TIMP1 associada à fibrose (SOARES *et al.*, 2010).

Com relação aos resultado do protocolo de WB, é importante ressaltar que LOX é uma proteína glicosilada secretada que possui diferentes pesos moleculares de acordo com seu estágio de maturação (SMITH *et al.*, 2016). Quando a proteína ainda está em sua forma “imatura”, recém-saída do retículo endoplasmático, ela possui peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Podemos chamar esta forma “imatura” de proteína pró-LOX. Quando a pró-LOX é secretadano ambiente extracelular, onde desempenha sua função primária de reticulação de colágeno e elastina, a proteína é clivada por metaloproteinases como ADAMTS2 e BMP-1 e torna-se ativa (SMITH *et al.*, 2016; ROSELL-GARCÍA *et al.*, 2019; TENTI; VANNUCCI, 2020). Neste ponto, a pró-LOX é clivada em LOX, uma proteína com aproximadamente 32 kDa com atividade enzimática, e LOX-PP, um pró-peptídeo com aproximadamente 18 kDa. Dessa forma, é possível perceber que, pelo menos no caso da proteína LOX, um WB com bandas de “código de barras” é um resultado esperado (HUILEI WANG *et al.*, 2021). Além disso, através deste protocolo WB anti-LOX foi possível demonstrar que o anticorpo primário de escolha foi capaz de identificar a proteína LOX tanto em tecidos controle (tecidos de camundongo) quanto na amostra experimental (mastocitoma cutâneo canino). Considerando que o objetivo do protocolo de WB protocolo foi apenas confirmar a especificidade da ligação antígeno-anticorpo do anticorpo utilizado em MCTs, é possível afirmar que os resultados obtidos foram satisfatórios.

Os MCTs são em sua maioria neoplasias malignas com frequente invasão tecidual e metástase (GARRETT, 2014; DE NARDI, 2022). A progressão das neoplasias malignas está diretamente relacionada à influência das células cancerosas em seu microambiente, uma vez que a modificação do estroma causa rearranjo da vascularização local e secreção de diversos fatores biologicamente ativos (OZBEK *et al.*, 2010). Além disso, a invasão tecidual por células neoplásicas depende da ação de enzimas proteolíticas capazes de degradar a MEC, denominadas metaloproteinases

de matriz (MMPs), cuja expressão já foi identificada em MCTs (LEIBMAN *et al.*, 2000; GIATIN *et al.*, 2012; PULZ *et al.*, 2017). Em conjunto, essas observações reforçam a importância de investigações sobre fatores que podem modificar a estrutura da MEC no câncer. Estas proteínas apresentam grande potencial para serem utilizadas como marcadores prognósticos e, possivelmente, como alvos em novas modalidades de tratamento. Mais estudos devem ser realizados para investigar essas hipóteses.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que ADAMTS2, BMP1, MMP14 e LOX são fatores prognósticos para mastocitomas cutâneos caninos. A expressão imunohistoquímica de PDGFRA, SPARC e LOXL2, embora não tenha apresentado significância estatística na comparação com o grau histológico e tempo de sobrevivência, esteve presente em todas as amostras de mastocitomas cutâneos caninos. Estudos complementares são sugeridos para elucidação do papel da MEC e do microambiente tumoral da etiopatogenia, progressão e metástase dos mastocitomas cutâneos caninos.

## 8 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S. N.; ST. JOHN, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nature reviews immunology**, v.10, n.6, p. 440-452, 2010.

ADAMS, J. C.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P. The evolution of tenascins and fibronectin. **Cell adhesion and migration**, v. 9, n. 1-2, p. 22-33, 2015.

ADAMS, J. C.; LAWLER, J. The thrombospondins. **Cold spring harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 10, p. 1-29, 2011.

ÅGREN, M. S.; AUF DEM KELLER, U. Matrix Metalloproteinases: How Much Can They Do? **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 8, p. 1-9, 2020.

AKIRI, G. *et al.* Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. **Cancer research**, v. 63, n. 7, p. 1657-1666, 2003.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1427 p.

ALFORD, A. I.; HANKENSON, K. D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. **Bone**, v. 38, n. 6, p. 749–757, 2006.

ALMUTAIRI, S. *et al.* Matrix Metalloproteinases Inhibitors in Cancer Treatment: An Updated Review (2013-2023). **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 1-31, 2023.

AL-SARRAF, R.; MAULDIN, G. N.; PATNAIK, A. K.; MELEO, K. A. A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v.10, n.6, p. 376-8, 1996.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current biology**, v. 30, n. 16, p. 921-925, 2020.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes & development**, v. 22, n. 10, p. 1276-1312, 2008.

APTE, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, p. 981-985, 2004.

APTE, S. S. A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. **The journal of biological chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31493-31497, 2009.

APTE, S. S. ADAMTS Proteases: Mediators of Physiological and Pathogenic Extracellular Proteolysis. **Encyclopedia of cell biology**, v. 1, p. 630-638, 2016.

ARNOLD, S. A.; BREKKEN, R. A. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. **Journal of cell communication and signaling**, v. 3, n. 3-4, p. 255-273, 2009.

AROLAS, J. L. *et al.* Multiple Architectures and Mechanisms of Latency in Metallopeptidase Zymogens. **Chemical reviews**, v. 118, n. 11, p. 5581-5597, 2018.

ATSAWASUWAN, P. *et al.* Lysyl oxidase binds transforming growth factor-beta and regulates its signaling via amine oxidase activity. **The journal of biological chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34229-34240, 2008.

AUXILIA, S. T.; HILL, P. B. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? **Veterinary dermatology**, v.11, p. 247-254, 2000.

B L TANG. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, p. 33-44, 2001.

BAKER-GABB, M.; HUNT, G. B.; FRANCE, M. P. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. **Australian veterinary journal**, v. 81, n. 12, p. 732-738, 2003.

BARBOSA, D. F. L.; PARAVENTI, M. D.; STREFEZZI, R. F. Reproducibility of nuclear morphometry parameters from cytologic smears of canine cutaneous mast cell tumors intra- and interobserver variability. **Veterinary clinical pathology**, v. 43, n. 3, p. 469-472, 2014.

BEATRICE YUE. Biology of the extracellular matrix: an overview. **Journal of glaucoma**, v. 23, n. 8, p. 20-23, 2014.

BEKHOUCHE, M.; ALAIN, C. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. **Matrix biology: journal of the international society for matrix biology**, v. 44-46, p. 46-53, 2015.

BELARTO, D. *et al.* Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 2, p. 143-150, 2015.

BERGMAN, P. J. *et al.* Correlation of histologic grading of canine mast cell tumors with Ki67/PCNA/AgNOR/c-Kit scores: 38 cases (2002-2003). **Veterinary and comparative oncology**, v. 2, n. 2, p. 98-111, 2004.

BERTRAM, C. A. *et al.* Computer-assisted mitotic count using a deep learning-based algorithm improves interobserver reproducibility and accuracy. **Veterinary pathology**, v. 59, n. 2, p. 211-226, 2022.

BERTRAM, C. A. *et al.* Atypical Mitotic Figures Are Prognostically Meaningful for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary sciences**, v. 11, n. 1, p. 1-5. 2023

BILLER, B. *et al.* AAHA Oncology guidelines for dogs and cats. **Journal of the american animal hospital association**, v.52, n.4, p.181-204, 2016.

BLACKWOOD, L. *et al.* European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and comparative oncology**, v. 10, n. 3, p. 1-29, 2012.

BLACKWOOD, L. Tumours of the skin and subcutaneous tissues. *In*: DOBSON, M.; LASCELLES, D. **BSAVA Manual of canine and feline oncology**. 3 ed. Quedgeley, Gloucester: BSAVA, 2011. Cap. 12, p. 130-158.

BO LI; GUOCHUN LOU; JUYING ZHOU. MT1-MMP promotes the proliferation and invasion of gastric carcinoma cells via regulating vimentin and E-cadherin. **Molecular medicine reports**, v. 19, n. 4, p. 2519-2526, 2019.

BOERKAMP, K. M. *et al.* Estimated incidence rate and distribution of tumours in 4,653 cases of archival submissions derived from the Dutch golden retriever population. **BMC Veterinary research**, v.10, n. 34, p. 1-10, 2014.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 786-801, 2014.

- BOOK, A. P. *et al.* Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. **Veterinary radiology & ultrasound**, v. 52, n. 5, p. 548-54, 2011.
- BORNSTEIN, P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1. **Journal of cell biology**, v. 130, n. 3, p. 503-506, 1995.
- BORNSTEIN, P. Matricellular proteins Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. **The journal of clinical investigation**, v. 107, n. 8, p. 929-934, 2001.
- BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current opinion in cell biology**, v. 14, n. 5, p. 608-616, 2002.
- BORNSTEIN P. Matricellular proteins: an overview. **Journal of cell communication and signaling**, v. 3, n. 3-4, p. 163-165, 2009.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **The journal of small animal practice**, v.14, n.1, p.27-41, 1973.
- BOSTOCK, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **British veterinary journal**, v. 142, n. 1, p. 1-19, 1986.
- BOSTOCK, D. E. *et al.* Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. **British journal of cancer**, v. 59, n. 6, p. 915-918, 1989.
- BRADSHAW A. D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 3, p. 480-488, 2012.
- CAMPS-PALAU, M. A. *et al.* Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). **Veterinary and comparative oncology**, v. 5, n. 3, p. 156-67, 2007.
- CAMUS, M. S. Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. **Veterinary pathology**, v. 53, n. 6, p. 1117-1123, 2016.
- CASAGRANDE, T. A. C. *et al.* The value of molecular expression of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2013.
- CAUGHEY, G. H. *et al.* Tryptase and chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines. **Immunology**, v. 63, n. 2, p. 339-344, 1988a.
- CAUCHEY, G. H. *et al.* Chymase and Tryptase in Dog Mastocytoma Cells: Asynchronous Expression as Revealed by Enzyme Cytochemical Staining. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1053-1060, 1988b.

CAUGHEY, G. H. Mast Cell Proteases as Protective and Inflammatory Mediators. *In: GILFILLAN, A. M.; METCALFE, D.D. (eds). Mast Cell Biology*. Boston, Massachusetts: Spriger, 2011. Cap. 12, p. 221-234.

CERDÀ-COSTA, N.; GOMIS-RÜTH, F. X. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. **Protein science: a publication of the protein society**, v. 23, n. 2, p. 123-144, 2014.

CHAFFIN, K.; THRALL, D. E. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. **Veterinary radiology & ultrasound**, v. 43, n. 4, p. 392-395, 2002.

CHIH-HAU CHANG *et al.* Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Enhances Cell Proliferation, Migration, and Epithelial Mesenchymal Transition, and SPARC Expression is Associated with Tumor Grade in Head and Neck Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1-12, 2017.

CHIODONI, C.; COLOMBO, M. P.; SANGALETTI, S. Matricellular proteins: From homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. **Cancer and metastasis reviews**, v. 29, n. 2, p. 295-307, 2010.

CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 36, n. 6, p. 986-990, 2004.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P. Tenascins and the importance of adhesion modulation. **Cold spring harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 5, p. 1-19, 2011.

CHLENSKI, A. *et al.* Anti-angiogenic SPARC peptides inhibit progression of neuroblastoma tumors. **Molecular cancer**, v. 9, n. 138, p. 1-10, 2010.

CHLENSKI, A.; COHN, S. L. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 1, p. 55-65. 2010.

CHUNYI JIANG *et al.* Overexpression of ADAMTS-2 in tumor cells and stroma is predictive of poor clinical prognosis in gastric cancer. **Human pathology**, v. 84, p. 44-51, 2019.

COOPER, M.; XINRU TSAI; BENNETT, P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. **Veterinary and comparative oncology**, v.7, n.3, p.196-206, 2009.

COSTA, R. M. G. C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine MCTs: From laboratory to clinic. **Veterinary journal**, v. 205, n. 1, p. 5-10, 2015.

COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. A. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. **Journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 60, n. 12, p. 885-897, 2012.



CRAMER, K. S.; MIKO, I. J. Eph-ephrin signaling in nervous system development. **F1000Research**, v. 5, n. 413, p. 1-8, 2016.

CUYLEN, S. *et al.* Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 308-312, 2016.

DAHLIN, J. S.; HALLGREN, J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. **Molecular immunology**, v. 63, n. 1, p. 9-17, 2015.

DAVIS, G. E.; SENGER, D. R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circulation research**, v. 97, n. 11, p. 1093–1107, 2005.

DE ALMEIDA, L. G. N. *et al.* Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 74, n. 3, p. 712–768, 2022.

DE NARDI, A. B. *et al.* Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 1-37, 2022.

DOBSON, J. M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. **ISRN veterinary science**, v. 2013, p. 1-23, 2013.

DOBSON, J. M.; SCASE, T. J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **Journal of small animal practice**, v. 48, n. 8, p. 424-431, 2007.

DOMOGATSKAYA, A.; RODIN, S.; TRYGGVASON, K. Functional Diversity of Laminins. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, n. 1, p. 523-553, 2012.

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, n. 12, p. 1718-1723, 2002.

DUBAIL, J. *et al.* ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 24, p. 4213-4232, 2010.

DUNN, T. B.; POTTER, M. A Transplantable Mast-Cell Neoplasm in the Mouse. **Journal of the national cancer institute**, v. 18, n. 4, p. 587-601, 1957.

DUPONT, L. *et al.* ADAMTS2 and ADAMTS14 can substitute for ADAMTS3 in adults for pro-VEGFC activation and lymphatic homeostasis. **JCI insight**, v. 7, n. 8, p. 1-16, 2022.

DVORAK, A. M. *et al.* Piecemeal Degranulation of Mast Cells in the Inflammatory Eyelid Lesions of Interleukin-4 Transgenic Mice. Evidence of Mast Cell Histamine Release In Vivo by Diamine Oxidase-Gold Enzyme-Affinity Ultrastructural Cytochemistry. **Blood**, v. 83, n. 12, p. 3600-3612, 1994.

DVORAK, A. M. New Aspects of Mast Cell Biology. *International archives of allergy and immunology*, v. 114, n. 1, p. 1-9, 1997.

DYDYCH, G.; KACZMARCZYK, K.; OKÓN, K. Mast cells and cancer: enemies or allies? *Polish journal of pathology*, v. 63, n. 1, p. 1-7, 2012.

FIFE, M. *et al.* Canine conjunctival mast cell tumors: a retrospective study. *Veterinary ophthalmology*, v. 14, n. 3, p. 153-160, 2011.

FILIPE, E. C.; CHITTY, J. L.; COX, T. R. Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. *International journal of experimental pathology*, v. 99, n. 2, p. 58-76, 2018.

FINNEY, J. *et al.* Human copper-dependent amine oxidases. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 546, p. 19-32, 2014.

FINORA, K. *et al.* Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mast cell tumours and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen. *Veterinary and comparative oncology*, v. 4, n. 3, p. 178-183, 2006.

FONSECA-ALVES, C. E. *et al.* Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. *Research in veterinary science*, v. 102, p. 122-126, 2015.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*, v. 123, n. 24, p. 4195-4200, 2010.

FREEDMAN, B. R. *et al.* The (dys)functional extracellular matrix. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1853, n. 11, p. 3153-3164, 2015.

FROSSI, B.; DE CARLI, M.; PUCILLO, C. The mast cell: an antenna of the microenvironment that directs the immune response. *Journal of leukocyte biology*, v. 75, n. 4, p. 579-585, 2004.

FULCHER, R. P. *et al.* Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the american veterinary medical association*, v. 228, n. 5, p. 210-215, 2006.

GALLI, S. J.; SUSUMU NAKAE; MINDY TSAI. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology*, v. 6, n. 2 p. 135-142, 2005.

GARRETT, L. D. Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment and prognosis. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, v. 5, p. 49-58, 2014.

GARY K. YIU *et al.* SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *The American journal of pathology*, v. 159, n. 2, p. 609-622, 2001.

GAUDENZIO, N. *et al.* Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. **The journal of clinical investigation**, v. 126, n. 10, p. 3981-3998, 2016.

GIANTIN, M. *et al.* Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mast Cell Tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 147, n. 4, p. 419-429, 2012.

GIEGER, T. L. *et al.* Biologic Behavior and Prognostic Factors for Mast Cell Tumors of the Canine Muzzle: 24 cases (1990-2001). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 17, n. 5, p. 687-692, 2003.

GIEGER, T.; NORTHRUP, N.; WALL, M. Clinical management of mast cell tumours in dogs. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v. 27, n. 1, p. 56-68, 2005.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. *In*: **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed. Ames, Iowa State: Iowa State Press, 2002. Cap. 2, p. 105-108.

GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 247-257, 2010.

GOVIER, S.M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 18, n. 2, p.103-106, 2003.

GRAU-BOVÉ, X.; RUIZ-TRILLO, I.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F. Origin and evolution of lysyl oxidases. **Scientific reports**, v. 5, n. 10568, p. 1-11, 2015.

GRGUREVIC, L.; PECINA, M.; VUKICEVIC, S. Marshall R. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins. **International orthopaedics**, v. 41, p. 1065-1069, 2017.

GRUNTZIG, K. *et al.* Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. **Journal of comparative pathology**, v. 155, n. 2-3, p. 156-170, 2016.

GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 25-33, 2012.

HAIWEI WANG *et al.* Identification of genomic alterations and associated transcriptomic profiling reveal the prognostic significance of MMP14 and PKM2 in patients with pancreatic cancer. **Aging**, v. 12, n. 18, p. 18676–18692, 2020.

HAJDÚ, I. *et al.* Inhibition of the LOX enzyme family members with old and new ligands. Selectivity analysis revisited. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 18, p. 3113-3118, 2018.

HAN CHUNG CHONG *et al.* Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. **Journal of oncology**, v. 2012, n. 351089, p. 1-17, 2012.

HANAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, v. 12 n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 20, n. 3, p. 309-322, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144 n. 5, p .646-674, 2011.

HERGT, F. *et al.* Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. **Veterinary clinical pathology**, v. 45, n. 3, p. 477-483, 2016.

HILL, P. B.; MARTIN, R. J. A review of mast cell biology. **Veterinary dermatology**, v. 9, n. 3, p.145-166, 1998.

HILLMAN, L. A. *et al.* Biological behavior of oral and perioral mast cell tumors in dogs: 44 cases (1996-2006). **Journal of american veterinary medical association**, v.237, n. 8, p. 936-942, 2010.

HODGES, K. *et al.* Mast cells, disease and gastrointestinal cancer: a comprehensive review of recent findings. **Translational gastrointestinal cancer**, v. 1, n. 2, p. 138-150, 2012.

HOFER, T. P. *et al.* Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids. **Journal of molecular medicine**, v. 86, n. 3, p. 323–332, 2008.

HOPKINS, D. R.; KELES, S.; GREENSPAN, D. S. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. **Matrix biology: journal of the international society for matrix biology**, v. 26, n. 7, p. 508–523, 2007.

HOTTENDORF, G. H.; NIELSEN, S. W. Pathologic Report of 29 Necropsies on Dogs with Mastocytoma. **Pathologia veterinaria**, v. 5, n. 2, p. 102-121, 1968.

HOTTENDORF, G.H.; NIELSEN, S. W. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. **Zentralblatt fur veterinarmedizin reihe a**, v. 14, n. 3, p. 272-281, 1967.

HUILEI WANG *et al.* An in situ activity assay for lysyl oxidases. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2021.

HUXLEY-JONES, J. *et al.* The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 63, p. 1-20, 2007.

HYNES, R. O. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1216-1219, 2009.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the Matrisome – An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. **Cold spring harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2012.

IRANI, A. M.; SCHWARTZ, L. B. Human mast cell heterogeneity. **Allergy proceedings: the official journal of regional and state allergy societies**, v. 15, n. 6, p. 303-308, 1994.

ISABELLA T TAI; MICHELLE J TANG. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. **Drug resistance updates**, v. 11, n. 6, p. 231-246, 2008.

JING TIAN *et al.* LOXL 2 promotes the epithelial-mesenchymal transition and malignant progression of cervical cancer. **Oncotargets and therapy**, v. 12, p. 8947-8954, 2019.

JIWON CHOI *et al.* Increased expression of the matrix-modifying enzyme Lysyl oxidase-like 2 in aggressive hepatocellular carcinoma with poor prognosis, **Gut liver**, v. 13, n. 1, p. 83-92, 2019.

JOGLEKAR-JAVADEKAR, M. *et al.* Characterization and Targeting of Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha (PDFRA) in Inflammatory Breast Cancer (IBC). **Neoplasia**, v. 19, n. 7, p. 564-573, 2017.

JONES, A. V.; CROSS, N. C. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 61, n. 23, p. 2912-2923, 2004.

JOSELEVITCH, J. A. *et al.* Nanog Expression and Proliferation Indices in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 6, p. 849-852, 2018.

JOURDAN-LE SAUX, C. *et al.* The human lysyl oxidase-related gene (LOXL2) maps between markers D8S280 and D8S278 on chromosome 8p21.2-p21.3. **Genomics**, v. 51, n. 2, p. 305-307, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, 376p.

KADLRE, K. E. *et al.* Collagens at a glance. **Journal of cell science**, v. 120, n. 12, p. 1955-1958, 2007.

KAGAN, H. M.; WANDE LI. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. **Journal of cellular biochemistry**, v. 88, n. 4, p. 660-672, 2003.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.

KANG LI; FRANKLIN R. TAY; CYNTHIA KAR YUNG YIU. The past, present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors. **Pharmacology & therapeutics**, v. 207, p. 1-13, 2020.

KAZUHIRO YAMAMOTO; MURPHY, G.; TROEBERG, L. Extracellular regulation of metalloproteinases. **Matrix biology: journal of the international society for matrix biology**, v. 44-46, p. 255-263, 2015.

KELWICK R. *et al.* The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. **Genome biology**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2015.

KHAZAIE, K. *et al.* The significant role of mast cells in cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 30, n. 1, p. 45-60, 2011.

KIERNAN, J. A. Production and life span of cutaneous mast cell in young rats. **Journal of anatomy**, v. 128, n. 2, p. 225-238, 1979.

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, n. 4, p. 371-377, 2004.

KIUPEL, M. *et al.* Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of veterinary medical**, v. 52, n. 6, p. 280-286, 2005.

KIUPEL, M. *et al.* Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 147-55, 2011.

KODRE, V. *et al.* Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. **In vivo**, v. 23, n. 1, p. 55-62, 2009.

KRICK, E. L. *et al.* Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. **Veterinary and comparative oncology**, v. 7, n. 2, p.130-138, 2009.

KRITAS, S. K. *et al.* Impact of mast cells on the skin. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 855-859, 2013.

KRITAS, S. K. *et al.* Interrelationship between IL-3 and mast cells. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 28, n. 1, p. 17-21, 2014.

KUBE, P. *et al.* Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. **Histochemistry and cell biology**, v. 110, n. 2, p. 129-135, 1998.

KUMAR, L. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases in Musculoskeletal Diseases. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 1-16, 2022.

KUMAR, S; RAO, N; GE, R. Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer. **Cancers**, v. 4, n. 4, p. 1252-1299, 2012.

KUSEWITT, D. F. Neoplasia e Biologia Tumoral. *In*: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 6, p. 289-324.

L. C. YONG. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. **Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie**, v. 49, n. 6, p. 409-424, 1997.

LEDUC, C. *et al.* In vivo N-Terminomics Highlights Novel Functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in Skin Collagen Matrix Building. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 8, p. 1-17, 2021.

LEIBMAN, N. F. *et al.* Identification of Matrix Metalloproteinases in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 14, n. 6, p. 583-586, 2000.

LEIDINGER, E. F. *et al.* Breed related odds ratio and anatomic distribution of canine mast cell tumours in Austria: Retrospective study of cases in the years 2000-2010. **Tierärztliche praxis. Ausgabe k, kleintiere/heimtiere**, v. 42, n. 6, p. 367-373, 2014.

LEJEUNE, A. *et al.* Aggressive local therapy combined with systemic chemotherapy provides long-term control in grade II stage 2 canine mast cell tumour: 21 cases (1999–2012). **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 3, p. 267-80, 2015.

LIAN TAO LI *et al.* Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). **Molecular medicine reports**, v. 11, n. 3, p. 1566-1572, 2015.

LINGHONG WU; YING ZHU. The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 36, n. 5, p. 1200-1204, 2015.

LONDON, C. A. *et al.* Expression of Stem Cell Factor Receptor (c-kit) by the Malignant Mast Cells from Spontaneous Canine Mast Cell Tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 115, n. 4, p.399-414, 1996.

LONDON, C. A. *et al.* Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental hematology**, v. 27, n. 4, p.689-697, 1999.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary clinics small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 473-489, 2003.

LONDON, C.A.; THAMM, D.H. Mast cell tumors. *In*: VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 6 ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2020. Cap. 21, p. 382-403.

LOWE, R. *et al.* The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 3, p. 775-784, 2017.

MACCALLUM, D. E.; HALL, P. A. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. **Journal of pathology**, v. 191, n. 3, p. 286-298, 2000.

MACNEILL, A. L. Cytology of Canine and Feline Cutaneous and Subcutaneous Lesions and Lymph Nodes. **Topics in companion animal medicine**, v. 26, n. 2, 2011.

MACY, D. W. Canine Mast Cell Tumors. **Veterinary clinics of north america: small animal practice**, v. 15, n. 4, p. 783-803, 1985.

MAGLENNON, G. A. *et al.* Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 6, n. 4, p. 268-274, 2008.

MARCONATO, L. *et al.* Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 22, n. 4, p. 1001-1007, 2008.

MARIA APARECIDA NAGAI *et al.* Prognostic value of NDG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. **Breast cancer research and treatment**, v. 126, n. 1, p. 1-14, 2011.

MARIANO, N. *et al.* Production of recombinant heterotrimeric mini-procollagen I and homotrimeric II mini-procollagen II reveals new cleavage sites for BMP-1. **BioRxiv**, v. 2022, p. 1-28, 2022.

MARSHALL, J. S. Mast cells response to pathogens. **Nature reviews: immunology**, v. 4, n. 10, p. 787-799, 2004.

MAURER, L. M.; MA, W.; MOSHER, D. F. Dynamic structure of plasma fibronectin. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 51, n. 4, p. 213-227, 2016.

MAYER, M. Radiation therapy for canine mast cell tumors. **Canadian veterinary journal**, v.47, n.3, p.263-265, 2006.

MCCAWE, D. L. *et al.* Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisone. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 8, n. 6, p.406-408, 1994.



MCDONALD J. W.; PILGRAM, T. K. Nuclear expression of p53, p21 and cyclin D1 is increased in bronchioloalveolar carcinoma. **Histopathology**, v. 34, n. 5, p. 439-446, 1999.

MCNIEL, E. A.; PRINK, A. L.; O'BRIEN, T. D. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 4, n. 1, p. 2-8, 2006.

MEAD, T. J.; APTE, S. S. ADAMTS proteins in human disorders. **Matrix biology: journal of the international society for matrix biology**, v. 71-72, p. 225-239, 2018.

METCALFE, D. D. *et al.* Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases. **World allergy organization journal**, v. 9, n. 1, 2016.

MIHOV, D.; SPIESS, M. Glycosaminoglycans: Sorting determinants in intracellular protein traffic. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 68, p. 87-91, 2015.

MILLER, D. M. The occurrence of mast cell tumors in young Shar-peis. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 7, n. 3, p. 360-363, 1995.

MILLER, R. L. *et al.* A retrospective review of treatment and response of high-risk mast cell tumours in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 14, n. 4, p. 361-370, 2016.

MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. **Muller & Kirk's Small animal dermatology**. 7 ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2013, 938p.

MISDORP, W. Mast cells and canine mast cell tumours: A review. **Veterinary quarterly**, v. 26, n. 4, p. 156-169, 2004.

MOCHIZUKI, H. *et al.* Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 3, p. 829-839, 2016.

MONTEIRO, B.; BOSTON, S.; MONTEITH, G. Factors influencing complete tumor excision of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: A retrospective study in 100 dogs. **The canadian veterinary journal**, v. 52, n. 11, p. 1209-1214, 2011.

MOON, T. C. *et al.* **Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function**. *Mucosal immunology*, v. 3, n. 2, p.111-128, 2010.

MOON, T. C.; BEFUS, A. D.; KULKA, M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 1-18, 2014.

MOORE, T. W. *et al.* **Spinal mast cell tumors in dogs: imaging features and clinical outcome of four cases**. **Veterinary radiology & ultrasound**, v. 58, n. 1, p. 44-52, 2017.

MORRIS, J.; DOBSON, J. Skin. *In*: MORRIS, J.; DOBSON, J. **Small Animal Oncology**. 1 ed. Osney Mead, Oxford: Blackwell Science, 2001. Cap. 4, p. 59-61.

MUIR, A. M. et al. BMP1-like proteinases are essential to the structure and wound healing of skin. **Matrix biology: journal of the international society for matrix biology**, v. 56, p. 114-131, 2016.

MULLINS, M. N. et al. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). **Journal of american veterinary medical association**, v. 228, n. 1, p. 91-95, 2006.

MURPHY, S. et al. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary record**, v. 158, n. 9, p. 287-291, 2006.

MUTZ, M. L. et al. Cytologic comparison of the lymph node aspirate samples from normal dogs versus dogs with allergic dermatologic disease and dogs with MCTs. **Journal of the american veterinary medical association**, v. 251, n. 4, p. 421-28, 2017.

N. IWATA et al. Canine Extracutaneous Mast-cell Tumours Consisting of Connective Tissue Mast Cells. **Journal of comparative pathology**, v. 123, n. 4, p. 306-310, 2000.

NAGARAJU, G. P.; SHARMA, D. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis. **Cancer treatment reviews**, v. 37, n. 7, p. 559-566, 2011.

NAGASE, H.; KAZUNARI, F. Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases. **Connective tissue research**, v. 49, n. 3, p. 169-174, 2008.

NELLAIAPPAN, K. et al. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 79, n. 4, p. 576–582, 2000.

NELSON, R. W; COUTO, C. G. **Small Animal Internal Medicine**. 4 ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2009, 1504p.

NEVE, A. et al. Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. **Biomed research international**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

NICHOLSON, A. C. et al. Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. **BMC evolutionary biology**, v. 5, n. 11, p. 1-13, 2005.

NING CUI; MIN HU; KHALIL R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 147, p. 1-73, 2017.

NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cell in wound healing. **Veterinary dermatology**, v. 12, n. 6, p. 303-313, 2001.

NORTHRUP, N. C. *et al.* Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 17, n. 3, p. 245-248, 2005

O'KEEFE, D. A. Canine Mast Cell Tumors. **Veterinary clinics of north america: small animal practice**, v. 20, n. 4, p. 1105-1115, 1990.

OSEINI, A. M.; ROBERTS, L. R. PDGFR $\alpha$ : a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma? **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 13, n. 4, p. 443-454, 2009.

OSTMAN A.; HELDIN C. H. PDGF receptors as targets in tumor treatment. **Advances in cancer research**, v. 97, p. 247-274, 2007.

OWEN, L. N. **WHO TNM Classification of tumors in domestic animals**. 1 ed. Genebra, Suíça: World Health Organization, 1980, 53p.

OZAKI, K. *et al.* Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 5, p. 557-564, 2002.

OZAWA, T. *et al.* PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. **Genes & development**, v. 24, n. 19, p. 2205-2218, 2010.

OZBEK, S. *et al.* The Evolution of Extracellular Matrix. **Molecular biology of the cell**, v. 21, n. 24, p. 4300-4305, 2010.

PACH, E. *et al.* Extracellular Matrix Remodeling by Fibroblast-MMP14 Regulates Melanoma Growth. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 1-15, 2021.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 8, n. 3, p. 221-233, 2007.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of cell science**, v. 115, n. 20, p. 3861-3863, 2002.

PATINAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary pathology**, v. 21, n. 5, p. 469-474, 1984.

PEINADO, H. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. **Cancer research**, v. 68, n. 12, p. 4541-4550, 2008.

PENG, LIANG *et al.* Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 10, p. 1660-1669, 2009.

PICKUP, M. W.; MOUW, J.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, v. 15, n. 12, p. 1243-1253, 2014.

PIERCE G. F. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. **Journal of cellular biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 319-326, 1991.

PIL-GU PARK *et al.* Role of LOXL2 in the epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 80325-80335, 2017.

PING ZHAN *et al.* Increased lysyl oxidase-like 2 associates with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. **The clinical respiratory journal**, v. 12, n. 2, p. 712-772, 2018.

PITTONI, P. *et al.* Tumor-intrinsic and -extrinsic roles of c-Kit: mast cells as the primary off-target of tyrosine kinase inhibitors. **Oncogene**, v. 30, n. 7, p. 757-769, 2011.

PRATSCHKE, K. M. *et al.* Evaluation of a modified proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases (2008-2012). **Journal of the american veterinary medical association**, v. 243, n. 10, p. 1436-1441, 2013.

PROPHET, E. B. *et al.* **Armed Forces Institute of Pathology: Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC. 1994, 279p.

PULZ, L. H. *et al.* Identification of two molecular subtypes in canine mast cell tumours through gene expression profiling. **Plos one**, v. 14, n. 6, 2019.

PULZ, L. H. *et al.* Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlates with improved outcome in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 2, p. 606-614, 2017.

PULZ, L. H.; STREFEZZI, R. F. Proteases as prognostic markers in human and canine cancers. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 3, p. 669-683, 2017.

PUPA, S. M. *et al.* New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. **Journal of cellular physiology**, v. 192, n. 3, p. 259-267, 2002.

QI YAN; SAGE, E. H. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. **Journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1495-1505, 1999.

QIAN XIAO; GAOXIANG GE. Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis. **Cancer microenvironment**, v. 5, n. 3, p. 261-273, 2012.

RAFI, J. H. *et al.* High expression of bone morphogenetic protein 1 (BMP1) is associated with a poor survival rate in human gastric cancer, a dataset approaches. **Genomics**, v. 113, p. 1141-1154, 2021.

RASSNICK, K. M. *et al.* Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 13, n. 6, p.601-605, 1999.

RASSNICK, K. M. *et al.* Phase II open-label study of single-agent hydroxyurea for treatment of mast cell tumours in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 8, n. 2, p.103-111, 2010.

RIBATTI, D. *et al.* Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Clinical and experimental allergy**, v. 31, n. 4, p. 602-608, 2001.

RIBATTI, D. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. **Immunology letters**, v. 152, n. 2, p. 83-88, 2013.

RIBATTI, D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. **International archives of allergy and immunology**, v. 176, n. 1, p. 55-60, 2018.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. **Biochimica et biophysica acta – molecular basis of disease**, v. 1822, n. 1, p. 2-8, 2012.

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold spring harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2011.

RICHARD N. WANG *et al.* Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. **Genes & diseases**, v. 1, n. 1, p. 87-105, 2014.

RIGONI, A.; COLOMBO, P.; PUCILLO, C. The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment. **Cancer microenvironment**, v. 8, n. 3, p. 167-176, 2015.

RIZZO, A. *et al.* The Identity of PDGFRA D842V-Mutant Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST). **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 1-9, 2021.

ROGERS, K. S. Mast Cell Tumors: Dilemmas of Diagnosis and Treatment. **Veterinary clinics of north america: small animal practice**, v. 26, n. 1, p. 87-102, 1996.

ROMANSIK E. M. *et al.* Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 3, p. 335-341, 2007.

ROSE, K. W. J. *et al.* Regulation of ADAMTS Proteases. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 8, p. 1-16, 2021.

ROSELL-GARCÍA, T. *et al.* Differential cleavage of lysyl oxidase by the metalloproteinases BMP1 and ADAMTS2/14 regulates collagen binding through a tyrosine sulfate domain. **The Journal of biological chemistry**, v. 294, n. 29, p. 11087-11100, 2019.

ROTHWELL, T. L. *et al.* Skin neoplasms of dogs in Sydney. **Australian veterinary journal**, v. 64, n. 6, p. 161-164, 1987.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.

S M HSU; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

SALEEM, A. *et al.* Analysis of lysyl oxidase as a marker for diagnosis of canine mammary tumors. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 5, p. 4909-4919, 2019.

SALEEM, A.; RAJPUT, S. Insights from the in silico structural, functional and phylogenetic characterization of canine lysyl oxidase protein. **Journal, genetic engineering & biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2020.

SANGALETTI, S.; COLOMBO, M. P. Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. **Cancer letters**, v. 267, n. 2, p. 245-253, 2008.

SCARPA, F.; SABATTINI, S.; BETTINI, G. Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 14, n. 3, p. 245-251, 2016.

SCASE, T. J. *et al.* Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 20, n. 1, p. 151-58, 2006.

SÉGUIN, B. *et al.* Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone. **Journal of the american veterinary medical association**, v. 28, n. 7, p. 1120-1123, 2001.

SFILIGOI, G. *et al.* Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001). **Journal of american veterinary medical association**, v. 226, n. 8, p. 1368-1374, 2005.

SHMUEL, D. L.; CORTES, Y. Anaphylaxis in dogs and cats. **Journal of veterinary emergency and critical care**, v. 23, n. 4, p. 377-394, 2013.

SHOOP, S. J. W. *et al.* Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. **Canine genetics and epidemiology**, v. 2, n. 1, p.1-10, 2015.

SHUANG CHEN *et al.* Regulation of SPARC family proteins in disorders of the central nervous system. **Brain research bulletin**, v. 163, p. 178-189, 2020.

SIMOES J. P.; SCHONING P. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 6, n. 4, p. 458-465, 1994a.

SIMOES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. **Veterinary pathology**, v. 31, n. 6, p. 637-647, 1994b.

SISMANOPOULOS, N. *et al.* Mast Cells in Allergic and Inflammatory Diseases. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 16, p. 2261-2277, 2012.

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

ŚMIECH, A. *et al.* Epidemiological study of canine mast cell tumours according to the histological malignancy grade. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 20, n. 3, p. 455-465, 2017.

SMITH M. A. *et al.* Overexpression of Soluble Recombinant Human Lysyl Oxidase by Using Solubility. **Enzyme Research**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

SMITH, L. R.; CHO, S.; DISCHER, D. E. Stem Cell Differentiation is Regulated by Extracellular Matrix Mechanics. **Physiology**, v. 33, n. 1, p. 16-25, 2018.

SPUGNINI, E. P. *et al.* Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. **Anticancer research**, v. 26, n. 6B, p. 4585-4589, 2006.

SPUGNINI, E. P. *et al.* Evaluation of Cisplatin as an electrochemotherapy agent for the treatment of incompletely excised mast cell tumors in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 25, n. 2, p. 407-411, 2011.

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

STENINA-ADOGNRAVI, O. Thrombospondins: old players, new games. **Current opinion in lipidology**, v. 24, n. 5, p. 401-409, 2013.

STREFEZZI, R. D. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L.; Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559-565, 2010.

STREFEZZI, R. F. *et al.* Nuclear Morphometry in Cytopathology: A Prognostic Indicator for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 21, n. 6, p. 821-825, 2009.

STREFEZZI, R. F. *et al.* Prognostic indicators for mast cell tumors. **Brazilian journal of veterinary pathology**, v. 2, n. 2, p. 110-121, 2009.

STREFEZZI, R. F.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary pathology**, v. 40, n. 3, p. 268-275, 2003.

SYDNEY CH'NG *et al.* Mast cells and cutaneous malignancies. **Modern pathology**, v. 19, n. 1, p. 149-159, 2006.

TAKAHASHI, T. *et al.* Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). **Journal of the american veterinary medical association**, v. 126, n. 2, p. 222-226, 2000.

TAKESHI NISHIOKA; EUSTACE, A.; WEST, C. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. **Cell structure and function**, v. 37, n. 1, p. 75-80, 2012.

TAKEUSHI, K.; ITO, F. Target Therapy for Cancer: Anti-cancer Drugs Targeting Growth-Factor Signaling Molecules. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 34, n. 12, p.1774-1780, 2011.

TAYLOR, F. *et al.* **Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases**. The Journal of Small Animal Practice, v. 50, n. 6, p. 284-289, 2009.

TENTI, P.; VANNUCCI L. Lysyl oxidases: linking structures and immunity in the tumor microenvironment. **Cancer immunology immunotherapy**, v. 69, n. 2, p. 223-235, 2020.

THAMM, D. H.; MAULDIN, E. A.; VAIL, D. M. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor-41 cases (1992-1997). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 13, n. 5, p.491-497, 1999.

THAMM, D. H.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. **The journal of veterinary medical science**, v. 68, n. 6, p. 581-587, 2006.

THEOHARIDES, T. C. *et al.* Mast cells and inflammation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1822, n. 1, p. 21-33, 2012.

THEOHARIDES, T. C.; KALOGEROMITROS, D. The Critical Role of Mast Cells in Allergy and Inflammation. **Annals of the new york academy of science**, v. 1088, p. 78-99, 2006.

THOMPSON, J. J. *et al.* Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors: Cellular Proliferation and KIT Expression as Prognostic Indices. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 169-181, 2011.

TIAN-YU LI *et al.* Reduced nuclear and ectopic cytoplasmic expression of lysyl oxidase-like 2 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Human pathology**, v. 43, n. 7, p. 1068-1076, 2012.



TORRES, S. *et al.* LOXL2 Is Highly Expressed in Cancer-Associated Fibroblasts and Associates to Poor Colon Cancer Survival. **Clinical cancer research: an official journal of the american association for cancer research**, v. 21, n. 21, p. 4892-4902, 2015.

TRUDEL, D. *et al.* Visual and automated assessment of matrix metalloproteinase-14 tissue expression for the evaluation of ovarian cancer prognosis. **Modern pathology**, v. 27, n. 10, p. 1394-1404, 2014.

VADON-LE GOFF, S.; HULMES, D. J. S.; MOALI, C. BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. **Matrix biology**, v. 44-46, p. 14-23, 2015.

VALLET, S. D.; RICARD-BLUM, S. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links. **Essays in biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 349-364, 2019.

VARGAS, T. H. M.; PULZ, L. H.; BARRA, C. N. Immunohistochemical expression of the Pluripotency Factor OCT4 in Canine Mast Cell Tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 153, n. 4, p. 251-255, 2015.

VASCELLARI, M. *et al.* Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association with Grading and Prognosis. **Veterinary pathology**, v. 50, n. 1, p. 110-121, 2012.

VILORIA, K. *et al.* A holistic approach to dissecting SPARC family protein complexity reveals FSTL-1 as an inhibitor of pancreatic cancer cell growth. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-19, 2016.

VINCENTI, S.; FINDJI, F. Influence of treatment on the outcome of dogs with incompletely excised grade-2 mast cell tumors. **Schweizer archiv fur tierheilkunde**, v. 159, n. 3, p. 171-177, 2017.

VOLOSHENYUK, T. G. *et al.* TNF- $\alpha$  increases cardiac fibroblast lysyl oxidase expression through TGF- $\beta$  and PI3Kinase signaling pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 413, n. 2, p. 370-375, 2011.

VUČIĆEVIĆ, I. *et al.* KIT Receptor Expression in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors (CMCTs) Without C-Kit Mutation. **Acta veterinaria-beograd**, v. 66, n. 2, p. 222-233, 2016.

WANDE LI *et al.* Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential. **Journal of cellular biochemistry**, v. 88, n. 1, p. 152-164, 2003.

WARLAND, J. *et al.* The utility of staging in canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 12, n. 4, p. 287-298, 2014.

WARLAND, J.; DOBSON, J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: A single centre experience in the United Kingdom. **The veterinary journal**, v. 197, n. 2, p. 496-498, 2013.

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, n. 3, p. 298-308, 2007.

WEBSTER, J. D. *et al.* The Role of *c-KIT* in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Neoplasia**, v. 8, n. 2, p. 104-111, 2006.

WEIHERMANN, A. C. *et al.* Elastin structure and its involvement in skin photoageing. **International journal of cosmetic science**, v. 39, n. 3, p. 241-247, 2017.

WEISHAAR, K. M. *et al.* Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. **Journal of comparative pathology**, v. 151, n. 4, p. 329-338, 2014.

WELLE, M. M. *et al.* Canine mast cell tumors: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary dermatology journal**, v. 19, n. 6, p. 321-339, 2008.

WEN XIAO *et al.* Overexpression of BMP1 reflects poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. **Cancer gene therapy**, v. 27, n. 5, p. 330-340, 2020.

WERB, Z. *et al.* Extracellular matrix remodeling and the regulation of epithelial-stromal interactions during differentiation and involution. **Kidney international supplements**, v. 54, p. 68-74, 1996.

WERNERSSEON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature reviews immunology**, v. 14, n. 7, p. 478-494, 2014.

WHITE, C. R. *et al.* Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. **Journal of the american animal hospital association**, v. 47, n. 3, p. 210-216, 2011.

WOZNEY, J. M. Bone morphogenetic proteins. **Progress in growth factor research**, v. 1, n. 4, p. 267-280, 1989.

XIJIA ZHU *et al.* Bone Morphogenetic Protein 1 Targeting COL1A1 and COL1A2 to Regulate the Epithelial-Mesenchymal Transition Process of Colon Cancer SW620 Cells. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 20, p.1366-1374, 2020.

XIN YIN *et al.* Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. **Journal of hematology & oncology**, v. 8, n. 23, p. 1-13, 2015.

XUEQIAN HU *et al.* ADAMTS1 induces epithelial-mesenchymal transition pathway in non-small cell lung cancer by regulating TGF- $\beta$ . **Aging**, v. 15, n. 6, p. 2097-2114, 2023.

Y KITAMURA *et al.* Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. **Nature**, v. 268, p. 442-443, 1977.

YAO YAO. Laminin: loss-of-function studies. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, n. 6, p. 1095-1115, 2017.

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, n. 11, p. 3341-3351, 1987.

YICHEN DONG *et al.* Increased expression of MMP14 correlates with the poor prognosis of Chinese patients with gastric cancer. **Gene**, v. 563, n. 1, p. 29-34, 2015.

YIMING WANG; NAADIYA CARRIM; HEYU NI. Fibronectin maintains the balance between hemostasis and thrombosis. **Oncotarget**, v. 6, n. 23, p. 19350-19351, 2015.

YUJIA LIU *et al.* Lysyl oxidase promotes anaplastic thyroid carcinoma cell proliferation and metastasis mediated via BMP1. **Gland surgery**, v. 11, n. 1, p. 245-257, 2022.

YUNG-YU HSIEH *et al.* Upregulation of bone morphogenetic protein 1 is associated with poor prognosis of late-stage gastric cancer patients. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2018.

ZAFFRYAR-EILOT, S.; HASSON, P. Lysyl Oxidases: Orchestrators of Cellular Behavior and ECM Remodeling and Homeostasis. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 19, p. 1-10, 2022.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 13, n. 4, p. 341-345, 2001.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the Juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 5, p. 529-535, 2002.