

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM
CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO**

Stella Habib Moreira
Mestra em Cirurgia Veterinária

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM
CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO

Discente: Stella Habib Moreira

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Coorientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Cirurgia Veterinária.

M838i	<p>Moreira, Stella Habib</p> <p>Identificação de vesículas extracelulares em cães com mastocitoma cutâneo / Stella Habib Moreira. -- Jaboticabal, 2023</p> <p>62 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Andriago Barboza De Nardi</p> <p>Coorientadora: Heidge Fukumasu</p> <p>1. Mastocitoma canino. 2. Câncer. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

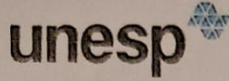
Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Estudos com biópsia líquida em animais de companhia são limitados, sendo a quantificação de nanovesículas uma ferramenta diagnóstica pouca invasiva e com valor preditivo no comportamento tumoral e terapêutica. O presente estudo demonstra inovação para a saúde ao correlacionar os principais fatores prognósticos do mastocitoma cutâneo em cães, neoplasma frequente na clínica veterinária.

POTENCIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Studies involving liquid biopsy in pets are limited, being the quantification of nanovesicles a minimally invasive diagnostic tool with predictive value in tumor and therapeutic behavior. The present study demonstrates innovation for health by correlating the main prognostic factors of cutaneous mast cell tumor in dogs, a frequent neoplasm in the veterinary clinic.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: IDENTIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO

AUTORA: STELLA HABIB MOREIRA

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORIENTADOR: HEIDGE FUKUMASU

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. RODRIGO DOS SANTOS HORTA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG Belo Horizonte/MG

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. GABRIELA NORONHA DE TOLEDO (Participação Virtual)
Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR/UFCG / Patos/PB

Profa. Dra. ISABEL CRISTINA BOLELI (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de março de 2023

DADOS CURRICULARES DO ALUNO

Stella Habib Moreira, nascida em Belo Horizonte, estado de Minas Gerais no dia 30 de julho de 1990. Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras, colando grau no dia 29 de dezembro de 2014. Residente em Clínica Cirúrgica de Animais de Companhia pelo Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais no período de março de 2015 a fevereiro de 2017. Ingressante no Programa de Pós-Graduação pela Unesp, Câmpus Jaboticabal em março de 2017, sendo bolsista Fapesp, obtendo o título de mestra em Cirurgia Veterinária no dia 28 de fevereiro de 2019, com orientação do Professor Doutor Andriago Barboza De Nardi e coorientação da Doutora Josiane Morais Pazzini. Ingressante no doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Unesp, Câmpus Jaboticabal em março de 2019, bolsista CNPq, sob orientação do Professor Doutor Andriago Barboza De Nardi e coorientação do Professor Doutor Heidge Fukumasu.

Epígrafe

“A minha vida é um vendaval que se soltou, é uma onda que
se levantou, um átomo a mais que se animou [...]
Não sei por onde vou, não sei para onde vou, mas sei que não vou por aí”
 (“Cântico Negro” – José Régio, por Maria Bethânia)

Dedicatória

Aos meus pais e irmã.

Aos meus pacientes, pelos quais me dedico para que tenham qualidade de vida.

AGRADECIMENTOS

Houve a hora de sair de casa, de plantar, de correr atrás dos sonhos e aproveitar as oportunidades que a vida apresentava. Chegou a hora de voltar para as raízes e colher os frutos de tantos anos de estudo e formação. Disse Maria Bethânia: *“acabei com tudo, escapei com vida [...] eu andei demais, não olhei para trás”*. Não foram anos fáceis, porém, posso dizer com toda certeza, que foram dias de muita alegria, de gratidão, crescimento, risos sinceros e onde cada dificuldade me fez crescer e valorizar o que eu tenho.

Agradeço a Deus pela fé, misericórdia, por cada dia, cada luta e conquista, afinal “o fardo nunca é maior do que podemos carregar”. Aos meus pais, Paulo e Lourdes, meus exemplos para a vida, com quem aprendi que a honestidade e a alegria abrem portas e deixam luz no coração de quem encontramos. Minha irmã, Ingrid, minha maior inspiração e minha melhor amiga. Obrigada por tanto esforço, por abdicarem de tantos sonhos para que eu pudesse sonhar e realizar os meus. Eu não chegaria aonde estou e não seria quem sou, senão por vocês, tenham certeza da minha eterna gratidão e amor.

Agradeço aos meus avós, em especial minha avó Hermínia que sei que cuida e olha por mim aonde quer que eu vá. Agradeço aos tios e primos por todo apoio e união que fazem dessa família um grande porto seguro. Ao Guilherme Arduini por todo carinho e me ensinar o amor de verdade.

Ao professor Andriago De Nardi por toda orientação ao longo desses anos, toda paciência, amizade, conselhos e por abrir as portas da Unesp a uma aluna desconhecida, que vinha de fora. Obrigada por ser um exemplo de professor e oncologista. Obrigada por cada oportunidade de aprender com o senhor.

Ao professor Heidge Fukumasu e Taismara Garnica por abrirem as portas da USP Pirassununga, por toda paciência, ensinamentos e incentivos ao longo do doutorado e me mostrarem uma oncologia repleta de novas descobertas, moléculas e inspirações.

Agradeço aos professores: Dra. Gabriela Noronha, Dra. Isabel Boleli, Dra. Paola Castro e Dr. Rodrigo Horta pelo aceite para composição da banca e período dedicado a leitura do trabalho.

Aos amigos que fiz durante essa longa caminhada de formação que se iniciou em 2009, em especial ao Caio Bustamante, Stenia Severo, Alice Barroso, Tryssia Moi, Rafaela Bortolotti, Marla Frasson, Noelia Talavera, Felipe Noleto, Gabriela Noronha e Emanuel Araújo que independente da época, da distância ou do motivo foram companheiros para as melhores ideias, reflexões, dias de trabalho, dias de preguiça e risada alta. Agradeço a Aline Politi que durante tantas sessões de terapia me fez ver que a comunicação e limite fazem a vida ser mais simples, e que por mais que tudo possa parecer difícil, tem sempre uma solução, basta pensar.

Ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) da Unesp Câmpus de Jaboticabal que me acolheu desde o estágio-residência em outubro de 2016 e guardo com muito carinho dentro do meu coração. Foram tantos dias, pacientes, tutores, um aprendizado sem tamanho, lições além da oncologia e qualidade de vida, mas amigos para a vida toda! Incentivadores de uma oncologia repleta de amor. Aos amigos da oncologia Jorge Gomez, Pedro Cassino, Josiane Pazzini, Oscar Sierra, Isabela Canavari, Gabriel Montanhim, Laís Menescal, Adilson Cabral, Gabriel Carra, Milena Magrin, Michelle Rocha, Celso Brant, Cristhian Vargas e Mariana Palma.

Aos demais professores, funcionários e alunos do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Unesp Campus de Jaboticabal, por todo apoio, cuidado e carinho com que sempre me ajudaram e fizeram da rotina de atendimento e dias de curso mais leves.

Ao Bacon, Cintio, Pingo e Sula que me incentivaram a me tornar médica veterinária e me empenhar para ser cada dia melhor por eles. Ensinar o que é o amor de um cão e o único defeito: não serem eternos. Levo vocês comigo aonde for.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e auxílio pesquisa ao longo do doutorado, processo 140341/2019-6.

Guimarães Rosa dizia que *“o que a vida quer da gente é coragem”*, então vamos finalizar esse grande desafio que foi o doutorado, e a pós-graduação. Ter a capacidade de ensinar e levar o que sabemos pode fazer a diferença na vida das pessoas. Que esse título, nunca conquistado por alguém da minha família, possa trazer luz e sabedoria a minha trajetória, porque sempre acreditarei no poder transformador da educação.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Mastocitoma cutâneo em cães.....	2
2.2 Nanovesículas extracelulares.....	7
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Instalações e seleção dos pacientes.....	13
4.2 Procedimentos Pré-Cirúrgicos e Transcirúrgicos.....	13
4.3 Coleta das amostras sanguíneas e tecido neoplásico.....	14
4.4 Análise histopatológica.....	14
4.5 Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares.....	15
4.6 Análise estatística.....	16
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Pacientes selecionados.....	16
5.2 Histopatologia.....	18
5.3 Caracterização das vesículas extracelulares (SEV) isoladas em soro canino.....	21
5.3.1 Grupo Controle e Grupo Mastocitoma.....	20
5.3.2 Pacientes vivos e óbitos.....	21
5.3.3 Recidiva tumoral.....	22
5.4 Caracterização de vesículas extracelulares (SEV) e fatores prognósticos.....	24
5.4.1 Presença de sinais sistêmicos.....	24
5.4.2 Demais fatores prognósticos.....	25
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31

8. REFERRÊNCIAS.....	32
APÊNDICE.....	40



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



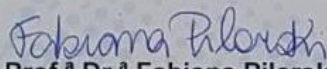
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Identificação de vesículas exossomais em cães com mastocitoma cutâneo alto grau**", protocolo nº 09484/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 15 de agosto de 2019.

Vigência do Projeto	01/09/2019 a 01/01/2021
Espécie / Linhagem	Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)
Nº de animais	30 cães
Peso / Idade	3,0 a 60,0 kg – Adultos (5 a 17 anos)
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Atendimento clínico, cirúrgico e oncológico do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", FCAV, UNESP, Jaboticabal-SP.

Jaboticabal, 15 de agosto de 2019.


Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

IDENTIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CÃES COM MASTOCITOMA CUTÂNEO

RESUMO – Os mastocitomas correspondem a 20% dos neoplasmas cutâneos nos cães. A partir de avaliação clínica, características histopatológicas e imuno-histoquímicas é possível determinar fatores prognósticos associados ao mastocitoma na tentativa de prever comportamento biológico e direcionar o tratamento. Células saudáveis e tumorais liberam no espaço extracelular vesículas, como os exossomos (20-150nm), contendo componentes moleculares como proteínas, miRNA, RNA e DNA que atuam na comunicação intercelular, sendo considerados potenciais biomarcadores do câncer. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de SEV (“small extracellular vesicles) em cães com mastocitoma e sua correlação ao comportamento tumoral e valor prognóstico através de avaliação NTA (“Nanoparticle Tracking Analysis”). Observou-se menor concentração de SEV circulantes em pacientes com mastocitoma cutâneo ($p < 0,05$), assim como em pacientes que vieram a óbito em decorrência do tumor ($p < 0,05$). A recidiva tumoral também indicou menor sobrevida dos pacientes e menor concentração de SEV circulantes ($p < 0,05$). A presença de sinais sistêmicos devido a degranulação de mastócitos neoplásicos indicou menor sobrevida dos pacientes e menor concentração de SEV circulantes ($p < 0,05$). Porém, não houve associação entre as SEV e os principais fatores prognósticos do mastocitoma como raça, localização tumoral, grau histopatológico Patnaik e Kiupel, índice mitótico, *c-KIT* e Ki67. Sugere-se que a baixa concentração de SEV em soro canino está relacionada com menor sobrevida, ocorrência de recidiva de mastocitoma e maior possibilidade de óbito. Logo, por meio da biópsia líquida pode ser possível definir valor prognóstico com relação aos pacientes com mastocitoma.

Palavras-Chave: exossomos, fatores prognósticos, nanovesículas, NTA, quantificação de vesículas extracelulares.

IDENTIFICATION OF EXTRACELLULAR VESICLES IN DOGS WITH CUTANEOUS MAST CELL TUMOR

ABSTRACT – Mast cell tumors account for 20% of cutaneous neoplasms in dogs. From clinical evaluation, histopathological and immunohistochemical characteristics, it is possible to determine prognostic factors associated to mast cell tumors in an attempt to predict biological behavior and treatment. Healthy and tumour cells release nanovesicles into the extracellular space, such exosomes (20-150nm), packaged proteins, miRNA, RNA and DNA that act in intercellular communication, promising biomarker for cancer. The present study aimed to characterize SEV (“small extracellular vesicles”) in dogs with mast cell tumors and their correlation with tumor behavior, prognostic factors through assessment NTA (“Nanoparticle Tracking Analysis”). A lower concentration of circulating SEV was observed in patients with cutaneous mast cell tumors ($p < 0,05$), as well in patient who died as a result of the tumor ($p < 0,05$). Mast cell tumor recurrence indicated short overall survival and lower concentration of SEV ($p < 0,05$). The presence of systemic signs due to degranulation of mast cell tumor indicated short overall survival and lower concentration of SEV ($p < 0,05$). However, was no significant difference for the characterize of SEV and the prognostic factors of mast cell tumors as breed, tumor location, grading system Patnaik and Kiupel, mitotic index, *c-KIT* and Ki67. We suggest that the low concentration of SEV in canine serum is related to short survival, occurrence of recurrence mast cell tumor and greater possibility os death. Therefore, through liquid biopsy it is can define prognostic value in relation to dogs with mast cell tumors.

Keywords – exosomes, prognostic factors, nanovesicles, NTA, quantification of extracellular vesicles

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitros

DNA – ácido desoxirribonucléico

ESCRT – Endossomal Sorting Complex Required for Transport

kg – quilograma

mg – micrograma

MHC - Major Histocompatibility Complex

mL – mililitros

miRNA – microRNA

nm – nanômetro

NTA – Nanoparticle Tracking Analysis

PAAF – punção aspirativa por agulha fina

RNA – ácido ribonucléico

TGF-β – transforming growth factor-β

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Descrição histológica de mastocitomas de acordo com a graduação Patnaik (Adaptado: Patnaik et al., 1984; London & Thamm, 2013).....3
- Quadro 2.** Descrição histológica de mastocitomas de acordo com a graduação Kiupel (Adaptado: Kiupel et al., 2011; Scarpa et al., 2014).....3
- Quadro 3.** Sistema de estadiamento clínico para mastocitoma cutâneo em cães proposto pela WHO (Adaptado: De Nardi et al., 2022).....6

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de formação do endossomo, a partir do encapsulamento da membrana celular. Processo denominado de endocitose, sendo a fase inicial para a formação das vesículas extracelulares. Adaptado: Santos et al., 2022.....8
- Figura 2.** Biogênese das vesículas extracelulares tumorais. Após o processo de endocitose, o endossomo inicial sofre invaginações mediadas pelas proteínas ESCRT, formando o corpo multivesicular. Este último pode sofrer degradação pelos lisossomos ou sofrer fusão com a membrana celular por meio da ação das moléculas reguladoras do tipo Rab. As vesículas liberadas no meio externo à célula podem atuar na tumorigênese ou formação de metástase, atuando na comunicação intercelular. Adaptado: Tai et al., 2018.....8
- Figura 3.** Representação gráfica de análise quantitativa de raças de cães com diagnóstico de mastocitoma cutâneo no período experimental de outubro/2019 a fevereiro/2021. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2022.....18
- Figura 4.** Representação gráfica em barra a partir de análise de variância (ANOVA) entre os graus histológicos Kiupel (baixo ou alto) e Patnaik (I, II ou III) e a sobrevivência média dos cães com mastocitoma. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2022.....19
- Figura 5.** Concentração de vesículas (SEV) em soro canino com relação aos grupos controle e grupo mastocitoma. A) Alta concentração de SEV em animais do grupo controle quando comparado ao grupo de cães com mastocitoma cutâneo ($p < 0,05$). B) Curva ROC representando a avaliação da concentração de SEV como predição no diagnóstico de mastocitoma em cães ($AUC = 0.8575$, $p < 0,05$).....21
- Figura 6.** Concentração de SEV em soro de cães com mastocitoma cutâneo com relação ao óbito no período analisado. A) Baixa concentração de SEV/mL de soro canino em pacientes que vieram a óbito em decorrência de mastocitoma cutâneo. B) Representação gráfica (teste Log-Rank) de menor concentração de SEV/mL de soro canino em pacientes que vieram a óbito ao longo do período analisado (linha vermelha) em relação a pacientes vivos no mesmo período (linha azul) ($p < 0,05$). C) Curva ROC representando a concentração de SEV como fator na possibilidade de óbito em pacientes com mastocitoma cutâneo ($AUC = 0.8526$ $p < 0,05$).....23
- Figura 7.** Concentração de vesículas (SEV) em soro canino com relação a recidiva tumoral de mastocitoma cutâneo. A) Baixa concentração de SEV/mL de soro canino em pacientes apresentaram recidiva de mastocitoma cutâneo. B) Curva ROC representando a concentração de SEV como

fator na possibilidade de recidiva de mastocitoma cutâneo (AUC=0.8036 $p<0,05$). C) Representação gráfica (teste Log-Rank) de menor taxa de sobrevida em pacientes caninos que apresentaram recidiva de mastocitoma cutâneo (linha vermelha) em relação a pacientes sem recidiva tumoral (linha azul) ($p<0,05$).....24

Figura 8. Concentração de SEV em cães com mastocitoma cutâneo em relação a presença de sinais clínicos decorrentes da degranulação de mastócitos. A) Concentração de SEV/mL de soro em cães sintomáticos e assintomáticos ($p<0,05$). B) Representação gráfica (teste Log-Rank) de menor taxa de sobrevida em pacientes caninos que apresentaram sinais clínicos decorrentes da degranulação de mastocitoma (linha vermelha) em relação a pacientes assintomáticos com mastocitoma (linha azul) ($p<0,05$).....26

Figura 9. Concentração de SEV em cães com mastocitoma cutâneo graduados de acordo com Kiupel ($p>0,05$).....27

1. INTRODUÇÃO

Mastocitomas são neoplasmas cutâneos frequentes em cães sendo proposta associação com lesões inflamatórias crônicas cutâneas, exposição à agentes irritantes, além de mutações no gene *c-KIT* relacionados a sua etiologia (Natividade et al., 2014; Mochizuki et al., 2017).

O grau histológico do mastocitoma está relacionado ao prognóstico, podendo ser graduado em I, II ou III de acordo com Patnaik, ou alto e baixo grau, de acordo com Kiupel (Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2011). A graduação histológica do mastocitoma canino associada a fatores prognósticos permitem prever comportamento biológico do tumor e direcionar o tratamento. Os principais fatores prognósticos considerados são raça, sinais sistêmicos, localização tumoral, graduação histopatológica, taxa de mitose, taxa de proliferação celular pelo Ki-67 e *c-KIT* (De Nardi et al., 2018).

Células saudáveis ou tumorais liberam no espaço extracelular nanovesículas, ou SEV (*“small extracellular vesicles”*), como os exossomos que apresentam de 20 a 150nm, sendo altamente heterogêneos quanto ao seu conteúdo e refletindo o estado fenotípico da célula (Yu et al., 2015). São compostos por camada bilipídica, carreando proteínas, miRNA (microRNA), RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucleico) (Kalluri, 2016). As SEV podem ser isolados de soro e plasma sanguíneo, saliva, urina ou sêmen (Yu et al., 2015).

A quantidade de SEV e a composição de miRNA exossomal diferem entre pacientes com câncer e saudáveis (Barger et al., 2016). SEV e os miRNAs são considerados potentes biomarcadores não invasivos de diagnóstico, prognóstico e resposta terapêutica do câncer na medicina veterinária (Siravegna et al., 2017; Ushio et al., 2019; Garnica et al., 2020).

O presente trabalho teve como objetivo a quantificação de SEV em cães com mastocitoma cutâneo em relação a pacientes considerados hígidos, avaliando a relação das vesículas extracelulares, quanto ao seu tamanho e concentração no comportamento do mastocitoma cutâneo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastocitoma cutâneo em cães

O mastocitoma é definido pela proliferação neoplásica de mastócitos, sendo tumores frequentes em cães e correspondem a cerca de 20% dos tumores malignos cutâneos na espécie (London & Thamm, 2013; Natividade et al., 2014). Os mastócitos tem origem a partir de células-tronco hematopoiética pluripotente, CD34, sendo maturados no seu local de ação, presentes na derme, pulmão, mucosa gástrica e região perivascular. Possuem grânulos citoplasmáticos compostos por substâncias bioativas como heparina, histamina, TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) e proteases (London & Thamm, 2013). A composição dos grânulos é altamente influenciada pelo microambiente que o mastócito se encontra (Strefezzi et al., 2009).

A etiologia do mastocitoma não é totalmente elucidada, sendo proposta associação com lesões cutâneas inflamatórias crônicas, exposição da pele à agentes irritantes e mutações no gene *c-KIT* (Mochizuki et al., 2017; De Nardi et al., 2018). O gene *c-KIT* codifica receptores tirosinaquinase, local de ligação de fatores “stem-cells” em mastócitos, contribuindo para a sobrevivência e proliferação celular desordenada, estando relacionado ao desenvolvimento de mastocitomas (De Nardi et al., 2022).

Comumente os mastocitomas acometem cães adultos a idosos, sendo os animais das raças Boxer, Labrador e Golden Retriever predispostos a ocorrência deste neoplasma (Strefezzi et al., 2009; London & Thamm, 2013; De Nardi et al., 2022). Acometem principalmente região de tronco (50 a 60%), extremidades de membros (25 a 40%) e região de cabeça e pescoço (10%) (Souza et al., 2018). Os nódulos de mastocitoma podem ser únicos ou múltiplos, bem delimitados, elevados em relação à pele, firmes ou macios, pruriginosos, alopecicos, com eritema local ou ulcerações (Daleck et al., 2016).

Sinais como vômito, hematêmese, melena, hematoquezia, anorexia e dor abdominal e até mesmo ocorrência de perfuração estomacal estão relacionados a degranulação de mastócitos, liberando no meio extracelular histamina, heparina e enzimas proteolíticas. Alterações gastrointestinais são observadas devido a liberação de altas concentrações de histamina na corrente sanguínea, estimulando receptores H2 em células parietais, aumentando a produção de ácido gástrico. Associado aos nódulos de mastocitoma é possível a formação de halo avermelhado peritumoral,

eritema e edema, chamado de Sinal de Darrier devido a degranulação local. Estes sinais são considerados como decorrentes de síndrome paraneoplásica (Musser et al., 2018; De Nardi et al., 2022).

O diagnóstico inicial do mastocitoma é baseado em análise citológica através da punção aspirativa com agulha fina (PAAF) da massa tumoral (Scarpa et al., 2014). A PAAF pode auxiliar no diagnóstico da neoplasia e influenciar no planejamento cirúrgico quanto ao tipo e extensão do procedimento, buscando promover ressecção cirúrgica com margens livres (Souza et al., 2018).

A análise histopatológica permite diagnóstico do mastocitoma, além de ser a principal ferramenta para sugerir comportamento tumoral ao permitir determinar fatores prognósticos. A biópsia incisional permite a remoção de fragmento de massa tumoral com auxílio de “punch”, enquanto a biópsia excisional permite a remoção tumoral considerando possível margem de segurança (Warland et al., 2015). A partir da análise histológica do mastocitoma pode ser definido em grau I, II ou III, de acordo com a graduação Patnaik, e em alto grau ou baixo grau, de acordo com a graduação Kiupel et al. (2011), conforme Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Descrição histológica de mastocitomas de acordo com a graduação Patnaik (Adaptado: Patnaik et al., 1984; London & Thamm, 2013).

Grau	Descrição Histológica
Grau I	apresenta células e citoplasma bem definidos, núcleo esférico ou ovóide, raras ou ausentes figuras de mitose, citoplasma com grânulos e coloração celular bem demarcada
Grau II	moderado pleomorfismo celular, núcleos arredondados ou pleomorfismo com granulações intracitoplasmáticas em tamanhos variados e presença de até duas figuras de mitose
Grau III	alta celularidade, acentuado pleomorfismo, núcleo vesicular, arredondado e pleomórfico com nucléolos proeminentes, comum binucleação, presença de três a seis figuras de mitose por campo, assim como áreas de hemorragia, necrose, edema e hialinização do colágeno

Quadro 2 – Descrição histológica de mastocitomas de acordo com a graduação Kiupel (Adaptado: Kiupel et al., 2011; Scarpa et al., 2014).

Grau	Descrição Histológica
Alto	presença de no mínimo 3 células multinucleadas em 10 campos de maior aumento, assim como três núcleos bizarros em 10 campos de maior aumento e cariomegalia
Baixo	demais mastocitomas sem as características do alto grau

A remoção cirúrgica é o tratamento padrão para o mastocitoma, possibilitando o controle da doença a longo prazo (Donnelly et al., 2013; Miller et al., 2014).

Preconiza-se a remoção cirúrgica do nódulo incluindo 3cm de margens laterais da lesão macroscópica e a remoção de uma fáscia muscular adjacente, associado a linfadenectomia regional (Lejeune et al., 2013; Marconato et al., 2018). Quando a remoção cirúrgica por técnicas convencionais não é suficiente para obtenção de margens livres, é possível a aplicação de técnicas reconstrutivas como retalhos ou enxertos cutâneos e/ou radioterapia ou a eletroquimioterapia em leito cirúrgico (Spugnini et al., 2006; Castro et al., 2015).

A graduação histopatológica associada com marcadores imuno-histoquímicos são fundamentais na compreensão do comportamento biológico, prognóstico e predição da resposta quimioterápica do mastocitoma (Costa, 2015; De Nardi et al., 2018). Os anticorpos que melhor caracterizam o mastocitoma são Ki-67 e *c-KIT* (Strefezzi et al., 2009). O número relativo de células imunomarcadas para Ki-67 é utilizado para determinar o índice de proliferação celular (Vascarelli et al., 2012). Valores de índice de proliferação celular a partir de Ki-67 acima de 23 células em cinco campos de maior aumento estão relacionados a altos riscos de recidiva tumoral e metástase (Warland et al., 2015; Calazans et al., 2016).

C-KIT é um receptor de membrana, determinado pelo gene *c-KIT*, com atividade de tirosina quinase para “stem cells factor” que estimula o crescimento de mastócitos. A mutação no gene *c-KIT*, sendo mais comum do tipo duplicação interna em tandem (ITD) nos éxons 8 ou 11, promove a contínua fosforilação da porção citoplasmática do receptor, independente da presença de “stem cells factor”, estimulando a multiplicação de mastócitos neoplásicos de modo descontrolado (Willmore-Payne et al., 2005; De Nardi et al., 2022). A presença de mutação no gene *c-KIT* em éxon 11 é relacionada com redução da sobrevida e incidência de recidiva local e metástase, frequentemente observadas em mastocitomas grau II e III (Costa, 2015).

Com o objetivo de definir o comportamento biológico do mastocitoma cutâneo canino e direcionar tratamento, alguns fatores prognósticos podem ser considerados como grau histopatológico Patnaik e Kiupel, índice mitótico, raça, localização tumoral, número de lesões, recidiva, presença de metástase a distância e em linfonodo regional, expressão de Ki-67 e padrão de expressão do *c-KIT* (Poggiani et al., 2012; Horta et al., 2018; De Nardi et al., 2022).

A sobrevida de cães com mastocitoma cutâneo está relacionada ao grau histopatológico do tumor de acordo com a classificação Patnaik. Logo pacientes com mastocitoma grau I apresentaram maior taxa de sobrevida que pacientes com grau II, e consequentemente pacientes com mastocitoma grau III menor sobrevida (Strefezzi et al., 2009). De acordo com a classificação histopatológica proposta por Kiupel et al., (2011), pacientes com mastocitomas cutâneo alto grau apresentaram menor tempo até a ocorrência de metástase ou recidiva, assim como menor taxa de sobrevida.

O índice mitótico é avaliado microscopicamente em 10 campos de grande aumento, sendo considerado um fator prognóstico do mastocitoma independente das características histopatológicas. Logo, índice mitótico acima de 5 em 10 campos de grande aumento ou maiores taxas mitóticas estão associadas a menor sobrevida em cães com mastocitoma cutâneo (Romansik et al., 2007).

Algumas raças demonstram predisposição ao desenvolvimento de mastocitomas, como Pug e Boxer sendo tumores menos agressivos. Diferindo dos cães da raça Shar-pei, principalmente os mais jovens, os quais tendem a apresentar mastocitomas pouco diferenciados e com comportamento biológico agressivo (Blackwood et al., 2012; De Nardi et al., 2022).

Estudos demonstram que mastocitomas localizados em cavidade oral, leito ungueal, região inguinal, perineal ou prepucial exibem, com frequência, comportamento de malignidade (De Nardi et al., 2022). O número de nódulos de mastocitoma cutâneo em cães pode ser considerado um fator prognóstico, uma vez que estudos reportam pior prognóstico em pacientes com múltiplas lesões (Kiupel et al., 2005). Enquanto outros trabalhos reportam que pacientes com múltiplos nódulos de mastocitoma apresentaram baixo grau histológico (Poggiani et al., 2012).

Sendo o mastocitoma cutâneo um neoplasma com comportamento extremamente variável, aproximadamente 50% são considerados agressivos, com possibilidade de recidiva e/ou metástase em 80% dos casos (Strefezzi et al., 2009; Stefanello et al., 2015). As metástases podem ser observadas em linfonodos regionais, baço e fígado e menos comumente em medula óssea, sendo caracterizada por quadros de mastocitose (Strefezzi et al., 2009; De Nardi et al., 2022). Aproximadamente 20% dos cães com mastocitoma cutâneo apresentam metástase em linfonodo regional no momento do diagnóstico, estando associado a redução da

sobrevida (Marconato et al., 2018). Recidivas de mastocitoma cutâneo estão associadas a maiores taxas de óbito, como descrito por Horta et al. (2018), onde 80% dos pacientes com recidiva vieram a óbito.

A determinação da expressão de ki-67 é realizada a partir da imunomarcção de núcleos positivos em 5 campos de maior aumento, sendo acima de 23 células positivas associado com alto risco de recidiva ou ocorrência de metástase (Webster et al., 2007). O padrão *c-KIT* é avaliado a partir da imunomarcção do receptor em membrana citoplasmática, focal ou de forma difusa em citoplasma, também denominados padrão I, II ou III (Horta et al., 2018). Os padrões focal e difuso, ou seja, II e III estiveram associados a prognósticos desfavoráveis, principalmente padrão III (De Nardi et al., 2018; Thamm et al., 2019).

Assim como os fatores prognósticos relacionados ao mastocitoma cutâneo em cães, é possível o estadiamento clínico (Quadro 3) proposto pela Organização Mundial da Saúde (WHO – World Health Organization). Ambos permitem definir prognóstico do paciente e opção terapêutica (De Nardi et al., 2022).

Quadro 3 – Sistema de estadiamento clínico para mastocitoma cutâneo em cães proposto pela WHO (Adaptado: De Nardi et al., 2022)

Estágio	Descrição
0	Um tumor excisado incompletamente da derme, identificado histologicamente, sem linfonodo regional envolvido a) Sem sinais sistêmicos b) Presença de sinais sistêmicos
I	Um tumor confinado a derme, sem linfonodo regional envolvido a) Sem sinais sistêmicos b) Presença de sinais sistêmicos
II	Um tumor confinado a derme, com envolvimento de linfonodo regional a) Sem sinais sistêmicos b) Presença de sinais sistêmicos
III	Múltiplos nódulos cutâneos; nódulos infiltrativos, com ou sem linfonodo regional envolvido a) Sem sinais sistêmicos b) Presença de sinais sistêmicos
IV	Qualquer nódulo com metástase distante, incluindo sangue ou medula óssea envolvidos

O tratamento inicial preconizado para mastocitoma cutâneo canino é a cirurgia com amplas margens livres, como citado anteriormente. Entretanto, fatores prognósticos definirão a necessidade de terapia quimioterápica adjuvante (Camps-Palau et al., 2007). A quimioterapia antineoplásica é indicada principalmente para o tratamento de mastocitomas disseminados, irressecáveis, classificados como alto

grau/grau II ou III, relacionados a fatores prognósticos negativos ou para doença residual microscópica (Donnelly et al., 2013; Jark et al., 2013; Varela et al., 2016).

Atualmente consideram-se o uso de corticóide, vimblastina e lomustina como os principais agentes quimioterápicos e o uso de inibidores de tirosina quinase para o tratamento sistêmico do mastocitoma cutâneo (Thamm et al., 1999; Varela et al., 2016). Porém, não há padrão-ouro de tratamento quimioterápico para mastocitoma canino (Olsen et al., 2018).

2.2 Nanovesículas extracelulares

Células saudáveis e tumorais liberam no espaço extracelular nanovesículas durante diversos processos fisiológicos e patológicos (Zmigrodzka et al., 2019). As nanovesículas, ou SEV (“small extracellular vesicles”), podem ser classificadas em três grupos, de acordo com seu tamanho e mecanismo de formação: exossomos (20-150nm), microvesículas (100-1µm) e corpos apoptóticos (1-5 µm) (Yu et al., 2015; Osaki e Okada, 2019).

As SEV são originadas a partir de vesículas endossomais, sendo heterogêneas quanto ao seu conteúdo e refletindo o estado fenotípico da célula (Li et al., 2017). A formação e liberação no meio extracelular ocorrem através dos processos de iniciação, endocitose, formação de corpo multivesicular e liberação de pequenas vesículas (Xu Zhang et al., 2015).

Inicialmente ocorre o encapsulamento da membrana celular e formação do endossomo (Figura 1). Este endossomo sofre maturação, tendo agora em seu interior múltiplas vesículas (corpo multivesicular) contendo proteínas, ácidos nucleicos, miRNA e fragmentos de DNA. O corpo multivesicular pode sofrer degradação pelos lisossomos ou sofrer fusão com a membrana celular e secretar no meio extracelular diversas vesículas, agora chamadas de SEV (Figura 2) (Xu Zhang et al., 2015; Tai et al., 2018; Osaki e Okada, 2019).

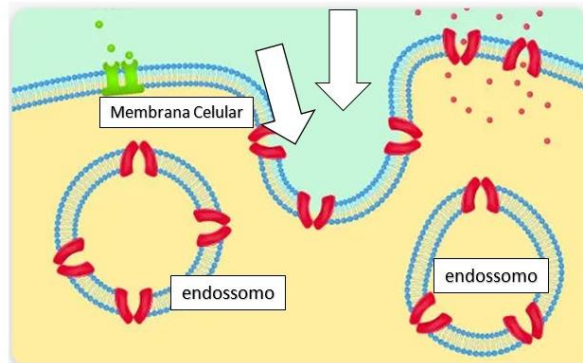


Figura 1. Esquema ilustrativo do processo de formação do endossomo, a partir do encapsulamento da membrana celular. Processo denominado de endocitose, sendo a fase inicial para a formação das vesículas extracelulares. Adaptado: Santos et al., 2022.

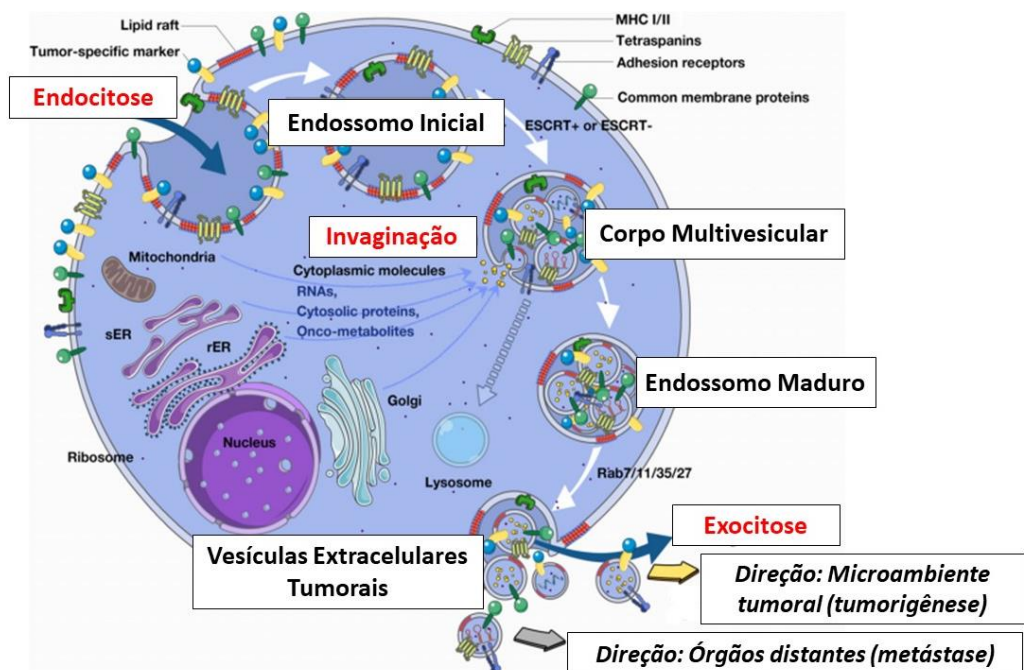


Figura 2. Formação das vesículas extracelulares tumorais. Após o processo de endocitose, o endossomo inicial sofre invaginações mediadas pelas proteínas ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required For Transport), formando o corpo multivesicular. Este último pode sofrer degradação pelos lisossomos ou sofrer fusão com a membrana celular por meio da ação das moléculas reguladoras do tipo Rab. As vesículas liberadas no meio externo à célula podem atuar na formação tumoral ou formação de metástase, atuando na comunicação intercelular. Adaptado: Tai et al., 2018.

A endocitose, ou seja, processo de formação do endossomo, é mediada por receptores específicos de membrana como as tetraparinas (CD9, CD63, CD82), MHC classe I e II (*Major Histocompatibility Complex*) e moléculas de adesão como as integrinas e caderinas (Ruivo et al., 2017; Tai et al., 2018; Pegtel e Gould, 2019). A maturação intracelular do endossomo inicial em corpo multivesicular envolve a ação de proteínas ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required For Transport*) e a via independente da ação de ESCRT. Proteínas como ESCRT-0, I, II e III formam complexos estimulando o acúmulo de vesículas no interior do corpo multivesicular (Osaki e Okada, 2019).

Estudos recentes demonstram que as SEV são secretadas no meio extracelular por meio do processo de brotamento ou quando ocorre inibição da proteína ESCRT e por meio da ação das moléculas reguladoras Rab7, Rab11, Rab27a, Rab27b e Rab35 (Zhang et al., 2015; Tai et al., 2018). Sendo a membrana das SEV formada por componentes do endossomo, se faz repleta de proteínas e moléculas de transporte e fusão como GTPases, anexinas, lipídeos como colesterol e ceramidas, assim como tetraparinas específicas como CD9, CD63, CD81 e CD82 (Brinton et al., 2015; Javeed e Muckopadhyay, 2017). Logo, devido a composição da membrana é possível sua entrada em células receptoras (Chan et al., 2019).

A fusão e transferência de SEV para a célula-alvo pode ocorrer por meio de três processos. Primeiro, as proteínas transmembranas das vesículas interagem diretamente com receptores de sinalização das células-alvo. Segundo, através da fusão de membranas plasmáticas da célula-alvo e vesículas. E terceiro, por meio de endocitose e posterior fagocitose pela célula-alvo, sendo a forma de maior captação (Xu Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Após se fundirem com a célula-alvo as SEV liberam seu conteúdo no citoplasma (Kalluri, 2016). Estudos revelam que o conteúdo liberado pelas vesículas atua como modulador da comunicação entre células próximas e distantes, influenciando processos fisiológicos e patológicos ao transferirem o seu conteúdo no meio intracelular de outra célula (Li et al., 2015; Golchin et al., 2018; Jayachandran et al., 2018).

As SEV são secretadas por diversas células como reticulócitos, linfócitos, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, assim como por células tumorais (Li et al., 2017;

Tai et al., 2018). Podendo ser isolados de diversos fluídos como soro e plasma sanguíneo, saliva, urina, leite e sêmen (Yu et al., 2015; Mihelich et al., 2016; Narita et al., 2019). Diversos fatores extracelulares e intracelulares contribuem para o mecanismo de secreção de pequenas vesículas como desordens inflamatórias, processos tumorais, condições de estresse celular como hipóxia, radiação γ e redução do pH (Barger et al., 2016; Kalluri, 2016).

O conteúdo interno das SEV varia de acordo com o tipo celular de origem. De modo geral carregam DNA, RNA, mRNA, miRNA, fragmentos de citoesqueleto, peptídeos e moléculas MHC classe I e II (Javeed e Muckopadhyay, 2017). Considerando a membrana bilipídica das vesículas derivada do processo de endocitose, é possível proteger o conteúdo carregado da ação de proteínas de degradação como RNases e outras proteases no meio extracelular, aumentando a capacidade de comunicação intercelular (Lin et al., 2015; Meehan e Vella, 2015; Tai et al., 2018; Simundic et al., 2019).

As nanovesículas possuem função na modulação da resposta imune e inflamatória, entretanto sua atuação no processo oncológico tem sido intensamente estudada nos últimos anos (Ruivo et al., 2017; Chan et al., 2019). Exossomos são descritos como possíveis promotores na progressão tumoral, metástase, indução a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e resposta à terapia através da transferência de miRNA entre células do câncer e estroma tumoral (Garzon et al., 2006; Lin et al., 2015; Kalluri, 2016; Sammarco et al., 2018).

De acordo com “Hallmarks of Cancer”, elaborado por Hanahan e Weinberg em 2000 e atualizado em 2022 (Hanahan, 2022), a tumorigênese ocorre em diversas etapas que são reflexo de modificações genéticas levando a alterações na fisiologia celular. Por exemplo autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão de sinais de apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese e capacidade de metástase. Estudos reportam o papel de nanovesículas originados de células tumorais como atuantes na progressão do câncer (Meehan e Vella, 2015; Ruivo et al., 2017; Zamboni et al., 2023).

A produção e liberação de vesículas no meio extracelular é um processo coordenado e alterado no câncer (Briton et al., 2015). Estima-se que são contabilizados aproximadamente 2000 trilhões de exossomos, um exemplo de

nanovesículas, no sangue de pacientes humanos saudáveis, enquanto pacientes com câncer apresentaram 4000 trilhões (Jayachandran et al., 2018). Além de alterações na concentração de vesículas extracelulares no processo tumoral, também é possível alterações nos componentes carregados, como miRNA e demais proteínas (Brady et al., 2018). As vesículas originadas de células tumorais são responsáveis pela indução da angiogênese, aumento da permeabilidade vascular no microambiente tumoral, evasão do sistema imune, progressão tumoral, invasão da matriz extracelular e metástase. (Muralidharan-Chari et al., 2010; Brinton et al., 2015, Jayachandran et al., 2018).

A comunicação mediada por SEV não se limita apenas entre às células tumorais, incluindo também o microambiente tumoral, local e à distância (Javeed e Muckopadhyay, 2017). As vesículas extracelulares derivadas de tumores podem transportar fragmentos de DNA, RNA, miRNA e oncogenes, assim como fator TGF- β (“*Transforming Growth Factor- β* ”) atuando em fibroblastos saudáveis levando à diferenciação destes em miofibroblastos (Osaki e Okada, 2019). Estudos reportam o papel das SEV tumorais na formação do nicho pré-metastático (Javeed e Muckopadhyay, 2017; Tai et al., 2018).

A identificação de SEV é realizada por meio de biópsia líquida de fluídos, sendo um processo minimamente invasivo (Jayachandran et al., 2018; Pegetl e Gould, 2019). A biópsia líquida é realizada inicialmente pela centrifugação do fluido corporal como soro ou plasma sanguíneo, saliva, urina ou sêmen. Seguido pela ultracentrifugação e ultrafiltração da amostra para isolamento em tempos distintos (Brett et al., 2015; Siravegna et al., 2017).

O tamanho e a concentração de SEV podem ser determinados através da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – “*Nanoparticle Tracking Analysis*”). NTA é uma técnica de caracterização que combina as propriedades da microscopia de espalhamento de luz a laser e o movimento browniano para obtenção da distribuição de tamanho de partículas em suspensão líquida (Soo et al., 2012; Vestad et al., 2017). Por meio de instrumentos de NTA e NanoSight acoplados à câmera digital é possível a identificação de partículas entre 10 a 2000nm em meio líquido (Vestad et al., 2017).

O potencial das nanovesículas para diagnóstico e tratamento de diferentes doenças vem sendo investigado nos últimos anos, pois o tamanho, concentração e composição podem fornecer importantes informações clínicas (Vestad et al., 2017). As SEV de origem tumoral e a análise de seu conteúdo são potenciais fontes para diagnóstico do câncer, assim como para obtenção de informações sobre resposta diante do tratamento, possíveis fatores reguladores da progressão tumoral, fatores prognósticos, comportamento e metástase, permitindo monitorar a doença e o tratamento de forma menos invasiva (Kalluri, 2016; Siravegna et al., 2017). Estudos têm sido conduzidos na tentativa de caracterizar as vesículas extracelulares e a sua correlação com o câncer, devido a concentração de SEV, seu tamanho e composição de miRNA diferir entre pacientes saudáveis e oncológicos (Berlung et al., 2015; Agarwal et al., 2021).

Atualmente na medicina veterinária as vesículas extracelulares e o seu conteúdo são estudados como um potencial biomarcador não invasivo de diagnóstico e valor prognóstico (Zmigrodzka et al., 2019). Em pacientes com linfoma é possível observar aumento na concentração de SEV em cães com linfoma multicêntrico em doença progressiva e a expressão de miRNA diferindo na doença progressiva e na doença em remissão em cães. Dessa forma é possível a avaliação da resposta terapêutica do linfoma por meio da biópsia líquida em cães (Garnica et al., 2020).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo a quantificação de pequenas vesículas extracelulares a partir de soro sanguíneo de cães diagnosticados com mastocitoma cutâneo. A partir da quantificação de SEV, identificar possíveis diferenças nos valores entre cães com mastocitoma cutâneo e animais considerados hígidos; associação do tamanho e a concentração de nanovesículas extracelulares aos fatores prognósticos relacionados ao mastocitoma cutâneo no cão e relacionar a quantificação de SEV como fator prognóstico associado à sobrevida de cães com mastocitoma cutâneo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalações e Seleção dos Pacientes

O presente projeto foi desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal – SP. O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV, Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, protocolo número 09484/19. Foram coletados dados e amostras entre outubro/2019 a fevereiro/2021.

Foram selecionados cães com idade mínima de 3 anos atendidos pelo Serviço de Oncologia Veterinária ou Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, apresentando um ou mais nódulos cutâneos com laudo citológico e/ou histopatológico compatível com mastocitoma cutâneo. Nos pacientes com mastocitoma foram observados os principais fatores prognósticos como grau histopatológico Patnaik e Kiupel, índice mitótico, raça, localização tumoral, número de lesões, recidiva, presença de metástase e linfonodo regional, expressão de Ki-67 e padrão de expressão de *c-KIT*.

Foram considerados como critérios de exclusão os pacientes com outros tipos tumorais concomitantes, presença de comorbidades, presença imagens sugestivas de metástase a distância através de exames de imagem, realização prévia de quimioterapia ou cirurgia prévia para exérese tumoral de mastocitoma.

Como grupo controle considerou-se cães hígidos provenientes da Unidade Didática Clínica Hospitalar de Medicina Veterinária (UDCH) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), da Universidade de São Paulo (USP), Campus Fernando Costa (Pirassununga – SP). Selecionou-se pacientes que não estavam em tratamento para alguma enfermidade nos últimos 6 meses, que não tenham sido submetidos a procedimentos cirúrgicos nos últimos 6 meses e sem alterações nutricionais, protocolo vacinal e de vermifugação em dia, conforme seleção prévia por Garnica e colabores (2020).

4.2 Procedimentos Pré-Cirúrgicos e Transcirúrgicos

Os pacientes selecionados com mastocitoma cutâneo foram submetidos à avaliação clínica e exames de hemograma e avaliações bioquímicas séricas de

alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinina, ureia e albumina. O estadiamento clínico de cada paciente foi realizado através de ultrassonografia abdominal e radiografias de tórax nas projeções látero-lateral esquerda, látero-lateral direita e ventrodorsal. Cães acima de 7 anos ou com alterações cardíacas à ausculta foram encaminhados para avaliação cardiológica com realização de ecocardiograma e eletrocardiograma. Posteriormente a realização dos exames, os cães com exames dentro da normalidade foram encaminhados para remoção cirúrgica dos nódulos cutâneos de mastocitoma.

A ressecção cirúrgica dos nódulos incluiu a remoção de margens radiais de 3cm e inclusão de fáscia muscular adjacente, livres de tecidos neoplásicos, seguida de linfadenectomia regional. Como protocolo anestésico preconizou-se o uso prévio de acepromazina¹ (0,02mg/kg, via intramuscular), metadona² (0,2mg/kg, via intramuscular) e prometazina³ (0,5mg/kg, via intramuscular). Indução de plano anestésico com uso intravenoso de propofol⁴ (5mg/kg) e manutenção com uso inalatório de isoflurano⁵ 1 a 3% diluído em 100% de oxigênio. Como protocolo analgésico imediatamente ao procedimento cirúrgico, foi instituído uso de metadona² (0,5mg/kg, via intramuscular), dipirona sódica⁶ (25mg/kg, via intramuscular) e meloxicam⁷ (0,1mg/kg, via subcutâneo). Aos dias subsequentes, administração de cloridrato de tramadol (5mg/kg, via oral, TID) e dipirona sódica (25mg/kg, via oral, TID) por 5 dias, uso de meloxicam (0,1mg/kg, via oral, SID) por 3 dias, cefalexina (20mg/kg, via oral, SID) por 7 dias e limpeza da ferida diariamente com solução fisiológica 0,9%. Aos 10 dias de pós-operatório foi realizada a remoção dos pontos a partir da adequada cicatrização da ferida cirúrgica.

¹ Apromazin® - Acepromazina 0,2%, solução injetável – Syntec – Tamboré, SP, Brasil.

² Mytedom® - Cloridrato de Metadona 10mg, solução injetável – Cristália – Itapira, SP, Brasil.

³ Pamergan® - Cloridrato de Prometazina 25mg, solução injetável – Cristália – Itapira, SP, Brasil.

⁴ Propovan® - Propofol 10mg, emulsão injetável – Cristália – Itapira, SP, Brasil.

⁵ Isoforine® - Isoflurano – Cristália, Itapira, SP, Brasil.

⁶ D500® - Dipirona Sódica 500mg, solução injetável – Zoetis – Campinas, SP, Brasil.

⁷ Flamavet® - Meloxicam 0,2%, solução injetável – Agener – São Paulo, SP, Brasil.

4.3 Coleta das amostras sanguíneas e tecido neoplásico

As amostras de sangue do grupo controle foram coletadas durante atendimento clínico, enquanto as amostras dos pacientes com mastocitoma foram coletadas antes do procedimento cirúrgico de ressecção tumoral. As amostras foram coletadas por meio de venopunção de jugular utilizando agulha 27x7mm e seringa de 5ml descartáveis, obtendo 3mL de sangue total armazenados em tubo de coleta sem anticoagulante. Com a formação de coágulo em 30 a 60 minutos após a coleta, a amostra foi centrifugada⁸ em 1500rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O soro sanguíneo em suspensão foi separado e armazenado em criotubos e congelado em freezer -86°C, baseado em Garnica et al. (2020).

O tecido removido assim como linfonodo regional foram encaminhados para o Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, Unesp, Câmpus Jaboticabal-SP. As amostras tumorais foram identificadas e encaminhadas em solução de formaldeído tamponado 10%, com pH entre 7,2-7,4 para posterior processamento e análise microscópica por patologista veterinário.

4.4 Análise Histopatológica

O tecido neoplásico excisado foi mantido em solução de formaldeído tamponado 10% com pH entre 7,2-7,4 durante 48 horas, e posteriormente processado e incluído em parafina para realização dos cortes histológicos. Os cortes foram realizados em micrótomo com espessura de 4µm e incluídos em lâminas de microscopia para proceder as reações específicas.

Para avaliação histoquímica utilizou-se a coloração com hematoxilina-eosina e azul de toluidina e análise dos cortes por patologista definindo o grau histológico do mastocitoma cutâneo de acordo com a classificação de Patnaik et al. (1984) em grau I, II ou III; classificação de Kiupel et al. (2011) em alto ou baixo grau. Análise quanto ao índice mitótico em 10 campos de grande aumento (40X); presença ou ausência de invasão vascular por mastócitos; necrose tumoral; células multinucleadas; avaliação das margens cirúrgicas obtidas quanto livres, exíguas ou comprometidas e avaliação

⁸ Centrífuga PARSEC® - Modelo Winchester CT 0603.

do linfonodo regional quanto à presença de mastócitos tumorais.

Pacientes com múltiplos nódulos de mastocitoma, considerou-se o resultado histopatológico de pior prognóstico, de acordo com De Nardi et al. (2022). Foi solicitada a realização de exame de imuno-histoquímica para os marcadores *c-KIT* e Ki67 em laboratório particular externo, de acordo com a disponibilidade dos tutores.

Os fatores prognósticos relacionados ao mastocitoma em cães como raça, sinais sistêmicos, localização tumoral, graduação histopatológica, taxa de mitose, padrão de expressão de *c-KIT* e Ki67 foram identificados a partir da anamnese, exame físico e avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

4.5 Isolamento e caracterização das vesículas extracelulares

As amostras de soro armazenadas em criotubos em freezer -86°C foram encaminhadas para o Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), USP, Campus “Fernando Costa”, Pirassununga – SP, sob orientação do Prof. Dr. Heidge Fukumasu. Baseado em Garnica et al. (2020) as pequenas vesículas extracelulares (SEV – “small extracellular vesicles”) foram obtidas de soro sanguíneo canino mediante processamento a partir da centrifugação consecutivas: 4°C a 300rpm por 10 minutos para retirada de células, 2000rpm por 10 minutos para retirada de debris celulares e 16500 xg por 30 minutos para retirada de vesículas extracelulares maiores. Para obtenção do precipitado rico em vesículas extracelulares pequenas (menores que 200 nm) as amostras foram filtradas em poros de 0,20 µm (Corning) e ultracentrifugado⁹ a 119700rpm por 70 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado foi diluído em tampão fosfato-salino (1xPBS) livre de cálcio e magnésio e ultracentrifugado novamente em 119700rpm por 70 minutos a 4°C.

O precipitado enriquecido com vesículas extracelulares pequenas foi diluído em 30µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio para posterior análise de NTA (“Nanoparticle Tracking Analysis”). Do volume total do “pellet”, 5 µL foram diluídos em 495 µL de 1xPBS para avaliação de tamanho e concentração de partículas com auxílio do aparelho NanoSight¹⁰. Foram obtidos para análise cinco vídeos de 30 segundos

⁹ Optima XE-90 Ultracentrifuge; rotor 70 Ti; Beckman Coulter.

¹⁰ NS300; NTA 3.4 Build 3.1.45; Malvern.

cada, em temperatura controlada a 37°C, Camera Level 13 e considerando threshold 5, por amostra.

4.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados com o teste Pearson e para duas comparações entre grupos aplicou-se o teste T não pareado ou Mann-Whitney, assim como Teste D'Agostini para avaliação de sobrevida. As curvas ROC foram aplicadas para definição de valor preditivo dos exames avaliados. Os valores de P foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Para análise dos dados utilizou-se o software GraphPad Prisma.

5. RESULTADOS

5.1 Pacientes selecionados

Foram selecionados 20 cães com diagnóstico citológico e histopatológico de mastocitoma cutâneo e 30 cães hígidos para composição do grupo controle. A média de idade foi de 9 anos (4 a 16 anos) no grupo mastocitoma e 3,4 anos (0,5 a 15 anos) no grupo controle. Dentre os cães com mastocitoma foram incluídos 17 fêmeas e 3 machos, todos castrados.

Com relação aos animais hígidos do grupo controle foram selecionados cães sem padrão racial definido (13), Border Collie (3), Golden Retriever (2), Labrador Retriever(2), Shih Tzu (2), Lhasa Apso (1), Pastor Alemão (1), Maltês (1), Australian Cattle Dog (1), Pinscher (1), Pittbull (1), Pastor Branco Suíço (1) e Yorkshire (1).

Os cães sem padrão racial definido (SRD) foram observados com maior frequência no grupo mastocitoma, sendo 8 animais, seguido das raças Boxer (2), Dachshund (2), Labrador (2), Bulldogue Francês (1), Chow-Chow (1), Galgo (1), Pinscher (1), Poodle (1) e Shar-pei (1) (Figura 3).

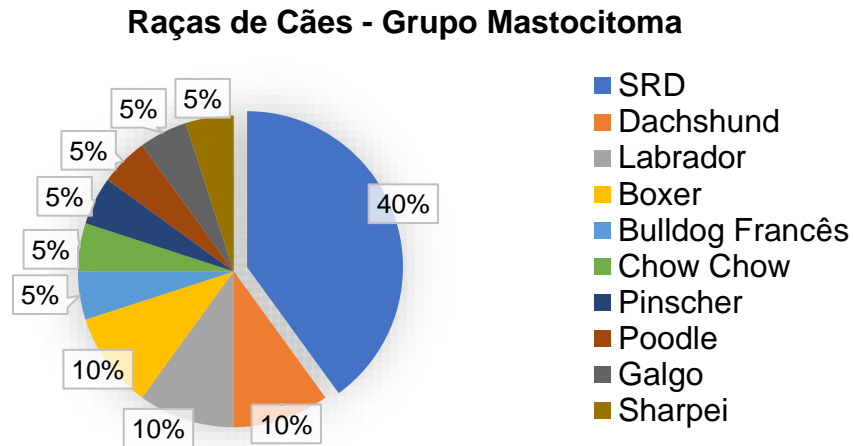


Figura 3. Representação gráfica de análise quantitativa de raças de cães com diagnóstico de mastocitoma cutâneo no período experimental de outubro/2019 a fevereiro/2021. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2022.

A presença de sinais sistêmicos como vômito, náusea, hematêmese, hematoquezia, dor abdominal e/ou Sinal de Darrier, decorrentes da possível degranulação de mastócitos neoplásicos, foi relatada em cinco cães no momento do diagnóstico. Sendo dois cães com diagnóstico de mastocitoma alto grau/grau II, um considerado alto grau / grau II e dois classificados em baixo grau / grau II. Com relação aos cinco pacientes, apresentaram sobrevida média de 186 dias (20 a 356 dias), entretanto quatro vieram a óbito em decorrência do mastocitoma cutâneo no período analisado.

O período de evolução da neoplasia, ou seja, desde a observação da lesão ao diagnóstico foi de 126 dias (10 a 365 dias). Com relação ao número de lesões, 15 cães apresentavam nódulos únicos e cinco cães apresentavam múltiplos nódulos de mastocitoma cutâneo. Oito cães apresentavam nódulos de mastocitoma em região de cabeça, dígito ou perineal. Entretanto não houve diferença estatística com relação a sobrevida média entre pacientes com mastocitoma cutâneo em região de cabeça, dígito ou perineal para as demais localizações observadas no presente estudo.

A sobrevida média dos pacientes do grupo mastocitoma foi de 350,1 dias (20 a 491 dias). Com relação aos pacientes com mastocitoma baixo grau / grau I houve sobrevida média de 483,5 dias (dois cães); pacientes com mastocitoma baixo grau / grau II de 181,6 dias (oito cães); pacientes com mastocitoma alto grau / grau II de 156,3 dias (quatro cães) e para pacientes com mastocitoma alto grau / grau III de 102

dias (seis cães), demonstrando diferença estatística entre os grupos quanto análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) (Figura 4).

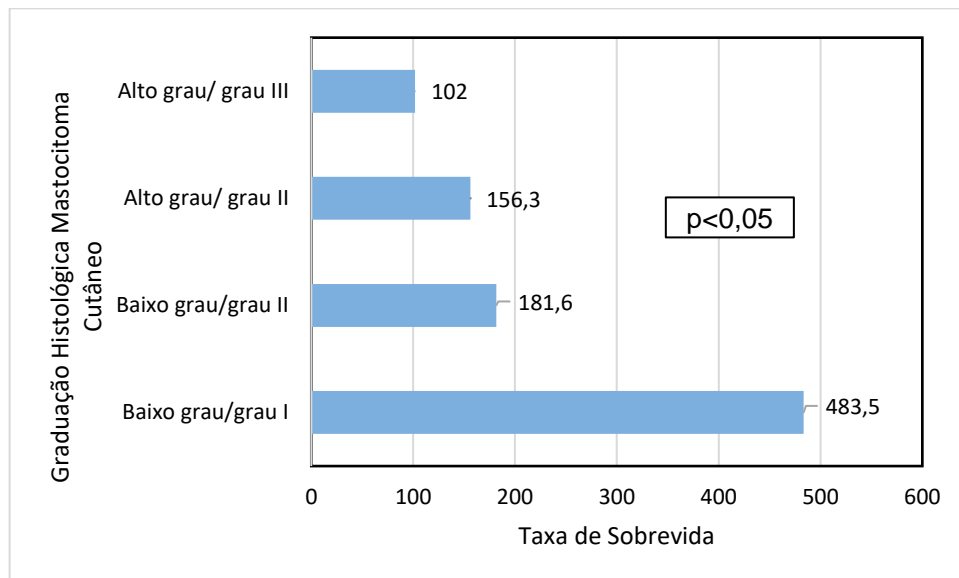


Figura 4. Representação gráfica em barra a partir de análise de variância (ANOVA) entre os graus histológicos Kiupel (baixo ou alto) e Patnaik (I, II ou III) e a sobrevida média dos cães com mastocitoma cutâneo. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2022.

Dentre os 20 pacientes com mastocitoma cutâneo analisados, sete apresentaram recidiva tumoral no período observado com sobrevida média de 184 dias (20 a 271 dias) e intervalo livre de doença médio de 166 dias (15 a 200 dias). Com relação aos pacientes com recidiva tumoral, quatro foram mastocitoma alto grau e seis com margens cirúrgicas comprometidas ou exúguas. Vieram a óbito em decorrência do mastocitoma cinco pacientes com recidiva tumoral (71,4% de óbito em pacientes com recidiva).

5.2 Histopatologia

Foram observados 10 pacientes com mastocitoma baixo grau e 10 pacientes com mastocitoma alto grau, de acordo com a classificação Kiupel et al. (2011). Dois pacientes apresentaram mastocitoma grau I, 12 pacientes mastocitoma grau II e seis pacientes mastocitoma grau III, de acordo com a classificação Patnaik et al. (1984). Sendo considerados mastocitoma baixo grau / grau I em dois cães (10%);

mastocitoma baixo grau / grau II em oito cães (45%); mastocitoma alto grau / grau II em quatro cães (15%) e mastocitoma alto grau / grau III em seis cães (30%).

Após a ressecção cirúrgica dos nódulos de mastocitoma cutâneo, as margens tumorais foram classificadas livres em seis pacientes, comprometidas em 11 pacientes e exíguas em três pacientes. Considerando os pacientes com margens livres, houve recidiva em um paciente com mastocitoma alto grau / grau III. Dentre os 14 pacientes com nódulos removidos com margens comprometidas ou exíguas, sete apresentaram recidiva de mastocitoma cutâneo ao longo do período observado e um não foi informado, sendo três considerados mastocitoma alto grau / grau III.

Com relação ao linfonodo regional encaminhado para análise histopatológica, nove não apresentaram metástase (45%) e 11 apresentaram focos metastáticos em linfonodo (55%). Considerando os linfonodos regionais metastáticos, sete ocorreram em mastocitoma alto grau. Os linfonodos regionais livres de focos metastáticos de mastocitoma ocorreram em três pacientes com mastocitoma alto grau (30%).

Índice mitótico foi considerado inferior a cinco figuras de mitose em 10 campos de grande aumento em 14 pacientes (70%) e acima de cinco figuras de mitose em 10 campos de grande aumento em seis pacientes com mastocitoma cutâneo (30%). Dentre os cães com mais de cinco figuras de mitose em 10 campos de grande aumento, sendo cinco cães com mastocitoma cutâneo alto grau/grau III e um alto grau/grau II com sobrevida de 152 dias.

Foram observados focos de invasão vascular por mastócitos neoplásicos em três pacientes, sendo um paciente com mastocitoma baixo grau / grau II, um paciente com mastocitoma alto grau / grau II e um paciente com mastocitoma alto grau / grau III. Nos cães onde foi observada invasão vascular e alto grau histológico Kiupel houve concomitante presença de metástase em linfonodo regional.

A realização de exame de imuno-histoquímica para os marcadores ckit e Ki-67 foi possível em apenas dois pacientes, devido restrição financeira dos demais tutores, tendo viés em possíveis diferenças estatísticas. Foi observado padrão ckit II e Ki-67 > 23% em mastocitoma alto grau / grau III e padrão ckit II e Ki67 < 23% em mastocitoma baixo grau / grau II.

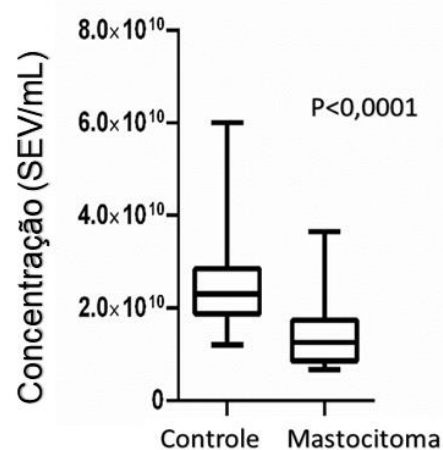
5.3 Caracterização das vesículas extracelulares (SEV) isoladas em soro canino

A partir de mensuração por NTA foi observado o tamanho médio das vesículas extracelulares em pacientes com mastocitoma cutâneo de 140,41nm (108,7 – 164,8nm), sendo em mastocitoma alto grau a média de 198,49nm e em mastocitoma baixo grau 143,4nm. Nos cães do grupo controle a amostra de soro sanguíneo apresentou média de tamanho de vesículas exossomais de 132,69nm (108,6 – 170,90nm).

A concentração de SEV, ou seja, SEV/mL em amostras de soro sanguíneo de cães com mastocitoma cutâneo foi de $1,58 \times 10^{10}$ /mL ($7,20 \times 10^9$ /mL a $2,56 \times 10^{10}$ /mL). Em cães do grupo controle a concentração média de SEV/mL foi de $2,56 \times 10^{10}$ /mL ($1,2 \times 10^{10}$ /mL a 6×10^{10} /mL).

5.3.1 Grupo Controle e Grupo Mastocitoma

Animais do grupo controle apresentaram maior concentração de SEV/mL quando comparados aos cães com mastocitoma ($p < 0,05$) (Figura 5A). A análise mediante curva ROC demonstrou que a mensuração da concentração de SEV abaixo de $1,2 \times 10^{10}$ SEV/mL foi significativa como predição no diagnóstico de mastocitoma cutâneo (AUC 0.8575, $p < 0,001$, 95% CI 0.7453 – 0.9697) (Figura 5B). Animais com mastocitoma apresentaram vesículas em maior tamanho, entretanto não houve diferença significativa com relação aos animais do grupo controle ($p = 0,06$).



A)

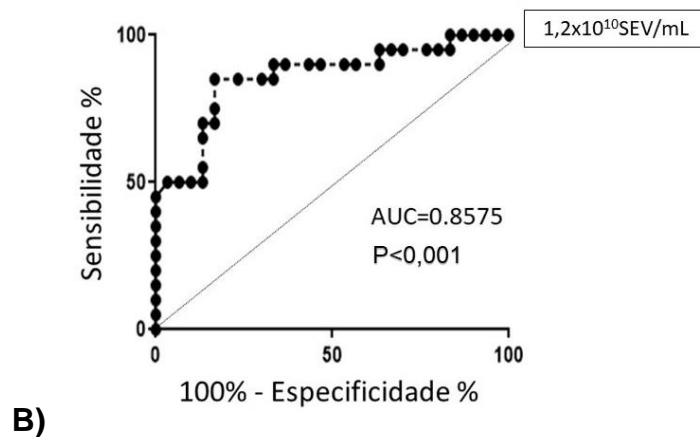


Figura 5. Concentração de vesículas (SEV) em soro canino com relação aos grupos controle e grupo mastocitoma. A) Alta concentração de SEV em animais do grupo controle quando comparado ao grupo de cães com mastocitoma cutâneo ($p < 0,05$). B) Curva ROC representando a avaliação da concentração de SEV como predição no diagnóstico de mastocitoma em cães (AUC=0.8575, $p < 0,05$).

5.3.2 Pacientes vivos e óbitos

Ao analisar a concentração de pequenas vesículas extracelulares (SEV) em soro de cães com mastocitoma houve menor concentração de SEV/mL em cães com mastocitoma que vieram ao óbito em decorrência da neoplasia, quando comparado a concentração de SEV/mL em animais vivos durante o período analisado ($p < 0,05$). Pacientes com mastocitoma com menos de $1,23 \times 10^{10}$ SEV/mL tiveram menor taxa de sobrevida (Figuras 6A e 6B). A análise mediante curva ROC demonstrou que a mensuração da concentração de vesículas extracelulares foi significativa como uma tendência ao menor tempo de sobrevida de cães com mastocitoma cutâneo (AUC 0.8526, $p = 0,0159$, 95% CI 0.7453 – 0.9697) abaixo de $1,23 \times 10^{10}$ SEV/mL (Figura 6C). Entretanto não houve diferença significativa com relação ao tamanho das SEV entre cães com mastocitoma vivos ou que vieram à óbito ($p > 0,05$).

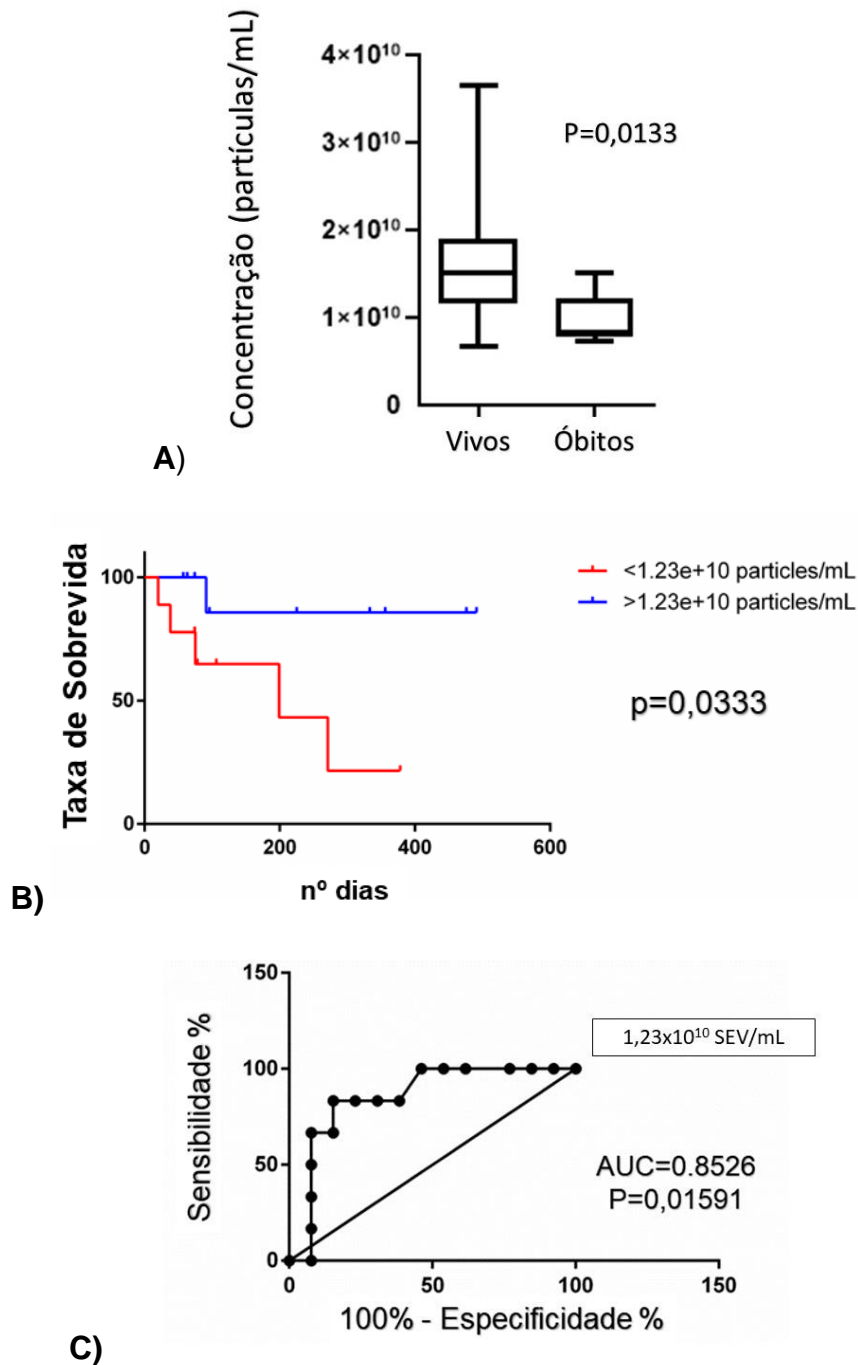
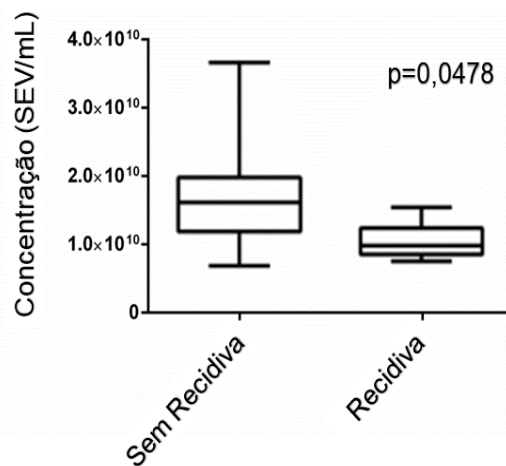


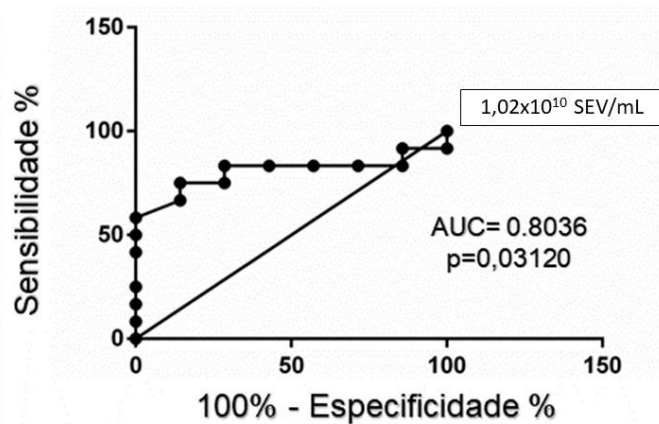
Figura 6. Concentração de SEV em soro de cães com mastocitoma cutâneo com relação ao óbito no período analisado. A) Baixa concentração de SEV/mL de soro canino em pacientes que vieram a óbito em decorrência de mastocitoma cutâneo. B) Representação gráfica (teste Log-Rank) de menor concentração de SEV/mL de soro canino em pacientes que vieram a óbito ao longo do período analisado (linha vermelha) em relação a pacientes vivos no mesmo período (linha azul) ($p < 0,05$). C) Curva ROC representando a concentração de SEV como fator na possibilidade de óbito em pacientes com mastocitoma cutâneo (AUC=0.8526 $p < 0,05$).

5.3.3 Recidiva tumoral

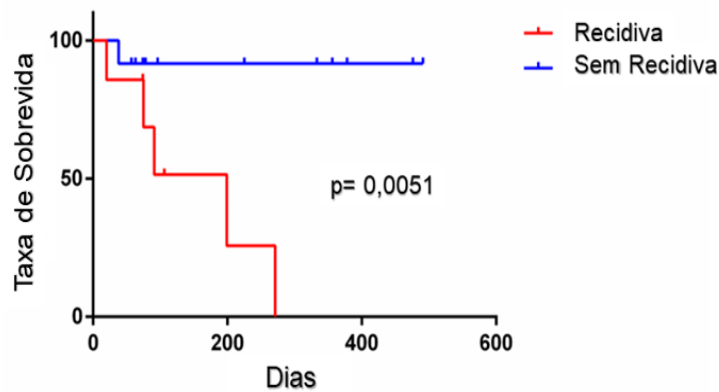
Dentre os pacientes com mastocitoma cutâneo, sete apresentaram recidiva ao longo do período analisado. A quantificação das vesículas (SEV) em cães com mastocitoma demonstrou menor concentração de SEV/mL de soro em pacientes que apresentaram recidiva tumoral quando comparado aos pacientes que não apresentaram recidiva ($p < 0,05$). (Figura 7A). Porém não houve diferença estatística ao comparar o tamanho das SEV entre pacientes com mastocitoma com recidiva ou não ($p > 0,05$). A análise mediante curva ROC demonstrou que a mensuração da concentração de SEV foi significativa como uma tendência a ocorrência de recidiva de mastocitoma cutâneo (AUC 0.8036, $P = 0,03120$, 95% CI 0.5974 – 1.000) abaixo de $1,02 \times 10^{10}$ SEV/mL (Figura 7B). Ao analisar a sobrevida dos pacientes com mastocitoma cutâneo foi observada significativa redução na taxa de sobrevida em cães que apresentaram recidiva ao longo do tempo ($p < 0,05$) (Figura 7C).



A)



B)



C)

Figura 7. Concentração de vesículas (SEV) em soro canino com relação a recidiva tumoral de mastocitoma cutâneo. A) Baixa concentração de SEV/mL de soro canino em pacientes apresentaram recidiva de mastocitoma cutâneo. B) Curva ROC representando a concentração de SEV como fator na possibilidade de recidiva de mastocitoma cutâneo (AUC=0.8036 $p<0,05$). C) Representação gráfica (teste Log-Rank) de menor taxa de sobrevivência em pacientes caninos que apresentaram recidiva de mastocitoma cutâneo (linha vermelha) em relação a pacientes sem recidiva tumoral (linha azul) ($p<0,05$).

5.4 Caracterização de vesículas extracelulares (SEV) e fatores prognósticos

5.4.1 Presença de sinais sistêmicos

Ao relacionar a concentração de SEV circulantes em soro de cães com mastocitoma cutâneo e a ocorrência de sinais clínicos como náusea, vômito ou prurido decorrentes da degranulação de mastócitos, houve menor concentração de vesículas extracelulares (SEV/mL) em animais com sintomas clínicos, com diferença significativa em relação aos animais assintomáticos ($p<0,05$) (figura 8A). Houve menor sobrevivência em pacientes com mastocitoma cutâneo sintomáticos com diferença significativa em relação aos animais assintomáticos ($p<0,05$) (Figura 8B). Entretanto, não houve diferença significativa em relação ao tamanho das SEV e a presença de sinais sistêmicos relacionados ao mastocitoma cutâneo.

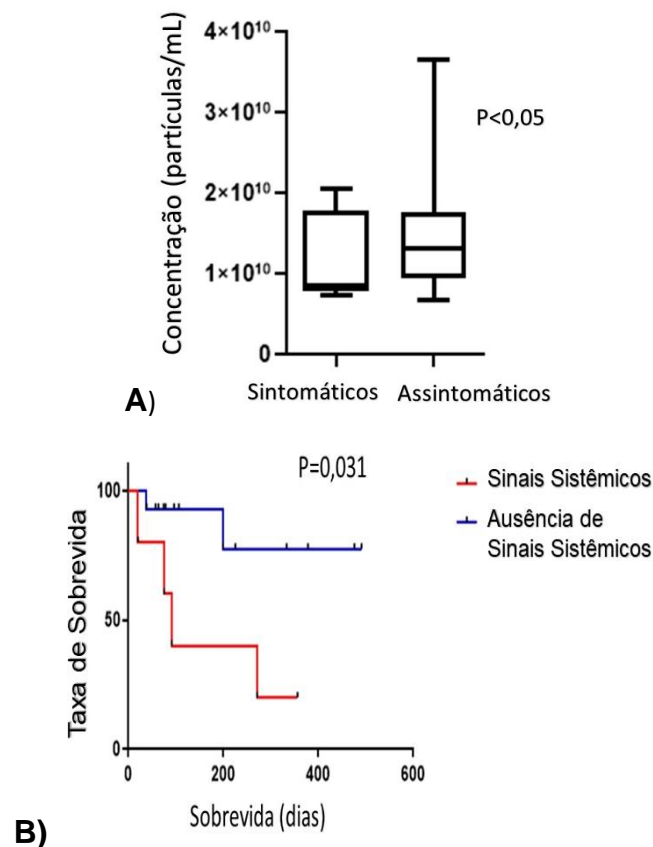


Figura 8. Concentração de SEV em cães com mastocitoma cutâneo em relação a presença de sinais clínicos decorrentes da degranulação de mastócitos. A) Concentração de SEV/mL de soro em cães sintomáticos e assintomáticos ($p < 0,05$). B) Representação gráfica (teste Log-Rank) de menor taxa de sobrevida em pacientes caninos que apresentaram sinais clínicos decorrentes da degranulação de mastocitoma (linha vermelha) em relação a pacientes assintomáticos com mastocitoma (linha azul) ($p < 0,05$).

5.4.2 Demais fatores prognósticos

A caracterização das vesículas (SEV) quanto a concentração e tamanho, não demonstrou diferença estatística com relação aos graus histológicos Patnaik para mastocitoma (grau I, II ou III) ($p > 0,05$). Com relação ao grau histológico alto ou baixo de acordo com Kiupel, também não houve diferença estatística com relação a concentração ou tamanho das vesículas exossomais isoladas ($p = 0,06$) (Figura 9).

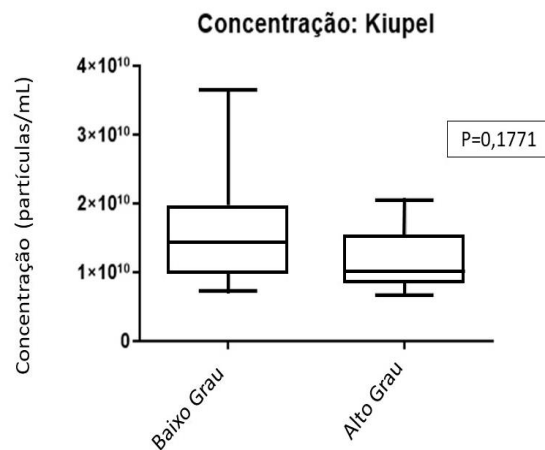


Figura 9. Concentração de SEV em cães com mastocitoma cutâneo graduados de acordo com Kiupel ($p > 0,05$).

Não houve diferença significativa quanto a concentração e tamanho das SEV em cães com mastocitoma cutâneo localizados em região perineal, dígito ou cabeça em relação as demais localizações observadas ($p > 0,05$). Assim como não houve diferença significativa quanto a caracterização das SEV em relação ao índice mitótico do mastocitoma cutâneo ($p > 0,05$) ou com relação as raças selecionadas durante o estudo ($p > 0,05$). A presença ou ausência de metástase em linfonodo sentinela não apresentou diferença significativa quanto a concentração ou tamanho das vesículas extracelulares circulantes em cães com mastocitoma cutâneo ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O mastocitoma cutâneo, ou seja, a proliferação desordenada de mastócitos é um neoplasma frequente em cães das raças Boxer, Labrador e Pug (Miller et al., 2014; De Nardi et al., 2022). No presente trabalho a principal raça observada foram os cães sem padrão racial definido, o que é justificado por ser tratar de um estudo prospectivo de acordo com a rotina de atendimento do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV, Unesp Câmpus de Jaboticabal.

Os principais locais de ocorrência do mastocitoma cutâneo em cães são região de tronco, extremidades de membros e região de cabeça e pescoço (Souza et al., 2018). Nos pacientes selecionados não foi observada diferença estatística com relação à sobrevida e a localização tumoral, como também relatado por Al-Sarraf et al. (1996) e Pizzoni et al. (2017). Os mesmos autores citam não observar associação

entre idade, sexo, localização tumoral, tempo de progressão da doença e sobrevida de pacientes com mastocitoma cutâneo.

Foram identificados dois cães com mastocitoma grau I (10%), 12 mastocitomas grau II (60%) e seis mastocitomas grau III (30%), de acordo com a graduação Patnaik et al., (1984). De acordo com a graduação Kiupel et al. (2011) foram identificados 10 mastocitomas baixo grau (50%) e 10 mastocitomas alto grau (50%). Segundo Souza et al. (2018) em estudo retrospectivo, também realizado no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” entre os anos de 2005 a 2015 com 105 animais, os mastocitomas cutâneos foram classificados como grau I em 11,8%, grau II em 73,7% e grau III em 14,5% na graduação Patnaik. Pela graduação Kiupel foram considerados baixo grau 64,8% e alto grau 35,2%, diferindo das proporções do presente estudo na graduação Kiupel, o que pode ser justificado pelo número de pacientes selecionados.

Houve diferença estatística com relação a sobrevida nas diferentes graduações histológicas dos mastocitomas cutâneos avaliados no presente trabalho, sendo menor sobrevida em cães com mastocitoma alto grau/grau III (102 dias) e maior sobrevida em cães com mastocitoma baixo grau/grau I (483,5 dias), e 156,3 dias para cães com mastocitoma alto grau/grau II e 181,6 dias para mastocitoma baixo grau/grau II. Sabbatini et al. (2014) identificaram menor sobrevida em cães com mastocitoma alto grau, principalmente em alto grau/grau III em relação aos demais graus histológicos. Dessa forma podemos observar a graduação Patnaik e Kiupel como um dos principais fatores prognósticos do mastocitoma.

Foi observada recidiva tumoral no período analisado em sete cães com mastocitoma cutâneo, sendo quatro com mastocitoma alto grau e seis com margens cirúrgicas consideradas comprometidas ou exíguas. Em estudo retrospectivo realizado por Michels et al. (2002) demonstrou menor tempo de recidiva de mastocitoma cutâneo em tumores removidos sem margem cirúrgica, quando comparado aos tumores removidos com margens livres. Donnelly et al. (2013) observaram que a recidiva tumoral teve maior frequência em mastocitomas de alto grau quando comparados aos tumores de baixo grau, mesmo estes últimos com margens exíguas. Assim, podemos considerar a recidiva relacionada a margem cirúrgica e ao grau histológico, como analisado no presente estudo.

A biópsia líquida é apontada como ferramenta diagnóstica minimamente invasiva em pacientes com câncer, permitindo diagnóstico, monitoramento da resposta terapêutica, doença residual mínima, comportamento tumoral e perfil genético na medicina humana (Kalluri, 2016; Siravegna et al., 2017). Estudos apontam o uso da biópsia líquida também na medicina veterinária, onde pouco se sabe a respeito das vesículas extracelulares em animais (Sammarco et al., 2018; Klymiuk et al., 2019; Garnica et al., 2020).

Sendo o mastocitoma um tumor maligno cutâneo frequente em cães, faz-se necessário o uso de ferramentas diagnósticas que permitam prever comportamento biológico previamente à análise histopatológica do tumor e a definição dos fatores prognósticos como grau histológico Patnaik e Kiupel, índice mitótico, raça, localização tumoral, recidiva, presença de metástase, *status* do linfonodo regional, expressão de Ki-67 e padrão *c-KIT* (Sammarco et al., 2018). A partir de amostras de soro sanguíneo de cães com mastocitoma cutâneo obtidos no pré-cirúrgico foi possível determinar concentração de SEV/mL e mensurar o tamanho das SEV circulantes e assim correlacionar aos fatores prognósticos.

Estudos iniciais de biópsia líquida na oncologia reportam alterações na quantidade de vesículas extracelulares circulantes em pacientes com câncer quando comparado a pacientes saudáveis, em humanos e na veterinária (Jayachandran et al. 2018). Por meio de citometria de fluxo, Simundic et al. (2019) avaliaram o tamanho e a concentração de vesículas extracelulares circulantes no plasma de nove cães com diagnóstico de mastocitoma cutâneo, observando maior concentração de SEV em cães com mastocitoma comparado aos animais saudáveis, 267 EV/ μ L e 145 EV/ μ L, respectivamente, porém sem diferença estatística. Tais resultados diferem no presente trabalho, tanto na metodologia empregada e nos valores encontrados. A ultracentrifugação é o método amplamente empregado como etapa inicial na biópsia líquida, seguido do NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) para caracterização das partículas, podendo alterar resultados (Sammarco et al., 2018).

Em estudo realizado por Garnica et al. (2020) observaram que cães que vieram a óbito em decorrência do linfoma multicêntrico apresentaram alta concentração de SEV/mL em soro ($>2,48 \times 10^{10}$ SEV/mL) em D0 quando comparado aos pacientes tratados que apresentaram remissão completa, diferindo do presente trabalho onde a

baixa concentração de SEV/mL em soro ($1,23 \times 10^{10}$ SEV/mL) indicou menor sobrevida em cães com mastocitoma cutâneo, onde ambos trabalhos utilizaram NTA como método de caracterização das vesículas. Li et al. (2015) observaram maior SEV/mL em pacientes com câncer de próstata quando comparado aos pacientes saudáveis, ao analisar as amostras de soro sanguíneo por NTA, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos.

A concentração de SEV/mL e tamanho das vesículas extracelulares em plasma sanguíneo de 17 cães com mastocitoma cutâneo, avaliados por Zamboni et al. (2023) seguiram metodologia semelhante ao presente trabalho. Observaram menor concentração de SEV/mL em pacientes com mastocitoma com linfonodo livre de metástases, seguido de cães com mastocitoma com linfonodo positivo e cães saudáveis, $2,68 \times 10^{10}$ partículas/mL, $2,89 \times 10^{10}$ partículas/mL e $3,21 \times 10^{10}$ partículas/mL, respectivamente, porém sem diferença estatística entre os grupos. Resultados estes também apresentados no presente trabalho, porém com diferença significativa entre as concentrações de SEV/mL entre os grupos.

No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas com relação a concentração de SEV ou tamanho de SEV e os principais fatores prognósticos considerados no mastocitoma cutâneo, como também não foram observados por Simundic et al. (2019). Assim, podemos considerar a quantificação de vesículas extracelulares como um fator prognóstico ao mastocitoma independente dos demais fatores prognósticos descritos a respeito do comportamento do tumor.

Diferente dos trabalhos que demonstram maior quantidade de vesículas extracelulares circulantes em animais com câncer, a menor concentração no presente estudo pode estar relacionado ao conteúdo carregado pelas vesículas. Em estudo realizado por Zamarian et al. (2020) foram identificados 63 miRNAs alterados em tecido de mastocitoma cutâneo canino fixado em formol. Dentre os miRNAs avaliados, miR-21 e miR-379 tiveram maior expressão em tecido saudável quando comparado ao mastocitoma ($p < 0,05$). E os miRNAs miR-885, miR-338 e miR-92a tiveram maior expressão em tecido neoplásico quando comparado ao saudável. Assim como observado por Zamboni et al. (2023), sendo menor concentração de SEV/mL em plasma de animais com mastocitoma cutâneo com linfonodo metastático ($2,89 \times 10^{10}$

partículas/mL) e maior expressão de miR-21-5p, quando comparado aos animais saudáveis.

A degranulação de mastócitos pode levar a ocorrência de lesões nodulares pruriginosas, com aspecto inflamado, ulceradas e a presença de sinais clínicos sistêmicos como alterações no trato gastrointestinal. De acordo com Walard et al. (2015), essas alterações estão relacionadas a mastocitomas de alto grau, que apresentam pior prognóstico, como observado no presente estudo. Observamos que a presença de sinais sistêmicos estava relacionada a menor sobrevida e menor concentração de SEV/mL de soro.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho indica o potencial diagnóstico da biópsia líquida na medicina veterinária. A caracterização das vesículas extracelulares permite, de forma menos invasiva e prévia, com uma amostra de soro sanguíneo, determinar prognóstico dos cães com mastocitoma cutâneo, uma vez que a menor concentração de SEV/mL esteve relacionado ao diagnóstico, a sobrevida e possibilidade de recidiva tumoral.

Considerando a divergência entre as concentrações de vesículas extracelulares a partir da biópsia líquida, se faz necessário mais estudos com relação ao conteúdo genético carregado pelas vesículas, assim como dispersos em soro sanguíneo.

8. REFERÊNCIAS¹¹

Agarwal P, Crepps MP, Stahr NA, Kretzschmar WP, Harris HC, Prasad N, Levy SE, Smith BF (2021) Identification of canine circulating miRNAs as tumor biospecific maskers using Next-Generation Sequencing and Q-RT-PCR. **Biochemistry and Biophysics Reports** 28:1-5.

Al-Sarraf R, Mauldin GN, Patnaik AK, Meleo KA (1996) A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 6:376-378.

Blackwood L et al (2012) European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology** 10:1-29.

Barger JF, Rahman MA, Jackson D, Acunzo M, Nana-Sinkam SP (2016) Extracellular miRNAs as biomarkers in cancer. **Food and Chemical Toxicology** 98:66-72.

Berlung E et al. (2015) Secretome protein signature of human gastrointestinal stromal tumor cells. **Science Direct** 1:158-170.

Brady JV et al. (2018) A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. *Translational Oncology*

Brett SI, Kim Y, Biggs CN, Chin JL, Leong HS (2015) Extracellular vesicles such as prostate cancer cell fragments as a fluid biopsy for prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Disease** 18:213-220.

Brinton LT, Sloane HS, Kester M, Kelly KA (2015) Formation and role of exosomes in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences** 72:659-671.

Calazans SG, Fonseca-Alves CE, Rodrigues PC, Magalhães GM (2016) Mastocitoma cutâneo canino, com progressão de baixo grau para alto grau -Relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 38:147-152.

¹¹De acordo com Normas do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária. <http://www.fcav.unesp.br/#!/pos-graduacao/programas-pg/cirurgia-veterinaria/normas-e-diretrizes/>

Camps-Palau MA, Leibman NF, Elmslie R, Lana SE, Plaza S, McKnight JA, Risbon R, Bergman PJ (2007) Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). **Veterinary and Comparative Oncology** 5:156-167.

Castro JLC, Hupples RR, De Nardi AB, Pazzini JM (2015) Introdução à anatomia. In.: Castro, JLC, Hupples, RR, De Nardi, AB, Pazzini, JM (Eds.) **Princípios e técnicas de cirurgias reconstrutivas da pele de cães e gatos (atlas colorido)**. Curitiba: Medvep, p.10-16.

Chan BD, Wong W, Lee MM, Cho WCS, Yee BK, Kwan YW, Tai WCS (2019) Exosomes in inflammation and inflammatory disease. **Proteomics** 19:1-12.

Costa RMG (2015) *C-KIT* as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: from laboratory to clinic. **The Veterinary Journal** 205:5-10.
Blackwood L et al. (2021) European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology** 10:1-29.

Daleck CR, Rocha NS e Ferreira MGPA (2016) In: Mastocitoma In: Daleck CR e De Nardi AB (Eds.) **Oncologia em Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Roca, p.649-59.

De Nardi AB et al. (2018) Brazilian consensus for the diagnosis, treatment and prognosis of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Investigação** 17:1-15.

De Nardi AB et al. (2022) Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells** 11:1-37.

Donnelly L, Mullin C, Balko J, Goldschmidt M, Krick E, Hume C, Brown DC, Sorenmo K (2013) Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumour. **Veterinary and Comparative Oncology** 13:70-76.

Garnica TK et al. (2020) Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. **Scientific Reports** 10:20371-20382.

Garzon, R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA expression and function in cancer. **Trends in Molecular Medicine** 12:580-587.

Golchin A, Hosseinzadeh S, Ardeshiryajimi A (2018) The exosomes released from different cell types and their effects in wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry** 1:1-29.

Hanahan D e Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. **Cell** 100:57-70.

Hanahan D (2022) The hallmarks of cancer. **Cancer Discovery** 12:31-46.

Horta RS, Lavallo GE, Monteiro LN, Reis FBTM, Costa MP, Giuliano A, Cassali GD, Dobson J (2018) Evaluation of histological, immunohistochemical, clinical and genetic prognostic factors associated with the response of canine mast cell tumours to glucocorticotherapy. **Journal of Comparative Pathology** 165:72-81.

Horta RS, Lavallo GE, Monteiro LN, Souza MCC, Cassali GD, Araújo RB (2018) Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical and molecular features. **Veterinary Pathology** 55:212-223.

Jark PC, Raposo TMM, Alves CEF, Macente BI, Gutierrez RR, De Nardi AB, Laufer-Amorim R, Tinucci-Costa M (2013) Quimioterapia neoadjuvante com vimblastina e lomustina no tratamento de um caso de mastocitoma cutâneo canino com múltiplos fatores prognósticos negativos e sobrevida superior a dois anos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 108:147-150.

Javeed N e Mukhopadhyay D (2017) Exosomes and their role in the micro/macro-environment: a comprehensive review. **The Journal of Biomedical Research** 31:386-394.

Jayachandran A, Manda SV, Shrestha R, Bridle KR, Prithviraj P, Crawford DHG (2018) Exosome-based liquid biopsy in the management of hepatocellular carcinoma. **Hepatoma Research** 4:1-12.

Kalluri R (2016) The biology and function of exosomes in cancer. **The Journal of Clinical Investigation** 126:1028-1215.

Kiupel M et al. (2011) Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology** 48:147-155.

Kiupel M, Webster JD, Miller RA, Kaneene JB (2005) Impact of Tumour Depth, Tumour Location and Multiple Synchronous Masses on the Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. **Journal of Veterinary Medicine** 52:280-286.

Klymiuk MC, Balz N, Elashry MI, Heimann M, Wenisch, Arnhold A (2019) Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells. **Veterinary Research** 15:42-51.

Lejeune A, Skorupski K, Frazier S, Vanhaezebrouck I, Rebhun RB, Reilly CM, Rodriguez Jr CO (2013) Aggressive local therapy combined with systemic chemotherapy provides long-term control in grade II stage 2 canine mast cell tumours: 21 cases (1999-2012). **Veterinary and Comparative Oncology** 13:267-280.

Li M, Rai AJ, DeCastro GJ, Zerlinger E, Barta T, Magdaleno S, Setterquist R, Vlassov AV (2015) An optimized procedure for exosome isolation and analysis using serum samples: application to cancer biomarker Discovery. **Methods** 87:26-30.

Li W, Li C, Zhou T, Liu X, Liu X, Li X, Chen D (2017) Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. **Molecular Cancer** 16:1-12.

Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen X, Xu Y, Huang L, Wang X (2015) Exosomes: Novel biomarkers for clinical diagnosis. **The Scientific World Journal** 2015:1-8.

London CA e Tham DH (2013) Mast cell tumors. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (Eds.) **Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Elsevier, p.336-355.

Marconato L et al. (2018) Therapeutic impact of regional lymphadenectomy in canine stage II cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology** 16:580-589.

Meehan K e Vella LJ (2015) The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences** Online:1-11.

Michels GM, Knapp DW, DeNicola DB, Glickman N, Bonney P (2002) Prognosis Following Surgical Excision of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors With Histopathologically Tumor-Free Versus Nontumor-Free Margins: A Retrospective Study of 31 Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association** 38:458-466.

Mihelich BF, Dambal S, Lin S, Nonn L (2016) miR-182, of the mi-R183 cluster Family, is packaged in exosomes and is detected in human exosomes from sérum, breast cells and prostate cells. **Oncology Letters** 12:1197-1203.

Miller RL, Lelyveld SV, Warland J, Dobson JM, Foale RD (2014) A retrospective review of treatment and response of high-risk mast cell tumours in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 14:361-370.

Mochizuki H, Thomas R, Moroff S, Breen M (2017) Genomic profiling of canine mast cell tumors identifies DNA copy number aberrations associated with KIT mutations and high histological grade. **Chromosome Research** 25:129-143.

Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, Schorey CS (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **Journal of Cell Science** 123:1603-1611.

Musser M, Berger E, Flaherty HA, Fox L, Johannes CM (2018) Marked paraneoplastic hypereosinophilia associated with a low-grade, metastatic canine mast cell tumour. **Veterinary Record Case Reports** 6:1-6.

Narita M et al. (2019) Identification of reference genes for microRNAs of extracellular vesicles isolated from plasma samples of healthy dogs by ultracentrifugation, precipitation, and membrane affinity chromatography methods. **AJVR** 80:449-454.

Natividade FS, Castro MB, Silva AS, Oliveira LB, McManus CM, Galera PD (2014) Análise de sobrevida e fatores prognósticos de cães com mastocitoma cutâneo. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 34:874-884.

Olsen JA, 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. **Veterinary Medicine and Science** 4:237-251.

Osaki M. e Okada F (2019) Exosomes and their role in câncer progression. **Yonago Acta Medica** 62:182-190.

Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG (1984) Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology** 21:469-474.

Pegtel DM e Gould SJ (2019) Exosomes. **Annual Review of Biochemistry** 88:487-514.

Pizzoni S et al. (2017) Features and prognostic impact of distant metastases in 45 dogs with de novo stage IV cutaneous mast cell tumours: A prospective study. **Veterinary and Comparative** 16:28-36.

Poggiani SSC, Terra EM, Torres Neto R, Costa MT, Amorim RL (2012) Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Biologic Behavior and Its Correlation with Prognostic Indicators. **Journal of Veterinary Medicine** 2:255-261.

Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA (2007) Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology** 44:335-341.

Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo AS (2017) The biology of cancer exosomes: insights and new perspectives. **Cancer Research** 77:6480-6488.

Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G (2014) Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? **Veterinary Pathology** 52:70-73.

Sammarco A, Finesso G, Cavicchioli L, Ferro S, Caicci F, Zanetti R, Sacchetto R, Zappulli V (2018) Preliminary investigation of extracellular vesicles in mammary cancer of dogs and cats: identification and characterization. **Veterinary and Comparative** 16:489-496.

Scarpa F, Sabattini S, Bettini G (2014) Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology** 14:245-251.

Simundic M, Svara T, Stukelj R, Krek JL, Gombac M, Iglic VK, Tozon N (2019) Concentration of extracellular vesicles isolated from blood relative to the clinical pathological status of dogs with mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology** 17:456-464.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. **Nature Reviews** 14:531-548.

Soo CY, Song Y, Zheng Y, Campbell EC, Riches AC, Gunn-Moore F, Powis SJ (2012) Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. **Immunology** 136:192-197.

Souza ACF, Pascoli AL, Ferreira MGPA, Reis Filho NP, Silva ICR, Santos RR, Faro AM, De Nardi AB (2018) Mastocitoma cutâneo canino: estudo retrospectivo dos casos atendidos pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da FCAV-Unesp, Campus Jaboticabal, de 2005 a 2015. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38:1808-1817.

Stefanello D et al. (2015) Comparison of 2 and 3 category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009 – 2014). **Journal of the American Veterinary** 246:765-769.

Strefezzi RF, Kleeb SR, Xavier JG, Catão-Dias JL (2009) Prognostic indicators for mast cell tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology** 2:110-121.

Spugnini EP, Vincenzi B, Baldi F, Citro G, Baldi A (2006) Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. **Anticancer Research** 26:4585-4590.

Tai Y, Chen K, Hsieh J, Shen T (2018) Exosomes in cancer development and clinical applications. **Cancer Science** 109:2364-2374.

Thamm DH, Mauldim EA, Vail (1999) Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumor - 41 Cases (1992–1997). **J Vet Intern Med** 13:491-497.

Ushio N, Rahman M, Maemura T, Lai Y, Iwanaga T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Momoi Y, Miura N (2019) Identification of dysregulated microRNAs in canine malignant melanoma. **Oncology Letters** 17:1080-1088.

Varela JCS, Pecceu E, Handel I, Lawrence J (2016) Tolerability of a rapid-escalation vinblastine-prednisolone protocol in dogs with mast cell tumours. **Veterinary Medicine and Science** 2:266-280.

Vascarelli M et al. (2012) Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. **Veterinary Pathology** 50:110-121.

Vestad B et al. (2017) Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. **Journal of Extracellular Vesicles** 6:1-11.

Warland J, Brioschi V, Owen L, Dobson J (2015) Canine mast cell tumours: decision-making and treatment. **In Practice** 37:315-332.

Webster JD, Gurkan VY, Miller RA, Kannene JB, Kiupel M (2007) Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with *c-KIT* and its role in prognostication. **Veterinary Pathology** 44:298-308.

Willmore-Payne C, Holden JA, Tripps S, Layfield LJ (2005) Human malignant melanoma: detection of BRAF- and ckit activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. **Human Pathology** 36:486-493.

Xu Zhang, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W (2015) Exosomes in cancer: small particle, big player. **Journal of Hematology & Oncology** 8:83-96.

Yu S, Cao H, Shen B, Feng J (2015) Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. **Oncotarget** 6:37151-37168.

Zamboni C et al (2023) Plasma small extracellular vesicles from dogs affected by cutaneous mast cell tumors deliver high levels of miR-21-5p. **Frontiers** 9:1-9.

Zamarian V et al. (2020) miRNA profiles of canine cutaneous mast cell tumours with early nodal metastasis and evaluation as potential biomarkers. **Scientific Reports** 10:18918-18931.

Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W (2015) Exosomes in cancer: small particle, big player. **Journal of Hematology and Oncology** 8:83-96.

Zmigrodzka M, Pilaszewicz OW, Rzepecka A, Cywinska A, Jagielski D, Winnicka A (2019) Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer—A Preliminary Study. **Animals** 9:575-588

APÊNDICE

ID	Tamanho partículas Moda (nm)	Concentração corrigida (partículas/ml)	Kiupel	Patnaik	Estágio WHO	Recidiva	Óbito	Sobrevida (dias)	Intervalo livre de doença (dias)
3	146,4	8.01e+09 +/- 6.50e+08	Alto	2	NI	Não	Óbito	38	38
4	145,4	2.04e+10 +/- 1.16e+09	Alto	2	2	Não	Vivo	356	356
5	140,4	1.50e+10 +/- 6.97e+08	Alto	3	4	Sim	Óbito	91	60
7	139,6	8.47e+09 +/- 2.21e+09	Alto	2	4	Sim	Óbito	75	37
8	123	1.12e+10 +/- 9.12e+08	Alto	3	4	Sim	Óbito	199	107
14	150,4	8.75e+09 +/- 7.11e+08	Alto	2	4	NI	NI	NI	NI
17	164,8	1.50e+10 +/- 1.52e+09	Alto	3	3	Não	Vivo	96	96
18	139,5	9.47e+09 +/- 9.76e+08	Alto	3	3	Sim	Vivo	74	34
19	142,3	1.69e+10 +/- 2.64e+08	Alto	3	3	Não	Vivo	74	74
20	150,3	6.72e+09 +/- 5.48e+08	Alto	3	NI	Não	Vivo	78	78

ID	Tamanho partículas Moda (nm)	Concentração corrigida (partículas/ml)	Kiupel	Patnaik	Estágio WHO	Recidiva	Óbito	Sobrevida (dias)	Intervalo livre de doença (dias)
1	154,2	1.75e+10 +/- 1.06e+09	1	1	4	Não	Vivo	491	491
2	155,1	1.31e+10 +/- 1.16e+09	1	1	1	Não	Vivo	476	476
6	160,4	7.20e+09 +/- 4.99e+08	1	2	3	Sim	Óbito	271	200
9	130,2	2.56e+10 +/- 1.28e+09	1	2	4	Não	Vivo	225	225
10	108,7	3.65e+10 +/- 1.62e+09	1	2	4	Não	Vivo	333	333
11	161,5	1.13e+10 +/- 9.54e+08	1	2	2	Não	Vivo	378	378
12	137,3	8.22e+09 +/- 3.75e+08	1	2	4	Sim	Óbito	20	15
15	123,7	1.20e+10 +/- 6.51e+08	1	2	1	Sim	Vivo	106	34
21	122,3	1.51e+10 +/- 8.73e+08	1	2	1	Não	Vivo	57	57
22	109,7	1.75e+10 +/- 4.64e+08	1	2	1	Não	Vivo	63	63

