

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PERFIL DE MUTAÇÃO NOS ÉXONS 8 E 11 DO GENE KIT NO MASTOCITOMA
CUTÂNEO DE CÃES**

VANESSA DALLA PORTA EDER

PORTO ALEGRE

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PERFIL DE MUTAÇÃO NOS ÉXONS 8 E 11 DO GENE KIT NO MASTOCITOMA
CUTÂNEO DE CÃES**

Autora: Vanessa Dalla Porta Eder

**Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Patologia Clínica**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Stella de Faria Valle

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Priscila Beatriz da
Silva Serpa

PORTO ALEGRE

2025

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) – Chamada CNPq/MCTI no. 10/2023 - UNIVERSAL - faixa A grupos emergentes.

CIP - Catalogação na Publicação

Dalla Porta Eder, Vanessa

PERFIL DE MUTAÇÃO NOS ÉXONS 8 E 11 DO GENE KIT NO MASTOCITOMA CUTÂNEO DE CÃES / Vanessa Dalla Porta Eder. -- 2025.

80 f.

Orientador: Stella de Faria Valle.

Coorientador: Priscila Beatriz da Silva Serpa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2025.

1. Oncologia veterinária. 2. Sequenciamento de DNA. 3. Mutações no gene KIT. 4. Citopatologia. 5. Neoplasias cutâneas. I. Valle, Stella de Faria, orient. II. Serpa, Priscila Beatriz da Silva, coorient. III. Título.

Vanessa Dalla Porta Eder

PERFIL DE MUTAÇÃO NOS ÉXONS 8 E 11 DO GENE KIT NO MASTOCITOMA
CUTÂNEO DE CÃES

Aprovado em 18 de agosto de 2025.

APROVADO POR:

Prof.^a Dr.^a Stella de Faria Valle

Orientadora e Presidente da Comissão

Prof.^a Dr.^a Priscila Beatriz da Silva Serpa

Coorientadora e Membro da Comissão

Prof.^a Dr.^a Andrea Pires dos Santos

Membro da Comissão

Prof.^a Dr.^a Luciana Sonne

Membro da Comissão

Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Horta

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Quando ingressamos em uma nova etapa, imaginamos que o destino (no caso, tornar-se mestra) é o objetivo final. Mas quando paramos para observar, percebemos que o que realmente importa é a jornada. O crescimento, o companheirismo, as dúvidas e o aprendizado. E nenhuma jornada pode ser concluída se estivermos sós.

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora prof.^a Stella pela presença e apoio; por sempre acreditar na minha capacidade, mesmo nos momentos de muita dúvida, e por enxergar o potencial em cada um de seus orientandos; sua dedicação e persistência são um grande exemplo. Ao longo de quase 10 anos de jornada no LACVet, ele se tornou família e abrigo; obrigada a todos pelos compartilhamentos e desejo de crescimento mútuo. Ali construí minha base profissional e relações que irão perdurar pela vida. À Laura Q., Lina, Carol H., Letícia, Aline, Carol F., Ana Paula B., Kauana, Stephanie, Laura S., Clara, Gabi F., Gabi S., Edgar e Talles, muito obrigada por tornarem os dias mais fáceis, pelas palavras de apoio e carinho, pelas risadas e por toda paciência quando era necessário.

À coorientadora prof.^a Priscila Serpa, obrigada pela confiança, oportunidade e pelo valioso enriquecimento ao trabalho. Suas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto e também ao meu desenvolvimento pessoal, com o incentivo ao questionamento e auxílio na escolha de direções e tomadas de decisões.

Também agradeço à Prof.^a Franciele Maboni e toda equipe do LaBacVet pela disponibilidade do espaço e equipamentos e por todo auxílio teórico e técnico; foi um desafio muito grande aprender sobre outra área de conhecimento em tão pouco tempo e certamente o apoio (e paciência) de vocês tornou o processo mais fácil.

À prof.^a Luciana Sonne e setor de Patologia Veterinária, muito obrigada pela colaboração no projeto. Sou sempre muito grata pelas trocas e oportunidade de aprender com vocês.

E por fim, àqueles que, sem eles, seria impossível estar onde estou: minha família, humana e canina. Aos meus pais, Álvaro e Vera, meu amor e gratidão infinitos; o apoio incondicional de vocês é meu maior suporte e exemplo. À minha irmã, sobrinhos e cunhado, muito obrigada por estarem sempre disponíveis, por ouvir e acreditar, e por tantos momentos maravilhosos. Pirata, Jesse e Tom, meus amores fonte de vida, e Nina, que recentemente nos deixou: fazer parte da vida de vocês é minha maior alegria e inspiração na busca do crescimento.

“Nenhum problema pode ser resolvido
pelo mesmo estado de consciência que o criou.”

- Albert Einstein

RESUMO

Os mastocitomas caninos são neoplasias malignas originadas da proliferação neoplásica de mastócitos. São os tumores cutâneos mais comuns em cães, representando de 10 a 21% das neoplasias cutâneas. O diagnóstico é obtido facilmente a partir do exame citopatológico e sua utilização como técnica de triagem na avaliação pré-operatória do grau tumoral com base em critérios citomorfológicos tem ganhado destaque. Ainda assim, a heterogeneidade celular e a representatividade da amostra limitam a acurácia prognóstica desse método, reforçando a importância da histopatologia na graduação tumoral e prognóstico do paciente. Este estudo investigou a graduação citológica e histopatológica e analisou a ocorrência de mutações nos éxons 8 e 11 do gene KIT de mastocitomas cutâneos caninos, com o objetivo de avaliar a concordância da graduação entre os métodos e identificar possíveis associações com mutações. Foram analisadas 45 lesões de 34 cães com diagnóstico citológico de mastocitoma, sendo que 35 foram submetidas à análise molecular. A graduação citológica apresentou 87,5% de concordância com a graduação histológica pelo sistema de Kiupel. Através de PCR convencional e sequenciamento Sanger, mutações foram identificadas em 86,4% das amostras para o éxon 8 e em 15% para o éxon 11 do KIT. As variações incluíram uma variante de nucleotídeo único (SNV) silenciosa na posição 120 e uma mutação missense (Q134R) potencialmente funcional no éxon 8, e uma SNV silenciosa na posição 193 do éxon 11. Não foi observada correlação entre presença de mutações e graduação de malignidade através da citologia ou histologia. Os achados reforçam a heterogeneidade genômica dos mastocitomas caninos e sugere a ampliação do sequenciamento genético para melhor compreensão do seu comportamento biológico, visto que a amostra regional estudada exibe um perfil diferenciado de mutações, diferentes das frequentemente descritas na literatura internacional.

Palavras-chave: Oncologia veterinária. Citopatologia. Sequenciamento de DNA. Mutações do KIT. Neoplasias cutâneas.

ABSTRACT

Canine mast cell tumors are malignant neoplasms arising from the neoplastic proliferation of mast cells. They are the most common cutaneous tumors in dogs, accounting for 10% to 21% of all skin neoplasms. Diagnosis is readily achieved through cytopathological examination, and its application as a screening technique for preoperative assessment of tumor grade based on cytomorphological criteria has gained prominence. Nevertheless, cellular heterogeneity and sample representativity limit the prognostic accuracy of this method, emphasizing the importance of histopathology for tumor grading and patient prognosis. This study investigated cytological and histopathological grading and analyzed the occurrence of mutations in exons 8 and 11 of the KIT gene in canine cutaneous mast cell tumors, with the aim of evaluating the concordance between grading methods and identifying possible associations with mutations. A total of 45 lesions from 34 dogs with a cytological diagnosis of mast cell tumor were evaluated, of which 35 were subjected to molecular analysis. Cytological grading showed 87.5% concordance with histological grading according to the Kiupel system. Through conventional PCR and Sanger sequencing, mutations were identified in 86.4% of the samples for exon 8 and in 15% for exon 11 of KIT. The variations included a silent single nucleotide variant (SNV) at position 120 and a potentially functional missense mutation (Q134R) in exon 8, as well as a silent SNV at position 193 in exon 11. No correlation was observed between the presence of mutations and malignancy grade as determined by cytology or histology. These findings reinforce the genomic heterogeneity of canine mast cell tumors and suggest the expansion of genetic sequencing to improve understanding of their biological behavior, given that the regional sample studied exhibits a distinct mutation profile differing from those frequently described in international literature.

Keywords: Veterinary oncology. Cytopathology. DNA sequencing. KIT mutations. Skin neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do receptor de membrana KIT.....	15
Figura 2 – Vias de sinalização do receptor KIT que controlam a sobrevivência, proliferação, migração e progressão do ciclo celular.....	16
Figura 3 – Formação de eritema ao redor da massa após aspiração.....	18
Figura 4 – Granulação metacromática evidente no citoplasma de mastócitos.....	18
Figura 5 – Citologias de mastocitomas cutâneos caninos classificados como baixo grau citológico e histológico de Kiupel.....	42
Figura 6 – Citologias de mastocitomas cutâneos caninos classificadas como alto grau citológico e alto grau histológico de Kiupel.....	43
Figura 7 – Heatmap com frequência de tumores por classificação de Patnaik e Kiupel.....	44
Figura 8 – Sequência referência do KIT éxon 8, aminoácidos da posição 107 a 161, sequência consenso e sequências obtidas a partir de mastocitomas cutâneos caninos, com destaque para a mudança de nucleotídeo na posição 134 da amostra A3. A6 = amostra <i>wild type</i>	46
Figura 9 – Sequência referência do KIT éxon 11, aminoácidos da posição 168 a 217, sequência consenso e sequências obtidas a partir de mastocitomas cutâneos caninos, com destaque para a mudança de nucleotídeo na posição 193 da amostra B16. B13 = amostra <i>wild type</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de graduação citológica de MCT em cães.....	23
Tabela 2 - Sistema de Patnaik para graduação histológica de MCT em cães.....	24
Tabela 3 - Sistema de Kiupel para graduação histológica de MCT em cães.....	25
Tabela 4 - Primers e condições da PCR convencional para as análises de mutações nos alvos do gene KIT.....	38
Tabela 5 - Número e porcentagem de casos por critério morfológico de malignidade em amostras citológicas de MCT caninos.....	41
Tabela 6 - Perfil mutacional de 35 amostras de MCT canino.....	45
Tabela 7 - Comparação de amostras de mastocitomas de alto grau citológico com perfil mutacional dos éxons 8 e 11.....	48
Tabela 8 - Comparação de amostras de mastocitomas de baixo grau citológico com perfil mutacional dos éxons 8 e 11.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG	Arginina
bFGF	Fator fibroblástico básico
cfDNA	DNA livre circulante
ctDNA	DNA tumoral circulante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FFPE	Tecido fixado em formalina e embebido em parafina
CG	Grau citológico
CHK	Grau histopatológico segundo Kiupiel
CHP	Grau histopatológico segundo Patnaik
GLN	Glutamina
GLY	Glicina
IL	Interleucina
KIT	Proteína receptora transmembrana de tirosina quinase
<i>KIT</i>	<i>KIT</i> proto-oncogene
MC	Mastócito
MCp	Precursor de mastócito
MCT	Mastocitoma
MO	Medula óssea
NGS	Sequenciamento de nova geração
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
SRD	Sem raça definida
SNV	Variante de nucleotídeo único
THR	Treonina
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WT	<i>Wild type</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Biologia dos mastócitos	14
2.1.1	Origem celular e diferenciação	14
2.1.2	Distribuição tecidual	16
2.1.3	Composição e função dos grânulos.....	17
2.1.4	Implicações funcionais na imunidade e na patogênese.....	18
2.2	Mastocitoma cutâneo em cães	19
2.2.1	Definição, características clínicas e epidemiologia	19
2.2.2	Prognóstico e terapêutica	20
2.2.3	Diagnóstico.....	21
2.3	Oncogênese dos mastocitomas.....	26
2.3.1	Mutações no <i>KIT</i>	27
2.3.2	Outras mutações.....	28
3.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE A - Resultados dos sequenciamentos e perfil mutacional do <i>KIT</i> éxons 8 e 11 de 45 amostras de MCT cutâneo em 34 cães.....	69
	APÊNDICE B - Resultados dos sequenciamentos e perfil mutacional do <i>KIT</i> éxons 8 e 11 de 45 amostras de MCT cutâneo em 34 cães.....	71

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias cutâneas representam um importante grupo de tumores em cães, com elevada prevalência e impacto clínico significativo na medicina veterinária. O mastocitoma cutâneo (MCT) destaca-se como uma das neoplasias mais comuns neste grupo, respondendo por até 20% dos tumores de pele (Kiupel; Camus, 2019; Villamil *et al.*, 2011). Este tumor tem origem na proliferação de mastócitos (MC), células do sistema imune inato, cuja participação em processos inflamatórios, alérgicos e neoplásicos é amplamente reconhecida. Sua apresentação clínica e comportamento biológico são bastante heterogêneos, tornando a definição prognóstica desafiadora. Os MCTs podem variar de tumores benignos e circunscritos até neoplasias agressivas, infiltrativas e metastáticas (Kiupel, 2017).

O diagnóstico do MCT é obtido facilmente a partir do exame citopatológico (Raskin; Conrado, 2023). Sua utilização como técnica de triagem na avaliação pré-operatória do grau tumoral com base em critérios citomorfológicos tem ganhado destaque (Camus *et al.*, 2016; Paes *et al.*, 2022; Scarpa; Sabbatini; Bettini, 2016). Ainda assim, a heterogeneidade celular e a representatividade da amostra limitam a acurácia prognóstica desse método, reforçando a importância da histopatologia na graduação tumoral e determinação de prognóstico do paciente. A determinação do grau histológico, portanto, segue como fator prognóstico mais relevante no manejo clínico-cirúrgico do MCT canino (Marouda *et al.*, 2024). Os sistemas de graduação de Patnaik e de Kiupel são amplamente utilizados e apresentam contribuições distintas na estratificação do risco (Kiupel *et al.*, 2011; Patnaik; Ehler; MacEwen, 1984; Willmann *et al.*, 2021).

Paralelamente, a compreensão da biologia molecular dos mastocitomas tem avançado, revelando alterações genéticas com potencial impacto no comportamento tumoral. As mutações no gene *KIT* têm sido estudadas extensivamente (Lennartsson *et al.*, 2005; Letard *et al.*, 2008). Seus 21 éxons codificam diferentes estruturas do receptor transmembrana de tirosina quinase KIT, também conhecido como receptor de fator de crescimento de células-tronco (SCF) ou CD117. Alterações no *KIT* podem levar à ativação constitutiva do receptor, promovendo proliferação celular independente do SCF e caracterizando-se como potenciais alvos terapêuticos (Halsey *et al.*, 2017). Estudos têm associado determinadas mutações do *KIT* a prognósticos desfavoráveis, maior grau histológico e menor sobrevida, destacando-se a presença de ITDs no éxon 11, que foram associadas a um comportamento tumoral mais agressivo, aumento da recorrência local e diminuição do tempo de sobrevida (Zemke; Yamini;

Yuzbasiyan-Gurkan, 2002; Zmorzynski *et al.*, 2024), enquanto ITDs éxon 8 estão associadas a um curso clínico da doença mais favorável e maior sobrevida, tendo sido detectadas em até 33% dos MCTs caninos, exibindo menor grau histológico e atividade proliferativa (Brocks *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Montanucci *et al.*, 2024). No entanto, a prevalência e a relevância funcional das mutações do gene *KIT* permanecem variáveis, dependendo da técnica empregada, da origem da amostra e da população estudada.

O presente estudo objetiva avaliar a graduação citológica e histopatológica de mastocitomas cutâneos caninos e investigar o perfil mutacional dos éxons 8 e 11 do gene *KIT* a partir de amostras obtidas por punção aspirativa e tecido parafinizado. Busca-se verificar a concordância entre a graduação citológica e a histopatológica, contribuindo para o enriquecimento na área de citopatologia, bem como oferecendo subsídios para futuras pesquisas com citogenética. A hipótese é de que mutações relevantes nesses éxons estejam associadas a graus mais elevados de malignidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

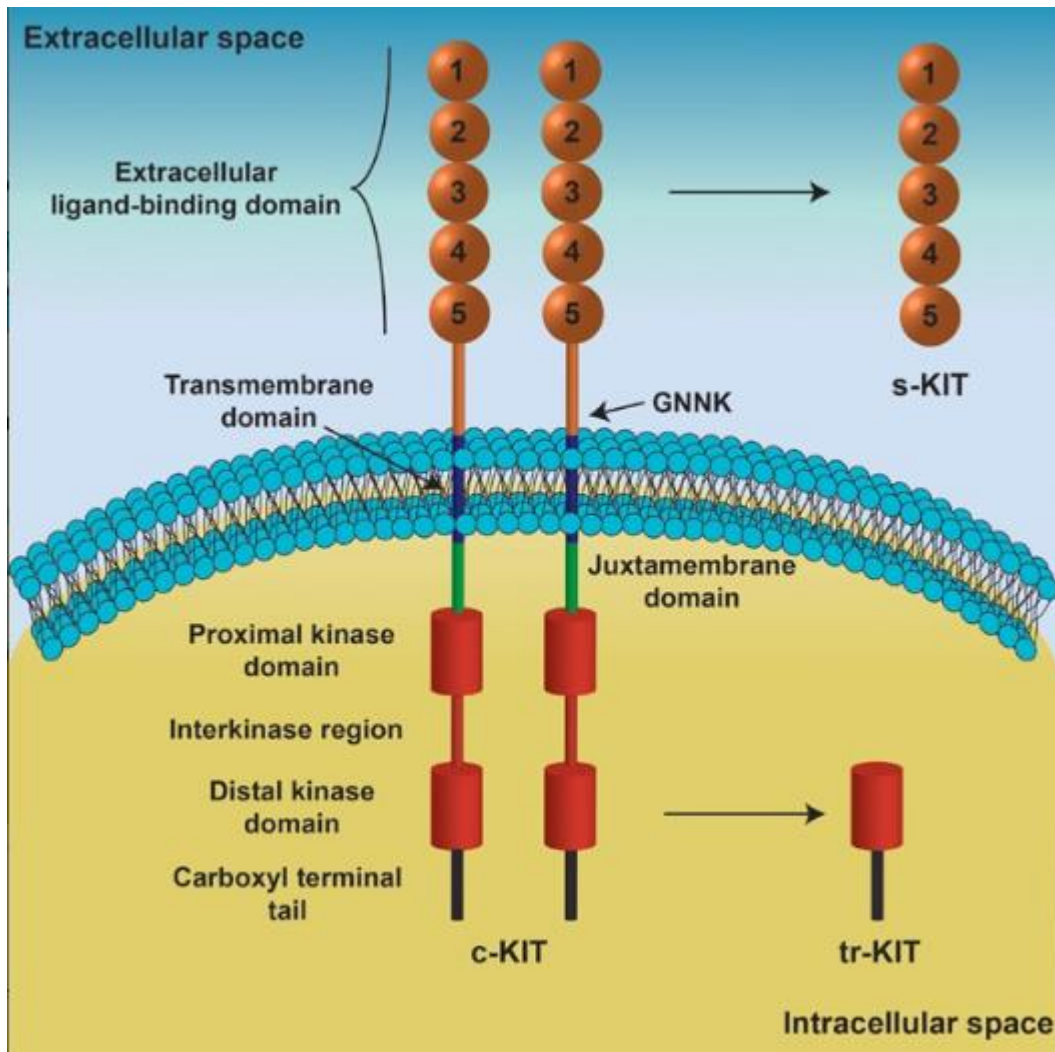
2.1 Biologia dos mastócitos

2.1.1 Origem celular e diferenciação

Os MC originam-se de precursores hematopoiéticos localizados na medula óssea (MO) e baço, porém maturam a partir dos precursores de MC que migram aos tecidos periféricos (Kastl; Pohlman, 2022). Durante a hematopoiese, o desenvolvimento dos mastócitos precursores (MCp) é altamente regulado por fatores de transcrição a partir de células tronco multipotentes. Após o comprometimento, os MCp circulam e se direcionam para os tecidos, ainda imaturos. A maioria dos MCp nos tecidos expressa o receptor do SCF KIT e o receptor de IgE de alta afinidade, assim como os MC maduros. No entanto, eles não são ou são menos granulados e, portanto, dificilmente identificados com técnicas de coloração histoquímica tradicionais (Dahlin; Hallgren, 2015). Uma vez nos tecidos, os MCp proliferam, diferenciam e maturam em MC intensamente granulados, sob a influência de uma variedade de interleucinas (IL), incluindo IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10 (Kastl; Pohlman, 2022).

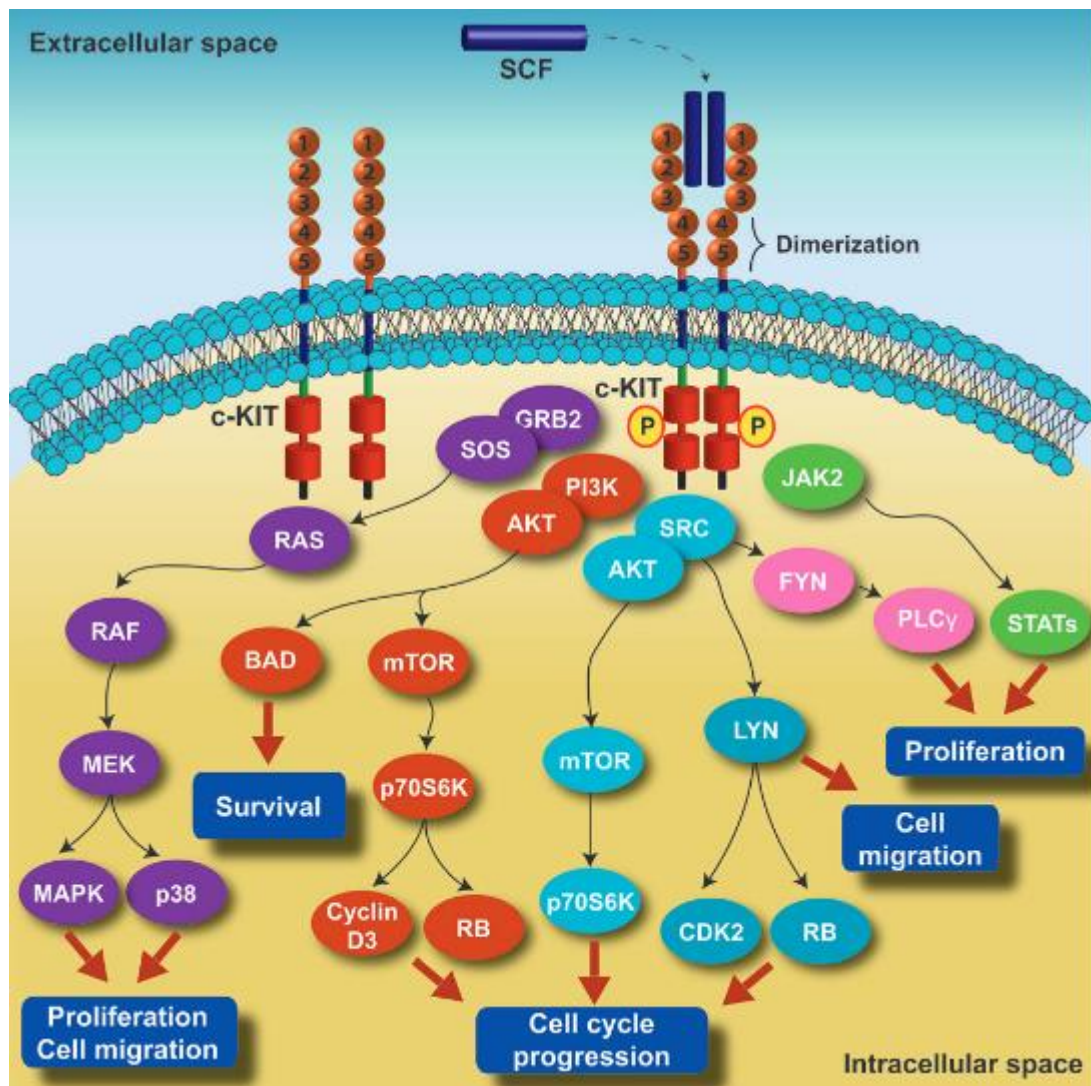
Esses MC maduros mantêm o potencial proliferativo mesmo em estágios de completa diferenciação. Enquanto a diferenciação dos MC da mucosa é regulada pelas interleucinas liberadas por células T, a diferenciação dos MC de tecidos conjuntivos é impulsionada pelo fator de célula-tronco - ou ligante KIT -, que é secretado por fibroblastos e células da medula óssea. O fator liga-se ao receptor KIT, que é codificado pelo gene *KIT*. O receptor KIT é composto por um domínio extracelular que se liga ao ligante, um domínio transmembrana e um domínio intracelular (Fig 1). A ligação do ligante ativa a tirosina quinase intracelular (Fig 2), levando à fosforilação de moléculas intracelulares e, assim, à ativação de vias de sinalização que são essenciais para a proliferação e diferenciação dos MC (Kiupel, 2017). É neste ambiente periférico que os MC adquirem suas características fenotípicas definitivas (Cowell et al., 2009).

Figura 1 – Representação esquemática do receptor de membrana KIT.



Os cinco domínios semelhantes a imunoglobulina da região extracelular estão envolvidos na ligação do ligante e na dimerização do receptor. A região intracelular, responsável pela transdução de sinal, contém domínios de quinase proximal e distal separados por uma região interquinase e uma cauda terminal carboxila. Fonte: Cardoso *et al.* (2014).

Figura 2 - Vias de sinalização do receptor KIT que controlam a sobrevivência, proliferação, migração e progressão do ciclo celular.



A ligação do SCF ao KIT induz a dimerização do receptor e a auto-fosforilação. As cascatas de sinalização ativadas incluem a via PI3K/AKT (vermelho), a via SRC (azul claro), a via JAK/STAT (verde) e a via RAS/MEK/MAPK (roxa). Fonte: (Cardoso *et al.*, 2014).

2.1.2 Distribuição tecidual

Em condições normais, os MC estão distribuídos de forma ampla por praticamente todos os tecidos do organismo, predominando especialmente em locais de interface com o ambiente externo, como a pele e superfícies mucosas. Ocasionalmente são visualizados na MO, mas raramente na circulação periférica (Blackwood *et al.*, 2012). Nos tecidos, os MC vivem por um longo período, e mesmo após a degranulação, a sua capacidade de síntese de mediadores é mantida (Oldford; Marshall, 2015). O principal mecanismo proposto para o aumento de MC

maduros nos tecidos é a maturação de MCp em divisão que entraram via sistema vascular, seja devido ao aporte contínuo destas células ou por recrutamento induzido por estímulos inflamatórios, levando ao aumento no número de MCp teciduais (Dahlin; Hallgren, 2015).

Essa distribuição justifica seu papel de célula sentinela capaz de recrutar células efetoras tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo (Oldford; Marshall, 2015).

2.1.3 Composição e função dos grânulos

Uma das características distintivas dos MC reside na abundância de grânulos citoplasmáticos. Os grânulos contêm uma variedade de mediadores bioativos como histamina, heparina, proteases (incluindo tripsina e quimotripsina), citocinas (interleucina-6 [IL-6], fator de necrose tumoral α [TNF- α]), fatores de crescimento (fator de crescimento endotelial vascular [VEGF], fator fibroblástico básico [bFGF]) e outros mediadores inflamatórios (Kumar; Sharma, 2010; London; Thamm, 2020; Oldford; Marshall, 2015). A histamina, por exemplo, é crucial na mediação das respostas alérgicas e na regulação da permeabilidade vascular; já a heparina exerce funções anticoagulantes e anti-inflamatórias (Yanase *et al.*, 2021). Através desse processo, os MC participam de várias atividades biológicas, incluindo cicatrização de feridas, indução de respostas imunes inatas, atividade antiparasitária e modulação da reação a venenos de insetos e aranhas (London; Thamm, 2020).

Ocasionalmente, a manipulação de MCT durante o exame físico pode levar à degranulação com produção de eritema e pápulas, formando o “sinal de Darier” (Fig. 3). A degranulação também pode ocorrer em resposta a estímulos imunológicos ou danos teciduais (Blackwood *et al.*, 2012; Yanase *et al.*, 2021). Quando estimuladas, essas células liberam rapidamente histamina, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), TNF- α e triptase, além de produzirem citocinas e quimiocinas adicionais, incluindo IL-3, IL-13, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa (MIP-1 α) (London; Thamm, 2020).

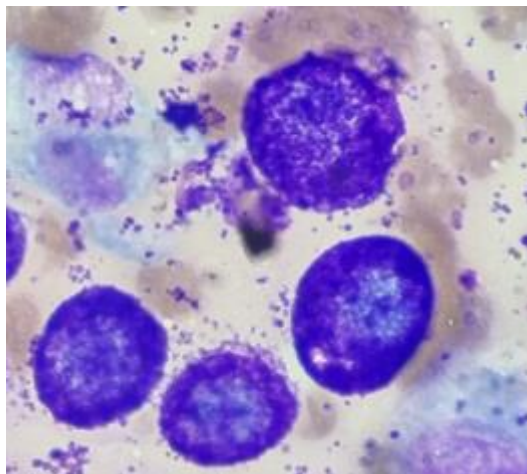
Em colorações utilizadas nas técnicas de citologia e histopatologia, os grânulos apresentam uma coloração metacromática roxa, uma propriedade clássica dos MC, permitindo a pronta identificação destas células (Cowell *et al.*, 2009). Essa propriedade resulta da alta concentração de proteoglicanos presentes nos grânulos, responsáveis pela modificação da afinidade com corantes Romanovski de base aquosa (Fig. 4).

Figura 3 – Formação de eritema ao redor da massa após aspiração.



Fonte: (Wellman; London, 2021).

Figura 4 – Granulação metacromática evidente no citoplasma de mastócitos.



Coloração de Wright-Giemsa. Objetiva de 100x. Fonte: a própria autora (2025).

2.1.4 Implicações funcionais na imunidade e na patogênese

Os MC participam ativamente das respostas imunes inata e adaptativa através da liberação de mediadores inflamatórios e antimicrobianos presentes nos grânulos, que contribuem para a regulação dos processos inflamatórios induzindo a vasodilatação e a quimiotaxia de células do sistema imune inato ao local da lesão (Abbas; Lichtman; Pillai, 2022;

Oldford; Marshall, 2015). A principal função é como célula efetora, atuando na defesa contra infecções por helmintos além de ser uma das principais células envolvidas em respostas alérgicas locais e sistêmicas, contribuindo ainda para condições autoimunes (Voehringer, 2013).

Diversos estímulos podem ativar os MC e promover a liberação do conteúdo dos grânulos para o espaço extracelular, bem como a síntese de citocinas e mediadores inflamatórios lipídicos (Dahlin; Hallgren, 2015; Voehringer, 2013). Estas células expressam receptores de membrana de alta afinidade para anticorpos IgE, e usualmente estão repletos com anticorpos de superfície. Quando o Ac na superfície do mastócito liga-se a um antígeno, eventos de sinalização levam à ativação celular. Eles também são ativados quando reconhecem produtos microbianos, independente de IgE, sendo células sentinelas do sistema imune inato (Kumar; Sharma, 2010).

Em tumores sólidos, diversos estímulos podem servir para ativar os MC, incluindo anticorpos antitumorais, hipóxia, citocinas e quimiocinas. Dessa forma, os MC podem ter efeitos imunológicos e regulatórios profundos com consequências pró-tumorais, incluindo promoção da angiogênese, supressão imune direta ou indireta e degradação da matriz extracelular, facilitando a invasão tecidual; e consequências antitumorais, como ação citotóxica, recrutamento e ativação de outras células imunes com ações efetoras sobre as células tumorais (Oldford; Marshall, 2015).

2.2 Mastocitoma cutâneo em cães

2.2.1 Definição, características clínicas e epidemiologia

Os MCT caninos são neoplasias malignas originadas da proliferação neoplásica de MC. São os tumores cutâneos mais comuns em cães, representando de 10 a 21% das neoplasias cutâneas (Blackwood *et al.*, 2012; London; Thamm, 2020; Tamlin; Bottema; Peaston, 2020; Welle *et al.*, 2008). O MCT usualmente ocorre em animais mais velhos, com idade média de aproximadamente 9 anos, embora possa acometer cães jovens, de até um ano de idade (Blackwood *et al.*, 2012; London; Thamm, 2020). Apesar da ocorrência frequente em cães sem raça definida, algumas raças apresentam risco aumentado de desenvolvimentos dos tumores, como Boxer, Pug, Labrador e Golden Retriever, Boston Terrier e Weimaraner (Camus, 2022; London; Thamm, 2020). Shar-peis são predispostos ao desenvolvimento de MCT

biologicamente mais agressivos, inclusive em animais jovens (Blackwood *et al.*, 2012). Não há predileção por sexo (Blackwood *et al.*, 2012), embora entre animais castrados, as fêmeas apresentaram maior risco de desenvolvimento de MCT do que machos (White *et al.*, 2011). Também foi verificado que cadelas castradas apresentaram um risco aumentado para o desenvolvimento de MCT em comparação com fêmeas intactas, e machos castrados possuíam um risco possivelmente mais alto do que machos intactos (White *et al.*, 2011).

Em cães, os MCT podem se desenvolver em qualquer região do corpo e apresentar-se como lesões únicas ou múltiplas. Aproximadamente 50% dos MCT ocorrem no tronco e região perineal, 40% nos membros e 10% no pescoço e cabeça (London; Thamm, 2020). O aspecto macroscópico pode variar, mimetizando outros tumores cutâneos e condições não neoplásicas; deve-se, portanto, considerar o MCT como diferencial em qualquer nódulo cutâneo (Kiupel; Camus, 2019; Welle *et al.*, 2008). Os MCT bem diferenciados usualmente são nódulos bem delimitados com crescimento lento, frequentemente presentes por meses. Já os tumores pouco diferenciados crescem rapidamente, podendo apresentar características infiltrativas e lesões satélites, muitas vezes ulceradas e associadas a prurido e vermelhidão locais (Blackwood *et al.*, 2012).

A etiologia dos MCT permanece indefinida, embora, como a maioria das neoplasias, seja provavelmente multifatorial. As predisposições bem documentadas em determinadas raças de cães sugerem a existência de um componente genético subjacente (Welle *et al.*, 2008). Algumas mutações em proto-oncogenes como o *KIT* têm sido associadas a um comportamento mais agressivo do tumor (Kiupel *et al.*, 2011).

2.2.2 Prognóstico e terapêutica

O prognóstico e opções terapêuticas são afetados pelo histórico do paciente, sinais clínicos e características tumorais, como localização anatômica, velocidade de crescimento, tamanho, aparência macroscópica (por exemplo, presença de ulceração), ocorrência de metástases, probabilidade de recorrência pós-cirúrgica e graduação histológica. A presença de múltiplas lesões deve ser considerada no prognóstico, mas não necessariamente indica uma doença mais agressiva (Blackwood *et al.*, 2012; Mullins *et al.*, 2006). A graduação histológica é atualmente o fator prognóstico mais relevante para cães com MCT. Os dois esquemas de graduação bem estabelecidos, de Patnaik (Patnaik; Ehler; MacEwen, 1984) e Kiupel (Kiupel *et al.*, 2011), são aplicáveis apenas aos tumores cutâneos de cães, devido às diferenças na

histologia e biologia tumoral de mastocitomas subcutâneos, viscerais ou de mucosas e de MCT em outras espécies (Tamlin; Bottema; Peaston, 2020). Tumores classificados como de baixo grau segundo os sistemas de Patnaik (1984) e Kiupel (2011) estão associados a uma sobrevida significativamente prolongada e a uma menor taxa de recorrência (Berlato *et al.*, 2021). Em contraste, MCTs de alto grau demonstram maior agressividade clínica, com índices elevados de recidiva local e metástases, resultando em um prognóstico reservado (Kiupel *et al.*, 2011; Smiech *et al.*, 2018). A literatura aponta que o tempo de sobrevida para MCT de baixo grau pode exceder 70 meses, enquanto para aqueles cuja histopatologia demonstra um número de mitoses superior a cinco por campo (40x), a sobrevida média é reduzida para dois a cinco meses (Berlato *et al.*, 2021; Cifuentes-Arias *et al.*, 2021).

Dentro das condutas terapêuticas, a cirurgia é a abordagem de escolha, preconizando-se a remoção completa do tumor com margens histologicamente limpas. Em casos de tumores de alto grau ou quando a localização limita a obtenção de margens adequadas, a terapia adjuvante com quimioterapia e, em alguns casos, terapias direcionadas como a eletroquimioterapia, é recomendada (Mullins *et al.*, 2006; Thamm, 2013).

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico do MCT é realizado a partir do exame clínico e análise citológica obtida por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) ou capilaridade do nódulo. A citologia permite o diagnóstico de 92 a 96% dos MCTs (Baker-Gabb; Hunt; France, 2003).

Citologicamente, o MCT é composto por células redondas individualizadas, bem delimitadas e com grânulos citoplasmáticos metacromáticos roxos. A granulação pode ser intensa, encobrindo o núcleo, ou escassa, com grânulos inconspícuos. Em espécimes bem granulares o diagnóstico é claro e é comum a presença de grânulos espalhados ao fundo da lâmina, no entanto, pode ser difícil observar o núcleo e características citológicas para gradação nestes casos (Kiupel, 2017). A utilização de corantes do tipo Romanowsky à base de metanol aprimoram a visualização dos grânulos de MC, que se coram eficientemente com corante de Wright. Mesmo em tumores pouco diferenciados, em que a granulação é escassa, alguns grânulos tornam-se visíveis com esta coloração, enquanto, eventualmente, não coram com coloração do tipo Romanovsky aquoso ou corantes utilizados em preparações histológicas (Kiupel, 2017). Os núcleos das células são redondos e localizados no centro ou levemente excêntricos. A degranulação pode estar associada com hemorragia, necrose vascular, edema e

degranulação eosinofílica. A quebra do colágeno ocorre por proteases presentes nas células neoplásicas e inflamatórias para otimizar a invasão tecidual e a proliferação de fibroblastos. Uma grande quantidade de eosinófilos é comumente encontrada na amostra citológica, bem como fibroblastos, células estromais associadas à fibroplasia reativa (Kiupel, 2017; Raskin; Conrado, 2023).

Recentemente, esquemas de graduação citopatológica têm sido desenvolvidos. Em um estudo (Camus *et al.*, 2016), o MCT foi classificado como de alto grau se as células estavam pobremente granulares ou apresentavam ao menos dois dos quatro critérios: presença de figuras de mitose, células bi ou multinucleadas, pleomorfismo nuclear ou anisocariose, definida como tamanho de núcleo >1,5 vezes o núcleo de um mastócito típico (Tabela 1). Essa classificação apresentou boa correlação com o sistema de graduação histológica de Kiupel, com 88% de sensibilidade e 94% de especificidade, bem como com o tempo de sobrevida. Pacientes com tumores de baixo grau citológico apresentam tempo de sobrevida maior e baixa probabilidade de serem de alto grau histológico (Camus *et al.*, 2016).

A presença significativa de eosinófilos e de fibras de colágeno na citologia parecem não correlacionar com a sobrevida (Camus *et al.*, 2016). Em contraste, um estudo encontrou uma correlação moderada entre baixa concentração de fibras de colágeno e mortalidade, sugerindo a inclusão desse critério para classificação de MCT de alto grau (Paes *et al.*, 2022).

O uso da graduação citológica quando aplicado em amostras adequadamente celulares é útil para prever comportamento biológico do tumor, podendo auxiliar no plano de tratamento do paciente, provendo informações prognósticas relevantes previamente à intervenção cirúrgica (Camus *et al.*, 2016; Raskin; Conrado, 2023). Porém, o sistema ainda precisa ser validado, e o diagnóstico citológico de MCT de alto grau deve ser interpretado com cautela. Outros fatores como apresentação e sinais clínicos devem ser considerados na suspeita de MCT com caráter agressivo (Berlato *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Critérios de graduação citológica de MCT cutâneo em cães

Grau citológico	Critérios citomorfológicos
Alto grau	Pouco granular Ou pelo menos dois dos seguintes: Figuras mitóticas Pleomorfismo nuclear Binucleação ou multinucleação > 50% anisocariose
Baixo grau	Acentuada ou moderada granulação Ausência de três critérios de alto grau

Fonte: adaptado de Camus *et al* (2016).

Apesar da PAAF fornecer um diagnóstico em 92 a 96% dos MCTs e da elevada correlação da graduação citológica, a histopatologia segue fundamental para a graduação e determinação do prognóstico dessa neoplasia (Baker-Gabb; Hunt; France, 2003; Blackwood *et al.*, 2012; Camus *et al.*, 2016).

Desde 1984, o sistema de classificação de Patnaik tem sido essencial na determinação do prognóstico dos MCT. Este sistema categoriza os MCTs em três graus (grau I, grau II e grau III) com base em critérios como a extensão do envolvimento tecidual, celularidade, morfologia celular e nuclear, atividade mitótica, reação estromal e presença de edema ou necrose (Tabela 2). Estudos demonstram a validade desse sistema, onde MCTs de grau I apresentam um prognóstico excelente a longo prazo, enquanto os de grau III têm um prognóstico reservado a ruim, devido à alta taxa de recorrência e metástases. No entanto, o comportamento dos MCTs de grau II é mais imprevisível: a maioria segue um curso clínico benigno, mas cerca de 20% destes demonstram comportamento agressivo.

Tabela 2 – Sistema de Patnaik para graduação histológica de MCT cutâneos em cães

Graduação	Critérios histológicos
I – Bem diferenciado	Células redondas monomórficas com citoplasma amplo e bem delimitado, grânulos intracitoplasmáticos de tamanho médio e núcleos redondos. Ausência de figuras de mitose. Grupos celulares compactos ou em linha, confinados à derme. Edema e necrose mínimos.
II – Diferenciação intermediária	Células moderadamente pleomórficas, redondas a ovóides; citoplasma distinto com grânulos finos e eventuais células com citoplasma indistinto e grânulos intracitoplasmáticos grandes e hipercromáticos. Núcleos redondos a indentados e um único nucléolo. Figuras de mitose presentes (0 a 2 por campo de grande aumento). Áreas difusas de edema ou necrose. Infiltração do tumor à derme/tecido subcutâneo.
III – Pouco diferenciado ou indiferenciado	Camada densa de células pleomórficas, com citoplasma indistinto, presença de poucos grânulos finos ou ausência destes. Núcleos redondos e indentados, com um ou mais nucléolos. Figuras de mitose (3 a 6 por campo em grande aumento). Frequentes células binucleadas, eventuais multinucleadas e células gigantes. Edema, hemorragia e necrose presentes. Infiltrado neoplásico em tecido subcutâneo.

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

A aplicação subjetiva do sistema por patologistas gera variabilidade na atribuição dos graus, especialmente para os MCTs de grau I e II, sendo menos controversa para os de grau III. Essa subjetividade pode ser atribuída à falta de diretrizes claras para a classificação em casos em que características histológicas de diferentes graus coexistem. Para superar essas limitações, foi desenvolvido, em 2011, um sistema de classificação em dois níveis, que divide os MCTs em baixo e alto grau, utilizando apenas critérios citomorfológicos como contagem mitótica, multinucleação, núcleos bizarros e cariomegalia (Tabela 3) (Kiupel *et al.*, 2011).

Tabela 3 – Sistema de Kiupel para graduação histológica de MCT cutâneos em cães

Graduação	Critérios histológicos
Alto grau (presença de qualquer um dos critérios de malignidade)	<p>≥ 7 figuras de mitose em 10 campos de maior aumento;</p> <p>≥ 3 células multinucleadas (3 ou mais núcleos) em 10 campos de maior aumento;</p> <p>≥ 3 núcleos bizarros em 10 campos de maior aumento;</p> <p>Presença de cariomegalia.</p>
Baixo grau	Ausência dos critérios de malignidade para alto grau.

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

O sistema de Kiupel foi validado como um fator prognóstico independente, prevendo recorrência local, tempo de sobrevida e mortalidade associada ao MCT, com 97% de concordância entre observadores a partir da definição objetiva dos critérios de atribuição de grau (Kiupel *et al.*, 2011). Contudo, a não consideração do padrão de crescimento ou da extensão do tumor (infiltrativo ou não) é uma limitação deste sistema.

Em tumores de baixo grau (grau I de Patnaik ou baixo grau de Kiupel), os MC apresentam uma morfologia uniforme, com citoplasma bem delimitado, granulação evidente e arquitetura tecidual normalmente preservada, com estroma bem definido. Em contrapartida, tumores classificados em alto grau evidenciam pleomorfismo nuclear, aumento do índice mitótico, multinucleações e, frequentemente, uma distribuição desorganizada das células, com presença de áreas de necrose e de invasão tecidual local (Berlato *et al.*, 2021; Cifuentes-Arias *et al.*, 2021).

Além disso, a avaliação imuno-histoquímica, com a análise da expressão de proteínas como KIT, cujo gene, frequentemente alterado nos MCT e pode estar correlacionado com a agressividade tumoral, complementa a avaliação morfológica (Kiupel & Camus, 2019). Essa análise combinada de técnicas permite que, além do diagnóstico, um prognóstico mais refinado seja realizado.

Por fim, a análise do perfil das mutações no MCT pode ser realizada por técnicas moleculares a partir do DNA extraído do tumor fresco, do tecido parafinizado e ainda a partir da amostra citológica do nódulo (Bellevicine *et al.*, 2013; Gailey *et al.*, 2015; Vozdova *et al.*,

2020b), sendo que a pesquisa por mutações no linfonodo também tem papel relevante. A utilização de esfregaços em lâmina apresenta algumas vantagens sobre o tecido parafinado. Os esfregaços contêm DNA de alta qualidade sem interferência de formol, permitem a avaliação rápida da celularidade e são adequados para armazenamento a longo prazo; sua principal limitação está no sacrifício de material diagnóstico para testes moleculares (Huang; Wei, 2019).

A avaliação de linfonodos regionais é essencial na pesquisa de metástases, pois a sua ocorrência está correlacionada com pior prognóstico. A citologia pode ser utilizada como método de triagem, porém falsos negativos podem ocorrer. A remoção e avaliação histopatológica do linfonodo são sempre recomendadas (de Nardi *et al.*, 2022; Willmann *et al.*, 2021). A análise de mutações do *KIT* em linfonodos regionais pode fornecer informações valiosas sobre o prognóstico e a necessidade de tratamento adjuvante, especialmente em casos de metástases (Rassele *et al.*, 2023).

O estadiamento clínico completo de pacientes com MCT deve incluir ultrassonografia abdominal, radiografia torácica e a PAAF do linfonodo de drenagem (BLACKWOOD *et al.*, 2012). O estadiamento clínico pode ser usado concomitante com as classificações histológicas do tumor, permitindo assim uma melhor avaliação de prognóstico, terapia e decisões clínicas.

2.3 Oncogênese dos mastocitomas

A instabilidade genética é um *hallmark* da maioria das neoplasias, envolvendo aumento nos erros de replicação e reparo de DNA e segregação de cromossomos, por exemplo. Os eventos celulares que levam às mutações representam uma série de etapas que agem em conjunto para alterar o fenótipo morfológico e funcional das células (Giannuzzi; Modiano; Breen, 2022). As mudanças genéticas que predis põe aos MCTs caninos, no entanto, não são completamente compreendidas (London; Thamm, 2020).

A alteração molecular mais bem descrita em MCTs caninos envolve o proto-oncogene *KIT*, que codifica uma proteína receptora de tirosina quinase. Este gene é normalmente expresso em uma variedade de células, e o receptor codificado desempenha um papel crucial na regulação do crescimento celular e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (London; Thamm, 2020). A estrutura da proteína receptora compreende uma região extracelular com cinco domínios semelhantes a imunoglobulinas (codificadas pelos éxons 1 a 9), um domínio transmembranar (éxon 10) e uma região intracelular (éxons 11 a 21). Esta última inclui um

domínio justamembranar regulatório (éxons 11 e 12) e dois domínios de tirosina quinase (Lennartsson *et al.*, 2005; Letard *et al.*, 2008).

O SCF é o ligante para o KIT, sendo sintetizado por células tronco na medula óssea, eosinófilos, fibroblastos e células de músculo liso (Tsai; Valent; Galli, 2022). A ativação da proteína *KIT* pelo SCF desencadeia cascatas de sinalização intracelulares distintas, promovendo a ativação de várias vias de transdução de sinal que são cruciais para a sobrevivência e proliferação celular, bem como diferenciação, maturação e indução da função secretória e a quimiotaxia dos mastócitos (Lennartsson *et al.*, 2005; Letard *et al.*, 2008; Zmorzynski *et al.*, 2024).

2.3.1 Mutações no *KIT*

Variações no gene *KIT* já foram documentadas em diversos tumores em animais e humanos. As mutações com ganho de função foram propostas como mecanismo oncogênico, uma vez que tipicamente levam à ativação constitutiva do gene independente de SCF e subsequente transdução de sinal desregulada (Lennartsson *et al.*, 2005; Letard *et al.*, 2008; Zmorzynski *et al.*, 2024).

Mutações somáticas no *KIT* foram detectadas em cerca de 15% dos MCT cutâneos em cães, apresentando um aumento na incidência de até 35% em casos de mastocitomas de alto grau (Thamm *et al.*, 2019). Em outro estudo, no entanto, uma prevalência de 8 a 40% de mutações foi relatada (Vozdova *et al.*, 2020b), evidenciando a variabilidade tumoral. Uma abordagem compreensiva das principais mutações descritas na literatura é apresentada no Apêndice B.

Os éxons 8 e 11 representam os locais de maior relevância clínica e biológica descritos na literatura. O domínio justamembrana, codificado pelo éxon 11, é o principal ponto para essas alterações. Diversos pesquisadores demonstraram que mutações do tipo duplicação interna em tandem (ITD) nesta região são as alterações mais prevalentes, ocorrendo em 15% a 35% dos casos (Downing *et al.*, 2002; London *et al.*, 1999; Tamlin *et al.*, 2017; Zemke; Yamini; Yuzbasiyan-Gurkan, 2002). A presença dessas mutações no éxon 11 exibe uma correlação com tumores de alto grau histológico, maior instabilidade genômica (Mochizuki *et al.*, 2017) e, consequentemente, um prognóstico desfavorável, com maiores taxas de recorrência e menor tempo de sobrevida (Thamm *et al.*, 2019; Zemke; Yamini; Yuzbasiyan-Gurkan, 2002).

Contudo, nem toda mutação no *KIT* confere agressividade, como demonstrado pela investigação de outras regiões do gene. Mutações do tipo ITDs no éxon 8, localizado no domínio extracelular, estão associadas a um comportamento biológico menos agressivo e a uma maior sobrevida global, contrastando com as mutações do éxon 11; estas mutações foram detectadas em até 33% dos MCTs caninos, exibindo menor grau histológico e atividade proliferativa e, menos frequentemente, localização aberrante de *KIT* (Brocks *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Montanucci *et al.*, 2024). Embora estudos *in vitro* tenham classificado as mutações no éxon 8 como de ganho de função (Letard *et al.*, 2008), seu impacto clínico mais benigno sugere que a localização da mutação — no domínio extracelular (éxons 8 e 9) ou justamembrana (éxon 11) — modula a sinalização intracelular de maneiras distintas.

Ainda, substituições simples de nucleotídeos e deleções também foram identificadas em ambos éxons, apesar da baixa ocorrência (Montanucci *et al.*, 2024; Tamlin *et al.*, 2017; Vozdova *et al.*, 2020b; Willmann *et al.*, 2021). Alterações menos frequentes mas funcionalmente relevantes nos éxons 9, 14, 16 e 17, com potencial ação de ganho de função de sinalização, (Conrad *et al.*, 2023; Letard *et al.*, 2008; Montanucci *et al.*, 2024) demonstram um panorama mutacional complexo.

2.3.2 Outras mutações

Além do *KIT*, a presença de mutações somáticas em outros genes também é explorada. Mutações recorrentes em *GNB1*, *LRP1B*, *SETD2*, *TP53*, *FAT4*, *CSMD3* foram detectadas através do sequenciamento completo do exoma (WES) e subsequente sequenciamento de nova geração (NGS). Estes genes, por exemplo, são reconhecidos como oncogênicos na lista do *Cancer Gene Census* (Vozdova *et al.*, 2020b).

Avanços recentes na genômica revelam que a oncogênese do MCT envolve uma instabilidade cromossômica mais ampla. Trabalhos demonstram que tumores portadores de mutações no *KIT* exibem um número significativamente maior de aberrações no número de cópias (CNAs), como perdas em genes supressores de tumor (*PTEN*, *FAS*) e ganhos em oncogenes (*MAPK3*) (Jark *et al.*, 2017; Mochizuki *et al.*, 2017). Essa instabilidade é corroborada por achados citogenéticos, como a alta prevalência de trissomia do cromossomo 11 (Vozdova *et al.*, 2018).

Mudanças citogenéticas como deleções nos cromossomos 5, 2 e 21 e inserções no cromossomo 21 são observadas em tumores com comportamentos mais agressivos (Mochizuki

et al., 2017). A expressão aumentada dos genes *FOXMI*, *GSN*, *FEN1* e *KPNA2* foram associadas com prognóstico desfavorável. Foram encontradas diferenças na expressão gênica de MCT bem diferenciados e pouco diferenciados, incluindo os genes *CCNB*, *CD20*, *CDCA8*, *NUF2*, *PRC1*, *NUSAPI*, *CENPP* e *UBE2S*, a maioria envolvidos no controle do ciclo celular (Jark *et al.*, 2017; Zmorzynski *et al.*, 2024). Tal complexidade também é demonstrada através da discordância no status mutacional entre o tumor primário e suas metástases linfonodais (Rassele *et al.*, 2023).

Ao analisar a prevalência e ao tipo de mutação identificada, é necessário considerar o impacto da metodologia sobre os resultados. A fonte do material biológico é um ponto de especial relevância. Estudos que utilizam amostras de tecido fresco ou congelado, como os de London *et al.* (1999) e Jark *et al.* (2017), trabalham com DNA e RNA de alta qualidade, otimizando a sensibilidade da detecção. Em contrapartida, a maioria dos trabalhos retrospectivos depende de tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE), como nos estudos de Tamlin *et al.* (2017) e Vozdova *et al.* (2019). A fixação por formalina é notoriamente prejudicial aos ácidos nucleicos, causando fragmentação e modificações químicas que podem dificultar a amplificação por PCR, especialmente de fragmentos longos, e, em alguns casos, levar a resultados falso-negativos. O estudo de Tamlin *et al.* (2017) reporta uma taxa de amplificação de apenas 60%, o que sugere que a prevalência real de mutações na população estudada pode ser subestimada devido à impossibilidade de analisar uma porção significativa das amostras.

Adicionalmente, a evolução das técnicas de biologia molecular ampliou o panorama das mutações conhecidas. Os estudos de Downing *et al.* (2002) e Zemke *et al.* (2002), empregaram primariamente PCR seguido de eletroforese em gel, uma técnica eficaz para identificar grandes inserções como as ITDs, que geram uma banda de tamanho diferente. Contudo, essa metodologia não identifica mutações de ponto (substituições de um único nucleotídeo) ou pequenas indels, o que explica por que o foco inicial da pesquisa foi quase exclusivamente nas ITDs do éxon 11. A introdução do sequenciamento de Sanger, utilizada por Letard *et al.* (2008) e Riva *et al.* (2005), permitiu a identificação de um espectro mais amplo de alterações, incluindo essas mutações menores. Mais recentemente, a aplicação de sequenciamentos de nova geração (NGS), como o sequenciamento completo do exoma (WES) por Vozdova *et al.* (2020) e a hibridização genômica comparativa (aCGH) por Mochizuki *et al.* (2017) aumentaram a sensibilidade para detectar variantes em baixa frequência (subclones tumorais), além de mutações recorrentes em outros genes (*GNBI*) e aberrações no número de cópias (CNVs) em

larga escala. Portanto, ao compilar dados de prevalência, é necessário considerar as limitações da tecnologia empregada, uma vez que a ausência de um tipo de mutação em um estudo pode refletir as tais limitações, e não a sua real ausência biológica.

A determinação do perfil mutacional do *KIT* pode prover informações objetivas e importantes para o clínico oncologista, apesar da presença de tais mutações ainda não terem sido validadas como um fator prognóstico independente (Berlato *et al.*, 2021; Willmann *et al.*, 2021). Devido à heterogeneidade de mutações encontradas nos MCT, a sua caracterização molecular deve ser amplamente explorada e reportada, incluindo o status mutacional completo do *KIT* (Willmann *et al.*, 2021). Em conjunto, esses dados corroboram a oncogênese do MCT como um processo multifatorial, impulsionada por um acúmulo de mutações e instabilidade genômica direcionando a progressão e comportamento tumoral. Ainda, a compreensão de como essas mutações genéticas e epigenéticas e sua heterogeneidade afetam a sinalização celular e a biologia do tumor pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos, com desenvolvimento de terapias que modulem ou regulem estas mutações e suas sinalizações intracelulares. Na veterinária, o acúmulo de tais conhecimentos está no princípio. A descoberta das mutações no *KIT* em MCTs caninos e seu subsequente uso como alvo de inibidores da tirosina quinase é um dos primeiros passos na aplicação desta abordagem na medicina veterinária (Hauck; Oblak, 2020).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, resultados e discussão deste estudo serão apresentados em forma de artigo científico a ser submetido para a revista *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação da graduação citológica demonstra associação positiva com o grau histopatológico de Kiupel. No entanto, a ocorrência de falsos negativos não possibilita considerar o grau citológico como preditor de comportamento biológico da neoplasia. No entanto, sua utilização como ferramenta de triagem e orientação de conduta terapêutica é relevante e deve ser incentivada. A identificação de poucas amostras com mutações potencialmente funcionais sugere que outros mecanismos de agressividade tumoral estejam envolvidos, que não foram aqui mapeados. Diante do perfil genético heterogêneo observado nos mastocitomas caninos, sugere-se que utilização de técnicas de sequenciamento de nova geração para análises de exoma completo, cobrindo múltiplos éxons de *KIT*, permitiria mapear com maior amplitude e precisão as variantes somáticas envolvidas na transformação neoplásica, especialmente ao considerarmos a diversidade genética da população regional e brasileira, composta predominantemente por cães sem raça definida. Além disso, estudos clínicos prospectivos com seguimento terapêutico seriam indicados para investigar a associação entre mutações pontuais, incluindo a aqui descrita, e resposta a inibidores de tirosina quinase.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cells and Tissues of the Immune System. *In: CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY*. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2022. (, n° cap. 2).
- ARCILA, M. E. Simple protocol for DNA extraction from archival stained FNA smears, cytopins, and thin preparations. **Acta Cytologica**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 632–635, 2012.
- BAKER-GABB, M.; HUNT, G.; FRANCE, M. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 81, n. 12, p. 732–738, 2003.
- BELLEVICINE, C. *et al.* Applications and limitations of oncogene mutation testing in clinical cytopathology. **Seminars in Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 30, n. 4, MOLECULAR STUDIES IN ANATOMIC PATHOLOGY: A CURRENT PERSPECTIVE, p. 284–297, 2013.
- BELLEVICINE, C. *et al.* How to prepare cytological samples for molecular testing. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 70, n. 10, p. 819–826, 2017.
- BERLATO, D. *et al.* Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 858–863, 2021.
- BLACKWOOD, L. *et al.* European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e1–e29, 2012.
- BROCKS, B. A. W. *et al.* Internal Tandem Duplication of Exon 8 of *c-kit* Is Associated With Longer Total Survival in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 315–324, 2021.
- CAMUS, M. S. *et al.* Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 1117–1123, 2016.
- CAMUS, M. Mast Cell Neoplasia. *In: SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY*. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2022.
- CARDOSO, H. J. *et al.* The SCF/c-KIT system in the male: Survival strategies in fertility and cancer. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 81, n. 12, p. 1064–1079, 2014.
- CATARINO, J. *et al.* Exploring canine mast cell tumors: An investigation into demographic characteristics, and grading system analysis from a pathology lab data (2019–2021). **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 236, p. 106416, 2025.
- CHEN, P. *et al.* Mutations in Exons 8 and 11 of *c-kit* Gene in Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors and Their Association with Cell Proliferation. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 493, 2022.
- CONRAD, D. *et al.* Immunohistochemical and Molecular Genetic Analysis of Canine Digital Mast Cell Tumours. **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1694, 2023.

DAHLIN, J. S.; HALLGREN, J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 9–17, 2015.

DE NARDI, A. B. *et al.* Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 618, 2022.

DE STREFEZZI, R. F. *et al.* Nuclear Morphometry in Cytopathology: A Prognostic Indicator for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 821–825, 2009.

DOWNING, S. *et al.* Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c- kit in mast cell tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. 1718–1723, 2002.

GAILEY, M. P. *et al.* Multiplatform comparison of molecular oncology tests performed on cytology specimens and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Cancer Cytopathology**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 30–39, 2015.

GIANNUZZI, D.; MODIANO, J. F.; BREEN, M. Genetics of Hematopoietic Neoplasia. *In*: SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY. 7. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2022.

HALSEY, C. H. C. *et al.* Expression of Phosphorylated KIT in Canine Mast Cell Tumor. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 387–394, 2017.

HAUCK, M. L.; OBLAK, M. L. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. *In*: WITHROW AND MACEWEN'S SMALL ANIMAL CLINICAL ONCOLOGY. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2020.

HERGT, F. *et al.* Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. **Veterinary Clinical Pathology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 477–483, 2016.

HORTA, R. S. *et al.* Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 212–223, 2018.

HUANG, M.; WEI, S. Overview of Molecular Testing of Cytology Specimens. **Acta Cytologica**, [s. l.], v. 64, n. 1–2, p. 136–146, 2019.

JARK, P. C. *et al.* Genomic copy number variation associated with clinical outcome in canine cutaneous mast cell tumors. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 111, p. 26–30, 2017.

KASTL, B. C.; POHLMAN, L. M. Basophils, Mast Cells, and Their Disorders. *In*: SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY. 7. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2022.

KIUPEL, M. Mast Cell Tumors. *In*: TUMORS IN DOMESTIC ANIMALS. 5. ed. Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 176–202.

KIUPEL, M. *et al.* Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 147–155, 2011.

KIUPEL, M.; CAMUS, M. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 819–836, 2019.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Mast cells: Emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 48, n. 1–3, p. 14–25, 2010.

LENNARTSSON, J. *et al.* Normal and Oncogenic Forms of the Receptor Tyrosine Kinase Kit. **Stem Cells**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 16–43, 2005.

LETARD, S. *et al.* Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1137–1145, 2008.

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

LONDON, C. A.; THAMM, D. H. Mast Cells Tumors. *In*: WITHROW AND MACEWEN'S SMALL ANIMAL CLINICAL ONCOLOGY. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2020. p. 382–403.

MARCONATO, L. *et al.* Concordance of c-kit Mutational Status in Matched Primary and Metastatic Cutaneous Canine Mast Cell Tumors at Baseline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 547–553, 2014.

MAROUDA, C. *et al.* Cutaneous Canine Mast Cell Tumor: The Use of Proliferative Markers (Ki-67 and Ki-67 × AgNOR) in Cytological Samples for Diagnosis and Prognosis. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 23, 2024.

MATHIESON, W.; THOMAS, G. Using FFPE Tissue in Genomic Analyses: Advantages, Disadvantages and the Role of Biospecimen Science. **Current Pathobiology Reports**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 35–40, 2019.

MOCHIZUKI, H. *et al.* Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 829–839, 2017.

MONTANUCCI, L. *et al.* Mutational Landscape of KIT Proto-Oncogene Coding Sequence in 62 Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 593, 2024.

MULLINS, M. N. *et al.* Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). [s. l.], 2006. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/228/1/javma.228.1.91.xml>. Acesso em: 17 maio 2025.

OLDFORD, S. A.; MARSHALL, J. S. Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 113–124, 2015.

PAES, P. R. O. *et al.* Inclusion of fibroblasts and collagen fibrils in the cytologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 339–348, 2022.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. **Vet. Pathol.**, [s. l.], v. 21, p. 469–474, 1984.

RASKIN, R. E.; CONRADO, F. O. Integumentary system. *In*: CANINE AND FELINE CYTOPATHOLOGY - A COLOR ATLAS AND INTERPRETATION GUIDE. 4. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2023.

RASSELE, A. C. *et al.* Mutations of the *c-KIT* gene in canine mast cell tumors and respective nodal metastases classified according to mast cell infiltration. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 43, p. e07140, 2023.

SABATTINI, S. *et al.* Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3?. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 70–73, 2015.

SCARPA, F.; SABATTINI, S.; BETTINI, G. Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 245–251, 2016.

TAKEUCHI, Y. *et al.* Validation of the prognostic value of histopathological grading or *c-kit* mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 196, n. 3, p. 492–498, 2013.

TAMLIN, V. S. *et al.* Canine mast cell tumours part I: Clinical and survival outcomes. **Veterinary Medicine and Science**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1409–1420, 2022.

TAMLIN, V. S. *et al.* Prevalence of exon 11 internal tandem duplications in the C-KIT proto-oncogene in Australian canine mast cell tumours. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 95, n. 10, p. 386–391, 2017.

TAMLIN, V. S.; BOTTEMA, C. D. K.; PEASTON, A. E. Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment. **Veterinary Medicine and Science**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 3–18, 2020.

THAMM, D. H. *et al.* Prognostic and predictive significance of KIT protein expression and *c-kit* gene mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 451–455, 2019.

TSAI, M.; VALENT, P.; GALLI, S. J. KIT as a master regulator of the mast cell lineage. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 149, n. 6, p. 1845–1854, 2022.

VILLAMIL, J. A. *et al.* Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. [s. l.], 2011. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/239/7/javma.239.7.960.xml>. Acesso em: 30 jul. 2025.

VOEHRINGER, D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 362–375, 2013.

VOZDOVA, M. *et al.* Mutation and methylation status of KIT and TP53 in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 438–444, 2020a.

VOZDOVA, M. *et al.* Prevalence and prognostic value of c-kit and TP53 mutations in canine mast cell tumours. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 247, p. 71–74, 2019.

VOZDOVA, M. *et al.* Recurrent gene mutations detected in canine mast cell tumours by next generation sequencing. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 509–518, 2020b.

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

WELLE, M. M. *et al.* Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 321–339, 2008.

WELLMAN, M. L.; LONDON, C. Cutaneous Mast Cell Tumors. *In*: CUTANEOUS MAST CELL TUMORS. 1. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2021. p. 138–150.

WHITE, C. R. *et al.* Cutaneous MCTs: Associations with Spay/Neuter Status, Breed, Body Size, and Phylogenetic Cluster. **Journal of the American Animal Hospital Association**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 210–216, 2011.

WILLMANN, M. *et al.* Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 8, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2021.755258/full>. Acesso em: 26 mar. 2025.

YANASE, Y. *et al.* The Role of Coagulation and Complement Factors for Mast Cell Activation in the Pathogenesis of Chronic Spontaneous Urticaria. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1759, 2021.

YE, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASCIYAN-GURKAN, V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of *c-KIT* Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 529–535, 2002.

ZMORZYNSKI, S. *et al.* Genetic Changes in Mastocytes and Their Significance in Mast Cell Tumor Prognosis and Treatment. **Genes**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 137, 2024.

APÊNDICE A - Resultados dos sequenciamentos e perfil mutacional do *KIT* éxons 8 e 11 de 45 amostras de MCT cutâneo em 34 cães.

# cão	# caso	<i>KIT 8</i>	<i>KIT 11</i>
1	1	IL	IL
2	2	IL	WT
2	3	SNV 134	NAmp
3	4	IL	IL
4	5	IL	IL
5	6	SNV 120	IL
6	7	WT	WT
7	8	SNV 134	WT
7	9	IL	IL
7	10	SNV 134	WT
7	11	IL	IL
8	12	IL	NAmp
9	13	WT	WT
10	14	IL	NAmp
11	15	IL	NAmp
12	16	SNV 120	SNV 193
12	17	IL	IL
13	18	SNV 120	SNV 193
14	19	SNV 120	NAmp
14	20	IL	IL
14	21	IL	NAmp
15	22	SNV 120	WT
16	23	IL	NAmp
17	24	IL	NAmp
18	25	IL	IL
19	26	IL	IL

20	27	WT	WT
21	28	IL	NAmpl
22	29	IL	NAmpl
23	30	SNV 120	WT
24	31	SNV 120	WT
25	32	SNV 120	WT
26	33	IL	NAmpl
26	34	IL	NAmpl
26	35	IL	WT
27	36	SNV 120	NAmpl
27	37	SNV 120	WT
27	38	SNV 134	WT
28	39	IL	NAmpl
29	40	SNV 120	WT
30	41	SNV 120	WT
31	42	SNV 120	WT
32	43	SNV 120	SNV 193
33	44	SNV 120	WT
34	45	IL	IL

IL = sequenciamento ilegível; NAmpl = ausência de amplificação na PCR; SNV = variante de nucleotídeo único; WT = *Wild type*.

APÊNCIDE B - Resumo de mutações no gene *KIT* e outras alterações genéticas em mastocitomas cutâneos caninos.

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
Brocks <i>et al.</i> (2021)	Analisar o valor prognóstico de mutações ITD no éxon 8 do gene <i>KIT</i> em MCTc, comparando-as com mutações no éxon 11.	221	PCR e Eletroforese Capilar	ITD	Éxon 8	Extracelular	33,0% (73/221)	Especula-se que não resulte em ganho de função, podendo ter efeito neutro ou perda de função.	Associada a melhor prognóstico, baixo grau histológico, baixos índices de proliferação e maior sobrevida.
		221	PCR e Eletroforese Capilar	ITD	Éxon 11	Justamembrana	45,2% (100/221)	Ganho de função, levando à ativação constitutiva do receptor KIT.	Associada a um pior prognóstico, alto grau histológico, altos índices de proliferação e menor sobrevida.
Conrad <i>et al.</i> (2023)	Caracterizar mastocitomas digitais caninos quanto à graduação, marcadores imunohistoquímicos e mutações nos éxons 8, 9, 11 e 14.	68	PCR e Sequenciamento Sanger	ITD; SNP (C>T; Tirosina>Tirosina); SNP (T>C)	Éxon 11; Éxon 11; Íntron 11	Justamembrana	12,7% (8/63); 25,4% (16/63)	Ganho de função.	Associação significativa com maior grau histológico, maior contagem mitótica, Ki67 elevado e padrão KIT aberrante.
		68	PCR e Sequenciamento Sanger	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) (G > A)	Éxon 14	Domínio Tirosina Quinase	Um caso (1/53)	Troca de aminoácido (ácido glutâmico por lisina), com	Dados de prognóstico não disponíveis.

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
		68	PCR e Sequenciamento Sanger	Nenhuma mutação encontrada	Éxons 8 e 9	Extracelular e Justamembrana	0%	potencial alteração funcional. Não aplicável.	Não foi possível estabelecer correlação.
Downing <i>et al.</i> (2002)	Determinar a prevalência de ITDs nos éxons 11 e 12 do KIT e correlacionar com grau histológico e comportamento biológico.	157	PCR e Eletroforese em gel de agarose	ITD	Éxons 11 (região 3' do éxon 11, podendo incorporar parte do íntron 11)	Justamembrana	33% (52/157) no total. Grau I: 8%; Grau II: 35%; Grau III: 35%	Ganho de função, com ativação constitutiva do receptor KIT.	Tumores com ITD apresentaram 5x mais chance de serem de grau II/III e 2x mais chance de recorrência e metástase (porém sem significância estatística no estudo).
Giantin <i>et al.</i> (2012)	Investigar a expressão do mRNA do <i>KIT</i> e sua relação com grau, prognóstico e mutações.	59	PCR de cDNA e Sequenciamento	ITD de 12 bp	Éxons 8 e 9	Extracelular	1/59	Inserção de 4 aminoácidos (QILT) no resíduo 421 (ITD417-421) com potencial de ganho de função.	Não foi possível estabelecer correlação.

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
		59	PCR de cDNA e Sequenciamento	ITDs (36 e 45 bp) e uma deleção (27 bp)	Éxon 11	Justamembrana	1/59	Alterações que levam à ativação constitutiva do receptor (ganho de função).	Não foi possível estabelecer correlação.
Jark <i>et al.</i> (2017)	Comparar variações no número de cópias (CNVs) em MCTs de cães com sobrevida curta vs. longa.	10	Hibridização genômica comparativa em array (aCGH)	CNV - PERDA	Genes em múltiplos cromossomos (ex: PTEN, FAS)	Genes supressores de tumor e de regulação da apoptose	50% (3/6) dos cães do grupo de pior prognóstico	Redução na supressão tumoral e na apoptose, favorecendo a progressão do câncer.	A perda de cópias destes genes foi encontrada exclusivamente e no grupo com menor sobrevida, associando-se a um pior prognóstico.
		10	aCGH	CNV - GANHO	Genes em múltiplos cromossomos (ex: MAPK3, WNT5B, FGFs)	Genes ligados à proliferação celular, migração e angiogênese	33% (2/6) dos cães do grupo de pior prognóstico	Aumento da sinalização para proliferação, migração e sobrevivência celular.	O ganho de cópias foi encontrado exclusivamente e no grupo com menor sobrevida, associando-se a um pior prognóstico.
Letard <i>et al.</i> (2008)	Examinar os tipos e a frequência de	191	RT-PCR e Sequenciamento	ITD e substituição de ponto	Éxon 8	Extracelular	4,7% (9/191)	Ganho de função, causando	Demonstra que são mutações

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
	mutações no gene KIT e avaliar seu efeito funcional.							ativação constitutiva e proliferação celular independente.	ativadoras, implicando um papel na tumorigênese. Sem dados de prognóstico.
		191	RT-PCR e Sequenciamento	Substituição de ponto (S479I e N508I)	Éxon 9	Extracelular	4,2% (8/191)	Ganho de função, com ativação constitutiva e proliferação celular independente.	Demonstra que são mutações ativadoras, implicando um papel na tumorigênese. Sem dados de prognóstico.
		191	RT-PCR e Sequenciamento	ITD, deleções e mutações in-frame	Éxon 11	Justamembrana	16,8% (32/191)	Ganho de função, com ativação constitutiva e proliferação celular independente.	Cita trabalhos anteriores que associam mutações neste éxon a maior grau, recorrência e morte.
		191	RT-PCR e Sequenciamento	Deleção com inserção (Del826-828InsDT)	Éxon 17	Domínio Tirosina Quinase (alça de ativação)	0,5% (1/191)	Ganho de função, mas com insensibilidade a inibidores de tirosina quinase, sugerindo resistência.	Implicações terapêuticas importantes devido à resistência.

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
London <i>et al.</i> (1999)	Investigar a presença de mutações no gene <i>KIT</i> , focando em duplicações em tandem.	11 e 2 linhagens celulares	RT-PCR, PCR genômico e Sequenciamento	Duplicação em Tandem (ITD) de 45 a 70 bp	Região 3' do Éxon 11, podendo envolver Íntron 11 e Éxon 12	Justamembrana	45,5% (5/11) dos tumores primários	Ganho de função, com fosforilação constitutiva do receptor KIT.	Sugere que estas mutações contribuem para o desenvolvimento ou progressão dos MCTs caninos.
Riva <i>et al.</i> (2005)	Identificar tipos e locais de mutações no <i>KIT</i> e correlacioná-los com a classificação histológica.	32	RT-PCR e Sequenciamento	Substituição de ponto (C>T na posição 1756)	Éxon 11	Justamembrana	22% (7/32)	Pode resultar na ativação do receptor KIT independente do ligante.	Encontradas apenas em tumores de grau I e II. Sugere associação com malignidade, mas sem valor prognóstico confirmado.
		32	RT-PCR e Sequenciamento	Deleção de 6 pares de base (posições 1691-1696)	Éxon 11	Justamembrana	3,1% (1/32)	Elimina os aminoácidos Trp-556 e Lys-557, alterando o domínio inibitório.	Detectada em um único cão com tumor de grau II.
Mochizuki <i>et al.</i> (2017)	Realizar perfil genômico para identificar CNAs associadas a mutações no <i>KIT</i> e alto grau.	147	oaCGH, ddPCR, Sequenciamento	ITD, deleção, substituição	Éxons 8, 9 e 11	Extracelular e Justamembrana	29% (42/147)	Ativação constitutiva do receptor KIT com ganho de função.	Fortemente associada a alto grau histológico. Tumores com mutação no KIT apresentaram

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
		147	oaCGH, ddPCR	Aberração no Número de Cópias (CNA)	Genoma completo (ex: perda em CFA 5, ganho em CFA 31)	Genes em vias supressoras de tumor (p53, RB) e oncogenes.	Variável. Ex: Perda de TP53 em 57,6% dos tumores com KIT mutado.	Desregulação de vias de controle do ciclo celular, apoptose e proliferação.	genoma mais instável. Acúmulo progressivo de CNAs conforme o aumento do grau histológico.
Montanucci <i>et al.</i> (2024)	Analisar a sequência codificadora completa (21 éxons) do gene <i>KIT</i> em MCTs cutâneos e subcutâneos.	62 (38 cutâneos, 24 subcutâneos)	RT-PCR e Sequenciamento de Sanger	ITD, SNV, Deleções	Éxons 2, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 16 e 3'-UTR	Múltiplos	Variável. Ex: ITD no éxon 11 em 21% dos cutâneos.	Ganho de função para mutações conhecidas. Predição <i>in silico</i> para novas variantes.	Confirma prevalência diferencial: ITDs no éxon 11 mais comuns em MCTs cutâneos de alto grau; ITDs no éxon 8 mais prevalentes em subcutâneos.
		62 (38 cutâneos, 24 subcutâneos)	RT-PCR e Sequenciamento de Sanger	Nova SNV (Asp767His)	Éxon 16	Domínio Tirosina Quinase (TK2)	3,2% (2/62), exclusivamente em MCTs subcutâneos	Predita como patogênica <i>in silico</i> .	Descoberta pode ajudar a explicar o comportamento clínico variável de MCTs subcutâneos.

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
Rassele <i>et al.</i> (2023)	Avaliar a incidência de mutações no éxon 11 do <i>KIT</i> em MCTs primários e em seus linfonodos regionais.	34	PCR	ITD	Éxon 11	Justamembrana	20% (7/34) no total (tumor e/ou linfonodo)	Ganho de função, associado à progressão tumoral.	Discordância encontrada: em 3 casos, a mutação foi detectada apenas no linfonodo metastático, e não no tumor primário.
Tamlin <i>et al.</i> (2017)	Determinar a prevalência de ITDs no éxon 11 do <i>KIT</i> em MCTs da Austrália e avaliar a relação com fatores prognósticos.	74	PCR e Eletroforese	ITD	Éxon 11	Justamembrana	17,6% (13/74) no total. Grau III: 55,6%; Alto Grau: 50%	Ganho de função, levando à proliferação celular descontrolada.	Associação significativa com alto grau histológico.
Vozdova <i>et al.</i> (2019)	Analisar a prevalência e o valor prognóstico de mutações nos genes <i>KIT</i> e <i>TP53</i> .	41	PCR e Sequenciamento	Substituições de ponto e ITDs	Éxons 8, 9 e 11	Extracelular e Justamembrana	19,5% (8/41)	Ganho de função, levando à proliferação celular.	Presença de mutações no c-kit foi significativamente associada a alto grau histológico.
Vozdova <i>et al.</i> (2018)	Investigar aberrações cromossômicas (estruturais e CNVs) em MCTs.	16	FISH	Ganho de cromossomo (Trissomia)	Cromossomo 11	Múltiplos (ex: <i>CDKN2A/B</i>)	81% (13/16)	Aumento do número de genes que podem estar envolvidos na progressão tumoral.	Alta frequência sugere um possível papel na progressão dos MCTs. Instabilidade

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
		16	FISH	Rearranjos cromossômicos e CNVs	Múltiplos cromossomos e genes	Múltiplos	Variável e heterogêneo	Desregulação de vias celulares, contribuindo para a instabilidade genômica.	cromossômica geral. Heterogeneidade sugere que são eventos secundários. Acúmulo de alterações em tumores agressivos.
Vozdova <i>et al.</i> (2020 - Mutation and methylation)	Analisar mutações e metilação dos genes <i>KIT</i> e <i>TP53</i> em cMCTs e scMCTs.	38 (27 cutâneos, 11 subcutâneos)	PCR e Sequenciamento	ITDs e mutação de ponto	Éxons 8 e 11	Extracelular e Justamembrana	26% nos cMCTs e 9% nos scMCTs	Mutações conhecidas por causar ganho de função.	Mutações no éxon 11 associadas a alto grau e redução na sobrevida. Éxon 8 sem associação com prognóstico negativo.
		38 (27 cutâneos, 11 subcutâneos)	PCR e Sequenciamento	ITD de 12 bp (ITD 417-421)	Éxon 8	Extracelular	9% (1/11)	Mutações conhecidas por causar ganho de função.	Primeiro caso de mutação no gene <i>KIT</i> detectado em um MCT subcutâneo.
Vozdova <i>et al.</i> (2020 - Recurrent	Utilizar NGS para descobrir mutações	81	WES, Painel NGS, Sanger	ITDs e substituições de ponto	Éxons 8, 9 e 11	Extracelular e Justamembrana	17,3% (14/81)	Ganho de função.	Mutações no éxon 11 são de prognóstico negativo.

Referência (Autor, Ano)	Objetivo do Estudo	Amostra (n)	Método de Detecção	Tipo de Mutação	Localização	Domínio Funcional	Frequência (%)	Consequência Funcional	Correlação Clínica
gene mutations)	recorrentes em MCTs.	81	WES, Painel NGS, Sanger	Nova mutação recorrente: Substituições de ponto	Gene <i>GNBI</i>	Subunidade beta 1 da Proteína G	17,3% (14/81)	Ativação de vias de sinalização downstream.	Mutações no <i>GNBI</i> não afetaram negativamente a sobrevida, mostrando tendência a prognóstico mais favorável.
Zemke <i>et al.</i> (2002)	Investigar a associação entre mutações no domínio justamembrana do <i>KIT</i> e o grau do tumor.	88	PCR e Sequenciamento Sanger	Duplicações (44 a 69 bp)	Região 3' do Éxon 11 e Intron 11	Justamembrana	9,1% (8/88)	Provável ganho de função.	Fortemente associada a tumores mais agressivos (Grau II e III).
		88	PCR e Sequenciamento Sanger	Deleções (6, 7 e 30 bp)	Junção Intron 10/Éxon 11 e dentro do Éxon 11	Justamembrana	4,5% (4/88)	Desregulação do receptor.	Encontradas exclusivamente em tumores de Grau II.

Fonte: o próprio autor (2025).