



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**PESQUISA DE MUTAÇÕES NO GENE *C-KIT* EM
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS E SUBCUTÂNEOS EM CÃES,
EM PORTUGAL**

Dissertação apresentada a provas públicas para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professora Doutora Maria Margarida Ferreira Alves e Mestre José Carlos Mota Catarino [co-orientador].

Hugo Abegão Neto, nº21700977

2024

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**PESQUISA DE MUTAÇÕES NO GENE *C-KIT* EM
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS E SUBCUTÂNEOS EM CÃES,
EM PORTUGAL**

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 14 de março de 2024, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 727/2024, de 19 de fevereiro, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor David Wilson Russo Ramilo

Arguente: Professor Doutor Rui Pedro Brás Martins Faísca
(Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa)

Orientador: Professora Doutora Maria Margarida Ferreira
Alves

Este trabalho também foi orientado por Mestre José Carlos
Mota Catarino.

Hugo Abegão Neto, nº21700977

2024

www.ulusofona.pt

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa. À diretora desta instituição, Professora Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado. A todo o corpo docente que integra esta grande instituição e acompanharam o meu percurso académico, o meu reconhecimento pela maneira como contribuíram para a minha formação que foi essencial.

À Professora Doutora Margarida Alves por ter aceite ser minha orientadora, por todo o apoio e ajuda durante todo o meu estágio curricular, por ter sempre uma posição positiva e otimista quando os resultados não eram os esperados, pela confiança que colocou em mim, pela palavra amiga nos momentos certos. Agradeço, também, por me proporcionar uma experiência positiva na área de investigação, através deste estágio curricular.

Ao Professor José Catarino, por me orientar, pelo conhecimento que me transmitiu, pelo apoio que me demonstrou e pela boa disposição que levava sempre para o laboratório.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Histopatológicas da Faculdade de Medicina Veterinária e a toda a sua equipa.

Agradeço aos meus pais por todo o amor incondicional, por sempre me apoiarem em tudo o que precisei, pelos valores que me transmitiram e que me tornaram em tudo o que sou hoje. Por acreditarem sempre em mim, mesmo quando eu próprio já não acreditava, pela confiança e segurança que me transmitem. São uma inspiração para ser sempre melhor cada dia que passa. Obrigado por tornarem tudo isto possível.

Ao meu irmão pelo companheirismo, amor, apoio e amizade, por alinhar nas minhas ideias, mesmo quando não te agradavam, por acreditares sempre em mim e por seres muito chato quando queres.

Aos meus avós por me incentivarem a trabalhar para atingir os meus objetivos, pela pronta palavra amiga e por mostrarem sempre orgulho nas minhas conquistas.

A toda a minha família pelo carinho que sempre me deram e pelo apoio durante este período académico. Em especial aos meus tios Frederico, Sara, Guilherme e Milene que sempre me apoiaram.

Agradeço à Ana e Rita pela grande amizade que dura anos, pelas longas jantaras onde a conversa era longa e pelos bons momentos partilhados.

Aos amigos que a faculdade me deu, são amizades muito especiais para mim. Em especial à Catarina e Ana, a quem, agradeço o companheirismo, por puxarem por mim, pelos momentos partilhados e por todo o apoio ao longo deste percurso académico.

Aos meus afilhados pela oportunidade que me deram da experiência de ser vosso padrinho académico, dou sempre o meu melhor e estou sempre para o que precisarem. Pela amizade que criámos. 3/4 + 1

Agradeço ao Hospital Veterinário das Laranjeiras, atual VETLUZ Hospital Veterinário, e a toda a sua equipa, por me terem recebido da melhor forma possível, por toda a disponibilidade para me ensinarem durante o meu estágio extracurricular e pelo que aprendi convosco.

À Paula e ao André, pelos valores que me transmitiram sobre entreajuda e trabalho em equipa, pelo conhecimento partilhado e pela amizade que guardo comigo. Também à Vera, Raissa e Giovanna pelo conhecimento, amizade e bons momentos partilhados.

Por fim, um agradecimento especial ao Goofy, Daisy, Pluto, Meggie, Wally e Isoh, pelo companheirismo e amor incondicional e por serem a razão pelo qual escolhi ter esta profissão.

Resumo

Os mastocitomas são neoplasias malignas comuns no cão, representando cerca de 16% a 21% de todas as neoplasias cutâneas em cães. Alguns fatores de prognóstico importantes incluem, a classificação do grau histológico, metastização e marcadores de proliferação celular. Mutações no gene *c-Kit* têm sido descritas nos mastocitomas cutâneos (exões 8, 9 e 11) e subcutâneos (exão 11) tendo sido consideradas por alguns autores como indicadores negativos de prognóstico. Todavia, dada a variabilidade do comportamento biológico destes tumores, não existe, ainda, uma característica capaz de sinalizar todos os mastocitomas mais agressivos.

Neste contexto, pretendeu-se, com o presente trabalho, avaliar a frequência de mutações nos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit* em mastocitomas cutâneos e subcutâneos caninos e avaliar o seu potencial prognóstico, relacionando a sua presença com o tempo de sobrevida. Para tal, foram estudadas 59 amostras em bloco de parafina de mastocitomas caninos, cutâneos e subcutâneos, dos quais era conhecida informação sobre o desfecho clínico dois anos após o diagnóstico. Todas as amostras foram submetidas a extração de DNA e, posteriormente, a reação de PCR, para amplificação dos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit*. A presença de mutações foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (exão 11) ou por sequenciação dos produtos de PCR (exão 8 e 9).

No total, foram observadas mutações em seis mastocitomas cutâneos (20,7%) e em um mastocitoma subcutâneo (3,3%). Foram identificadas mutações nos três exões em estudo. Nos animais que sobreviveram até dois anos após o diagnóstico, a frequência de mutações não sinónimas encontrada foi muito superior à observada nos cães que morreram devido ao tumor. A frequência de mutações não sinónimas em cães que morreram devido à neoplasia foi muito baixa. Apenas 14,3% dos animais com mutação morreram de causa relacionada com o tumor. Estes resultados levantam a questão da importância a ser atribuída às mutações no gene *c-Kit* como fator prognóstico e evidenciam a necessidade de mais estudos que possam contribuir para a clarificação deste assunto.

Palavras-chave: mastocitomas, cães, prognóstico, mutações, gene *c-Kit*

Abstract

Mast cell tumors are common canine malignant neoplasms, accounting for about 16% to 21% of all skin neoplasms in dogs. Some important prognostic factors include histological grade classification, metastasis and markers of cell proliferation. Mutations in the *c-Kit* gene have been described in cutaneous mast cell tumors (exons 8, 9 and 11) and subcutaneous mast cell tumors (exon 11) and have been considered by some authors as negative indicators of prognosis. However, given the variability of the biological behavior of these tumors, there is still no characteristic capable of signaling all the most aggressive mast cell tumors.

In this context, the aim of the present study was to evaluate the frequency of mutations in exons 8, 9 and 11 of the *c-Kit* gene in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors and to evaluate their prognostic potential, relating their presence to survival time. In order to accomplish this, 59 paraffin samples of canine, cutaneous and subcutaneous mast cell tumors, with known information about the clinical outcome two years after diagnosis, were studied. All samples were submitted to DNA extraction and PCR reaction for amplification of exons 8, 9 and 11 of the *c-Kit* gene. The presence of mutations was evaluated by agarose gel electrophoresis (exon 11) or by sequencing of PCR products (exon 8 and 9).

Overall, mutations were observed in six cutaneous mast cell tumors (20,7%) and one subcutaneous mast cell tumor (3,3%). Mutations were identified in the three exons under study. In animals that survived up to two years after diagnosis, the frequency of non-synonymous mutations found was much higher than that observed in dogs that died because of the tumor. The frequency of non-synonymous mutations in dogs that died due to the neoplasm was very low. Only 14,3% of the animals with mutation died from tumor-related causes. These results raise the question of the importance to be attributed to mutations in the *c-Kit* gene as a prognostic factor and highlight the need for further studies that can contribute to the clarification of this subject.

Key-words: mast cell tumors, dogs, prognosis, mutations, *c-Kit* gene

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

® - Marca registada

™ – Marca comercial (do inglês “*Trademark*”)

% - Percentagem

3' - Extremidade da molécula de DNA portadora do grupo hidroxilo

5' - Extremidade da molécula de DNA portadora do grupo fosfato

A, C, G, T – Bases azotadas (adenina, citosina, guanina e timina)

AgNORs – Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofilas, do inglês “*Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions*”

Array CGH – Técnica citogenética de hibridação genómica comparativa por microarranjos, do inglês “*Array Comparative Genomic Hybridization*”

ATP – Adenosina trifosfato

°C – Graus Celcius

CD34+ - Células estaminais linfohematopoiéticas que expressam o marcador CD34

c-Kit – Gene que codifica a proteína recetora tirosina quinase

cm - Centímetros

cm³ – Centímetros Cúbicos

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”

dNTP's – Desoxirribonucleósidos trifosfato

EMA - Agência Europeia de Medicamentos, do inglês “*European Medicines Agency*”

et al. – E outros, abreviatura do latim “*et alii*”

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

ULusófona – Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa

FAK - Quinase de adesão focal, do inglês “*Focal Adhesion Kinase*”

FcεRI – Recetor de alta afinidade para a fração constante (Fc) da IgE

FFPE – Fixado em formalina, embebido em parafina, do inglês “*Formalin-fixed, paraffin-embedded*”

fGFR3 - Recetor 3 do fator de crescimento de fibroblastos, do inglês “*fibroblast growth factor receptor 3*”)

g – Aceleração gravitacional (unidade de Força Centrífuga Relativa)

GNB1 – Gene que codifica a proteína de ligação ao nucleótido guanina (proteína G), subunidade beta 1, do inglês “*Guanine Nucleotide-Binding Protein (G protein), Subunit Beta-1*”

HN – Nódulo Histológico

HZ4-FeSV – Vírus do sarcoma felino Hardy-Zuckerman 4, do inglês “*Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma virus*”

IgE - Imunoglobulina E

IL-3, IL-4, IL-6 e IL-9 - Interleucinas 3, 4, 6 e 9

IM – Índice mitótico

ITD - Duplicações internas em *tandem*, do inglês “*Internal Tandem Duplications*”

KIT – Recetor do fator de crescimento de mastócitos/células estaminais ou CD117

LACH - Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia

Lck – Quinase específica de linfócitos, do inglês “*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*”

MIMV - Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

min. - Minutos

mL – Mililitros

MTC – Mastocitoma

MTCC – Mastocitoma cutâneo

MTSC – Mastocitoma subcutâneo

m/v – Massa/volume

NGS - Sequenciação de Nova Geração, do inglês “*Next-Generation Sequencing*”

NORs – Regiões Organizadoras Nucleolares, do inglês “*Nucleolar Organizer Regions*”

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – Valor de probabilidade

pb – Par de bases

PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”

PDGFR - Recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas, do inglês “*Platelet-derived growth factor receptors*”

seg. – Segundos

SCF – Fator das Células Estaminais, do inglês “*Stem Cell Factor*”

SRD – Sem Raça Definida

μm – Micrómetro

μL – Microlitro

V – Volt

VEGFR2 - Recetor 2 do fator de crescimento endotelial vascular, do inglês “*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*”

TA – Temperatura Ambiente

TBE – Tris/Borato/EDTA

TKI - Inibidores de tirosina quinase, do inglês “*Tyrosine Kinase Inhibitors*”

TP53 – Gene que codifica a proteína supressora de tumor P53

UV – Ultravioleta

Índice

Índice de Tabelas	12
Índice de Figuras	13
I – Descrição da casuística do estágio	15
II – Pesquisa de mutações no gene <i>c-Kit</i> em mastocitomas cutâneos e subcutâneos em cães, em Portugal.....	16
1. Introdução.....	16
1.1. Mastócitos.....	16
1.1.1. Morfologia	17
1.1.2. Função biológica	17
1.1.3. Desenvolvimento tumoral	18
1.2. Mastocitomas	19
1.2.1. Mastocitomas da pele.....	19
1.2.2. Classificação do grau histopatológico de MTC caninos.....	21
1.2.3. Genética de mastocitomas caninos	23
1.2.4. O gene <i>c-Kit</i>	25
1.2.5. Mutações no gene <i>c-Kit</i> canino.....	27
1.3. Incidência e Epidemiologia	28
1.3.1. Incidência	28
1.3.2. Raça.....	28
1.3.3. Sexo.....	28
1.3.4. Idade.....	29
1.4. Apresentação clínica e síndromes paraneoplásicas	29
1.5. Diagnóstico	30
1.6. Tratamento	31
1.6.1. Terapêutica com inibidores da tirosina quinase.....	32

1.7. Estadiamento.....	33
1.8. Prognóstico	36
1.8.1. Fatores de Prognóstico	36
1.8.2. Outros fatores de prognóstico - Marcadores de Proliferação Celular	39
1.8.3. Padrão de expressão do KIT e mutações no <i>c-Kit</i>	40
1.9. Objetivos.....	42
2. Material e Métodos	43
2.1. Descrição da população	43
2.2. Extração de DNA de blocos de parafina.....	43
2.2.1. Reinclusão	43
2.2.2. Desparafinação.....	44
2.2.3. Isolamento de DNA genómico.....	45
2.3. Amplificação por PCR.....	46
2.3.1. Otimização da temperatura de ligação dos <i>primers</i> para amplificação dos exões 8 e 9.....	48
2.4. Eletroforese em gel de agarose	49
2.4.1. Preparação do gel de agarose	49
2.5. Purificação das amostras de DNA e Sequenciação	50
2.5.1. Purificação dos Produtos de PCR	50
2.5.2. Purificação dos produtos de PCR a partir de Gel de agarose	51
2.6. Análise Estatística.....	52
3. Resultados.....	53
3.1. Caracterização da população estudada	53
3.2. Otimização da temperatura de ligação dos <i>primers</i> amplificados dos exões 8 e 9	54
3.3. Amplificação dos exões 8, 9 e 11 do gene <i>c-Kit</i>	55
3.4. Sequenciação dos exões 8, 9 e 11 amplificados	56
3.5. Desfecho clínico e análise estatística.....	59

4. Discussão	61
5. Conclusão	66
IV - Referências Bibliográficas	67
V – Apêndices	I

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Escala de classificação histológica de mastocitomas cutâneos caninos.....	22
Tabela 2 - Classificação histológica dos mastocitomas cutâneos caninos.	23
Tabela 3 - Sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de estadiamento clínico para mastocitomas.	34
Tabela 4 - Sistema de Estadiamento Clínico para Mastocitomas Cutâneos Caninos proposto pela SEVC.	35
Tabela 5 - Sistema de Estadiamento Clínico para Mastocitomas Cutâneos Caninos proposto por Horta et al. (2018).	36
Tabela 6 - Sequência de primers utilizados na amplificação dos exões 8, 9 e 11 do gene c-Kit canino.	47
Tabela 7 - Condições da reação de PCR para amplificação do exão 11.....	48
Tabela 8 - Condições da reação de PCR para amplificação dos exões 8 e 9.....	49
Tabela 9 - Frequência das mutações não sinónimas identificadas nas amostras em estudo....	58
Tabela 10 - Desfecho clínico dois anos após o diagnóstico.	59
Tabela 11 - Frequência de mutações não sinónimas em função do desfecho clínico.....	59
Tabela 12 - Alterações na sequência nucleotídica identificadas nas amostras de mastocitomas caninos após a sequenciação dos exões 8 e 9.	I

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura da proteína KIT codificada pelo gene c-Kit. Numeração 1-21: exões que codificam os domínios da proteína; Ig1-5: domínios semelhantes à imunoglobulina; DT: domínio transmembranar; DJ: domínio justamembranar; TQ-1 e TQ-2: domínios tirosina-quinase; IQ: inserção de quinase; Cauda Carboxiterminal: extremidade onde se encontra o grupo carboxilo (COOH).....	26
Figura 2 - Representação esquemática da ativação do c-Kit induzida pelo SCF. 1- ligação do SCF à proteína KIT; 2- dimerização do recetor KIT; 3- fosforilação do recetor KIT.	26
Figura 3 - Distribuição da amostra populacional pela localização tecidual.....	53
Figura 4 - Distribuição da amostra populacional por sexo.....	53
Figura 5 - Distribuição da amostra relativamente à faixa etária dos cães presentes no estudo.	53
Figura 6 - Distribuição da amostra populacional de acordo com as raças dos cães em estudo.	54
Figura 7 - Resultados da amplificação de otimização de temperatura de ligação dos primers para os exões 8 e 9, observados em eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v).	55
Figura 8 – Visualização dos produtos de amplificação do exão 11 em amostras de MTCs. ..	56
Figura 9 - Alinhamento da sequência do exão 8 da amostra 1256/17 com a sequência de referência wild type (ensembl), onde se podem observar as alterações c.1242_1243insGC e c.1346T>C.....	56
Figura 10 - Alinhamento da sequência do exão 8 da amostra 2782/17 com a sequência de referência wild type (ensembl), onde se podem observar as alterações c.1242T>A e c.1243G>A.	56
Figura 11 - Alinhamento da sequência do exão 9 da amostra 1105/20C com a sequência de referência wild type (ensembl), onde se pode observar a alteração c.1434A>G.	57
Figura 12 - Alinhamento da sequência do exão 9 da amostra 1191/17A com a sequência de referência wild type (ensembl), onde se pode observar a alteração c.1472T>C.	57
Figura 13 - Alinhamento da sequência do exão 9 da amostra 1256/17 com a sequência de referência wild type (ensembl), onde se pode observar a alteração c.1408C>T.	57

Figura 14 - Curva de sobrevivência dos animais com e sem mutação no exão 11. A cruz no final de cada curva significa a ausência de informação sobre o desfecho clínico após os 24 meses.60

I – Descrição da casuística do estágio

O estágio foi realizado no âmbito da Unidade Curricular “Estágio” do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV), na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa (FMV-ULusófona), frequentado entre setembro de 2022 e janeiro de 2023. Este foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona (LACH-FMV-ULusófona) sob orientação da Professora Doutora Margarida Alves.

O estágio curricular realizado no laboratório LACH, teve como objetivo a realização do projeto de investigação que culminou na elaboração da presente dissertação de mestrado. Nesse contexto, o autor pôde obter mais conhecimentos e competências nas áreas de biologia molecular e genética. Para além das técnicas abordadas e descritas ao longo da dissertação, foi possível observar de perto outros projetos de investigação que estavam a decorrer e compreender de forma mais próxima a rotina num laboratório de análises clínicas e histopatologia.

As atividades desenvolvidas durante este estágio foram manipulação do micrótomo para a realização de cortes em amostras de mastocitomas parafinadas, manipulação e extração de DNA de amostras em parafina, reação em cadeia polimerase (PCR convencional), preparação de gel de agarose para realizar eletroforese dos produtos de PCR, purificação das amostras de DNA e análise de resultados de sequenciação de DNA.

No presente estudo foram incluídas amostras provenientes do arquivo de blocos de parafina do laboratório DNATech e do Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da FMV-ULusófona.

II – Pesquisa de mutações no gene *c-Kit* em mastocitomas cutâneos e subcutâneos em cães, em Portugal

1. Introdução

1.1. Mastócitos

Em 1878, Paul Ehrlich descobriu, pela primeira vez, os mastócitos, os quais, denominou de “*mastzellen*”, que significa “células de alimentação” devido à sua aparência (Beaven, 2009; Galli, Maurer & Lantz, 1999). As células progenitoras, os precursores dos mastócitos (CD34+), são formadas na medula óssea durante a hematopoiese e circulam na corrente sanguínea, como células mononucleares indiferenciadas (Nauta *et al.*, 2008; Robbie-Ryan & Brown, 2002). Estas permanecem indiferenciadas no sangue e diferenciam-se apenas ao migrarem para os tecidos, onde se tornam mastócitos maduros sob influência de fatores locais, como várias citocinas, de que são exemplo o fator de células estaminais (SCF, do inglês “*Stem Cell Factor*”) e as interleucinas 3, 4, 6 e 9 (IL-3, IL-4, IL-6 e IL-9) (Nauta *et al.*, 2008).

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo, que podem ter uma vida muito longa, variando de semanas a meses (Bradding & Holgate, 1999; Wedemeyer, Tsai & Galli, 2000). São encontrados em todo o corpo, na medula óssea, tecido conjuntivo, pele, trato gastrointestinal e trato respiratório, tendo assim uma grande distribuição pelo organismo. (Orkin & Schwartzman, 1959; Siebenhaar, Redegeld, Bischoff, Gibbs & Maurer, 2018). Estes formam uma população heterogénea de células com diferenças aparentes no seu desenvolvimento, conteúdo em mediadores inflamatórios, ultraestrutura e funcionalmente na sua capacidade de interagir com o ambiente local (Bradding & Holgate, 1999). Os mastócitos participam na resposta imunitária, inata e adaptativa, em infeções bacterianas e parasitárias e são conhecidos pela função que desempenham nas reações alérgicas (Siebenhaar *et al.*, 2018). Os mastócitos desempenham um papel nas reações de hipersensibilidade que levam a distúrbios alérgicos, como dermatite atópica, algumas alergias alimentares, rinite alérgica e asma alérgica (Galli & Tsai, 2012).

Foi estabelecido por muitos estudos que a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos mastócitos são estritamente reguladas pelo SCF, que atuam através do seu recetor KIT, expresso na superfície dos mastócitos (Sundström, Alfredsson, Olsson & Nilsson, 2001). Em condições normais, o número de mastócitos no tecido é considerado relativamente constante,

exceto quando há hiperplasia de mastócitos em diferentes patologias, como processos inflamatórios crônicos, distúrbios fibróticos e cicatrização de feridas (Bischoff & Sellge, 2002).

1.1.1. Morfologia

Os mastócitos são células mononucleadas, de formato irregular ou ovais do tecido conjuntivo, têm como diâmetro entre 7 a 20 μm . São células com o citoplasma preenchido com grânulos de secreção basófila que, muitas vezes, escurecem o núcleo central. Esses grânulos são densos em eletrões e de tamanho variável, variando de 0,3 a 2,0 μm de diâmetro. O seu núcleo é pequeno, esférico e central e, por vezes, de difícil observação, em microscópio, pois muitas vezes está coberto pelos grânulos citoplasmáticos (Mescher, 2018a).

1.1.2. Função biológica

Os mastócitos podem participar em processos tanto fisiológicos quanto patológicos, e isso depende não só da sua quantidade nos tecidos, mas também da natureza e tamanho dos mediadores libertados (Gilfillan, Austin & Metcalfe, 2011). Têm um papel essencial em diversos processos fisiológicos, incluindo a imunidade, tanto a inata quanto a adquirida, a inflamação, libertando mediadores químicos da resposta inflamatória (como a histamina e heparina), as respostas alérgicas e as reações parasitárias, devido à sua ação parácrina (Beaven, 2009; Mescher, 2018a; Zorn, 2013). Para esse fim, os mastócitos manifestam uma variedade de tipos de recetores na sua superfície, sendo os principais os recetores $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, que se associam às imunoglobulinas E (IgE), bem como recetores de reconhecimento padrão, recetores para componentes do complemento e recetores para catecolaminas (Kumar & Sharma, 2010).

Os plasmócitos secretam IgE, a qual exibe uma alta afinidade para os recetores $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, estabelecendo uma conexão. Essa ligação estabiliza a expressão do recetor promovendo assim o desenvolvimento de muitas agregações IgE- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ nas superfícies dos mastócitos e sensibilizando as respostas dos mastócitos a antígenos específicos. A inatividade dos mastócitos é mantida até que um antígeno (por exemplo, um alérgeno) se una aos anticorpos IgE presentes na membrana celular. Isso desencadeia a desgranulação dos mastócitos, libertando várias citocinas e quimiocinas no sangue, facilitando assim as respostas imunes do hospedeiro. A libertação de histamina pelos mastócitos aumenta a permeabilidade vascular e a

vasodilatação, acelerando a passagem de leucócitos para os tecidos e tendo efeitos tóxicos contra parasitas invasores (Galli & Tsai, 2012; Siebenhaar *et al.*, 2018).

Além disso, os mastócitos estão também envolvidos no processo fisiológico de cicatrização de feridas e no desenvolvimento da fibrose, pois têm a capacidade de influenciar diretamente os fibroblastos e/ou, de forma indireta, outras células, conduzindo a uma resposta pró-fibrótica (Puxeddu, Piliponsky, Bachelet & Levi-Schaffer, 2003).

1.1.3. Desenvolvimento tumoral

No local de crescimento tumoral é criada uma zona de inflamação que resulta na migração e acumulação de diversos tipos formas celulares, que estão intimamente ligadas ao crescimento do tumor. Em alguns tipos de tumores, os mastócitos são identificados como uma forma precoce e persistente de infiltração celular, muitas vezes presentes antes da angiogénese e do aumento significativo do crescimento tumoral (Beaven, 2009; Maltby, Khazaie & McNagny, 2010). O recrutamento e ativação dos mastócitos é mediado, maioritariamente, pelo SCF produzido pelas células tumorais (Ribatti & Crivellato, 2012).

O desenvolvimento de mastocitomas dá-se pela mastocitose, ou seja, por uma proliferação anormal de mastócitos a nível local ou sistémica, de origem desconhecida (Ranieri *et al.*, 2015). A tendência para aparecerem em aglomerados densos está associada a situações patológicas, que podem representar um estado reativo ou neoplásico.

Os mastócitos a nível do crescimento tumoral podem ter efeitos diretos nas células tumorais, como citotoxicidade, ou efeitos indiretos, como é o caso da angiogénese, remodelação tecidular do ambiente envolvente e o recrutamento de células imunitárias (Maltby *et al.*, 2010). Estes acumulam-se no limite entre tecidos saudáveis e malignos e são encontrados associados a vasos sanguíneos dentro do microambiente tumoral, podendo desempenhar um papel precoce na angiogénese de tumores em desenvolvimento, pois expressam diversos componentes angiogénicos. A angiogénese fornece os nutrientes necessários ao crescimento tumoral e é necessária para a metastização de tumores sólidos em locais distantes do corpo (Maltby *et al.*, 2010). A propagação e metastização do tumor são promovidos pelo papel importante no crescimento tumoral que os mastócitos desempenham na remodelação tecidular da matriz extracelular durante a cicatrização de feridas (Maltby *et al.*, 2010).

1.2. Mastocitomas

Os mastocitomas (MTCs) são a segunda neoplasia maligna mais frequente diagnosticada em cães (Dobson, Samuel, Milstein, Rogers & Wood, 2002; Hauck, 2013), representando 16% a 21% de todas as neoplasias cutâneas caninas (London & Thamm, 2020). São neoplasias malignas mesenquimatosas que, na maioria dos casos, surge primeiro na derme ou no tecido subcutâneo e, raramente, noutras partes do corpo como os órgãos viscerais, ou de forma sistêmica (Takahashi *et al.*, 2000). O seu diagnóstico é direto, contudo o seu comportamento biológico é imprevisível (Kiupel & Camus, 2019).

Esta neoplasia é caracterizada pela proliferação e acumulação anormal de mastócitos com diferentes níveis de diferenciação celular (Blackwood *et al.*, 2012). Estas massas neoplásicas de mastócitos podem sofrer desgranulação espontânea, libertando moléculas biologicamente ativas que podem executar efeitos sérios e potencialmente fatais em outras partes do corpo. Estes são denominados distúrbios paraneoplásicos e incluem anafilaxia, ulceração ou perfuração gástrica e duodenal, doença glomerular e hemorrágica (Siebenhaar *et al.*, 2018).

Em cães, os MTCs são neoplasias de pele comuns, sendo muito heterogénios na aparência clínica e comportamento biológico (Siebenhaar *et al.*, 2018). Os MTCs, no gato, são menos comuns e o seu comportamento biológico é menos variável. Em humanos, geralmente apresenta-se como uma doença sistêmica, em vez de, uma massa definida e varia de doença benigna em crianças em idade de amamentação, lactentes, a doenças malignas agressivas em adultos. Apesar das diferenças a nível do comportamento e na manifestação clínica, os mastócitos neoplásicos compartilham uma anomalia molecular subjacente em diferentes espécies, a mutação do proto-oncogene *c-Kit*. Este gene codifica um recetor transmembranar tirosina-quinase, denominada KIT ou CD117, associado ao desenvolvimento, proliferação e diferenciação dos mastócitos (Kiupel, 2017; de Nardi *et al.*, 2022).

1.2.1. Mastocitomas da pele

Considerada o maior órgão individual do corpo, a pele normalmente corresponde aproximadamente 15-20% do peso corporal total. Também é conhecida como tegumento, derivada do latim, *L. integumentum*, que significa revestimento, ou camada cutânea. É composta por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e por uma porção

subjacente de tecido conjuntivo de origem mesodérmica, a derme (Mescher, 2018b). Em continuidade com a derme, e abaixo da mesma, está a hipoderme (tecido subcutâneo), há autores que a consideram como uma terceira porção da pele, sendo uma camada composta por tecido conjuntivo laxo e essencialmente constituída por tecido conjuntivo adiposo (Hill, 2012).

Os mastocitomas localizados na pele, são diferenciados em mastocitomas cutâneos (MTCC) e subcutâneos, com base na sua localização na derme ou tecido subcutâneo, determinada pela análise histopatológica (Willmann *et al.*, 2021). Esta divisão anatômica é importante, pois mais de 90% dos mastocitomas subcutâneos (MTSC) são considerados benignos e podem ser controlados com excisão cirúrgica completa (Gill, Leibman, Monette, Craft & Bergman, 2020; Horta *et al.*, 2018; Newman, Mrkonjich, Walker & Rohrbach, 2007; Thompson *et al.*, 2011a). No entanto, uma proporção de aproximadamente 10% dos cães diagnosticados com mastocitomas subcutâneos não consegue superar a doença. Segundo a literatura, observa-se uma taxa de recorrência entre 8% a 9% nos mastocitomas subcutâneos, e em 4% a 6% observa-se o surgimento de metástases (Newman *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2011a).

Os MTSCs tendem a exibir um comportamento menos agressivo (Pakhrin *et al.*, 2007), embora se encontrem descritas observações contraditórias. Apesar de uma publicação recente descrever as características dos mastocitomas cutâneos e subcutâneos (Willmann *et al.*, 2021), o seu comportamento biológico ainda não foi diretamente comparado em um estudo.

Os MTCCs exibem uma diversidade marcante na sua aparência macroscópica, variando entre nódulos cutâneos até tumefações difusas ou, mais frequentemente, apresentando-se como tumores eritematosos elevados, desprovidos de pêlos. O tamanho varia de alguns milímetros a massas consideráveis. Lesões claramente definidas, sem pêlos e isoladas têm uma propensão ao crescimento lento e, muitas vezes, persistem ao longo de meses. Em contrapartida, MTCs ulcerados e pruriginosos são, geralmente, mal circunscritos (Kiupel, 2017). Existe uma tendência para um crescimento rápido e com a presença comum de tumores menores e adicionais nas proximidades. MTCCs que apresentam características muito agressivas, como tamanho significativo, invasão marcada e ulceração grave, geralmente são de natureza maligna. No entanto, MTCs que exibem uma aparência bem diferenciada não devem ser automaticamente considerados benignos. Na superfície de corte, os MTCCs podem ter uma aparência branca ou rosada, por vezes, com pontos de hemorragia e as suas margens não são nitidamente definidas (Kiupel, 2017).

Os MTSCs estão localizados no tecido subcutâneo em várias partes do corpo, sendo os membros, dorso e tórax os locais mais prevalentes, representando 60% desses tumores (Newman *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2011a). Tumores múltiplos são pouco frequentes, 95% destas neoplasias surgem como massas únicas (Thompson *et al.*, 2011a). Essas lesões causam uma saliência na pele, sem penetrar na derme e raramente apresentam ulceração. Geralmente, manifestam-se como massas moles e carnudas, assemelhando-se a lipomas. A falta de uma delimitação clara torna desafiadora a determinação precisa das margens, seja por palpação ou visualização durante a excisão cirúrgica. Em casos de disseminação metastática, é possível identificar linfadenopatia local ou organomegalia por meio de palpação abdominal ou exames de imagem (Kiupel, 2017).

1.2.2. Classificação do grau histopatológico de MTC caninos

Há várias décadas que a graduação histopatológica tem sido usada para prever o comportamento biológico dos mastocitomas. A recorrência, o tempo de sobrevivência e a probabilidade de metastização têm sido ligados à avaliação do grau de diferenciação celular.

Existem dois sistemas de classificação mais utilizados, o sistema de Patnaik (Patnaik, Ehler & MacEwen, 1984) e de Kiupel (Kiupel *et al.*, 2011). O sistema desenvolvido por Patnaik *et al.* (1984) é o mais utilizado e categoriza os MTCs bem diferenciados em grau I, os intermédios em grau II e os pouco diferenciados em grau III, seguindo os critérios especificados na tabela 1. No estudo realizado por Patnaik *et al.* (1984), cães com MTC de grau I, II ou III apresentaram probabilidade de sobrevivência superior a 1500 dias de 93% (28/30), 44% (16/36) e 6% (1/17), respetivamente, enquanto as probabilidades de morte ou eutanásia são de 7% (2/30), 56% (20/36) e 94% (16/17), respetivamente.

Tabela 1 - Escala de classificação histológica de mastocitomas cutâneos caninos. Adaptado de Patnaik *et al.* (1984)

Grau	Descrição Histopatológica
Grau I	- Lesões neoplásicas restritas à derme e espaços interfoliculares. - Mastócitos bem diferenciados, redondos e monomórficos, com limites citoplasmáticos distintos e grânulos intracitoplasmáticos de tamanho médio, distribuídos em fileiras ou pequenos aglomerados, separados por fibras de colagénio maduro. Os núcleos redondos com cromatina condensada. - Ausência de mitoses. - Edema e necrose mínimos.
Grau II	- Diferenciação celular intermédia. Neoplasia com invasão celular moderada a muito alta na derme profunda, tecido subcutâneo e muscular esquelético ou outros tecidos envolventes - Células neoplásicas redondas a ovóides, com algum pleomorfismo e raras células binucleares - A maioria das células com citoplasma bem diferenciado, com grânulos intracitoplasmáticos finos, mas alguns impercetíveis, misturados com grânulos grandes e hipercromáticos. - Núcleos redondos com cromatina dispersa, em algumas células com núcleo duplo. - Raras mitoses (0 a 2 por campo ótico) - Algumas áreas de edema difuso e necrose
Grau III	- Pouco diferenciado e de crescimento rápido, possível ulceração, prurítico e presença de nódulos satélites/metástases. - Sintomatologia sistémica presente (linfadenomegalia e sinais gastrointestinais) - Altamente infiltrativo da derma profunda, tecido subcutâneo, tecido muscular e tecidos adjacentes. - Citoplasma indistinto, núcleo redondo com um ou mais nucléolos protuberantes. Presença de células gigantes e multinucleadas. - Presença de mitoses (3 a 6 células por campo ótico) - Presença frequente de edema, hemorragia e necrose

Havendo uma subjetividade inerente ao sistema proposto por Patnaik *et al.* (1984), de forma a aumentar concordância entre patologistas, Kiupel e colaboradores (2011) apresentaram uma nova abordagem para a classificação histológica dos MTCCs, simplificando-os em dois graus: grau I (baixo) e grau II (alto). A comparação com o sistema de Patnaik *et al.* (1984) demonstrou que a proposta de Kiupel *et al.* (2011) trouxe maior consistência e precisão ao prognóstico, reduzindo a subjetividade e aprimorando a previsão de aparecimento de metástases (Kiupel *et al.*, 2011; Sledge, Webster & Kiupel, 2016).

Tabela 2 - Classificação histológica dos mastocitomas cutâneos caninos. Adaptado de Kiupel *et al.* (2011)

Grau	Descrição Histológica
Grau I (baixo)	- Bem diferenciado. - Esperança média de sobrevivência de 2 anos. - Observam-se menos de 7 figuras mitóticas, menos de 3 células multinucleadas, menos 3 núcleos pleomórficos por campo ótico. - Cariomegalia presente (diâmetros nucleares de pelo menos 10% dos mastócitos neoplásicos variam em pelo menos 2 vezes). - Melhor prognóstico (crescimento lento, menor probabilidade de aparecimento de lesões satélites ou metástases).
Grau II (alto)	- Pouco diferenciado. - Menor tempo de sobrevida (4 meses). - Observam-se 7 ou mais figuras mitóticas, 3 ou mais células multinucleadas, 3 ou mais núcleos pleomórficos por campo ótico. - Cariomegalia presente - Evolução mais rápida (aparecimento de metástases ou novas massas) - Pior prognóstico

A categorização independente dos MTSCs em relação aos cutâneos é crucial, uma vez que o prognóstico está intimamente ligado a essa distinção. Os MTSCs, ao contrário dos cutâneos, não exibem encapsulamento, a maioria apresenta características infiltrativas, alguns são bem circunscritos e muitos são uma combinação desses dois padrões (Thompson *et al.*, 2011a).

Até recentemente, os MTSCs não eram diferenciados dos cutâneos na análise, sendo frequentemente classificados como MTCCs de grau II de Patnaik *et al.* (1984), conforme a escala de graduação dos MTCCs (Gross, Ihrke, Walder & Affolter, 2005; Patnaik *et al.*, 1984). Embora não haja uma escala de graduação específica para os MTSCs, mais de 90% destes, são benignos, e podem ser controlados por meio de excisão cirúrgica (Newman *et al.*, 2007 & Thompson *et al.*, 2011a). No entanto, num estudo de Thompson *et al.* (2011a), 9% (27/306) dos cães afetados por esta doença morreram de complicações relacionadas com a mesma, 11% (35/306) desenvolveram um segundo MTSC numa localização distante do primeiro, 8% (24/306) apresentaram recidiva e 4% (13/306) metástases.

1.2.3. Genética de mastocitomas caninos

Apesar dos mastocitomas serem uma das neoplasias mais comuns em cães, a base genética da sua origem e desenvolvimento não se encontra totalmente esclarecida. De acordo

com de Nardi e colaboradores (2022) foram encontradas mutações no gene *c-Kit* em cerca de 10-45% dos MTCCs em cães. O tipo de mutação mais comum é a duplicação interna em *tandem*, essencialmente nos exões 8 ou 11 do *c-Kit*, seguida por mutações pontuais nos exões 8, 9, 11 e 17 (Letard *et al.*, 2008; London *et al.*, 2009; Webster, Kiupel & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006a; Zemke, Yamini & Yuzbasiyan-Gurkan, 2002). Este tipo de mutação envolve a duplicação de uma porção do exão, levando a uma forma alterada da proteína do *c-Kit* (Brocks *et al.*, 2021). O recetor transmembranar KIT tem um papel centrado na diferenciação e proliferação celular. A maioria das mutações já identificadas no gene *c-Kit* causam ativação constitutiva do recetor KIT, mesmo na ausência de seu ligante, o SCF. Além das mutações no exão 8, as mutações no *c-Kit* estão associadas ao comportamento agressivo dos MTCs, redução do tempo de sobrevida e aumento da probabilidade de recidiva e morte relacionadas ao tumor (Brocks *et al.*, 2021; Horta *et al.*, 2018; Takeuchi *et al.*, 2013; Tamlin, Bottema & Peaston, 2020; Vozdova *et al.*, 2019; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Miller, Kaneene & Kiupel, 2007; Zemke *et al.*, 2002).

Foram identificados vários genes com mutações, em baixa frequência, em MTCs cutâneos caninos, como no *GNB1* (17,3% dos MTCs) e *TP53* (14,6% dos MTCs) (Mochizuki, Thomas, Moroff & Breen, 2017a; Vozdova *et al.*, 2019; Zorzan, Hanssens, Giantin, Dacasto & Dubreuil, 2015). O *TP53* é um gene supressor de tumor que se encontra frequentemente mutado em vários tumores humanos e animais, embora as mutações deste gene não tenham mostrado marcadores prognóstico confiáveis em MTCs caninos (Vozdova *et al.*, 2019; Vozdova *et al.*, 2020b). O gene *GNB1* codifica uma subunidade de proteína de ligação ao nucleótido guanina. Em cães, foram identificadas mutações no gene *GNB1* em MTCs cutâneos e subcutâneos, com uma correlação positiva com um prognóstico favorável (Mochizuki *et al.*, 2017a; Vozdova *et al.*, 2019; Vozdova *et al.*, 2020a).

Relativamente às anomalias cromossômicas, através de técnicas citogenéticas de hibridação genómica comparativa por microarranjos (Array CGH, do inglês “*Array Comparative Genomic Hybridization*”) e de hibridação fluorescente *in situ*, foram detetadas variações no número de cópias em vários cromossomas e translocações cromossômicas em MTCs caninos. Especificamente, a perda do cromossoma 5, o ganho do cromossoma 31 e o ganho ou perda parcial do cromossoma 20 foram associados a MTCs com comportamentos agressivos (Mochizuki *et al.*, 2017a).

Assim sendo, mutações no gene *c-Kit*, com exceção das mutações no exão 8, aneuploidias múltiplas, poliploidias, acumulação de mutações e variantes de número de cópias cromossômicas e subcromossômicas estão relacionadas a MTCs agressivos, de alto grau e a um mau prognóstico. No entanto, são necessárias investigações adicionais para esclarecer a etiologia dos MTCs e encontrar novos marcadores prognósticos confiáveis e alvos terapêuticos (de Nardi *et al.*, 2022).

1.2.4. O gene *c-Kit*

O oncogene *v-Kit* foi identificado em 1986, no genoma viral do vírus do sarcoma felino Hardy-Zuckerman 4 (HZ4-FeSV, do inglês “*Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma vírus*”), que causa fibrossarcomas em gatos (Besmer *et al.*, 1986). Um ano mais tarde, foi identificado o *c-Kit*, com base em semelhanças de sequências (Yarden *et al.*, 1987). O gene *c-Kit* codifica a proteína KIT (também denominada, CD117) que é um recetor transmembranar tirosina-quinase. Este, quando ativado pelo SCF, promove o crescimento de mastócitos. Este recetor, codificado pelo proto-oncogene *c-Kit*, desempenha um papel importante não só na sobrevivência, desenvolvimento, proliferação, diferenciação e migração dos mastócitos (Amagai *et al.*, 2014; Costa Casagrande *et al.*, 2015; de Nardi *et al.*, 2022; Giantin *et al.*, 2012; Kiupel, Webster, Kaneene, Miller, & Yuzbasiyan-Gurkan, 2004; Kiupel, 2017; Sailasuta *et al.*, 2014), como no desenvolvimento, proliferação e função de melanócitos, células intersticiais de Cajal e células estaminais hematopoiéticas (Lennartsson, Jelacic, Linnekin & Shivakrupa, 2005).

A estrutura da proteína KIT, representada na figura 1, inclui uma região extracelular, codificada pelos exões 1-9, que contém cinco domínios semelhantes a imunoglobulinas e um domínio transmembranar, codificado pelo exão 10. A região intracelular, contém um domínio justamembranar, codificado pelo exão 11, envolvido na inibição autónoma da atividade do recetor, dois domínios de tirosina-quinase (domínios ATP e fosfotransferase), separados por uma inserção de quinase, e uma porção terminal do grupo carboxilo, designada de cauda Carboxiterminal (Lennartsson *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2013).

1.2.5. Mutações no gene *c-Kit* canino

As mutações que ocorrem nos domínios semelhantes à imunoglobulina, codificados pelos exões 8 e 9 e no domínio justamembranar são designadas de mutações do tipo regulatório, enquanto que as mutações a nível dos exões 13-21, que codificam os domínios intracelulares da quinase, designam-se de mutações do tipo bolsa enzimática (Longley, Reguera & Ma, 2001).

Quando o SCF se liga ao recetor KIT, o domínio citoplasmático do recetor sofre autofosforilação. Na presença de mutações do tipo duplicações internas em *tandem* (ITD, do inglês “*Internal Tandem Duplications*”) no exão 11, o recetor é fosforilado, independentemente de o SCF estar, ou não, ligado ao recetor (de Nardi *et al.*, 2022). O KIT fosforilado ativa as vias de sinalização que estimulam o crescimento dos mastócitos neoplásicos. Assim, segundo London e colaboradores (1999) esta mutação, estando presente, é diretamente responsável pela proliferação descontrolada do tumor que, neste caso, apresenta pior prognóstico (Webster *et al.*, 2007).

Cerca de 8-29% dos MTCs caninos possuem mutação do tipo regulatório nos exões 8, 9 e 11 (Horta *et al.*, 2018; Mochizuki *et al.*, 2017a). Entre 60 a 74% dessas mutações são ITDs do exão 11, que se encontram em 18% dos tumores (Horta *et al.*, 2018; Mochizuki *et al.*, 2017a). A frequência da mutação no gene *c-Kit* é maior em graus histológicos tumorais mais elevados e os ITDs do exão 11 estão associados a tempos de sobrevida reduzidos e ao aumento da probabilidade de recorrência do tumor e metástases (Horta *et al.*, 2018; Tamlin *et al.*, 2017). Embora menos frequentes, ITDs no exão 8, bem como inserções, deleções e substituições de nucleótidos nos exões 8, 9, 11, 14 e 17 também se encontram documentados (Mochizuki *et al.*, 2017a; Takeuchi *et al.*, 2013; Webster, Kiupel & Yuzbasiyan-Gurkan, 2006a).

Chen *et al.* (2022), desenvolveram um estudo com o objetivo de determinar a prevalência de mutações nos exões 8 e 11 do gene *c-Kit* em 216 MTSCs caninos e analisar a sua relação com outros fatores de prognóstico, incluindo contagem mitótica, grau histológico, padrão de expressão de KIT e marcadores de proliferação. A presença de mutações no exão 11 foi associada ao alto grau histológico e à alta contagem mitótica, indicando que estes parâmetros podem ajudar a prever o comportamento biológico de MTSCs, de forma semelhante aos cutâneos. Este estudo revelou uma maior prevalência de mutações ITD nos exões 8 e 11 do *c-Kit* em MTSCs, em comparação com descrições anteriores. À semelhança dos MTCCs, foi observado que os MTSCs com mutações no exão 11 têm uma maior propensão a apresentarem alto grau histológico e uma contagem mitótica mais alta. No entanto, tais associações não foram

identificadas em MTSCs com mutações no exão 8 (Chen, Marconato, Sabbatini & Kiupel, 2022).

Assim sendo, a expressão alterada de KIT e as mutações em *c-Kit* demonstram ser indicadores de prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos (Takeuchi *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2007). Para além disso, os MTCs que apresentam mutações de *c-Kit* ou alterações na expressão de KIT, são potenciais candidatos para terapêutica direcionada com inibidores de tirosina quinase (Sledge *et al.*, 2016).

1.3. Incidência e Epidemiologia

1.3.1. Incidência

Segundo Dobson *et al.* (2002) e Hauck (2013), o mastocitoma (MTC) é a segunda neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada em cães, representando 16-21% de todas as neoplasias cutâneas caninas. No entanto, a sua apresentação clínica é heterogênia, tendo um comportamento biológico com potencial variável para recorrência e criação de metástases (London & Thamm, 2020; O'Connell & Thomson, 2013).

1.3.2. Raça

Existem raças com maior incidência de mastocitomas, mas estes podem surgir em qualquer raça ou cruzamento de raças. Está descrita uma maior predisposição racial em *Boxer*, *Labrador Retriever*, *Golden Retriever*, *Bull Terrier*, *Shar-Pei*, *Cocker Spaniel*, *Bulldog* Inglês, *Bulldog* Francês, *Schnauzer*, *Weimaraner*, *Pug* e *Beagle* (Morris & Dobson, 2008; Shoop *et al.*, 2015). Embora exista uma predisposição racial, foi registada uma elevada ocorrência de MTCs em animais sem raça definida (SRD) (Warland & Dobson, 2013).

1.3.3. Sexo

No que diz respeito à predisposição sexual, apesar dos vários estudos realizados, nenhum deles conseguiu estabelecer uma relação entre sexo do animal e a predisposição para o desenvolvimento desta doença (Couto, 2019; Patnaik *et al.*, 1984). Ao comparar os resultados obtidos em outros estudos, que foram realizados posteriormente, verificam-se discrepâncias, e,

portanto, até ao presente momento, não foi estabelecida nenhuma predisposição sexual, sendo necessários mais estudos para melhor compreensão da possível relação que as hormonas sexuais possam ter com o desenvolvimento de MTCs (Kiupel, 2017; Śmiech *et al.*, 2018; White, Hohenhaus, Kelsey & Procter-Gray, 2011).

1.3.4. Idade

No que diz respeito à faixa etária, os MTCs podem surgir em qualquer idade, mas existe uma predisposição para o seu desenvolvimento em cães seniores a idosos (Kiupel & Camus, 2019; Śmiech *et al.*, 2018).

1.4. Apresentação clínica e síndromes paraneoplásicas

Para além da formação de tumores, é possível observar sinais clínicos secundários em cerca de metade dos cães afetados por mastocitomas (Welle, Bley, Howard & Rüfenacht, 2008). Estes incluem sinais resultantes da desgranulação de mastócitos e da consequente libertação de constituintes bioativos, tais como histamina, heparina, fatores quimiotáticos de eosinófilos e enzimas proteolíticas (Mullins *et al.*, 2006; Welle *et al.*, 2008).

A nível local, os sinais são, na sua maioria, causados pela estimulação dos recetores de histamina H1 e podem ocorrer espontaneamente ou ser despoletados ou exacerbados após manipulação, por exemplo, durante o exame físico. Os sinais mais comuns, localmente, são alterações intermitentes das dimensões do tumor, efeitos da desgranulação resultante da palpação, e observação de eritema, edema e formação de pápulas na área afetada, numa manifestação designada de sinal de Darier. Adicionalmente, deve-se considerar a possibilidade de atraso na cicatrização de feridas e anomalias na coagulação, resultantes da libertação de heparina, que pode ser desencadeada durante a realização de exames complementares de diagnóstico, como por exemplo, punção aspirativa por agulha fina (PAAF) ou biópsia e, até, durante a excisão do MTC (Blackwood *et al.*, 2012).

Também podem ocorrer sinais a nível sistémico, que são, essencialmente, gastrointestinais, como ulceração, comprometendo principalmente o estômago e, menos frequente, o duodeno, sendo estas lesões geralmente superficiais e múltiplas, embora, em alguns casos, possam ocorrer ulcerações mais graves. A sua manifestação é evidenciada pelo aumento

dos níveis sanguíneos de histamina que estimulam os recetores H2 nas células parietais, levando a uma produção excessiva de ácido gástrico e hipermotilidade gástrica (Blackwood *et al.*, 2012; Welle *et al.*, 2008). Além disso, a histamina provoca danos no endotélio vascular das arteríolas e vénulas e liberta fibrinolisin, levando à trombose intravascular e necrose isquémica da mucosa do estômago. Por outro lado, a heparina tende a bloquear os efeitos da histamina, mas está presente em baixas concentrações (Blackwood *et al.*, 2012; Welle *et al.*, 2008). Nesses casos, podem surgir manifestações clínicas como vômitos, hematémese, anorexia, hematoquezia, melena, dor abdominal, anemia por défice de ferro secundária à hemorragia gastrointestinal causada pelas úlceras e, nos casos mais graves, perfuração intestinal ou úlceras perfurantes, podendo ocorrer peritonite e sépsis (Blackwood *et al.*, 2012; Welle *et al.*, 2008).

Embora menos frequente, poderá ocorrer hipotensão e colapso circulatório (Blackwood *et al.*, 2012; Welle *et al.*, 2008). Este último sinal clínico, embora raro, pode ocorrer na presença de libertação maciça de histamina pelas células neoplásicas, particularmente em animais com doença extensa. A presença de uma elevada eosinofilia é descrita como uma síndrome paraneoplásica associada a MTC em casos de doença cutânea e visceral. A sua manifestação está associada à libertação de fatores quimiotáticos eosinofílicos (Endicott *et al.*, 2007; Musser, Berger, Flaherty, Fox & Johannes, 2018; Takahashi *et al.*, 2000).

1.5. Diagnóstico

Assim como todas as circunstâncias clínicas, a realização de um exame físico completo é de extrema relevância, devendo incluir a pesquisa de outros nódulos ou lesões, palpação de linfonodos e palpação abdominal, de forma a identificar possíveis linfadenomegalias e/ou organomegalias. Posteriormente, aquando da suspeita de mastocitoma, a primeira abordagem diagnóstica consiste na punção do nódulo para análise citológica, por PAAF. Para confirmação, ou em casos onde os resultados para um diagnóstico não sejam obtidos por citologia, poderá ser realizada biópsia para avaliação histopatológica (Blackwood *et al.*, 2012).

O recurso a exames complementares de imagiologia é, também, uma opção. Apesar de haver uma elevada presença de mastócitos nos pulmões, e sendo este um local habitual de metastização de outras neoplasias, a metastização de MTCs para este órgão é muito rara, pelo que as radiografias ao tórax são de baixo valor diagnóstico (North & Banks, 2009). Porém, podem-se detetar algumas alterações como derrame pleural, linfadenomegalia esternal ou peri-

hilar e a presença de massas mediastínicas, apesar de serem raras. A avaliação radiográfica abdominal é importante, pois permite avaliar o envolvimento do fígado e do baço, assim como, outras estruturas (North & Banks, 2009). A ecografia abdominal tem elevado valor diagnóstico na avaliação do envolvimento do fígado e do baço. No entanto, a aparência ecográfica do baço com MTC, por exemplo, pode ser hiperecogénica, hipoecogénica ou normal, pelo que a ecografia deve ser acompanhada de PAAF ou biópsia ecoguiada, de forma a obter um diagnóstico conclusivo (O'Brien & Barr, 2009).

Assim sendo, a avaliação diagnóstica em cães suspeitos de MTC pretende atingir múltiplos objetivos, incluindo o diagnóstico definitivo através de exames citológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos, a determinação do estadiamento clínico completo, a identificação e registo de sinais clínicos referentes a síndromes paraneoplásicas e a avaliação de fatores prognóstico relacionados com a doença (Blackwood *et al.*, 2012; de Nardi *et al.*, 2022; Welle *et al.*, 2008).

1.6. Tratamento

Em mastocitomas, as opções de tratamento devem ter em consideração as características clínicas, o tamanho do tumor, localização, grau histológico, estadiamento clínico e a evidência de metástases (Blackwood *et al.*, 2012). Há várias alternativas, no tratamento de MTCs, que podem incluir terapêutica farmacológica sistémica, cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou abordagem terapêutica que combina essas diferentes modalidades (Blackwood *et al.*, 2012).

Perante tumores de pequenas dimensões e de baixo grau, geralmente, é possível a sua remoção por excisão cirúrgica na maioria dos locais anatómicos, sem haver necessidade de recorrer a tratamento adicional. Estes apresentam baixa probabilidade de metastizar, independentemente das margens histológicas livres de tumor (Donnelly *et al.*, 2015; Mullins *et al.*, 2006). Contrariamente, em tumores com de maiores dimensões e de grau intermédio, existe um risco significativo de recorrência e metástases de tumores de alto grau, após a excisão cirúrgica, assim, é recomendada terapêutica adicional para estes doentes (Donnelly *et al.*, 2015).

1.6.1. Terapêutica com inibidores da tirosina quinase

Os recetores tirosina-quinase, estão envolvidos nos mecanismos de proliferação, diferenciação, migração, angiogénese e ativação celular (Thamm, 2013). Alguns estudos sugerem que esses recetores desempenham papel fundamental no processo de transformação neoplásica (Olsen, Thomson, O’Connell & Wyatt, 2018). Desta forma, o recetor KIT, quando ativado, torna-se um alvo terapêutico promissor para o tratamento dos MTCs caninos (Halsey *et al.*, 2017). Para inibir esses recetores, a principal estratégia desenvolvida na Medicina Veterinária, foi o uso dos inibidores de tirosina quinase (TKI, do inglês “*Tyrosine Kinase Inhibitors*”), que têm sido desenvolvidos para o tratamento de MTCs recorrentes ou não excisáveis. Estes têm demonstrado eficácia clínica, particularmente em tumores que apresentam mutações no *c-Kit*. (Halsey *et al.*, 2017; Moirano, Lima, Hume & Brodsky, 2018). Estes inibidores são capazes de bloquear a atividade dos recetores através da inibição competitiva da ligação do ATP e consequente fosforilação, impedindo a ativação causada por mutações do tipo regulatório e, assim, impedindo o início das cascatas de sinalização a jusante, o que leva à redução da proliferação e migração celular e estimula a apoptose dos mastócitos neoplásicos (Blackwood *et al.*, 2012; Gil da Costa, 2015; Kiupel, 2017; London, 2009).

Foram aprovados, pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês “*European Medicines Agency*”), dois TKI para o tratamento de MTCs caninos. Os TKIs em questão são o fosfato de toceranib (Palladia®) e o masitinib (Masivet®), ambos direcionados ao recetor KIT (Dubreuil *et al.*, 2009). Ambos os medicamentos mostraram eficácia em ensaios clínicos (Hahn *et al.*, 2010; London *et al.*, 2009), sendo o Palladia® indicado para tratamento de MTCs caninos de grau II ou III de Patnaik não excisáveis e recorrentes (EMA, 2017). O Masivet® é indicado para MTCs de grau II ou III de Patnaik não excisáveis, com confirmação de mutação no gene *c-Kit* (EMA, 2013).

Tanto o toceranib quanto o masitinib têm como alvo o recetor KIT. O toceranib também inibe o recetor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2, do inglês “*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*”) e o recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR, do inglês “*Platelet-derived growth factor receptors*”), ambos envolvidos na angiogénese tumoral e metastização (London *et al.*, 2009), enquanto que o masitinib também tem como alvo o PDGFR, a quinase específica de linfócitos (Lck, do inglês “*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*”), o recetor 3 do fator de crescimento de fibroblastos (fGFR3,

do inglês “*fibroblast growth factor receptor 3*”) e a quinase de adesão focal (FAK, do inglês “*Focal Adhesion Kinase*”) (Dubreuil *et al.*, 2009).

Embora os TKI proporcionem, regra geral, excelentes resultados iniciais, frequentemente, desenvolvem-se resistência durante o tratamento a longo prazo (London, 2013). Halsey e colaboradores (2014) forneceram recentemente dados adicionais, descrevendo que linhas celulares MTC resistentes ao toceranib desenvolvem mutações secundárias no *c-Kit* que afetam os domínios justamembranares e tirosina-quinase e também regulam positivamente a expressão do gene *c-Kit*, mas não expressam a glicoproteína P associada à quimiorresistência.

Alterações na estrutura da proteína KIT, resultante de mutações na região intracelular, levam à diminuição da afinidade dos TKIs ao local de ligação. Os mastócitos neoplásicos que contêm esse tipo de mutação, são resistentes à maioria das terapêuticas com TKI. Assim, a localização das mutações do *c-Kit* influenciam se o tumor será responsivo ou resistente ao tratamento com TKI (Nakano, Kobayashi, Bonkobara & Takanosu, 2017).

1.7. Estadiamento

Após o diagnóstico inicial de mastocitoma, é necessário realizar exames complementares de diagnóstico adicionais, de modo a avaliar o estado geral do animal, a presença de síndromes paraneoplásicas e a presença de metástases (Blackwood *et al.*, 2012).

O estadiamento é uma etapa fundamental, sendo que deve ser sempre realizado com o objetivo de definir a extensão da doença, que influencia diretamente na tomada de decisão terapêutica e no prognóstico (London & Thamm, 2020).

O estadiamento dos MTCs em cães pode ser realizado de forma simples ou mais completa, dependendo da localização e fatores de prognóstico. O estadiamento simples inclui hemograma, painel bioquímico e análises citológicas dos linfonodos regionais, mesmo que não apresentem alterações palpáveis ao exame físico (London & Thamm, 2020; Warland, Amores-Fuster, Newbury, Brearley & Dobson, 2014). A presença fisiológica de mastócitos e o seu aumento em processos inflamatórios, que podem não estar relacionado com a neoplasia, podem dificultar a avaliação citológica (Krick, Billings, Shofer, Watanabe & Sorenmo, 2009). Em casos difíceis de excisão ou com fatores de mau prognóstico, é recomendado realizar um estadiamento mais abrangente, envolvendo ecografia abdominal e análises citológicas (PAAFs)

de fígado e baço (Book *et al.*, 2011; Stefanello *et al.*, 2009). Para avaliar a existência de metástases pulmonares, embora sejam raras, e para investigar a presença de doenças concomitantes, além de possíveis sinais de linfanomegalia nos linfonodos da cavidade torácica, é sugerida a realização de radiografias torácicas (Blackwood *et al.*, 2012 & Warland *et al.*, 2014). Citologias de medula óssea são realizadas em casos de alto risco, especialmente em MTCs de alto grau, para detecção de metástases (Aubry, Spangler, Schleis & Smith, 2014). Ecografia e tomografia podem ser realizadas para avaliar a extensão dos MTCs e guiar o planejamento cirúrgico, caso se for necessário.

Diversos sistemas de estadiamento clínico para MTCs caninos foram propostos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs um sistema de estadiamento clínico (Tabela 3) para MTC caninos, que classifica cães com presença de metástases ganglionares como estágio II e cães com presença de múltiplos tumores como o estágio III, mesmo com linfonodos livres de metástases. Esta classificação é questionada por diversos estudos, principalmente em termos de MTCs de grau 3 (Murphy, Sparkes, Blunden, Brearley & Smith, 2006).

Tabela 3 - Sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de estadiamento clínico para mastocitomas. Adaptado de: London & Thamm, 2020.

Estádio	Descrição
0	Um tumor parcialmente removido da derme, identificado histologicamente, sem envolvimento de linfonodos regionais. a) Sem sinais sistêmicos b) Com sinais sistêmicos
I	Um tumor único, confinado à derme, sem envolvimento de linfonodos regionais a) Sem sinais sistêmicos b) Com sinais sistêmicos
II	Um tumor único, confinado à derme, com envolvimento de linfonodos regionais a) Sem sinais sistêmicos b) Com sinais sistêmicos
III	Tumores dérmicos múltiplos, tumores infiltrativos de grades dimensões, com ou sem envolvimento de linfonodos regionais a) Sem sinais sistêmicos b) Com sinais sistêmicos
IV	Qualquer tumor com metástase à distância, incluindo envolvimento do sangue ou da medula óssea

Um sistema adicional de estadiamento para MTCs foi proposto durante a Conferência Veterinária do Sul da Europa (SEVC), em Barcelona, em 2008. Nesse sistema, qualquer paciente com doença metastática ganglionar, independentemente do número e tamanho das formações, é classificado, como estágio IV (Tabela 4) (de Nardi *et al.*, 2022).

Tabela 4 - Sistema de Estadiamento Clínico para Mastocitomas Cutâneos Caninos proposto pela SEVC. Adaptado de de Nardi *et al.* (2022)

Estádio	Tumor	Linfonodo	Metástase
I	Nódulo único, < 3 cm, bem circunscrito.	-	-
II	Mais 1 nódulo, < 3 cm, distância intralesional > 10 cm, bem circunscrito.	-	-
III	1 ou mais nódulos, > 3 cm, distância intralesional < 10 cm, mal circunscrito ou ulcerado.	-	-
IV	Qualquer tipo de lesão.	+	-
V	Qualquer tipo de lesão.	+ ou -	+

I-V: nível de estágio, cm: centímetros, (<): menor, (>): maior, (+): positivo, (-): negativo

Horta *et al.* (2018) propuseram uma melhoria no sistema de estadiamento já estabelecido pela OMS, permitindo a classificação de cães com MTCs, com base no risco de recidiva e desenvolvimento de metástases. O estudo demonstrou que doentes com múltiplas lesões sem envolvimento de linfonodos regionais geralmente têm melhor prognóstico em comparação com aqueles com uma única lesão, mas com comprometimento linfonodal. Desta forma, no novo sistema de estadiamento proposto, a presença de metástase em um linfonodo regional classificaria o paciente como estágio III. O estágio IV seria caracterizado pela presença de formações extensas e infiltrativas ou múltiplas formações com comprometimento linfonodal, enquanto o estágio V na presença de metástases à distância (Tabela 5).

Tabela 5 - Sistema de Estadiamento Clínico para Mastocitomas Cutâneos Caninos proposto por Horta *et al.* (2018). Adaptado do Sistema da Organização Mundial da Saúde (OMS)

Estadio	Descrição
I	Tumor único, sem linfonodos regionais envolvidos
II	Tumores múltiplos (≥ 3), sem envolvimento de linfonodos regionais
III	Único tumor, com envolvimento dos linfonodos regionais
IV	Tumores de grandes dimensões e infiltrativos, sem delimitação, ou tumores múltiplos (≥ 3), com envolvimento dos linfonodos regionais
V	Qualquer tumor com metástase à distância, incluindo invasão da medula óssea e presença de mastócitos no sangue periférico.

($\geq$): maior ou igual

Dada a complexidade na implementação prática dos atuais sistemas de estadiamento propostos e considerando a variabilidade no comportamento biológico variável da doença, ainda não é possível padronizar um sistema único para MTCs da pele em cães. Curiosamente, outras características, como a raça e localização do tumor, são fatores de prognósticos negativos, bem estabelecidos na literatura e que ainda não são considerados nos atuais sistemas de estadiamento (Horta *et al.*, 2018; Stefanello *et al.*, 2015). Assim, torna-se necessário, novos estudos para validar o estadiamento já proposto ou mesmo propor novas adaptações (de Nardi *et al.*, 2022).

1.8. Prognóstico

A previsão de prognóstico para MTCs caninos é notavelmente variável, podendo ser influenciada por uma série de fatores, pois o comportamento biológico ou resposta ao tratamento em cães afetados por MTCs, não podem ser previstos com base exclusivamente num único fator. Por essa razão, é fundamental considerar o maior conjunto possível de parâmetros (Blackwood *et al.*, 2012; London & Thamm, 2020).

1.8.1. Fatores de Prognóstico

Em cães de faixa etária geriátrica, observa-se um aumento na incidência de tumores de alto grau histológico e uma redução no período livre de doença, estando normalmente associados a pior prognóstico (Mochizuki, Motsinger-Reif, Bettini, Moroff & Breen, 2017b).

Estudos recentes também procuraram correlacionar a predisposição da raça ao comportamento biológico de MTCs e sugeriram que cães de raça *Pug* e *Boxer* são mais propensos a tumores com comportamento menos agressivo, acrescentando que os *Pugs* têm uma predisposição para desenvolver múltiplos MTCCs. No entanto, os *Shar-Pei* tendem a desenvolver tumores mais agressivos, associados a pior prognóstico e numa idade mais juvenil (Mochizuki *et al.*, 2017b & Śmiech *et al.*, 2018).

Na avaliação do comportamento com base na localização, estudos sugerem que MTCs na cavidade oral, leito ungueal e regiões inguinal, perineal e prepucial tendem a ser mais agressivo e têm maior probabilidade de metastizar nos linfonodos (Elliott *et al.*, 2016; Turrel, Kitchell, Miller & Théon, 1988). A localização no escroto e no plano nasal está associada a uma maior propensão para graus mais elevados e ocorrência precoce de metástases (Horta *et al.*, 2018 & Śmiech *et al.*, 2018). No que diz respeito aos MTSCs, estes são localizados no tecido adiposo subcutâneo e exibem um comportamento biológico distinto dos MTCCs e têm um prognóstico mais favorável (Newman *et al.*, 2007 & Thompson *et al.*, 2011b). É fundamental considerar também a forma visceral, caracterizada pela infiltração nos linfonodos abdominais, fígado e baço, indicando envolvimento sistêmico na medula óssea. No entanto, estas apresentações são consideradas incomuns em cães (de Nardi *et al.*, 2022). Habitualmente MTCs viscerais ou no trato gastrointestinal têm um prognóstico muito reservado (Ozaki, Yamagami, Nomura & Narama, 2002; Takahashi *et al.*, 2000).

Os sinais clínicos que sugerem um comportamento agressivo de um MTC, e consequentemente, um pior prognóstico incluem crescimento rápido, inflamação ou irritação local, infiltração local ou pouca demarcação em relação aos tecidos adjacentes, ulceração, nódulos satélites, linfonodos regionais aumentados e sintomatologia paraneoplásica, tais como anorexia, vômitos, melena, eritema disseminado, edema ou ulceração gastrointestinal. Esses sinais estão, frequentemente, relacionados com as formas viscerais de MTCs (Mullins *et al.*, 2006), indicam a presença de tumores de grau histológico intermédio ou alto, indicando um pior prognóstico. Complicações relacionadas à hiperhistaminémia, como úlceras gastrointestinais e choque anafilático, podem ser fatais (Mullins *et al.*, 2006). A presença de lesões múltiplas, eritema, prurido local, ulceração tumoral e presença de sinais clínicos sistêmicos, são outros fatores também associados a pior prognóstico (Thamm, Weishaar, Charles & Ehrhart, 2020).

Segundo Mullins *et al.* (2006), MTCs que manifestam um rápido crescimento (superior a 1cm³ por semana) e excedem 3cm de diâmetro tumoral estão associados a um pior prognóstico, com tempo médio de sobrevida reduzido e uma taxa de recidiva elevada. Por outro lado, a presença de MTCs que permanecem localizados e se mantêm por longos períodos de tempo, que podem ser de meses ou anos, sem alterações significativas, são por norma de natureza benigna. Aqueles que persistem por mais de 7 meses apresentam um prognóstico mais favorável (Welle *et al.*, 2008).

O grau histológico é o fator de prognóstico mais consistente e confiável, desempenha um papel crucial na previsão do comportamento biológico das neoplasias, especialmente nos mastocitomas (London & Thamm, 2020; Patnaik *et al.*, 1984; Webster, Yuzbasiyan-Gurkan, Thamm, Hamilton & Kiupel, 2008). Embora alguns estudos tenham encontrado uma associação entre a classificação de Kiupel com maior valor prognóstico (Jaffe *et al.*, 2000; Stockham, Basel & Schmidt, 1986), ainda é recomendado o uso de ambos os sistemas de classificação (Cruz *et al.*, 2020). Apesar da associação entre as duas classificações histológicas, uma percentagem de MTCs ainda apresenta comportamento biológico imprevisível, independentemente da graduação (Horta *et al.*, 2018; Thamm *et al.*, 2020). Stefanello *et al.* (2015), destacaram a importância de avaliar o grau histológico em conjunto com outros fatores clínicos de prognóstico relevantes, como as dimensões do tumor, localização anatômica e presença de metástases. Segundo estes autores, é essencial que qualquer sistema de graduação histológica seja acompanhado por estadiamento clínico e avaliação prognóstica adicional.

Os principais locais de metastização dos MTCs incluem linfonodos, fígado, baço e medula óssea, sendo os linfonodos regionais geralmente os primeiros a serem afetados (Warland *et al.*, 2014). A detecção de metástases nos linfonodos está associada a um prognóstico reservado, no entanto, com um tratamento adequado, é possível observar melhorias significativas e, em alguns casos, alcançar tempos de sobrevida semelhantes aos de cães sem metástases (Dobson, Cohen & Gould, 2004; Hume *et al.*, 2011; Mendez *et al.*, 2020). Foi proposto por um estudo um sistema de classificação histológica para metástases nos linfonodos, com o intuito de padronizar a classificação da metastização nos linfonodos (Weishaar, Thamm, Worley & Kamstock, 2014). Linfonodos com mastócitos raros ou ausentes são interpretados como não metastáticos (HN0), com mais de três mastócitos individualizados são considerados linfonodos pré-metastáticos (HN1), no caso de conterem aglomerados de mastócitos são chamados de linfonodos com metástases precoces (HN2) e por último, quando os linfonodos

apresentam alterações na sua arquitetura por mastócitos em focos, camadas ou massas evidentes interpreta-se como metástases evidentes (HN3). Foi verificado também por Weishaar e colaboradores (2014) que classificações mais elevadas de metastização (HN2 e HN3) estão associadas a um prognóstico mais reservado.

Também se associa a prognóstico reservado, quando há recidiva local pós excisão cirúrgica. Por esse motivo, é essencial estabelecer um plano de tratamento adequando durante da primeira apresentação, de modo a evitar recidiva (Horta *et al.*, 2018; Mullins *et al.*, 2006).

1.8.2. Outros fatores de prognóstico - Marcadores de Proliferação Celular

Parâmetros de prognóstico como a localização, o tamanho e a aparência da neoplasia, bem como sua avaliação histológica, podem não fornecer informações suficientes para prever o comportamento biológico de um MTC ou a sua resposta a um tratamento específico. Dessa forma, a investigação de marcadores específicos de proliferação tem sido realizada para alcançar um prognóstico mais preciso (Vascellari *et al.*, 2013). A proliferação celular é um reflexo do número de células no ciclo celular (fração de crescimento) e da taxa à qual as células progridem ao longo do ciclo celular (taxa de proliferação) (Sledge *et al.*, 2016). A avaliação da proliferação celular é condicionada pelo número de células em mitose e pela velocidade de progressão do ciclo celular, sendo possível avaliá-la por meio de marcadores desses parâmetros. No caso de MTCs de grau intermédio, esses marcadores desempenham um papel crucial para obter um prognóstico mais preciso (Berlato *et al.*, 2015; Webster *et al.*, 2007).

O índice mitótico (IM) traduz-se pelo número de mitoses observadas por 10 campos óticos, numa ampliação de 400x (Blackwood *et al.*, 2012). Este fator de prognóstico é o marcador mais explorado sendo até um dado acrescido ao relatório histopatológico de muitos laboratórios; no entanto não reflete a fração do crescimento total (Blackwood *et al.*, 2012; Sledge *et al.*, 2016). Como índice de fase, as mitoses apenas diferenciam as células na fase M do ciclo celular. A avaliação independente da contagem mitótica pode levar a sobrestimação ou subestimação da fração total de crescimento (Sledge *et al.*, 2016). Apesar de não refletir a fração em crescimento total, o IM é de valor inquestionável no que toca ao prognóstico, especialmente por não necessitar de nenhuma metodologia adicional para ser avaliado além do exame das lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os limites «cut-offs» prognósticos para a contagem mitótica variam entre estudos, no entanto, um IM elevado tem sido consistentemente sugerido

como um indicador de prognóstico reservado (Kiupel *et al.*, 2011; Romansik, Reilly, Kass, Moore & London, 2007)

Um índice de fração de crescimento, como a proteína nuclear Ki-67, identifica células que estão em todas as fases do ciclo celular (Vascellari *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2007), exceto na fase de repouso (G0), mas não sugere a taxa na qual as células estão progredindo ao longo do ciclo celular (Sledge *et al.*, 2016). A expressão desta proteína está diretamente associada à capacidade proliferativa da neoplasia, podendo servir como fator de prognóstico independentemente do grau histológico. Desta forma, a identificação da presença de Ki-67 no núcleo é um indicador de proliferação celular (Webster *et al.*, 2007). Não há um valor de referência definido para a expressão de Ki-67; no entanto, diversos estudos evidenciam que uma expressão elevada dessa proteína está relacionada com a probabilidade de metastização, recidiva e morte (Vascellari *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2007).

As regiões organizadoras nucleolares (NORs, do inglês “*Nucleolar Organizer Regions*”) consistem em segmentos de DNA marcados seletivamente pela prata (Ag) e, por essa razão, denominadas AgNORs (do inglês do inglês “*Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions*”). O número médio de AgNOR por núcleo é correlacionado com a velocidade e proliferação celular, ou seja, a medição de AgNORs reflete a taxa relativa na qual as células progridem ao longo do ciclo celular, sendo este considerado um índice de taxa de proliferação celular (Blackwood *et al.*, 2012; Sledge *et al.*, 2016). Os mastocitomas com uma contagem baixa de AgNOR, por núcleo, exibem um comportamento biológico menos agressivo, enquanto que valores elevados de AgNOR por núcleo estão associados a um pior prognóstico, resultando num aumento da mortalidade, recidiva local e metástases (Sledge *et al.*, 2016; Webster *et al.*, 2007).

1.8.3. Padrão de expressão do KIT e mutações no *c-Kit*

A relação entre localização do recetor KIT e o prognóstico foi avaliada em diversos estudos. Kiupel e colaboradores (2004) propuseram três padrões de coloração imunohistoquímica: I) membranar, II) focal e III) difuso no citoplasma, tendo observado que a presença do padrão III se associava a um aumento da recidiva e da mortalidade, o que foi, mais tarde, confirmado por outro estudo (Webster *et al.*, 2008). No entanto, um estudo posterior revelou uma relação entre localizações aberrantes do recetor e a atividade proliferativa, mas

não estabeleceu ligação entre os padrões de marcação do recetor e a incidência de recidiva ou a mortalidade (Costa Casagrande *et al.*, 2015).

A presença de mutações no gene *c-Kit* está ligada a localizações anormais do recetor KIT, aumentando a incidência de recidiva, metástases e morte associada ao MTC (Downing, Chien, Kass, Moore & London, 2002; Webster *et al.*, 2006b).

A pesquisa de mutações no gene *c-Kit* por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”) foi descrita por diversos autores como um dos testes de prognóstico, especialmente em MTCs de grau II, na escala de Patnaik, tendo como objetivo orientar a decisão sobre a necessidade de quimioterapia, mesmo na ausência de metástases e com margens cirúrgicas sem comprometimento (Gil da Costa, 2015).

A presença de alterações no *c-Kit* desempenha um papel no desenvolvimento de MTCs. A existência de mutações no gene *c-Kit*, especialmente do tipo duplicações internas em *tandem* (ITDs) no exão 11, e alterações no padrão de expressão do KIT, são considerados, por alguns autores, como indicadores de pior prognóstico em MTCs caninos (Kiupel, 2017; Takeuchi *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2016; Webster *et al.*, 2006b; Zemke *et al.*, 2002). A detecção destas mutações, por meio de PCR, é essencial para a prevenção de recidivas e para a avaliação do risco de metastização (Webster *et al.*, 2006b; Zemke *et al.*, 2002).

Num estudo, foi observada uma associação entre a fosforilação do KIT a um pior prognóstico clínico tanto em MTCs com mutação no gene *c-Kit* como nos sem mutação (Thompson *et al.*, 2016).

As mutações mais comuns do gene *c-Kit* são as ITDs no exão 11 e ocorrem aproximadamente entre 10% a 46% dos MTCs cutâneos caninos (Downing *et al.*, 2002; Letard *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2006b; Zemke *et al.*, 2002). Sendo estas mutações mais observadas em MTCs de alto grau, estão associadas à redução do intervalo livre de doença e dos tempos de sobrevida e, também, associadas ao aumento do risco de recidiva local, metastização e mortalidade relacionada com os MTCs (Downing *et al.*, 2002; Letard *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2006b; Zemke *et al.*, 2002). No entanto, no estudo de Kiupel (2017), apenas 35% (30/86) dos MTCs cutâneos caninos com ITDs no exão 11 do *c-Kit* eram tumores de alto grau. Nesse mesmo estudo, cerca de 39% (19/49) dos cães com MTCs cutâneos e ITDs no exão 11 morreram em menos de 1 ano devido a doença associada ao MTC.

Letard *et al.* (2008) descreveram não apenas mutações ativadoras no exão 11 do *c-Kit*, mas também nos exões 8 e 9. Observaram que existem ITDs no exão 8 do *c-Kit* em menos de 5% (8/191) dos MTCs cutâneos. No estudo de Kiupel, (2017), apenas 9% (5/54) dos MTCs cutâneos caninos com ITDs no exão 8 eram tumores de alto grau e apenas 13% (5/40) dos cães com MTCs cutâneos e ITDs no exão 8, morreram com menos de 1 ano devido a doença associada ao MTC.

1.9. Objetivos

Sendo os mastocitomas as neoplasias malignas de pele mais comuns no cão, considerando a variabilidade do seu comportamento biológico e a inexistência, até à data, de um bom biomarcador de prognóstico e de escolha terapêutica, foram estabelecidos para o presente trabalho, os seguintes objetivos:

- Realização de um estudo descritivo e de frequência de mutações presentes nos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit*, numa coorte de 59 mastocitomas da pele do cão, e subsequente comparação entre mastocitomas cutâneos e subcutâneos.
- Avaliação do potencial prognóstico das mutações encontradas relacionando a sua presença com o tempo de sobrevida.

2. Material e Métodos

2.1. Descrição da população

No presente estudo foi realizada a pesquisa de mutações nos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit* em amostras parafinadas de mastocitomas caninos. As amostras incluídas neste estudo eram provenientes dos arquivos de blocos de parafina do laboratório de diagnóstico DNATech.

Foram incluídos no estudo todos os casos de mastocitomas caninos, cutâneos e subcutâneos, dos quais era conhecida informação sobre o desfecho clínico 2 anos após o diagnóstico. Para os mastocitomas cutâneos foram utilizadas as mesmas amostras do estudo de Casanova *et al.* (2021) (n=29); para os mastocitomas subcutâneos (n=30) foram utilizadas amostras com diagnóstico realizado entre 2019-2020. Foram selecionados casos em que os cães foram tratados, apenas, por extirpação cirúrgica, sem qualquer administração de quimioterapia ou radioterapia, e em que o diagnóstico foi feito, pelo menos, 2 anos antes do início do estudo ou, se após alguns meses, foi confirmada a morte relacionada ao tumor.

O trabalho prático foi realizado no LACH-FMV-ULusófona. Todas as amostras em estudo passaram por um processo de extração de DNA, utilizando um kit de extração específico para amostras histológicas parafinadas. O DNA isolado foi submetido a reação de PCR convencional com o objetivo de amplificar os exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit*. Posteriormente, os fragmentos de PCR amplificado, foram analisados para verificar a presença de mutações por eletroforese em gel de agarose e por sequenciação.

2.2. Extração de DNA de blocos de parafina

2.2.1. Reinclusão

Tendo em conta que as amostras parafinadas de mastocitomas incluem não só tecido tumoral, mas, também, tecido muscular dérmico, entre outros, e que o alvo do estudo era o tecido tumoral, procedeu-se à reinclusão das amostras com o intuito de obter um bloco de parafina apenas com tecido tumoral, para posterior realização de cortes histológicos:

1. Identificaram-se as cassetes de inclusão com a identificação das amostras iniciais.
2. Preparou-se o doseador de parafina, colocando no reservatório a parafina líquida.
3. Colocaram-se as amostras parafinadas em moldes.

4. Aplicou-se um pouco de parafina no fundo do molde antes de colocar a peça, para que esta se sustenha na posição correta para a boa execução do corte.
5. Confirmou-se que as amostras ficaram centradas dentro do molde e com a superfície de corte na horizontal.
6. Colocaram-se as cassetes sobre os moldes e preencheu-se com parafina.
7. Arrefeceram-se os blocos de parafina rapidamente numa placa fria de modo a evitar que se formem várias camadas distintas de parafina (o que pode dificultar o corte, em caso da sua ocorrência).
8. Após a parafina ter solidificado, retiraram-se bloco a bloco e colocaram-se no micrótomo para se proceder aos cortes.
9. Fixaram-se as cassetes com o bloco e procedeu-se ao desbaste da parafina que envolve a peça, descartando os primeiros cortes para minimizar a contaminação.
10. Os cortes a descartar tinham uma espessura de 4 μm , para diminuir a proximidade à peça e descartar contaminações.
11. Realizaram-se cortes com uma espessura de 10 μm e colocaram-se num microtubo de 2 mL estéril. Para cada amostra foram feitos, no mínimo, 4 cortes. Nas amostras em que a dimensão do tecido tumoral era reduzida, foram feitos até 10 cortes.

Para evitar contaminações com DNA exógeno e/ou contaminação cruzada com DNA das diferentes amostras processadas foram tomadas as seguintes medidas:

- 1) O processamento de cada bloco foi precedido por uma desinfecção com lixívia a 10%, do micrótomo e de todas as superfícies de trabalho;
- 2) Cada bloco foi cortado com uma lâmina nova.

2.2.2. Desparafinação

Os cortes das amostras em parafina foram submetidos a um protocolo de desparafinação, a fim de se obter apenas tecido celular tumoral, sem parafina agregada ao mesmo:

1. Adicionou-se 1 mL de xilol, homogeneizou-se no vórtex e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente (TA).
2. Fez-se uma centrifugação (centrifuga Galaxy, 14D, VWR® Radnor, PA, EUA) a 13.000 $\times g$, durante 5 minutos.
3. Decantou-se o sobrenadante.

4. Repetiram-se os passos 1, 2 e 3.
5. Adicionou-se 1 mL de etanol absoluto, homogeneizou-se e incubou-se 5 minutos à TA.
6. Centrifugou-se a 13.000 $\times g$, durante 5 minutos.
7. Decantou-se o sobrenadante.
8. Repetiram-se os passos 5, 6 e 7.
9. Adicionou-se 1 mL de Álcool a 70%, homogeneizou-se e incubou-se uns 5 minutos à TA.
10. Centrifugou-se a 13.000 $\times g$, durante 5 minutos.
11. Decantou-se o sobrenadante.
12. Num toalhete seco, secaram-se os resíduos de álcool. Deixou-se secar totalmente, incubando os tubos numa placa de aquecimento (Stuart Scientific Test Tube Heater SHT 2) a 65°C.

2.2.3. Isolamento de DNA genómico

As amostras já desparafinadas foram submetidas a extração de DNA com recurso ao Kit comercial “blackPREP FFPE DNA Kit” (analytik jena, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas. Por cada lote de 15 amostras, fez-se a extração de um controlo negativo para avaliar a ausência de contaminação cruzada durante o procedimento experimental.

1. Adicionaram-se 400 μL de *Lysis Solution MA* e 80 μL de proteinase K à amostra, misturou-se vigorosamente num vórtex por 10 segundos.
2. Incubaram-se os tubos a 65°C, durante 1 hora, num banho de água (VWR® – Avantor, Radnor, PA, EUA), agitando no vórtex a cada 10 minutos.
3. Em seguida, colocaram-se as amostras num banho de água a 90°C e incubaram-se, durante 1 hora, agitando no vórtex a cada 10 minutos.
4. Incubaram-se as amostras por 5 minutos à temperatura ambiente
5. Adicionaram-se 400 μL de etanol absoluto (100%) e misturou-se vigorosamente no vórtex por 10 segundos.
6. Efetuou-se um *short-spin* a 3.000 $\times g$, durante 1 minuto.
7. Aplicou-se a amostra num conjunto *Spin Filter* mais tubo recetor. Fechou-se a tampa e centrifugou-se a 13.000 $\times g$, durante 1 minuto.

8. Descartou-se o tubo recetor com o filtrado. Colocou-se a coluna *Spin Filter* num novo tubo recetor.
9. Adicionaram-se 500 µl de *Washing Solution C*, fechou-se a tampa e centrifugou-se à velocidade máxima (13.000 ×g), durante 1 minuto.
10. Descartou-se o tubo recetor com o filtrado. Colocou-se a coluna *Spin Filter* num novo tubo recetor.
11. Adicionaram-se 650 µL de *Washing Solution BS*, fechou-se a tampa e centrifugou-se à velocidade máxima (13.000 ×g), durante 1 minuto.
12. Descartou-se o tubo recetor com o filtrado. Colocou-se a coluna *Spin Filter* num novo tubo recetor.
13. Adicionaram-se 650 µL de etanol absoluto (100%), fechou-se a tampa e centrifugou-se à velocidade máxima (13.000 ×g), por 1 minuto.
14. Descartou-se o tubo recetor com o filtrado. Colocou-se a coluna *Spin Filter* num novo tubo recetor.
15. Centrifugou-se na velocidade máxima (13.000 ×g) por 3 minutos. Para remover todos os vestígios de etanol. Descartou-se o tubo recetor.
16. Colocou-se a coluna *Spin Filter* num microtubo de 1,5 mL e adicionaram-se 100 µL de água desionizada estéril. Incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugou-se à velocidade máxima (13.000 ×g), durante 1 minutos.

2.3. Amplificação por PCR

A reação de PCR é uma técnica que permite fazer a síntese de muitas cópias de uma região alvo de DNA específica, através da sucessão de vários ciclos de temperatura. Na reação de PCR, a primeira etapa implica a desnaturação do DNA, que acontece a 95°C, para que ocorra a quebra das ligações por pontes de hidrogénio, que mantêm as cadeias unidas (Clark & Pazdernik, 2009). Para obter a amplificação seletiva da região de interesse, é necessário que os *primers* se liguem por complementaridade às cadeias simples de DNA. Esse emparelhamento requer uma temperatura mais baixa, aproximadamente entre 50°C a 60°C, dependendo do tamanho e sequência dos *primers*. Assim, a cada ciclo, a etapa de desnaturação é seguida pela etapa de ligação dos *primers*, seguida pela extensão. Durante esta última etapa, a enzima DNA polimerase faz a síntese das novas cadeias de DNA, utilizando os *primers* como ponto de partida, adicionando à nova cadeia os desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's)

complementares à sequência alvo. Esta etapa acontece a uma temperatura de 72°C. Estas etapas, repetidas ao longo de diversos ciclos, resultam na amplificação de múltiplas cópias da região de interesse (Clark & Pazdernik, 2009; Nicholas, 2010).

A presença de mutações nos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit* nas amostras em estudo foi avaliada por PCR convencional, através da amplificação de fragmentos específicos de cada exão estudado.

Com recurso à ferramenta Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) foram desenhados os *primers* para a amplificação dos exões 8 e 9 do gene *c-Kit*.

Para a amplificação do exão 11 foram utilizados os *primers* PE1 e PE2 descritos por Jones *et al.* (2004).

Na tabela 6, encontram-se descritas as sequências de todos os *primers* e dimensões dos fragmentos amplificados.

Tabela 6 - Sequência de *primers* utilizados na amplificação dos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit* canino.

Exão	<i>Primers</i>	Sequências	Dimensão do fragmento amplificado	Referências
8	E8Fw	5'-GGA GCC TTG GTG AGG TGT TC-3'	220 pb	---
	E8Rev	3'-GTC CTT CCC TCG TGC ACA T-5'		
9	E9Fw	5'-CCA GGC TGT TAT TTT CTC TTC CC-3'	272 pb	---
	E9Rev	3'-GGC AGG CAG AGC CTA AAC AT-5'		
11	PE1	5'-CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG-3'	190 pb	(Jones et al., 2004)
	PE2	3'-GTT CCC TAA AGT CAT TGT TAC ACG-5'		

A amplificação de cada amostra foi realizada uma mistura reacional com um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL NZYTaq II 2x Green Master Mix (NZYTech®, Lisboa, Portugal), 0,7 µL de cada *primer*, *forward* e *reverse*, entre 5 a 7,5 µL DNA genómico e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para garantir a validação dos resultados positivos e negativos, em cada reação realizada, foram introduzidos um controlo positivo, contendo DNA de cão de uma amostra anteriormente amplificada com sucesso, e dois controlos negativos, contendo água desionizada estéril.

Para evitar contaminações com DNA exógeno, todos os equipamentos e consumíveis, utilizados na preparação das reações de PCR, como minicentrífuga, micropipetas, pontas, microtubos, suportes, entre outros, foram expostos a radiação ultravioleta (UV), durante 15 a 20 minutos, dentro de uma câmara usada exclusivamente para a preparação da mistura reacional. Antes da exposição à radiação UV, realizou-se a desinfecção com lixívia a 10% das superfícies de trabalho e dos materiais utilizados. A mistura reacional foi preparada dentro da câmara de PCR, onde não havia presença de material genómico. Foram utilizadas micropipetas e pontas de micropipetas estéreis com filtro, reservadas, apenas, para uso dentro da câmara. A adição do DNA à mistura reacional ocorreu numa outra bancada de trabalho, destinada para esse fim.

A amplificação do exão 11 decorreu de acordo com as condições descritas por Jones *et al.* (2004), indicadas na tabela 7.

Tabela 7 - Condições da reação de PCR para amplificação do exão 11 (Jones *et al.*, 2004).

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	3 min.	1
Desnaturação	95°C	30 seg.	39
Ligação dos <i>primers</i>	59°C	30 seg.	
Extensão	72°C	1 min.	
Extensão final	72°C	5 min.	1

2.3.1. Otimização da temperatura de ligação dos *primers* para amplificação dos exões 8 e 9

Para amplificar os exões 8 e 9, foi necessário otimizar as condições de reação, nomeadamente no que respeita à temperatura de ligação dos *primers*. Para tal, foi realizada, num termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), uma reação de PCR com gradiente de temperatura de ligação dos *primers*. Neste gradiente foram testadas cinco temperaturas diferentes, num intervalo compreendido entre 56,3°C e 61°C. As condições de amplificação dos exões 8 e 9, após esta otimização, encontram-se descritas na tabela 8.

Tabela 8 - Condições da reação de PCR para amplificação dos exões 8 e 9.

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	3 min.	1
Desnaturação	95°C	30 seg.	39
Ligação dos <i>primers</i>	61°C	30 seg.	
Extensão	72°C	1 min.	
Extensão final	72°C	5 min.	1

2.4. Eletroforese em gel de agarose

Para a observação dos produtos de PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2,5% (m/v), no caso do exão 11, e a 1,5% (m/v) para os exões 8 e 9.

A observação do resultado da migração do DNA no gel, foi feita num transiluminador, por emissão de fluorescência do GelRed[®] intercalado no DNA.

2.4.1. Preparação do gel de agarose

1. Preparou-se o suporte do gel, tapando as extremidades do suporte e colocaram-se os pentes, para criar os poços no gel de agarose.
2. Preparou-se o gel de agarose para o volume pretendido, medindo numa balança técnica (EK-600H, AND[®]) a massa de agarose necessária.
3. Num *erlenmeyer*, adicionou-se à agarose, o volume necessário de tampão de eletroforese TBE 1×.
4. Levou-se ao microondas (700 watts), a solução preparada em 3, o tempo necessário até ocorrer a fusão da agarose (obtenção de uma solução homogênea e translúcida).
5. Arrefeceu-se um pouco o *erlenmeyer* em água corrente.
6. Adicionou-se GelRed[®] Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, CA) ao conteúdo do *erlenmeyer*, na proporção de 0,42 µL por 100 µL de gel, e agitou-se para homogeneizar.
7. Transferiu-se a solução de agarose para o suporte e esperou-se pela sua polimerização.

8. Colocou-se o gel na tina de eletroforese, assegurando que ficasse completamente submerso no tampão (TBE 1×).
9. Aplicaram-se 7 µL de marcador de peso molecular (Hypperladder 100bp, Bioline®) no primeiro poço e 10 µL (exões 8 e 9) ou 15 µL (exão 11) de produto de PCR nos poços seguintes.
10. Colocou-se a tampa na tina de eletroforese, ligou-se a fonte de alimentação e realizou-se a eletroforese a 100 V (exões 8 e 9) ou 70 V (exão 11), durante 90 a 120 minutos.
11. Observaram-se os resultados, colocando o gel sobre um transiluminador (AlfaGene®, Carcavelos, Portugal) e registou-se o resultado em fotografia.

2.5. Purificação das amostras de DNA e Sequenciação

A sequenciação pelo método de Sanger é uma técnica que permite obter a sequência de nucleótidos de fragmentos amplificados por PCR (Clark & Pazdernik, 2009). Antes de realizar a sequenciação dos produtos gerados pelo PCR, é necessário efetuar a sua purificação prévia para eliminar os componentes residuais da reação de PCR (*primers*, DNA polimerase, sais e dNTP's) que podem afetar o sucesso do processo de sequenciação (Bell, 2008).

2.5.1. Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos de amplificação dos exões 8 e 9 foram purificados utilizando o “Jetquick – PCR Product Purification Spin Kit/50” (Genomed® GmbH, Bad Oeynhausen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

1. Adicionaram-se 4 volumes de *Binding Buffer* (H1) a 1 volume de amostra de PCR. Misturou-se bem.
2. Colocou-se uma coluna *JetQuick® Spin Column* num tubo recetor de 2 mL e pipetou-se toda a amostra preparada em 1, para o conjunto coluna + tubo recetor. Centrifugou-se numa centrífuga (Galaxy, 14D, VWR® Radnor, PA, EUA) a 13.000 ×g, durante 1 minuto.
3. Descartou-se o tubo recetor com o filtrado, reinseriu-se a coluna num novo tubo recetor e adicionaram-se 500 µL de *Wash Buffer* (H2). Centrifugou-se a 13.000 ×g, durante 1 minuto.

4. Descartou-se o tubo com o filtrado e colocou-se a coluna no mesmo tubo recetor de 2 mL. Centrifugou-se a $13.000 \times g$, durante 1 minuto.
5. Colocou-se a coluna num novo microtubo de 1.5 mL estéril. Adicionaram-se 50 μ L de água estéril, e centrifugou-se a $13.000 \times g$, durante 2 minutos.
6. O tubo de eluição contém o produto de PCR purificado para ser submetido a sequenciação.

2.5.2. Purificação dos produtos de PCR a partir de Gel de agarose

No caso dos produtos de amplificação do exão 11, em que foi identificada a presença de mutação, pela observação de uma banda de amplificação adicional, esta foi excisada do gel, com recurso a uma lâmina de bisturi. De seguida, a banda excisada, foi submetida a um protocolo de purificação, com recurso ao kit NZYGelpure (NZYTech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante:

1. Pesou-se a fatia de gel e transferiu-se para um microtubo de 1,5 mL.
2. Adicionaram-se 500 μ L de *Binding Buffer* por cada 100 mg de massa de gel.
3. Incubou-se a 55-60°C, durante 5-10 minutos e agitou-se ocasionalmente até que a agarose estar completamente dissolvida.
4. Adicionou-se 1 volume de gel de isopropanol à amostra e misturou-se bem pipetando várias vezes.
5. Aplicou-se a mistura acima na coluna colocada num tubo coletor. Centrifugou-se a $13.000 \times g$, durante 1 minuto e descartou-se o filtrado que ficou no tubo coletor.
6. Adicionaram-se 500 μ L de *Wash Buffer* e centrifugou-se a $13000 \times g$, durante 1 minuto. Descartou-se o filtrado do tubo coletor.
7. Adicionaram-se 600 μ L de *Wash Buffer* e centrifugou-se a $13000 \times g$, durante 1 minuto. Descartou-se o filtrado do tubo coletor.
8. Centrifugou-se a $13.000 \times g$, por 1 minuto para secar o etanol residual na membrana da coluna.
9. Colocou-se a coluna num microtubo de 1,5 mL estéril. Adicionaram-se 50 μ L de tampão de eluição ao centro da coluna e incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugou-se a $13.000 \times g$, durante 1 minuto, para eluir o DNA.

Foram submetidos a sequenciação pelo método de Sanger, todos os produtos de amplificação dos exões 8 e 9. Os produtos de amplificação do exão 8 foram todos sequenciados em ambos os sentidos (cadeias paralela e antiparalela). Os produtos de amplificação do exão 9 foram sequenciados, apenas, num sentido. Foram, ainda, submetidos a sequenciação, os produtos de PCR do exão 11 da banda do gel correspondente à presença da mutação. A sequenciação dos produtos de PCR purificados foi realizada na empresa STABVida®.

Os resultados recebidos, representados por cromatogramas, foram visualizados com recurso ao programa FinchTV (Geospiza®). As sequências obtidas foram submetidas a alinhamento para obtenção das sequências consenso, com recurso ao programa Unipro® UGENE. Para cada amostra, com o objetivo de identificar a presença de eventuais mutações foi avaliada, com recurso ao programa MultiAlin (Corpet, 1988), a homologia entre a sequência consenso e a sequência de referência do gene *c-Kit* (*wild type*) depositada na base de dados Ensembl (Martin *et al.*, 2023) (gene ENSCAFG00845011904; transcrito ENSCAFT00845021185.1).

2.6. Análise Estatística

No exão 11, para averiguar a associação entre as variáveis desfecho clínico e presença/ausência de mutação no exão 11 foi realizado o teste de Chi-quadrado. Foram obtidas as curvas de sobrevivência para as mesmas variáveis e foi realizado o teste de Log Rank (Mantel-Cox) para comparações globais. Foi considerado um nível de significância de 0,05 em todos os testes realizados.

Para os exões 8 e 9 não foram realizados testes estatísticos, devido à reduzida dimensão da amostra, uma vez que, para cada um deles, apenas foram encontradas mutações não sinónimas em duas amostras.

3. Resultados

3.1. Caracterização da população estudada

Para este estudo, a população amostrada era constituída por um total de 59 amostras de biópsias de MTCs caninos em blocos de parafina, dos quais, 49,15% (29/59) eram MTCCs e os restantes, 50,85% (30/59), MTSCs (Figura 3).

Relativamente ao número de total de cães em estudo, contabilizaram um total de 57, uma vez que duas amostras cutâneas pertenciam ao mesmo indivíduo, mas eram de nódulos diferentes. Em relação ao sexo, 49,12% (28/57) das amostras pertenciam a machos e 50,88% (29/57) pertenciam a fêmeas (Figura 4).

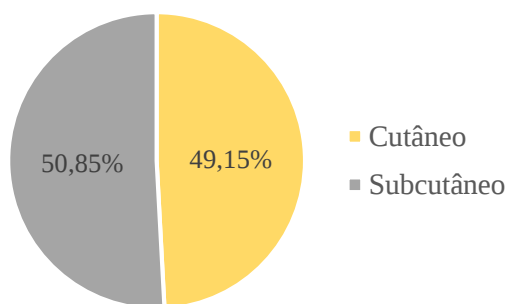


Figura 3 - Distribuição da amostra populacional pela localização tecidual.

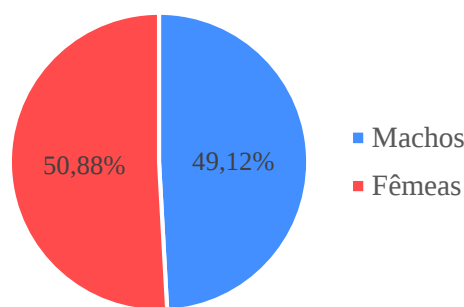


Figura 4 - Distribuição da amostra populacional por sexo.

O intervalo de idades da amostra populacional está compreendido entre 2 e 20 anos, verificando-se que 17,54% (10/57) dos cães tinham 9 anos, sendo esta a idade mais frequente (Figura 5). A média de idades dos animais foi feita com o total de 50 cães, pois 7 no total de 57 tinham idade desconhecida, o valor para a média de idades foi de 8,4 anos.

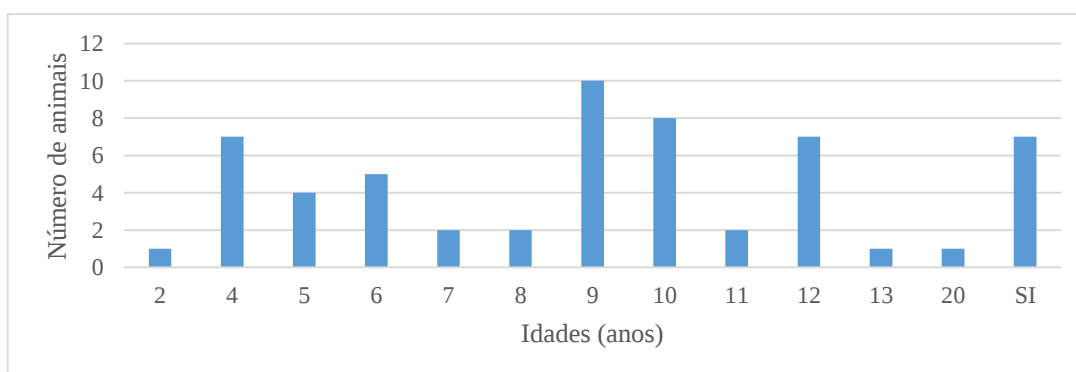


Figura 5 - Distribuição da amostra relativamente à faixa etária dos cães presentes no estudo.

Em relação à distribuição de raças, 31,58% (18/57) não tinham raça definida (SRD), *Labrador Retriever* eram 21,05% (12/57), *Bulldog* Francês eram 7,02% (4/57), *Boxer* e *Bouvier Bernois* estavam representados com 5,26% cada (3/57), *Golden Retriever* e *Shar-Pei* ambos com 3,51% (2/57) cada e as restantes raças como *Beagle*, *Basset hound*, *Bull Terrier*, *Bulldog*, *Caniche*, *Chihuahua*, *Pastor Alemão*, *Pincher*, *Pug*, *Cão da Serra de Aires*, *Weimaraner* e *Yorkshire Terrier* com 1,75% (1/57) cada.

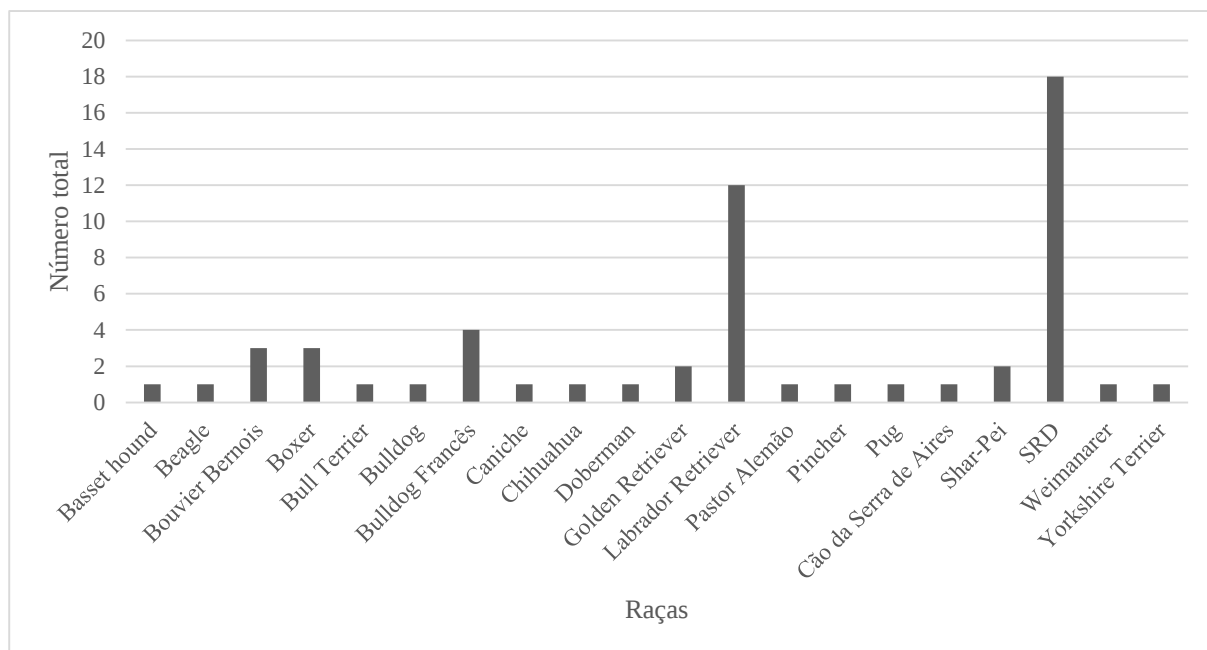


Figura 6 - Distribuição da amostra populacional de acordo com as raças dos cães em estudo.

3.2. Otimização da temperatura de ligação dos *primers* amplificados dos exões 8 e 9

A análise dos produtos de amplificação dos exões 8 e 9, obtidos na PCR de otimização da temperatura de ligação dos *primers*, permitiu concluir que a temperatura ótima seria 61°C, pois, em ambos os exões, as bandas observadas no gel eram as mais intensas, tendo havido boa amplificação das amostras testadas. A esta temperatura, a reação de PCR apresentava rendimento superior, resultando em bandas de maior intensidade (Figura 7). Conforme esperado, os produtos de amplificação dos exões 8 e 9 apresentavam um tamanho de 220 e 272 pb, respetivamente. Não foi observada nenhuma amplificação nos controlos negativos (Figura 7).

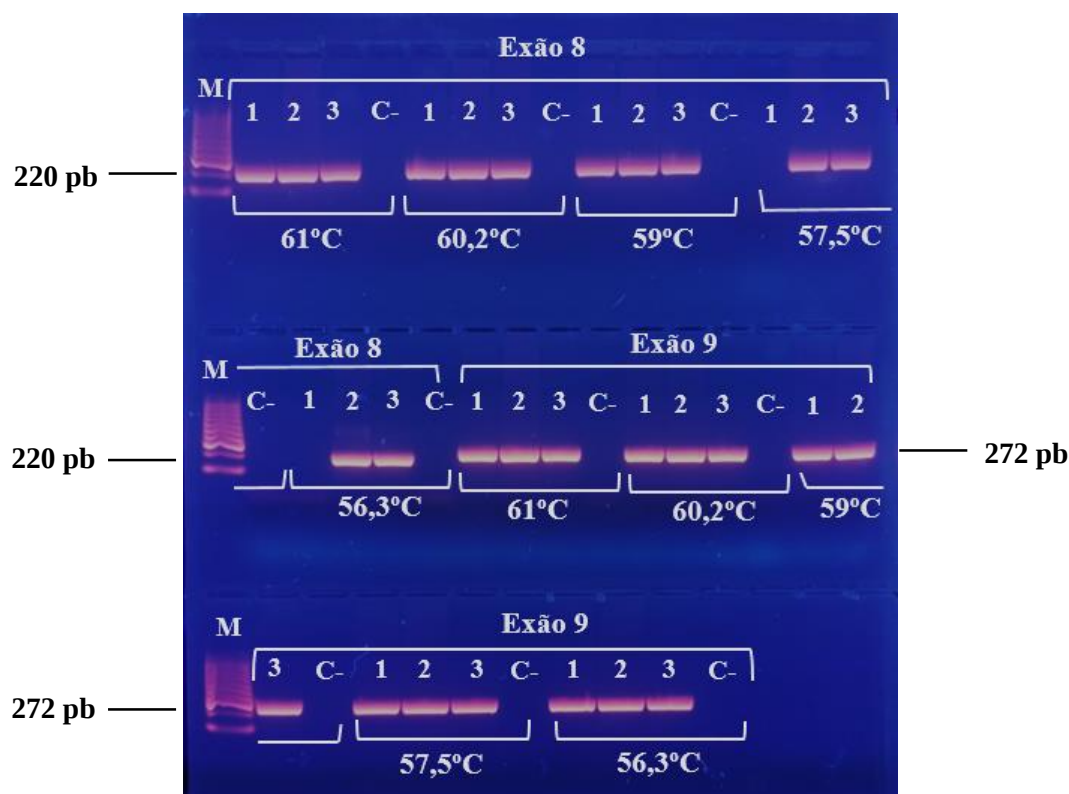


Figura 7 - Resultados da amplificação de otimização de temperatura de ligação dos *primers* para os exões 8 e 9, observados em eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v). M: Marcador de pesos moleculares (Hyperladder 100 bp, Bioline). 1, 2 e 3: produtos de PCR de amostras de DNA. C-: Controlo negativo. Fotografia original do autor.

3.3. Amplificação dos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit*

Após a otimização da temperatura de ligação dos *primers* para amplificação dos exões 8 e 9, procedeu-se à amplificação de todos os exões nas amostras em estudo.

Em todas as amostras, a amplificação dos exões 8, 9 e 11 foi bem sucedida, observando-se uma única banda, correspondendo a um produto de amplificação de 220 pb, 272 pb e 190 pb, respetivamente. Não se observou a presença de bandas inespecíficas. Não foram observadas bandas de amplificação nos controlos negativos da reação de PCR, nem nos controlos negativos da extração de DNA (*vide* 2.2.3).

Na amplificação do exão 11, o fragmento amplificado na ausência de mutação (*wild type*) apresenta um tamanho de 190 pb. Em 4 amostras, foi observada a presença de uma banda adicional, de dimensões superiores a 190 pb (Figura 8). A presença desta banda adicional é compatível com a existência da mutação ITD, descrita por vários autores (Jones *et al.*, 2004; Tamlin, Dobson, Woolford & Peaston, 2019).

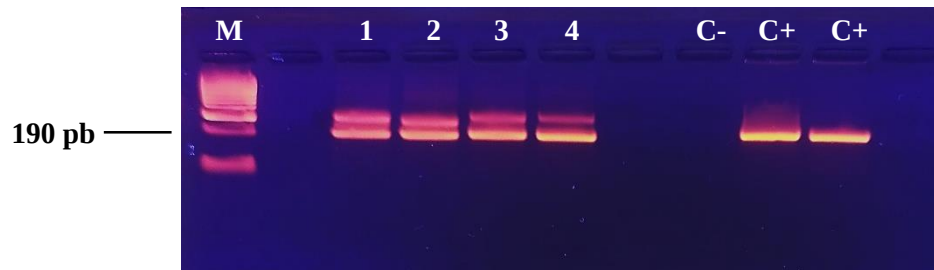


Figura 8 – Visualização dos produtos de amplificação do exão 11 em amostras de MTCs. M: Marcador de pesos moleculares (Hyperladder 100 bp, Bioline). 1-4: Produtos de PCR de amostras com a mutação ITD. C-: Controlo negativo. C+: Controlo positivo. Fotografia original do autor

A confirmação do tipo de mutação, será feita por sequenciação da banda adicional excisada do gel.

3.4. Sequenciação dos exões 8, 9 e 11 amplificados

Os resultados da sequenciação dos produtos de amplificação do exão 8 evidenciaram a presença de mutações em duas (6,9%; 2/29) amostras de MTCCs (Apêndice I). Numa das amostras (1256/17), foi observada uma inserção de dois nucleótidos (GC) no resíduo 1242 do cDNA (c.1242_1243insGC) e uma mutação pontual c.1346T>C (Figura 9); esta última resulta numa alteração de aminoácido no codão 449 (Ala449Val).

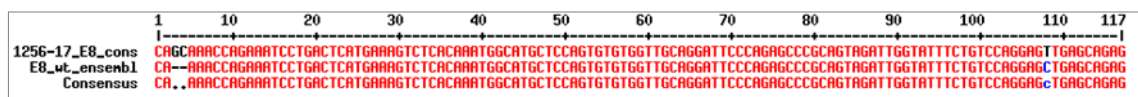


Figura 9 - Alinhamento da sequência do exão 8 da amostra 1256/17 com a sequência de referência *wild type* (ensembl), onde se podem observar as alterações c.1242_1243insGC e c.1346T>C.

Na amostra 2782/17 foram identificadas duas mutações pontuais consecutivas: c.1242T>A e c.1243G>A; a primeira resulta numa mutação sinónima e a segunda na alteração de aminoácido no codão 415 (Lys415Glu) (Figura 10).

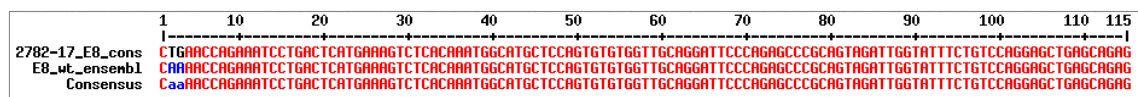


Figura 10 - Alinhamento da sequência do exão 8 da amostra 2782/17 com a sequência de referência *wild type* (ensembl), onde se podem observar as alterações c.1242T>A e c.1243G>A.

Em 75,8% (22/29) dos MTCCs foi identificado polimorfismo sinónimo c.1275G>A, anteriormente descrito por outros autores (Letard *et al.*, 2008; Marconato *et al.*, 2014). Esta alteração encontra-se descrita na plataforma Ensembl, com a identificação rs22299980.

Não foram observadas mutações no exão 8 nos MTSCs, com exceção do polimorfismo sinónimo c.1275G>A, encontrado em 66,7% (20/30) das amostras.

Relativamente ao exão 9, três amostras foram sequenciadas e ambos os sentidos, tendo, nas restantes, sido sequenciada, apenas, a cadeia *forward*. No caso destas últimas amostras, a sequenciação não permitiu sequenciar todo o exão, tendo sido conseguidas percentagens de sequenciação entre 81,4% e 88,7% da totalidade do exão. Os resultados da sequenciação do exão 9 permitiram identificar três amostras com mutação na sequência de bases nucleotídicas (5,1%; 3/59). Duas dessas três amostras eram MTCCs e uma um MTSC. A primeira dessas amostras (1105/20C), um MTSC, apresentava uma mutação sinónima c.1434A>G (Figura 11).

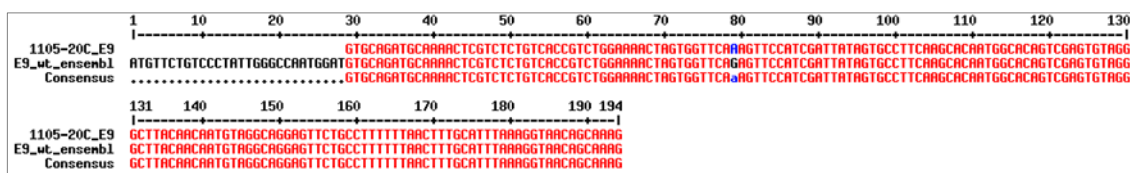


Figura 11 - Alinhamento da sequência do exão 9 da amostra 1105/20C com a sequência de referência *wild type* (ensembl), onde se pode observar a alteração c.1434A>G.

A amostra 1191/17A, um mastocitoma cutâneo, apresentava a mutação c.1472T>C (Figura 12), responsável pela alteração do aminoácido 491 (Thr491Ile).

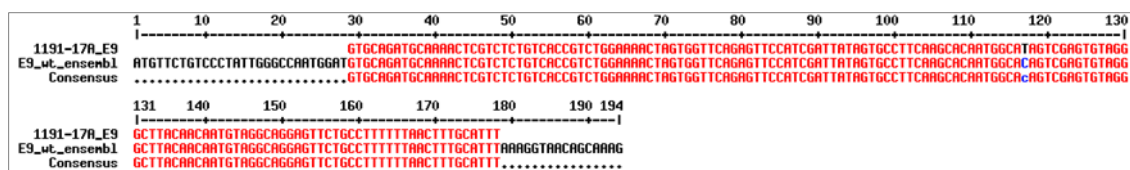


Figura 12 - Alinhamento da sequência do exão 9 da amostra 1191/17A com a sequência de referência *wild type* (ensembl), onde se pode observar a alteração c.1472T>C.

A amostra 1256/17, um mastocitoma cutâneo, apresentava a mutação c.1408C>T (Figura 13), responsável pela alteração do aminoácido 470 (Ser470Pro).

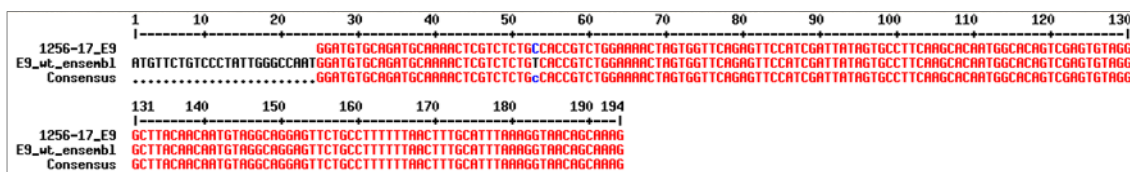


Figura 13 - Alinhamento da sequência do exão 9 da amostra 1256/17 com a sequência de referência *wild type* (ensembl), onde se pode observar a alteração c.1408C>T.

Encontra-se em curso a sequenciação da cadeia *reverse* dos fragmentos de amplificação do exão 9, de forma a completar a sequência da porção do exão cuja sequência não foi possível obter com a sequenciação da cadeia *forward*.

Para o exão 11, o resultado da sequenciação da banda adicional, excisada do gel de agarose, não permitiu obter sequências de qualidade que permitissem identificar a mutação ITD presente em cada uma das amostras. Assim, no presente trabalho, apenas nos é possível descrever a presença de mutação no exão 11 em quatro amostras de MTCs (6,8%; 4/59), três deles classificados como cutâneos (10,3%; 3/29) e um como subcutâneo (3,3%; 1/30). A identificação das mutações será feita, posteriormente, por Sequenciação de Nova Geração (NGS, do inglês “*Next-Generation Sequencing*”).

No total, foram observadas mutações em seis MTCCs (20,7%) e em um MTSC (3,3%). Os MTCCs foram, assim, os que apresentaram maior frequência de mutações nos exões estudados. De todas as amostras, apenas uma apresentava mutação em mais do que um exão; esta amostra (1256/17) correspondia a um MTCC e apresentava duas mutações não sinónimas e uma sinónima no exão 8 e uma mutação não sinónima no exão 9. Na tabela 9, são apresentadas as frequências relativas das mutações não sinónimas observadas nos MTCCs e subcutâneos analisados no presente estudo.

Tabela 9 - Frequência das mutações não sinónimas identificadas nas amostras em estudo.

	Frequência absoluta e relativa de mutações não sinónimas		
	Exão 8	Exão 9	Exão 11
Mastocitomas cutâneos (n=29)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	3 (10,3%)
Mastocitomas subcutâneos (n=30)	0	0	1 (3,3%)

3.5. Desfecho clínico e análise estatística

De entre os 27 animais com MTCCs, 22 (81,5%) encontravam-se vivos dois anos após o diagnóstico, tendo os restantes 5 (18,5%) morrido de causa relacionada com o tumor. Dos 30 animais com MTSCs, 20 (66,7%) encontravam-se vivos dois anos após o diagnóstico, tendo os restantes 10 (33,3%) morrido de causa relacionada com o tumor (tabela 10).

Tabela 10 - Desfecho clínico dois anos após o diagnóstico.

	Animais vivos	Animais com morte relacionada com MTC
Animais com mastocitomas cutâneos (n=27)	22 (81,5%)	5 (18,5%)
Animais com mastocitomas subcutâneos (n=30)	20 (66,7%)	10 (33,3%)

Dos cinco animais que morreram devido ao MTCC, apenas um apresentava mutação (ITD no exão 11). De entre os 22 animais vivos e com MTCC, cinco apresentavam mutação não sinónimas em, pelo menos, um dos exões estudados.

Relativamente aos MTSCs, de entre os 20 animais vivos, um apresentava mutação ITD no exão 11; dos 10 animais que morreram devido ao MTC, nenhum apresentava mutação não sinónima nos exões estudados (tabela 11).

Tabela 11 - Frequência de mutações não sinónimas em função do desfecho clínico

	Animais com mutações não sinónimas	
	MTC cutâneos	MTC subcutâneos
Animais vivos	5/22 (22,7%)	1/20 (5,0%)
Animais com morte relacionada com MTC	1/5 (20,0%)	0/10 (0%)

Todos os animais que apresentavam mutações nos exões 8 e 9 encontravam-se vivos dois anos após o diagnóstico. Dos quatro animais com mutação no exão 11, três (75%) encontravam-se vivos dois anos após o diagnóstico e um (25%) morreu 2 meses após o diagnóstico, tendo a sua morte sido relacionada com o tumor; este mastocitoma estava

classificado como cutâneo. Considerando a totalidade dos animais com mutação em pelo menos, um dos exões estudados, 85,7% (6/7) encontravam-se vivos ao fim de dois anos, tendo apenas um (14,3%) morrido de causas relacionadas com o tumor.

Após a análise estatística, nenhum resultado foi considerado como significativo ($p > 0,05$).

A curva de sobrevivência dos animais com e sem mutação no exão 11 encontra-se representada na figura 14.

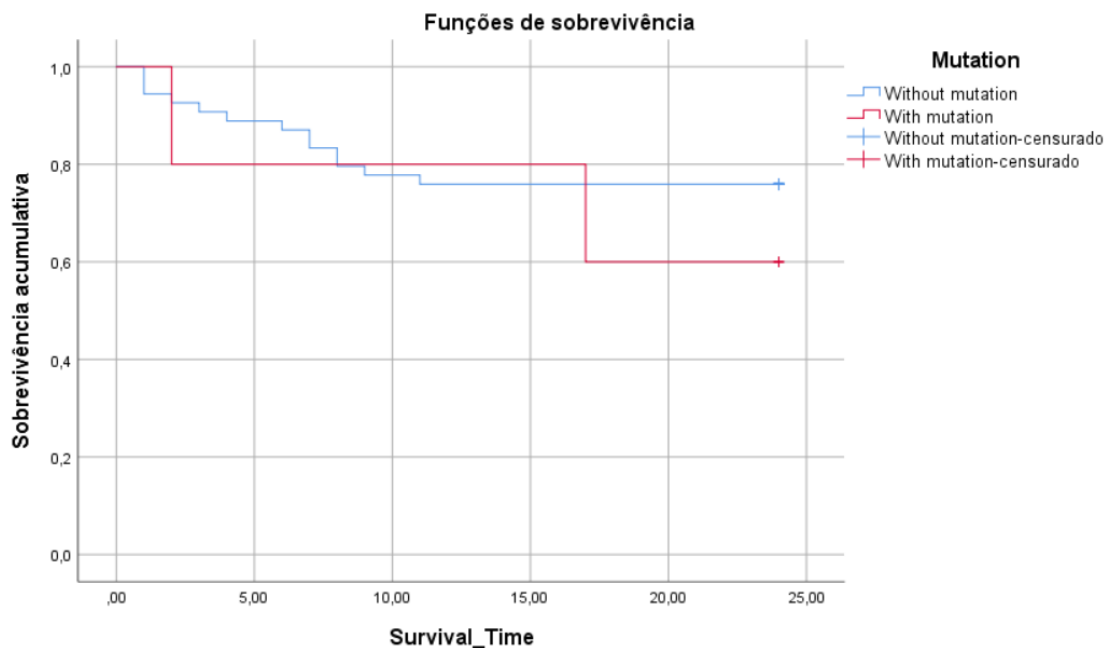


Figura 14 - Curva de sobrevivência dos animais com e sem mutação no exão 11. A cruz no final de cada curva significa a ausência de informação sobre o desfecho clínico após os 24 meses.

4. Discussão

Os MTCs são neoplasias cutâneas malignas frequentes em cães (Hauck, 2013; London & Thamm, 2020). A particularidade desta neoplasia reside na multiplicação descontrolada e na acumulação anormal de mastócitos, os quais exibem variações nos seus níveis de diferenciação celular (Blackwood *et al.*, 2012). Estas, são neoplasias malignas das células redondas, que surgem, maioritariamente na pele (Takahashi *et al.*, 2000). Devido à sua prevalência e diversidade de comportamento biológico, é crucial definir um prognóstico preciso. Em MTCs caninos, mutações no gene *c-Kit* e alterações na expressão da proteína recetora KIT são reconhecidas como indicadores negativos de prognóstico. Em particular, mutações ativadoras nos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit*, são comuns e têm sido descritas como fortes preditores de um mau prognóstico (Horta *et al.*, 2018; de Nardi *et al.*, 2022).

No âmbito do presente trabalho, foram estudadas 59 amostras de MTCs, 29 cutâneos e 30 subcutâneos (Figura 3). Em relação ao sexo dos animais estudados, existe um equilíbrio no número de macho e fêmeas, 49,12% (28/57) e 50,88% (29/57) respetivamente (Figura 4). Assim, com esta amostra, não foi possível estabelecer uma relação direta entre o sexo e a predisposição para o desenvolvimento de MTCs, sendo necessário o desenvolvimento de mais estudos para uma melhor compreensão sobre a possível relação que as hormonas sexuais possam no aparecimento de MTCs. Também Shoop *et al.* (2015), no Reino Unido, num estudo com 453 cães com MTC, não encontraram relação entre o sexo e o desenvolvimento da neoplasia. Śmiech *et al.* (2018), na Polónia, com uma amostra de 492 cães, observaram um risco mais elevado de desenvolvimento de MTCs em fêmeas (*Odds ratio* 1,38, $p=0,001$). Atualmente, os resultados apresentados na literatura sobre uma predisposição de sexo para o desenvolvimento de MTCs não consensuais, sendo necessário desenvolver mais estudos no sentido de clarificar uma eventual associação entre as hormonas sexuais e o desenvolvimento desta neoplasia (Kiupel, 2017; Shoop *et al.*, 2015; Śmiech *et al.*, 2018; Thamm, 2013 & White *et al.*, 2011).

No que respeita à faixa etária, foi observada conformidade com o que está descrito na literatura, indicando que o desenvolvimento de MTCs pode manifestar-se em qualquer idade (Kiupel & Camus, 2019; Śmiech *et al.*, 2018 & Tamlin *et al.*, 2022). A amostra populacional deste estudo abrange uma faixa etária entre 2 e 20 anos, com maior frequência de cães com idades entre 9 e 20 anos (Figura 5). Na população estudada 58% (29/50) dos animais tinha 9 ou mais anos, evidenciando uma predisposição mais acentuada ao desenvolvimento de MTCs em

cães considerados seniores. Vários autores descreveram, também, uma maior prevalência de mastocitomas em cães idosos (Kiupel & Camus, 2019; Śmiech *et al.*, 2018 & Tamlin *et al.*, 2022).

Conforme descrito por Warland & Dobson (2013), que observaram uma elevada ocorrência de MTCs em cães SRD, o mesmo aconteceu no presente estudo, uma vez que, 31,58% (18/57) dos animais não apresentava raça definida (Figura 6). De seguida, as raças mais prevalentes na amostra estudada são *Labrador Retriever* com 21,05% (12/57), *Bulldog* Francês com 7,02% (4/57), *Boxer* e *Bouvier Bernois* ambos com 5,26% cada (3/57) (Figura 6). Com exceção da raça *Bouvier Bernois*, as restantes são, também, descritas na literatura, como das mais propensas a desenvolver MTCs (Mochizuki *et al.*, 2017b; Morris & Dobson, 2008; Shoop *et al.*, 2015; Śmiech *et al.*, 2018 & Tamlin *et al.*, 2022).

Mutações ativadoras no domínio transmembranar do proto-oncogene *c-Kit* foram, inicialmente, associadas à progressão de MTCs caninos por London e colaboradores (1999). Desde então, diversos autores têm descrito mutações em vários exões do gene *c-Kit*, com principal destaque para os exões 8, 9 e 11 (Brocks *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022; Downing *et al.*, 2002; Letard *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 2013; Tamlin *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2011b; Vozdova *et al.*, 2019; Webster *et al.*, 2006; Zemke *et al.*, 2002). Em Portugal, pouco se sabe sobre a prevalência das mutações nestes exões do gene *c-Kit*, tendo esta lacuna no conhecimento justificado a realização do presente trabalho. No estudo aqui apresentado, foram identificadas mutações nos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit*. As mutações foram encontradas, predominantemente, em MTCCs (20,7%), nos três exões estudados. Apenas foi identificado um caso de MTSCs (3,3%) que apresentava mutação no exão 11; não foi identificada nenhuma mutação nos exões 8 e 9 dos MTSCs analisados (Tabela 9). Estes resultados vão ao encontro do descrito na literatura onde mutações nos exões 8, 9 e 11 têm sido descritas em MTCCs em frequências até 45% e onde são pouco frequentes as descrições de mutações identificadas em MTSCs (Brocks *et al.*, 2020; Downing *et al.*, 2002; Letard *et al.*, 2008; London *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2013; Tamlin *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2006; Zemke *et al.*, 2002). Apenas três autores descreveram mutações nos exões 8 e 11 de MTSCs (Chen *et al.*, 2022; Tamlin *et al.*, 2019; Vozdova *et al.*, 2020). O presente trabalho contribui, assim, com mais uma descrição de uma mutação no exão 11 de *c-Kit* em MTSCs.

O domínio justamembranar do recetor KIT é codificado pelo exão 11 e desempenha um papel crucial na autoinibição desta proteína fazendo com que, na ausência do ligando SCF,

a sua atividade se encontre inibida (Chan, Ilangumaran, la Rose, Chakrabartty, & Rottapel, 2003). Diversos autores têm associado as mutações no exão 11 do gene *c-Kit* a tumores com um comportamento mais agressivo e a um pior prognóstico, uma vez que estas resultam na diminuição da inibição do domínio quinase e, conseqüentemente, no aumento da transdução de sinal e na proliferação de mastócitos (Brocks *et al.*, 2021; Tamlin *et al.*, 2019; Webster *et al.*, 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho, apesar de não apresentarem significância estatística, não evidenciam esta associação, uma vez que, dos quatro cães com MTCs e mutação no exão 11, apenas um tinha morrido de causas relacionadas com o tumor dois meses após o diagnóstico. Os restantes três animais encontravam-se vivos dois anos após o diagnóstico. A análise estatística, embora limitada pelo reduzido número de amostras com mutação, não revelou nenhuma associação estatisticamente significativa entre a presença de mutação no exão 11 e o desfecho clínico (Figura 14). Também Tamlin e colaboradores (2022) descrevem que cães com mutação ITD no exão 11 não apresentavam risco aumentado de morte relacionada com o tumor. Chen e colaboradores (2022), ao estudarem mutações no exão 11, observaram em MTSCs um comportamento menos agressivo do que nos cutâneos. No presente estudo, dos quatro cães com mutação no exão 11 o único que não se encontrava vivo passados dois anos do diagnóstico tinha um MTCCs. Contudo, o alcance de qualquer associação que pudesse ser feito a este respeito é limitado pelo pequeno número de amostras que apresentavam mutação neste exão.

Alguns autores descrevem uma frequência de mutações no exão 11 muito superior à da dos restantes exões (Brocks *et al.*, 2022; Letard *et al.*, 2008; Vozdova *et al.*, 2019; Webster *et al.*, 2021). No presente estudo, apesar de também terem sido encontrados mais casos de MTCs com mutação no exão 11 do que nos exões 8 e 9, esta diferença foi pouco expressiva, possivelmente, devido ao baixo número de amostras analisadas (tabela 9). A frequência de mutação no exão 11 encontrada em MTCCs foi de 10,3% (tabela 9). Na literatura encontram-se descritos valores diversos, de 15% (9/60) (Webster *et al.*, 2006), 33,1% (52/157) (Downing *et al.*, 2002) e 45% (5/11) (London *et al.*, 1999) nos Estados Unidos da América, 17,6% (13/74) (Tamlin *et al.*, 2017) e 10% (24/239) (Tamlin *et al.*, 2019) na Austrália, 6,8% (4/59) em Itália (Giantin *et al.*, 2012), 16,8% (32/191) em França (Letard *et al.*, 2008) e de 22,2% (6/27) na República Checa (Vozdova *et al.*, 2019). A variabilidade destes valores pode refletir, entre outros, diferenças biológicas relacionadas com os cães de cada região geográfica, a variabilidade do número de animais estudados ou os critérios de seleção dos mesmos. No

presente trabalho o valor obtido deve ser analisado com alguma cautela, devido ao baixo número de amostras estudadas.

Ao contrário do exão 11, as mutações no exão 8 encontram-se descritas como associadas a um melhor prognóstico e desfecho clínico (Brocks *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022). Apesar da ausência de significância estatística, no presente trabalho, todos os animais com alterações nos exões 8 e 9 se encontravam vivos 2 anos após o diagnóstico. Uma vez que os cães envolvidos no estudo não haviam sido sujeitos a qualquer protocolo terapêutico de quimio ou radioterapia, o desfecho clínico mais favorável poderá dever-se ao comportamento menos agressivo do tumor.

Relativamente às mutações não sinónimas identificadas nos exões 8 e 9, podemos especular que possam não ter impacto na ativação do gene *c-Kit* e consequente aumento da proliferação tumoral. Esta especulação realça a necessidade de estudos adicionais de avaliação do impacto das mutações identificadas na estrutura e função da proteína KIT e da sua associação com o comportamento biológico dos MTCs.

Ao contrário de Vozdova *et al.* (2019) e Chen *et al.* (2022), que encontraram mutações ITD no exão 8, no presente estudo, apenas foram encontradas mutações por substituição pontual de uma base nucleotídica e por inserção de duas bases.

O polimorfismo c.1275G>A, identificado com frequência nos MTCs em estudo no presente trabalho foi, também, descrito como frequentemente encontrado neste tipo de tumores por Marconato *et al.* (2014) e Letard *et al.* (2008).

Em ambos os tipos de tumores, MTCC e MTSC, a percentagem de animais vivos dois anos após o diagnóstico foi largamente superior à dos que morreram ou foram eutanasiados devido à neoplasia (tabela 10). A frequência de animais que se encontravam vivos foi de 81,5% para os MTCCs e de 66,7% para os MTSCs (tabela 10). Apesar destes valores apontarem para uma tendência de melhor prognóstico nos MTCCs, esta associação não pode ser feita uma vez que a seleção das amostras a incluir no estudo não foi completamente aleatória, uma vez que se pretendia que, na amostra a estudar, fossem incluídos animais com os dois tipos de desfecho clínico. A frequência de mutações não sinónimas foi superior nos animais vivos dois anos após o diagnóstico do que naqueles que tinham morrido devido ao tumor; A frequência de mutações não sinónimas encontrada em cães que morreram devido ao tumor foi muito baixa (1 num MTCC e 0 nos MTSC) (tabela 11). Apenas um (14,3%) dos sete animais onde foram

identificadas mutações não sinónimas morreu de causas relacionadas com o tumor. Os testes estatísticos realizados não evidenciaram associações estatisticamente significativas entre os parâmetros analisados. Esta falta de falta de significância pode ser atribuída ao reduzido tamanho de amostra estudada. Contudo, a ausência de mutações em alguns casos de morte relacionada com o tumor e sua presença em animais com vida dois anos após o diagnóstico, levanta a questão, também colocada por Tamlin *et al.* (2022) sobre a importância a atribuir à presença de mutações como fator prognóstico. Os resultados obtidos realçam a necessidade de estudar outros fatores genéticos e histológicos, para que se obtenha uma compreensão mais abrangente dos mecanismos associados à progressão e prognóstico desta doença.

Que seja do conhecimento do autor, a presente investigação constitui o primeiro estudo de rastreio de mutações nos exões 8, 9 e 11 em MTCs realizado em Portugal. Apesar da pequena dimensão da população estudada, os resultados obtidos justificam o estudo de uma amostra mais alargada de modo a consolidar os achados descritos no presente trabalho.

5. Conclusão

Com o presente trabalho pretendeu-se identificar a presença mutações nos exões 8, 9 e 11 do gene *c-Kit*, numa amostra de MTCs caninos cutâneos e subcutâneos e avaliar uma eventual relação com o seu potencial prognóstico.

Os objetivos determinados para a presente dissertação foram atingidos, na medida em que foi possível verificar a presença de mutações nos três exões do gene *c-Kit*. Foram detetadas mutações num total de sete mastocitomas, sendo seis deles cutâneos (20,7%) e um subcutâneo (3,3%). Os MTCCs foram os que exibiram uma maior frequência de mutações nos exões analisados. Apesar da ausência de significância estatística, foi encontrada uma maior frequência de mutações em animais vivos dois anos após o diagnóstico do que naqueles que morreram de causas relacionadas com o tumor. Apenas 14,3% dos animais com mutação morreram de causa relacionada com o mastocitoma. Os resultados obtidos permitem questionar o verdadeiro papel a atribuir à presença de mutações no gene *c-Kit* como fator prognóstico e evidenciam a necessidade de realizar mais estudos, com um número superior de amostras e alargado a outros parâmetros moleculares e histológicos que ajudem a clarificar os mecanismos associados à progressão, comportamento e prognóstico desta doença.

IV - Referências Bibliográficas

- Amagai, Y., Tanaka, A., Jung, K., Matsuda, A., Oida, K., Nishikawa, S., ... & Matsuda, H. (2014). Production of stem cell factor in canine mast cell tumors. *Res Vet Sci*, 96(1), 124-126. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.10.014>
- Aubry, O. A., Spangler, E. A., Schleis, S. E., & Smith, A. N. (2014). Evaluation of bone marrow aspirates from multiple sites for staging of canine lymphoma and mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 12(1), 58-56. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00331.x>
- Beaven, M. A. (2009). Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol*, 39(1), 11-25. <https://doi.org/10.1002/eji.200838899>
- Bell, J. R. (2008). A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT®. *BioTechniques*, 44(6), 834. <https://doi.org/10.2144/000112890>
- Berlato, D., Murphy, S., Monti, P., Stewart, J., Newton, J. R., Flindall, A., & Maglennon, G. A. (2015). Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 13(2), 143-150. <https://doi.org/10.1111/vco.12029>
- Besmer, P., Murphy, J. E., George, P. C., Qiu, F., Bergold, P. J., Ledermasn, L., ... & Hardy, W. D. (1986). A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, 320(6061), 415-421. <https://doi.org/10.1038/320415a0>
- Bischoff, S. C., & Sellge, G. (2002). Mast cell hyperplasia: Role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol*, 127(2), 118-122. <https://doi.org/10.1159/000048181>
- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., de Vos, J. P., de Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., ... & Argyle, D. J. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol*, 10(3), e1-e29. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x>
- Book, A. P., Fidel, J., Wills, T., Bryan, J., Sellon, R., & Mattoon, J. (2011). Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. *Vet Radiol Ultrasound*, 52(5), 548-554. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2011.01839.x>

- Bradding, P., & Holgate, S. T. (1999). Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol*, 31(2), 119-133. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(99\)00010-4](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(99)00010-4)
- Brocks, B. A. W., Bertram, C. A., Bartel, A., Kirpensteijn, J., Collins-Webb, A., Catlin, C., ... & Kiupel, M. (2021). Internal Tandem Duplication of Exon 8 of c-kit Is Associated With Longer Total Survival in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, 58(2), 315-324. <https://doi.org/10.1177/0300985820973463>
- Casanova, M., Branco, S., Veiga, I. B., Barros, A., & Faísca, P. (2021). Stereology in Grading and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, 58(3), 483-490. <https://doi.org/10.1177/0300985820985138>
- Chan, P. M., Ilangumaran, S., la Rose, J., Chakrabartty, A., & Rottapel, R. (2003). Autoinhibition of the Kit Receptor Tyrosine Kinase by the Cytosolic Juxtamembrane Region. *Mol Cell Biol*, 23(9), 3067–3078. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.9.3067-3078.2003>
- Chen, P., Marconato, L., Sabattini, S., & Kiupel, M. (2022). Mutations in Exons 8 and 11 of c-kit Gene in Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors and Their Association with Cell Proliferation. *Vet Sci*, 9(9), 493. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090493>
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2009). In: D. P. Clark & N. J. Pazdernik (Eds.), *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution* (pp. 59-123). Amsterdam: Academic Press.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res*, 16(22), 10881-10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Costa Casagrande, T. A., de Oliveira Barros, L. M., Fukumasu, H., Cogliati, B., Chaible, L. M., Dagli, M. L. Z., & Matera, J. M. (2015). 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. *Vet Comp Oncol*, 13(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/vco.12010>
- Couto, C. G. (2019). Selected Neoplasms in Dogs and Cats. In: R. W. Nelson, C. G. Couto, K. M. Couto, A. P. Davidson, A. D. Maggiore, S. P. DiBartola, E. C. Hawkins, J. A. Larsen, M. R. Lappin, J. C. R. Scott-Moncrieff, S. M. Taylor, W. A. Ware, J. I. Ward, P. J. Watson, J. I. Westropp, A. Woolcock, M. D. Willard (Eds.), *Small Animal Internal Medicine* (6th Ed., pp. 1322-1339). Missouri: Elsevier.

- Cruz, V. S., Borges, J. C. A., Nepomuceno, L. L., Gonçalves, P. A. M., Prado, Y. C. L., Bianchi, C., ... & Araújo, E. G. (2020). Histological classification and expression of markers of canine mast cell tumors. *Vet World*, 13(8), 1627-1634. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1627-1634>
- de Nardi, A. B., dos Horta, R. S., Fonseca-Alves, C. E., de Paiva, F. N., Linhares, L. C. M., Firmo, B. F., ... & Dagli, M. L. Z. (2022). Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells*, 11(4), 618. <https://doi.org/10.3390/cells11040618>
- Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., & Wood, J. L. N. (2002). Canine neoplasia in the UK: Estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract*, 43(6), 240-246. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x>
- Dobson, J., Cohen, S., & Gould, S. (2004). Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Vet Comp Oncol*, 2(3), 132-141. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2004.00048.x>
- Donnelly, L., Mullin, C., Balko, J., Goldschmidt, M., Krick, E., Hume, C., ... & Sorenmo, K. (2015). Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 13(1), 70-76. <https://doi.org/10.1111/vco.12021>
- Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. F., & London, C. A. (2002). Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res*, 63(12), 1718-1723. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1718>
- Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., Humbert, M., Castéran, N., ... & Hermine, O. (2009). Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One*, 4(9), e7258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007258>
- Elliott, J. W., Cripps, P., Blackwood, L., Berlato, D., Murphy, S., & Grant, I. A. (2016). Canine oral mucosal mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 14(1), 101-111. <https://doi.org/10.1111/vco.12071>
- Endicott, M. M., Charney, S. C., McKnight, J. A., Loar, A. S., Barger, A. M., & Bergman, P. J. (2007). Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs

- with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999-2002). *Vet Comp Oncol*, 5(1), 31-37. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2006.00115.x>
- European Medicines Agency (2013). *Product information of masivet*. Acedido em 8 dezembro 2023 em https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/masivet-epar-product-information_en.pdf
- European Medicines Agency (2017). *Product information of palladia*. Acedido em 8 dezembro 2023 em https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/palladia-epar-product-information_en.pdf
- Galli, S. J., Maurer, M., & Lantz, C. S. (1999). Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 11(1), 53-59. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(99\)80010-7](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)80010-7)
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*, 18(5), 693-704. <https://doi.org/10.1038/nm.2755>
- Giantin, M., Vascellari, M., Morello, E. M., Capello, K., Vercelli, A., Granato, A., ... & Dacasto, M. (2012). c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: Correlations with post-surgical prognosis. *J Vet Diagn Invest*, 24(1), 116-126. <https://doi.org/10.1177/1040638711425945>
- Gil da Costa, R. M. (2015). C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: From laboratory to clinic. *Vet J*, 205(1), 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.05.002>
- Gilfillan, A. M., Austin, S. J., & Metcalfe, D. D. (2011). Mast cell biology: Introduction and overview. *Adv Exp Med Biol*, 716, 2-12. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9533-9_1
- Gill, V., Leibman, N., Monette, S., Craft, D. M., & Bergman, P. J. (2020). Prognostic Indicators and Clinical Outcome in Dogs with Subcutaneous Mast Cell Tumors Treated with Surgery Alone: 43 Cases. *J Am Anim Hosp Assoc*, 56(4), 215-225. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6960>
- Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J. & Affolter, V. K. (2005). Mast cell tumors. In: T. L. Gross, P. J. Ihrke, E. J. Walder & V. K. Affolter (Eds.), *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis* (2nd Ed., pp. 853-865). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.

- Hahn, K. A., Legendre, A. M., Shaw, N. G., Phillips, B., Ogilvie, G. K., Prescott, D. M., ... & Hermine, O. (2010). Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *Am J Vet Res*, 71(11), 1354-1361. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.11.1354>
- Halsey, C. H. C., Gustafson, D. L., Rose, B. J., Wolf-Ringwall, A., Burnett, R. C., Duval, D. L., ... & Thamm, D. H. (2014). Development of an in vitro model of acquired resistance to toceranib phosphate (Palladia®) in canine mast cell tumor. *BMC Vet Res*, 10, 105. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-105>
- Halsey, C. H. C., Thamm, D. H., Weishaar, K. M., Burton, J. H., Charles, J. B., Gustafson, D. L., ... & Ehrhart, E. J. (2017). Expression of Phosphorylated KIT in Canine Mast Cell Tumor. *Vet Pathol*, 54(3), 387-394. <https://doi.org/10.1177/0300985816688943>
- Hauck, M. L. (2013). Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: S. J. Withrow, D. M. Vail & R. L. Page (Eds.) *Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology* (5th Ed., pp. 305-320). Philadelphia, P. A.: Saunders.
- Hill, P. B. (2012). Structure and Function of the Skin. In: W. H. Miller, C. E. Griffin & K. L. Campbell (Eds.), *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology* (7th Ed., pp. 1-56). Missouri: Elsevier Mosby
- Horta, R. S., Lavalle, G. E., Monteiro, L. N., Souza, M. C. C., Cassali, G. D. & Araujo, R. B. (2018). Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet Pathol*, 55(2), 212-223. <https://doi.org/10.1177/0300985817747325>
- Hume, C. T., Kiupel, M., Rigatti, L., Shofer, F. S., Skorupski, K. A., & Sorenmo, K. U. (2011). Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997-2007). *J Am Anim Hosp Assoc*, 47(1), 37-44. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5557>
- Jaffe, M. H., Hosgood, G., Taylor, H. W., Kerwin, S. C., Hedlund, C. S., Lopez, M. K., ... & Paranjpe, M. (2000). Immunohistochemical and Clinical Evaluation of p53 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, 37(1), 40-46. <https://doi.org/10.1354/vp.37-1-40>
- Jones, C. L. R., Grahn, R. A., Chien, M. B., Lyons, L. A., & London, C. A. (2004). Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel

- electrophoresis. *J Vet Diagn Invest*, 16(2), 95-100.
<https://doi.org/10.1177/104063870401600201>
- Kiupel, M., Webster, J. D., Kaneene, J. B., Miller, R., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2004). The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol*, 41(4), 371-377. <https://doi.org/10.1354/vp.41-4-371>
- Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., ... Miller, R. (2011). Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol*, 48(1), 147-155. <https://doi.org/10.1177/0300985810386469>
- Kiupel, M. (2017). Mast cell tumors. In: D. J. Meuten (Ed.) *Tumors in domestic animals* (5th Ed., pp. 176–202). Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc.
- Kiupel, M., & Camus, M. (2019). Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 49(5), 819-836. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.002>
- Krick, E. L., Billings, A. P., Shofer, F. S., Watanabe, S., & Sorenmo, K. U. (2009). Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: Association with grade and survival. *Vet Comp Oncol*, 7(2), 130-138. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00185.x>
- Kumar, V., & Sharma, A. (2010). Mast cells: Emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol Immunol*, 48(1–3), 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.07.009>
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., & Shivakrupa, R. (2005). Normal and Oncogenic Forms of the Receptor Tyrosine Kinase Kit. *Stem Cells*, 23(1), 16-43. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0117>
- Lennartsson, J., & Rönnstrand, L. (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: From basic Science to clinical implications. *Physiol Rev*, 92(4), 1619-1649. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>
- Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmérini, F., Leventhal, P. S., Guéry, S., ... & Dubreuil, P. (2008). Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common

- in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res*, 6(7), 1137-1145. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0067>
- London, C. A., Galli, S. J., Yuuki, T., Hu, Z. Q., Helfand, S. C., & Geissler, E. N. (1999). Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol*, 27(4), 689-697. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(98\)00075-7](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(98)00075-7)
- London, C. A. (2009). Tyrosine Kinase Inhibitors in Veterinary Medicine. *Top Companion Anim Med*, 24(3), 106-112. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.02.002>
- London, C. A., Malpas, P. B., Wood-Follis, S. L., Boucher, J. F., Rusk, A. W., Rosenberg, M. P., ... & Michels, G. M. (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin Cancer Res*, 15(11), 3856-3865. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1860>
- London, C. A. (2013). Kinase dysfunction and kinase inhibitors. *Vet Dermatol*, 24(1), 181-7.e7.0E40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01081.x>
- London, C. A., & Thamm, D. H. (2020). Mast Cell Tumors. In: D. M. Vail, D. H. Thamm, J. M. Liptak (Eds.) *Withrow and Macewen's: Small Animal Clinical Oncology* (6th Ed., 382-393). Missouri: Elsevier.
- Longley, B. J., Reguera, M. J., & Ma, Y. (2001). Classes of c-KIT activating mutations: Proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res*, 25(7), 571-576. [https://doi.org/10.1016/s0145-2126\(01\)00028-5](https://doi.org/10.1016/s0145-2126(01)00028-5)
- Maltby, S., Khazaie, K., & McNagny, K. M. (2010). Mast Cells in Tumor Growth: Angiogenesis, Tissue Remodeling and Immune-modulation. *Biochim Biophys Acta*, 1796(1), 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.02.001>
- Marconato, L., Zorzan, E., Giantin, M., di Palma, S., Cancedda, S., & Dacasto, M. (2014). Concordance of c-kit mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. *J Vet Intern Med*, 28(2), 547-553. <https://doi.org/10.1111/jvim.12266>

- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., ... & Flicek, P. (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Res*, 51(D1), D933-D941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac958>
- Mendez, S. E., Drobatz, K. J., Duda, L. E., White, P., Kubicek, L., & Sorenmo, K. U. (2020). Treating the locoregional lymph nodes with radiation and/or surgery significantly improves outcome in dogs with high-grade mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 18(2), 239-246. <https://doi.org/10.1111/vco.12541>
- Mescher, A. L. (2018a). Connective Tissue. In: A. L. Mescher (Ed.) *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas* (15th Ed. pp. 96-120). New York: McGraw-Hill Education.
- Mescher, A. L. (2018b). Skin. In: A. L. Mescher (Ed.) *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas* (15th Ed. pp. 371-391). New York: McGraw-Hill Education.
- Mochizuki, H., Thomas, R., Moroff, S., & Breen, M. (2017a). Genomic profiling of canine mast cell tumors identifies DNA copy number aberrations associated with KIT mutations and high histological grade. *Chromosome Res*, 25(2), 129-143. <https://doi.org/10.1007/s10577-016-9543-7>
- Mochizuki, H., Motsinger-Reif, A., Bettini, C., Moroff, S., & Breen, M. (2017b). Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 15(3), 829-839. <https://doi.org/10.1111/vco.12225>
- Moirano, S. J., Lima, S. F., Hume, K. R., & Brodsky, E. M. (2018). Association of prognostic features and treatment on survival time of dogs with systemic mastocytosis: A retrospective analysis of 40 dogs. *Vet Comp Oncol*, 16(1), E194-E201. <https://doi.org/10.1111/vco.12373>
- Morris, J., & Dobson, J. (2008). Skin: Mast Cell Tumours. In: J. Morris & J. Dobson (Eds.), *Small Animal Oncology* (1st Ed. pp. 59-62). Oxford: Blackwell Science.
- Mullins, M. N., Dernell, W. S., Withrow, S. J., Ehrhart, E. J., Thamm, D. H., & Lana, S. E. (2006). 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). *J Am Vet Med Assoc*, 228(1), 91-95. <https://doi.org/10.2460/javma.228.1.91>

- Murphy, S., Sparkes, A. H., Blunden, A. S., Brearley, M. J., & Smith, K. C. (2006). Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Vet Rec*, 158(9), 287-291. <https://doi.org/10.1136/vr.158.9.287>
- Musser, M., Berger, E., Flaherty, H. A., Fox, L., & Johannes, C. M. (2018). Marked paraneoplastic hypereosinophilia associated with a low-grade, metastatic canine mast cell tumour. *Vet Rec Case Rep*, 6(2). <https://doi.org/10.1136/vetreccr-2017-000563>
- Nakano, Y., Kobayashi, M., Bonkobara, M., & Takanosu, M. (2017). Identification of a secondary mutation in the KIT kinase domain correlated with imatinib-resistance in a canine mast cell tumor. *Vet Immunol Immunopathol*, 188, 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.05.004>
- Nauta, A. J., Engels, F., Knippels, L. M., Garssen, J., Nijkamp, F. P., & Redegeld, F. A. (2008). Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol*, 585(2–3), 354-360. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.094>
- Newman, S. J., Mrkonjich, L., Walker, K. K., & Rohrbach, B. W. (2007). Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *J Comp Pathol*, 136(4), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.02.003>
- Nicholas, F. W. (2010). Molecular biology: Polymerase chain reaction. In: F. W. Nicholas (Ed.), *Introduction to Veterinary Genetics* (3rd Ed., pp. 46-84). Oxford: Blackwell Publishing
- North, S., & Banks, T. (2009). Mast Cell Tumours. In: S. North, & T. Banks (Eds.), *Small Animals Oncology an Introduction* (1st Ed., pp. 183-196). Saunders – Elsevier.
- O'Brien, R., & Barr, F. (2009). *BSAVA Manual of Canine and Feline Abdominal Imaging*. United Kingdom: Wiley.
- O'Connell, K., & Thomson, M. (2013). Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. *Vet Comp Oncol*, 11(1), 51-62. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00301.x>
- Olsen, J. A., Thomson, M., O'Connell, K., & Wyatt, K. (2018). Combination vinblastine, prednisolone and toceranib phosphate for treatment of grade II and III mast cell tumours in dogs. *Vet Med Sci*, 4(3), 237-251. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/vms3.106>

- Orkin, M., & Schwartzman, R. M. (1959). A Comparative Study of Canine and Human Dermatology. *J Invest Dermatol*, 32(3), 451-466. <https://doi.org/10.1038/jid.1959.75>
- Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K., & Narama, I. (2002). Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. *Vet Pathol*, 39(5), 557-564. <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-557>
- Pakhrin, B., Kang, M. S., Bae, I. H., Park, M. S., Jee, H., You, M. H., ... & Kim, D. Y. (2007). Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *J Vet Sci*, 8(3), 229-236. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.229>
- Patnaik, A. K., Ehler, W. J., & MacEwen, E. G. (1984). Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. *Vet Pathol*, 21(5), 469-474. <https://doi.org/10.1177/030098588402100503>
- Puxeddu, I., Piliponsky, A. M., Bachelet, I., & Levi-Schaffer, F. (2003). Mast cells in allergy and beyond. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(12), 1601-1607. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00208-5](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00208-5)
- Ranieri, G., Marech, I., Pantaleo, M., Piccinno, M., Roncetti, M., Mutinati, M., ... & Sciorsci, R. L. (2015). In vivo model for mastocytosis: A comparative review. *Crit Rev Oncol Hematol*, 93(3), 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.10.010>
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Bichim Biphys Acta Mol Basis Dis*, 1822(1), 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.010>
- Robbie-Ryan, M., & Brown, M. A. (2002). The role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 14(6), 728-733. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(02\)00394-1](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(02)00394-1)
- Romansik, E. M., Reilly, C. M., Kass, P. H., Moore, P. F., & London, C. A. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol*, 44(3), 335-341. <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-335>
- Sailasuta, A., Ketpun, D., Piyaviriyakul, P., Theerawatanasirikul, S., Theewasutrakul, P., & Rungsipipat, A. (2014). The relevance of CD117-immunocytochemistry staining patterns to mutational exon-11 in c-kit detected by PCR from fine-needle aspirated canine mast cell tumor cells. *Vet Med Int*, 2014, 787498. <https://doi.org/10.1155/2014/787498>

- Siebenhaar, F., Redegeld, F. A., Bischoff, S. C., Gibbs, B. F., & Maurer, M. (2018). Mast Cells as Drivers of Disease and Therapeutic Targets. *Trends Immunol*, 39(2), 151-162. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.10.005>
- Shoop, S. J., Marlow, S., Church, D. B., English, K., McGreevy, P. D., Stell, A. J., ... & Brodbelt, D. C. (2015). Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Genet Epidemiol*, 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2052-6687-2-1>
- Sledge, D. G., Webster, J., & Kiupel, M. (2016). Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J*, 215, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.003>
- Śmiech, A., Ślaska, B., Łopuszyński, W., Jasik, A., Bochyńska, D., & Da,browski, R. (2018). Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. *Acta Vet Scand*, 60(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0424-2>
- Stefanello, D., Valenti, P., Faverzani, S., Bronzo, V., Fiorbianco, V., Pinto da cunha, N., ... & Caniatti, M. (2009). Ultrasound-guided cytology of spleen and liver: A prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. *J Vet Intern Med*, 23(5), 1051-1057. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0354.x>
- Stefanello, D., Buracco, P., Sabattini, S., Finotello, R., Giudice, C., Grieco, V., ... & Marconato, L. (2015). Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). *J Am Vet Med Assoc*, 246(7), 765-769. <https://doi.org/10.2460/javma.246.7.765>
- Stockham, S. L., Basel, D. L., & Schmidt, D. A. (1986). Mastocytemia in Dogs With Acute Inflammatory Diseases. *Vet Clin Pathol*, 15(1), 16-21. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.1986.tb00862.x>
- Sundström, M., Alfredsson, J., Olsson, N., & Nilsson, G. (2001). Stem cell factor-induced migration of mast cells requires p38 mitogen-activated protein kinase activity. *Exp Cell Res*, 267(1), 144-151. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5239>
- Tamlin, V. S., Kessell, A. E., Mccoy, R. J., Dobson, E. C., Smith, T. S., Hebart, M., ... & Peaston, A. E. (2017). Prevalence of exon 11 internal tandem duplications in the C-

- KIT proto-oncogene in Australian canine mast cell tumours. *Aust Vet J*, 95(10), 386-391. <https://doi.org/10.1111/avj.12636>
- Tamlin, V. S., Dobson, E. C., Woolford, L., & Peaston, A. E. (2019). DNA purification increases PCR-amplifiable DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded canine mast cell tumors for routine KIT mutation detection. *J Vet Diagn Invest*, 31(5), 756-760. <https://doi.org/10.1177/1040638719867743>
- Tamlin, V. S., Bottema, C. D. K., & Peaston, A. E. (2020). Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment. *Vet Med Sci*, 6(1), 3-18. <https://doi.org/10.1002/vms3.201>
- Tamlin, V. S., Bottema, C. D. K., Woolford, L., Dobson, E. C., Kessell, A. E., & Peaston, A. E. (2022). Canine mast cell tumours part I: Clinical and survival outcomes. *Vet Med Sci*, 8(4), 1409-1420. <https://doi.org/10.1002/vms3.812>
- Takahashi, T., Kadosawa, T., Nagase, M., Matsunaga, S., Mochizuki, M., Nishimura, R., & Sasaki, N. (2000). Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). *J Am Vet Med Assoc*, 216(2), 222-226. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.216.222>
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Takahashi, M., Nakagawa, T., Takeuchi, A., ... & Tsujimoto, H. (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *Vet J*, 196(3), 492-498. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.11.018>
- Thamm, D. H. (2013). Miscellaneous tumors. Section A: Hemangiosarcoma. In: S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. I. Page (Eds.), *Withrow&MacEwen's. Small animal Clinical oncology* (5th ed., 679-688). Elsevier Saunders: St. Louis, MI, USA, 2013.
- Thamm, D. H., Weishaar, K. M., Charles, J. B., & Ehrhart, E. J., 3rd (2020). Phosphorylated KIT as a predictor of outcome in canine mast cell tumours treated with toceranib phosphate or vinblastine. *Vet Comp Oncol*, 18(2), 169-175. <https://doi.org/10.1111/vco.12525>
- Thompson, J. J., Pearl, D. L., Yager, J. A., Best, S. J., Coomber, B. L., & Foster, R. A. (2011a). Canine subcutaneous mast cell tumor: Characterization and prognostic indices. *Vet Pathol*, 48(1), 156-168. <https://doi.org/10.1177/0300985810387446>

- Thompson, J. J., Yager, J. A., Best, S. J., Pearl, D. L., Coomber, B. L., Torres, R. N., ... & Foster, R. A. (2011b). Canine subcutaneous mast cell tumors: Cellular proliferation and kit expression as prognostic indices. *Vet Pathol*, 48(1), 169-181. <https://doi.org/10.1177/0300985810390716>
- Thompson, J. J., Morrison, J. A., Pearl, D. L., Boston, S. E., Wood, G. A., Foster, R. A., & Coomber, B. L. (2016). Receptor Tyrosine Kinase Expression Profiles in Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, 53(3), 545-558. <https://doi.org/10.1177/0300985815610388>
- Turrel, J. M., Kitchell, B. E., Miller, L. M., & Théon, A. (1988). Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 193(8), 936-940.
- Vascellari, M., Giantin, M., Capello, K., Carminato, A., Morello, E. M., Vercelli, A., ... & Mutinelli, F. (2013). Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. *Vet Pathol*, 50(1), 110-121. <https://doi.org/10.1177/0300985812447829>
- Vozdova, M., Kubickova, S., Fictum, P., Fröhlich, J., Jelinek, F., & Rubes, J. (2019). Prevalence and prognostic value of c-kit and TP53 mutations in canine mast cell tumours. *Vet J*, 247, 71-74. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.03.005>
- Vozdova, M., Kubickova, S., Pal, K., Fröhlich, J., Fictum, P., & Rubes, J. (2020a). Recurrent gene mutations detected in canine mast cell tumours by next generation sequencing. *Vet Comp Oncol*, 18(4), 509-518. <https://doi.org/10.1111/vco.12572>
- Vozdova, M., Kubickova, S., Fictum, P., Cernohorska, H., Fröhlich, J., & Rubes, J. (2020b). Mutation and methylation status of KIT and TP53 in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 18(3), 438-444. <https://doi.org/10.1111/vco.12543>
- Warland, J., & Dobson, J. (2013). Breed predispositions in canine mast cell tumour: A single centre experience in the United Kingdom. *Vet J*, 197(2), 496-498. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.017>
- Warland, J., Amores-Fuster, I., Newbury, W., Brearley, M., & Dobson, J. (2014). The utility of staging in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 12(4), 287-298. <https://doi.org/10.1111/vco.12012>

- Webster, J. D., Kiupel, M., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2006a). Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer*, 6, 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-85>
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J. B., Miller, R. A., Resau, J. H., & Kiupel, M. (2006b). The role of c-KIT in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*, 8(2), 104-111. <https://doi.org/10.1593/neo.05622>
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R. A., Kaneene, J. B., & Kiupel, M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol*, 44(3), 298-308. <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-298>
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Thamm, D. H., Hamilton, E., & Kiupel, M. (2008). Evaluation of prognostic markers for Canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Vet Res*, 4, 32. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-32>
- Wedemeyer, J., Tsai, M., & Galli, S. J. (2000). Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol*, 12(6), 624–631. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00154-0](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00154-0)
- Weishaar, K. M., Thamm, D. H., Worley, D. R., & Kamstock, D. A. (2014). 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. *J Comp Pathol*, 151(4), 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.004>
- Welle, M. M., Bley, C. R., Howard, J., & Rüfenacht, S. (2008). Canine mast cell tumours: A review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol*, 19(6), 321-339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00694.x>
- White, C. R., Hohenhaus, A. E., Kelsey, J., & Procter-Gray, E. (2011). Cutaneous MCTs: Associations with Spay/Neuter Status, Breed, Body Size, and Phylogenetic Cluster. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47(3), 210–216. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5621>
- Willmann, M., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Marconato, L., Dacasto, M., Hadzijušufovic, E., Hermine, O., ... & Valent, P. (2021). Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal. *Front Vet Sci*, 8, 755258. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.755258>

- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., ... & Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*, 6(11), 3341-3351. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02655.x>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zemke, D., Yamini, B., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2002). Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. *Vet Pathol*, 39(5), 529-535. <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-529>
- Zorn, T. (2013). Capítulo 5: Tecido Conjuntivo. In: L. C. Junqueira & J. Carneiro (Eds.). *Histologia Básica: Texto e Atlas* (12^a Ed., pp 95-96). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA e GEN
- Zorzan, E., Hanssens, K., Giantin, M., Dacasto, M., & Dubreuil, P. (2015). Mutational hotspot of TET2, IDH1, IDH2, SRSF2, SF3B1, KRAS, and NRAS from human systemic mastocytosis are not conserved in canine mast cell tumors. *PLoS One*, 10(11), e0142450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142450>

V – Apêndices

APÊNDICE I

Tabela 12 - Alterações na sequência nucleotídica identificadas nas amostras de mastocitomas caninos após a sequenciação dos exões 8 e 9.

Mastocitomas Cutâneos			Mastocitomas Subcutâneos		
Amostra	Exão 8	Exão 9	Amostra	Exão 8	Exão 9
2602/17	Sem alterações	Sequenciação completa Sem alterações	1254/19 D	c.1275G>A (heterozigótico)	Sequenciação completa Sem alterações
2234/17 B	Sem alterações	Sequenciação completa Sem alterações	1446/22 A3	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações
2809/17 AI	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações	1105/20 C	Sem alterações	(sequenciado 85,6% do exão) c.1434A>G (mutação sinónima)
2517/17	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	2963/20 B	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações
1735/17 D	Sem alterações	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações	952/20 B2	Sem alterações	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações
772/17 C1	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações	468/20 B	Sem alterações	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações
2539/17 A	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	3027/19 B	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações
1189/17 A	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	1255/20 B	Sem alterações	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações
4/17	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,7% do exão) Sem alterações	3754/20 B1	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,1% do exão) Sem alterações
883/17 A	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações	3414/20	Sem alterações	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações
1949/17 B	c.1275G>A (heterozigótico)	Má qualidade	2641/20	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações
376/17 A	Sem alterações	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	1541/20 A2	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações

2776/17 B	Sem alterações	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações	2761/19	Sem alterações	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações
2782/17 A	c.1275G>A (heterozigótico) c.1242T>A (mutação sinónima) c.1243G>A (mutação não sinónima)	(sequenciado 86,1% do exão) Sem alterações	2494/19	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações
1191/17 A	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 85,6% do exão) c.1472T>C (mutação não sinónima)	3046/20	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações
2671/17	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações	2732/21 A2	Sem alterações	(sequenciado 86,1% do exão) Sem alterações
2327/17	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	2171/20 D	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,7% do exão) Sem alterações
610/17	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 81,4% do exão) Sem alterações	3418/20	Sem alterações	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações
1256/17	c.1242_1243insGC c.1346T>C (mutação não sinónima) c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 87,6% do exão) c.1408C>T (mutação não sinónima)	585/20	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações
3136/17 B	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações	792/20 B	Sem alterações	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações
2400/17	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	3436/20 B	c.1275G>A (homozigótico)	Sequenciação completa Sem alterações
205/17	Sem alterações	(sequenciado 86,1% do exão) Sem alterações	2297/19 A	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações
1191/17 B	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações	2450/20 A	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações
3212/17 A	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações	3132/20 B	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações
576/17 A	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações	2473/20 A	Sem alterações	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações

1500/17	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações	2134/19	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 87,6% do exão) Sem alterações
3110/17 B	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	3008/19 A	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 86,1% do exão) Sem alterações
937/17 B	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 86,6% do exão) Sem alterações	3294/19	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 86,1% do exão) Sem alterações
576/17 B	c.1275G>A (homozigótico)	(sequenciado 85,6% do exão) Sem alterações	1725/20	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações
---	---	---	1725/20	c.1275G>A (heterozigótico)	(sequenciado 88,1% do exão) Sem alterações