

UNIVERSIDADE PAULISTA
BRENO AGUIAR SALZEDAS

**MODULAÇÃO COLAGÊNICA NA PROGRESSÃO METASTÁTICA NODAL
EM CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO**

SÃO PAULO
2025

BRENO AGUIAR SALZEDAS

**MODULAÇÃO COLAGÊNICA NA PROGRESSÃO METASTÁTICA NODAL
EM CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

**SÃO PAULO
2025**

Salzedas, Breno Aguiar.

Modulação colagênica na progressão metastática nodal em cães portadores de mastocitoma cutâneo / Breno Aguiar Salzedas. - 2025.

44 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Colágeno. 2. Miofibroblastos. 3. Oncologia veterinária.
4. Vênulas pós-capilares. I. Xavier, José Guilherme (orientador).
II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

BRENO AGUIAR SALZEDAS

**MODULAÇÃO COLAGÊNICA NA PROGRESSÃO METASTÁTICA NODAL
EM CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/ __/ ____

_____/ __/ ____

_____/ __/ ____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e sabedoria ao longo desta caminhada.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier pela orientação, paciência e apoio fundamentais para a realização deste trabalho.

À UNIP, pela oportunidade e estrutura oferecida.

À CAPES, pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudos.

Ao Hospital Veterinário Vet Popular, em nome da Dra. Ayla Rocha, pelo auxílio e cessão das amostras.

À minha família, Célia, Silvio, Larissa, Diego, Estela, Diana e Manu, pelo amor incondicional, incentivo e suporte em todos os momentos.

Aos amigos Jéssika Takaki, Prof. Dr. Franco Ferraro Calderaro, Renata Dutra, Isabella Monteiro e Eurides Dias, pelo apoio e encorajamento ao longo dessa jornada.

Ao Paulo Vedovato pela histotécnica.

Aos tutores que autorizaram o uso das amostras.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a finalização deste projeto.

MODULAÇÃO COLAGÊNICA NA PROGRESSÃO METASTÁTICA NODAL EM CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO

Artigo a ser submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira.

ABSTRACT.- Salzedas, B. A.¹; Freitas, R. F. ¹; Arita, D. B. ¹; Spadari, L.T. ¹; Boccia, J.P. ¹; Xavier, J.G.¹ [**Collagen Modulation in Nodal Metastatic Progression in Dogs with Cutaneous Mast Cell Tumors**] Modulação colagênica na progressão metastática nodal em cães portadores de mastocitoma cutâneo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. ¹Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, Rua Doutor Bacelar, 1212, Vila da Saúde, São Paulo, SP, 04026-002, Brasil; E-mail: breno.salzedas@gmail.com

Recent studies across multiple species have highlighted the importance of the tumor stroma, particularly cancer-associated fibroblasts (CAFs) and the extracellular matrix (ECM), in neoplastic progression. Metastasis is the leading cause of death in oncology patients, regardless of species, with lymph nodes being one of the most frequently colonized sites by tumor cells. Although extensively studied in primary tumors, the role of the stroma in metastatic sites remains poorly understood. In this study, using morphological, histochemical, immunohistochemical, and morphometric tools, we investigated aspects of the nodal stroma in dogs with cutaneous mast cell tumors—the second most common malignant neoplasm in dogs—with or without lymph node metastasis. Twenty-four lymph node samples from patients diagnosed with cutaneous mast cell tumors of low and high histological grade were evaluated. The lymph nodes were graded according to Weishaar et al. (2014), and the myofibroblast population was quantified based on the immunoexpression of smooth muscle actin, the predominant phenotypic marker in CAFs. Collagen deposition, the main component of the ECM, was assessed using Masson's trichrome-stained sections. High-grade mast cell tumors showed greater nodal metastasis compared to low-grade tumors. There was no statistical difference in myofibroblast count among the different groups. However, increased collagen deposition was observed at nodal colonization sites, an event typically associated with poorer prognosis. Additionally, phenotypic modulation was noted in postcapillary venules in these areas, with frequent endothelial flattening. These findings highlight significant microenvironmental modulation associated with the primary metastatic site in canine mast cell tumors, offering new perspectives for prognostic markers and potential therapeutic interventions targeting collagen.

Key-words: collagen, myofibroblast, veterinary oncology, postcapillary venules.

RESUMO.- [Modulação colagênica na progressão metastática nodal em cães portadores de mastocitoma cutâneo] Estudos recentes, em diversas espécies, apontam a importância do estroma tumoral, especialmente dos fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e da matriz extracelular (MEC), na progressão neoplásica. A metástase é a maior causa de óbito em pacientes oncológicos, independentemente da espécie, sendo o linfonodo um dos locais mais frequentemente colonizados por células tumorais. Embora amplamente investigado no tumor primário, o papel do estroma no foco metastático ainda é pouco elucidado. Neste estudo, com o emprego de ferramentas morfológicas, histoquímicas, imuno-histoquímicas e morfométricas, foram investigados aspectos do estroma nodal de cães com mastocitoma cutâneo, a segunda neoplasia maligna mais comum em cães, com ou sem metástase em linfonodo. Foram avaliadas 24 amostras de linfonodo de pacientes diagnosticados com mastocitoma cutâneo, de baixo e alto grau de malignidade, sendo os linfonodos graduados de acordo com Weishaar et al. (2014) quantificando-se a população miofibroblástica, a partir da imunoexpressão de actina de músculo liso, perfil fenotípico predominante em CAFs, e a deposição colagênica, principal componente da MEC, investigada em cortes corados pelo tricrômico de Masson. Os mastocitomas de alto grau de malignidade apresentaram maior metastatização nodal se comparados aos de baixo grau. Não houve diferença estatística na contagem de miofibroblastos entre os diferentes grupos. Porém, identificou-se aumento na deposição colagênica em sítios de colonização nodal, evento usualmente associado à pior prognóstico. Em associação houve uma modulação fenotípica em vênulas pós-capilares nessas áreas, com frequente achatamento endotelial. Tais achados evidenciam uma importante modulação microambiental associada ao principal sítio metastático em mastocitomas caninos, abrindo perspectivas para novos parâmetros prognósticos, e para intervenções terapêuticas complementares tendo o colágeno como alvo.

Palavras-chave: colágeno, miofibroblastos, oncologia veterinária, vênulas pós-capilares.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Graduação de linfonodos segundo Weishaar et al. (2014) nos pacientes diagnosticados com mastocitoma de baixo grau de malignidade.	22
Figura 2. Graduação de linfonodos segundo Weishaar et al. (2014) nos pacientes diagnosticados com mastocitoma de alto grau de malignidade.	23
Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando delicada cápsula densamente colagênica, com escassa deposição de fibras em áreas subjacentes (setas), tricrômico de Masson. 400x.	23
Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando imunomarcção para actina de músculo liso concentrada em área capsular (setas), DAB contracorada com Giemsa. 400x.	24
Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando imunomarcção para actina de músculo liso em região paracortical, com destaque para a imunomarcção pericítica em parede de vênula de endotélio alto (seta). DAB contracorada com Giemsa. 400x.	24
Figura 6. Fotomicrografia de linfonodo colonizado por células neoplásicas (HN3), que se dispõe em tapete em região paracortical (setas). Hematoxilina-eosina. 10x.	24
Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando vênulas de endotélio alto em região paracortical (setas). Hematoxilina-eosina. 400x.	25
Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando colonização por mastócitos neoplásicos (HN2), exibindo o predomínio de vasos revestidos por endotélio pavimentoso (setas). Hematoxilina-eosina. 400x.	25
Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando delicado estroma colagênico, predominantemente	26

em cercanias vasculares (setas). Tricrômico de Masson. 400x.	
Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando colonização por mastócitos neoplásicos (HN2), acompanhados por densificação estromal, esboçando traves (setas). Tricrômico de Masson. 400x.	26
Figura 11. Percentual do campo histológico ocupado por deposição colagênica em microambiente nodal de cães portadores de mastocitoma cutâneo, avaliado em cortes corados pelo tricrômico de Masson (N=18). Diferença estatisticamente significativa com $p < 0,0001$ entre os grupos *: HN0 e HN2, ** entre HN0 e HN3 (teste T de Student, não pareado).	26
Figura 12. Percentual do campo histológico ocupado por deposição colagênica em microambiente nodal de cães portadores de mastocitoma cutâneo, de baixo e alto grau de malignidade, avaliado em cortes corados pelo tricrômico de Masson (N=17), evidenciando ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Teste T de Student não pareado, $p > 0,05$.	26
Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando área folicular, acompanhada em periferia por densificação estromal e imunopositividade para 1a4 (setas). DAB contracorado com Giemsa. 400x.	27
Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando colonização por mastócitos neoplásicos (HN2), acompanhados por densificação estromal e imunopositividade para 1a4 em trave conjuntiva (setas). DAB contracorado com Giemsa. 400x	27
Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando região interfolicular apresentando estroma denso com imunopositividade para 1a4 (setas). DAB contracorado com Giemsa. 400x	28
Figura 16. Contagem de miofibroblastos em “hot spots” de linfonodos com padrão HN0, HN2 e HN3 em cães portadores de mastocitoma cutâneo, de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à imunomarcacão com anticorpo 1a4, evidenciando	28

ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p>0,05$. (N=13) (teste T de Student, não pareado).

Figura 17. Contagem de miofibroblastos em “hot spots” nodais, 28
provenientes de cães portadores de mastocitoma cutâneo, de baixo e
alto de grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à
imunomarcação com anticorpo 1a4, evidenciando ausência de
diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p>0,05$ (N=14),
(Teste T de Student não pareado).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Graduação histopatológica de linfonodos de cães portadores de mastocitoma cutâneo.	18
Quadro 2. Protocolo da imunomarcagem.	19
Quadro 3. Dados clínicos, localização e graduação histopatológica das neoplasias primárias e dos linfonodos avaliados.	21

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
A	Alto grau
B	Baixo grau
CAF	Fibroblasto associado ao câncer
CGA	Campo de grande aumento
DAB	Diaminobenzidina-3'3
F	Fêmea
HN0	Sem disseminação
HN1	Pré-metastático
HN2	Metástase inicial
HN3	Metástase evidente
Ico	Índice de colágeno
M	Macho
MEC	Matriz extracelular
Mm	Milímetros
°C	Graus Celsius
S.R.D.	Sem raça definida
TBS	Solução salina tamponada com Tris
α-SMA	Alfa actina de músculo liso

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	14
2.MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Animais	17
2.2. Avaliação histopatológica.....	17
2.3. Quantificação do colágeno.....	18
2.4. Avaliação imuno-histoquímica	19
2.5. Avaliação estatística	20
3.RESULTADOS	21
4. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Tumores constituem ecossistemas complexos, envolvendo vários tipos celulares, implicadas na tumorigênese e na modulação do comportamento neoplásico (AGUADÉ-GORGORIÓ et al., 2024). Assim, além das células tumorais propriamente ditas, uma série de elementos, como células imunes, endoteliais, pericitos, fibroblastos e a matriz extracelular (MEC) modulam o crescimento tumoral, e integram o microambiente tumoral (MONTERAN & EREZ, 2019). Essa interação entre parênquima e estroma acompanha a progressão neoplásica, estabelecendo um nicho que favorece a sobrevivência, expansão e escape à imunovigilância, envolvendo com frequência uma cooptação, pelas células tumorais, da população local, evento bastante investigado no tumor primário (CHEN et al., 2021; MARTINEZ-REYES & CHANDEL, 2021). No entanto, bem menos é conhecido acerca do microambiente e da dinâmica de interações nos focos metastáticos, em especial em animais de companhia. A metástase é um processo altamente ineficiente, que ocorre em múltiplas etapas, e que culmina com a colonização do “novo” microambiente pelas células neoplásicas, sendo o evento responsável pelo óbito em cerca de 70-90% dos pacientes oncológicos (GARCIA-SILVA & PEINADO, 2024). Reconhecidamente, a principal rota utilizada pelas células neoplásicas para disseminação é a circulatória, sanguínea e/ou linfática, sendo o linfonodo, em geral, o primeiro sítio metastático (BOER et al., 2010). Nas últimas décadas houve um grande avanço na caracterização desses processos, com a identificação de um preparo prévio dos tecidos para o acolhimento às células malignas em disseminação, territórios que passam a ser referidos como nichos pré-metastáticos (KAPLAN et al., 2005). O primeiro a ser estudado foi o pulmonar, e posteriormente fígado, osso e encéfalo (WANG et al., 2024). Também a modulação microambiental do linfonodo para “nidar” as células neoplásicas em disseminação foi investigada, destacando-se a indução da imunossupressão e da linfangiogênese (LIU & CAO, 2016). Uma peça chave nesse evento é a célula reticular fibroblástica, distribuída principalmente na paracórte, ativa na síntese de colágeno e de citocinas, influenciando a imunidade e a movimentação celular no microambiente nodal (HAYAKAWA et

al., 1988; GRIFFITH et al., 2014; GRANT et al., 2020).

A metástase nodal tem relevância prognóstica, impactando negativamente a evolução de pacientes em uma série de malignidades na Medicina Humana, como no carcinoma colorretal, carcinoma pancreático, carcinoma de tireoide e melanoma (HONSELMANN et al., 2020; SASHA et al., 2021; ZHU et al., 2021; TROPEA et al., 2022). As metástases em pacientes caninos, em geral, também foram relacionadas com um pior prognóstico, sendo correlacionadas com menor tempo de sobrevivência, como nos carcinomas mamários, osteossarcomas, hemangiossarcomas e mastocitomas (KIM et al., 2021; WILK & ZABIELSKA-KOCZYWAS, 2021; DE NARDI et al., 2022; DE NARDI et al., 2023).

O mastocitoma é o segundo tumor maligno cutâneo mais comum em cães, e possui comportamento biológico variado, relacionado ao grau histopatológico (WEBSTER et al., 2007; KIUPEL et al., 2011). O sistema de graduação histopatológica proposto por Kiupel et al. (2011) divide as lesões em baixo e alto grau, com base em características específicas. Os tumores que possuírem um ou mais dos critérios apresentados a seguir são caracterizados como alto grau, os critérios são: presença de sete ou mais mitoses em 10 campos de grande aumento (CGA), três células multinucleadas em 10 CGA, três núcleos bizarros em 10 CGA e/ou cariomegalia em 10% das células. Todos os tumores que não apresentarem nenhum dos critérios, são identificados como mastocitomas de baixo grau (KIUPEL et al., 2011). Além disso, foi observado que cães da raça Shar-pei tendem a desenvolver mastocitomas de comportamento biológico mais agressivo, enquanto cães das raças Pug e Boxer tendem a desenvolverem tumores menos agressivos (KIUPEL, 2017).

A incidência de metástase nodal em cães portadores de mastocitoma cutâneo varia entre 18% e 68%, na dependência dos linfonodos avaliados, se sentinelas ou regionais (BAGINSKI et al., 2014; FERRARI et al., 2018; BEER et al., 2022). A frequência e relevância biológica da disseminação nodal, além da elevada ocorrência de resultados falso negativos nas avaliações citológicas nodais, levaram à recomendação da realização da linfadenectomia em cães portadores de mastocitomas cutâneos (LAPSLEY et al., 2021). O diagnóstico histopatológico da amostra nodal é baseado no protocolo proposto por Weishaar et al. (2014), com a caracterização de quatro cenários, referidos como: sem

disseminação (HN0), lesão pré-metastática (HN1), metástase inicial (HN2) e metástase evidente (HN3). Krick et al. (2009) mostraram que cães apresentando as maiores graduações tiveram menor intervalo livre da doença e menor sobrevida. A linfadenectomia melhorou a sobrevida dos pacientes (MARCONATO et al., 2018, SABATTINI et al., 2021, CHALFON et al., 2022).

Contemporaneamente, estudos têm abordado a relevância do microambiente no comportamento tumoral, com particular interesse em seu estroma, composto principalmente pelos componentes da MEC, com destaque para as fibras de colágeno, e por fibroblastos ativados, assumindo um fenótipo miofibroblástico, sendo usualmente denominados fibroblastos associados ao câncer (CAFs), com origem pouco compreendida e função relacionada a manutenção tumoral (GLABMAN et al., 2022), principalmente na lesão primária. As avaliações nesse sentido, mas enfocando a lesão metastática são menos frequentes. Com a finalidade de contribuir para o conhecimento dessas relações, esse estudo investiga, com o emprego de parâmetros histológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos, características do estroma nodal de cães portadores de mastocitomas cutâneos, com ou sem disseminação para o linfonodo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram analisados 22 mastocitomas cutâneos, e 24 linfonodos sentinelas e/ou regionais previamente excisados e emblocados provenientes de 22 cães portadores de mastocitoma cutâneo, locados nos arquivos do setor de Patologia do Hospital Veterinário Vet Popular e do Hospital Veterinário da Universidade Paulista (UNIP). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob número de protocolo 3141101224. Todos os tutores autorizaram o uso das amostras para o estudo.

2.2. Avaliação histopatológica

As formações cutâneas e os linfonodos foram seccionados longitudinalmente, acompanhando seu maior diâmetro e submetidos ao processamento histológico convencional. Foram procedidos cortes histológicos de aproximadamente 4 µm do material parafinado, sendo as amostras tumorais coradas pela hematoxilina-eosina, e, quando necessário, pelo azul de toluidina, possibilitando o diagnóstico e graduação, como de baixo ou alto grau de malignidade de acordo com os parâmetros preconizados por Kiupel et al. (2011). Já os cortes de linfonodo foram invariavelmente corados pelos métodos de hematoxilina-eosina e azul de toluidina, possibilitando o rastreamento de mastócitos e o enquadramento nos perfis de Weishaar et al. (2014), caracterizando os linfonodos como sem metástase (HN0), pré-metastático (HN1), metástase inicial (HN2) e metástase evidente (HN3) (Quadro 1). Em complemento, para a pesquisa de parâmetros estromais, foram acrescentadas abordagens histoquímicas, imuno-histoquímicas e morfométricas. Cortes nodais foram submetidos a coloração pelo tricrômico de Masson investigando-se a deposição colagênica em interstício. Por fim, as amostras foram submetidas à imunomarcação para a actina de músculo liso, importante na caracterização de diferenciação miofibroblástica.

Quadro 1. Graduação histopatológica de linfonodos de cães portadores de mastocitoma cutâneo.

Classificação	Crítérios histopatológicos
HN0	Três mastócitos ou menos, isolados, por campo de grande aumento (400x) em seios ou parênquima nodal.
HN1	Mais de três mastócitos, isolados, em quatro campos de grande aumento (400x) em seios ou parênquima nodal.
HN2	Agregados de mais de três mastócitos em seios ou parênquima nodal ou tapetes de mastócitos em seios.
HN3	Discretos focos, nódulos, tapetes ou massas evidentes de mastócitos com desarranjo arquitetural.

Fonte: Weishaar et al. (2014) modificado.

Em todas as análises microscópicas as lâminas foram examinadas por dois pesquisadores (BAS e JGX) com o emprego de fotomicroscópio OPTICAM® acoplado à câmera digital, OPUHD 14.3MP, para documentação dos achados e avaliações morfométricas.

2.3. Quantificação do colágeno

Para a quantificação do colágeno nodal, os cortes foram corados pelo tricrômico de Masson e cinco campos de grande aumento (objetiva de 40x) com maior intensidade de marcação (“hot spots”) foram selecionados, obtendo-se imagens digitalizadas, e submetidas a avaliação morfométrica com o emprego do software de análise de imagem ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD, EUA) com auxílio do plugin IHC Toolbox. Foi mensurado o percentual da área ocupada por colágeno por campo através de uma técnica de limiarização (threshold) para isolar a coloração e quantificar o colágeno, permitindo o cálculo do índice de colágeno (ICo), a partir da média de cada caso (DANIEL et al., 2019). Para a quantificação não foram consideradas as fibras colágenas da cápsula do linfonodo.

2.4. Avaliação imuno-histoquímica

Foram realizados, a partir das amostras nodais selecionadas, cortes de aproximadamente 4 μ m, submetidos a desparafinização na estufa a 60-65°C por uma hora, posteriormente passando por uma bateria de Xilol e diluições decrescentes de álcool. Realizou-se a recuperação antigênica por calor durante um minuto a 125°C na panela elétrica Decloacker. Após resfriamento da solução, procedeu-se a lavagem das lâminas em solução TBS. Em sequência o material foi submetido a bloqueio da peroxidase endógena por cinco minutos, seguindo-se lavagem das lâminas com TBS. Posteriormente procedeu-se a incubação com o anticorpo monoclonal primário de camundongo anti-humano, com reatividade para cães anti-alfa actina de músculo liso a (α -SMA), clone 1a4, DAKO®, overnight. Como anticorpo secundário foi utilizado o sistema EnvisionFlex. Seguiu-se lavagem com solução TBS/água deionizada e a revelação realizada com emprego da diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração com Giemsa por 15 minutos. O anticorpo empregado, sua origem e concentração estão listados no quadro 2.

Quadro 2. Protocolo da imunomarcção

Anticorpo	Natureza	Clone	Concentração	Rec. antigênica	Fabricante
Alfa actina de músculo liso	Monoclonal Camundongo	1a4	1:200	citrato (ph 5,6)	DAKO

Foi investigada a distribuição dos miofibroblastos nas áreas de colonização tumoral nos linfonodos HN2/HN3 e em territórios análogos, nas regiões paracorticais principalmente, em HN0, a partir da expressão citoplasmática de α -SMA. A quantificação dos miofibroblastos foi realizada a partir de “hot spots” em 10 CGA para cada amostra de linfonodo. A distinção entre miofibroblastos e pericitos foi realizada pela disposição das células, considerando os pericitos sempre associados ao endotélio. Estes foram excluídos da contagem.

2.5. Avaliação estatística

A avaliação estatística foi realizada com o emprego do software GraphPad Prism 9® , aplicando-se o teste T de Student, não pareado, considerando-se $p \leq 0,05$ estatisticamente significativa, comparando a deposição colagênica e a contagem de miofibroblastos em linfonodos em relação aos grupos HN0, HN2 e HN3 e em relação às neoplasias de baixo e alto grau de malignidade.

3. RESULTADOS

Foram avaliadas 24 amostras de linfonodos provenientes de 22 cães portadores de mastocitoma cutâneo, sendo que em dois pacientes foram analisados dois linfonodos de regiões distintas. Prevaleram os animais sem raça definida (S.R.D.) (59,1%), fêmeas (63,6%), e com idade média de 10,8 anos. A neoplasia primária foi mais frequentemente localizada nos membros (45,4%), sobretudo os membros pélvicos, equivalente a 60% dos casos em membros (Quadro 3).

Quadro 3. Dados clínicos, localização e graduação histopatológica das neoplasias primárias e dos linfonodos avaliados.

Caso	Raça	Sexo	Idade (anos)	Tumor primário	Linfonodo	Grau tumor/linfonodo
1	SRD	M	14	membro pélvico	poplíteo	B/HN0
2a	SRD	F	10	membro pélvico	inguinal	A/HN3
2b	SRD	F	10	membro pélvico	poplíteo	A/HN2
3	dogo	F	7	membro pélvico	poplíteo	B/HN2
4	SRD	F	-	membro pélvico	poplíteo	A/HN0
5	SRD	M	14	Tórax	axilar	B/HN0
6	SRD	F	5	membro torácico	cervical	A/HN2
7a	SRD	F	9	membro torácico	axilar	B/HN3
7b	SRD	F	9	membro torácico	pré-escapular	B/HN3
8	SRD	F	-	-	-	B/HN0
9	pit bull	F	10	Mama	inguinal	A/HN0
10	SRD	M	15	Tórax	axilar	A/HN3
11	labrador	F	15	Tórax	axilar	B/HN2
12	SRD	M	13	membro pélvico	inguinal	B/HN0
13	golden	M	11	membro torácico	cervical	A/HN3
14	SRD	F	8	perivulvar	inguinal	B/HN3
15	labrador	F	8	pavilhão	cervical	A/HN1
16	pinscher	F	12	mama	-	B/HN2
17	pit bull	M	5	Dorso	axilar	B/HN2
18	SRD	M	10	Tórax	axilar	A/HN2
19	bulldogue	M	-	Orelha	mandibular	B/HN0
20	S.R.D.	F	10	-	-	B/HN0
21	maltês	F	7	-	axilar	B/HN2
22	SRD	F	-	membro pélvico	inguinal	B/HN1

As amostras descritas como “a” e “b” pertencem ao mesmo animal, porém de linfonodos distintos. M: macho, F: fêmea, A: alto grau, B: baixo grau, HN0: linfonodo livre de tumor, HN1: pré-metastático, HN2: metástase inicial, HN3: metástase evidente.

Em termos de graduação histopatológica, 14/22 (63,6%) foram mastocitomas de baixo grau e 8/22 (36,4%) mastocitomas de alto grau de malignidade (Quadro 3). Considerando os linfonodos examinados, foram encontradas metástases nodais em 56,25% das amostras provenientes de cães com mastocitomas de baixo grau e em 75% dos linfonodos de animais com lesões de alto grau. Entre os mastocitomas de baixo grau foram analisados 16 linfonodos, sendo 31,2% (5/16) caracterizados como HN0, 12,5% (2/16) como HN1, 31,2% (5/16) como HN2 e 25,0% (4/16) como HN3 (Figura 1). Enquanto nos mastocitomas de alto grau foram analisados oito linfonodos, com graduação histopatológica de 25,0% (2/8) HN0, 37,5% (3/8) HN2 e 37,5% (3/8) HN3 (Figura 2). Nesse grupo não foi detectado nenhum linfonodo com padrão HN1.

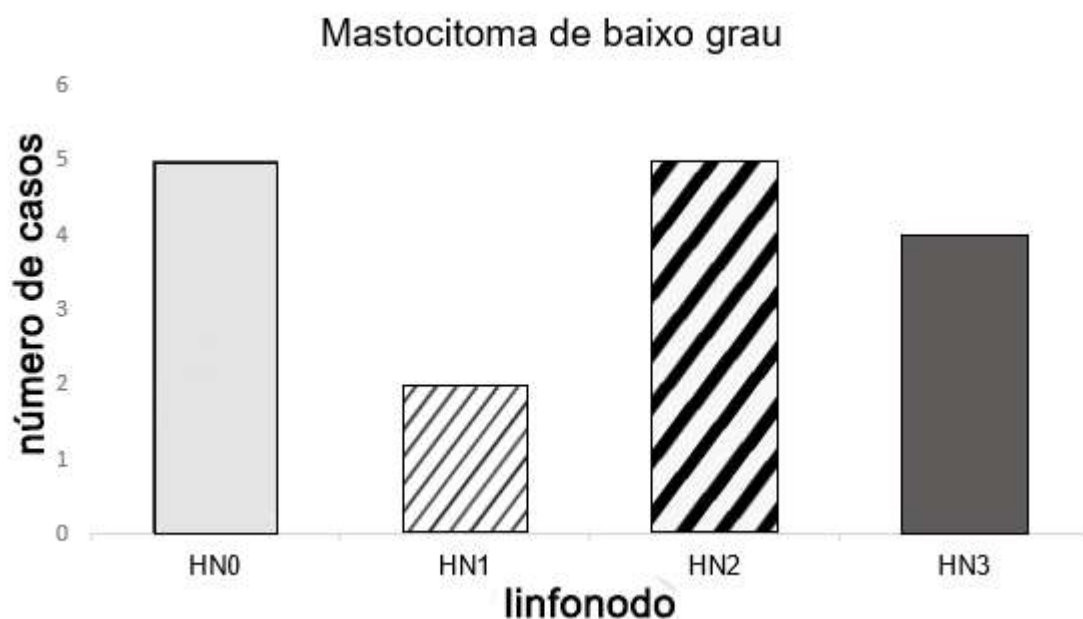


Figura 1. Graduação histopatológica de linfonodos segundo Weishaar et al. (2014), nos pacientes diagnosticados com mastocitoma de baixo grau de malignidade.

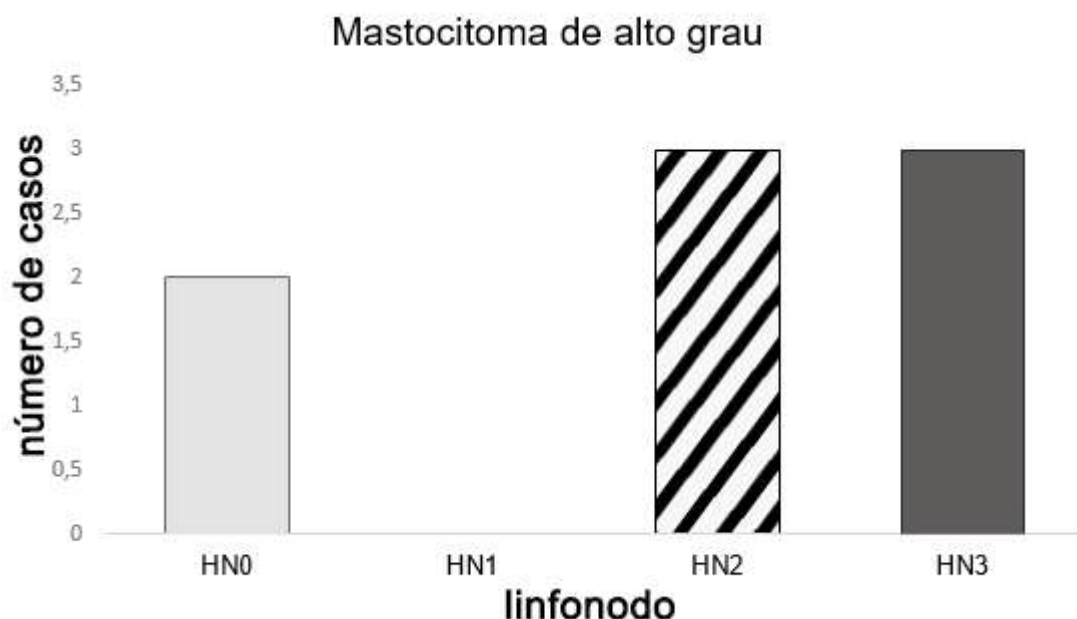


Figura 2. Graduação histopatológica de linfonodos segundo Weishaar et al. (2014), nos pacientes diagnosticados com mastocitoma de alto grau de malignidade.

Os linfonodos sem evidência de colonização neoplásica (HN0), apresentaram preservação arquitetural, com ativação variável de seus compartimentos. De maneira geral, predominaram folículos linfóides secundários e expansões focais paracorticais e sinusais. A principal representação estromal nesses casos situou-se em sítios capsulares, trabeculares e paracorticais. Essa consideração é válida também para a população miofibroblástica (Figuras 3 a 5).

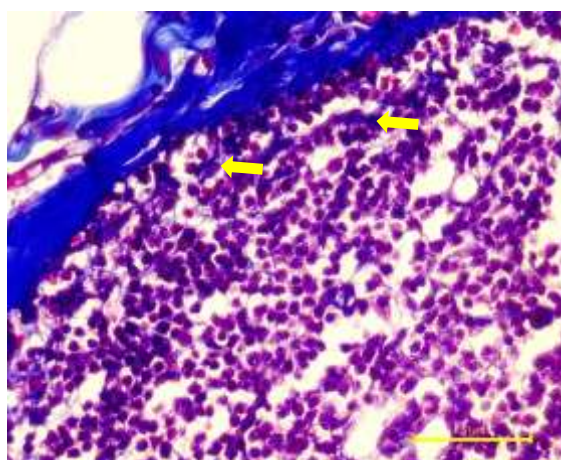


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando delicada cápsula densamente colagênica, com escassa deposição de fibras em áreas subjacentes (setas), tricrômico de Masson. 400x.

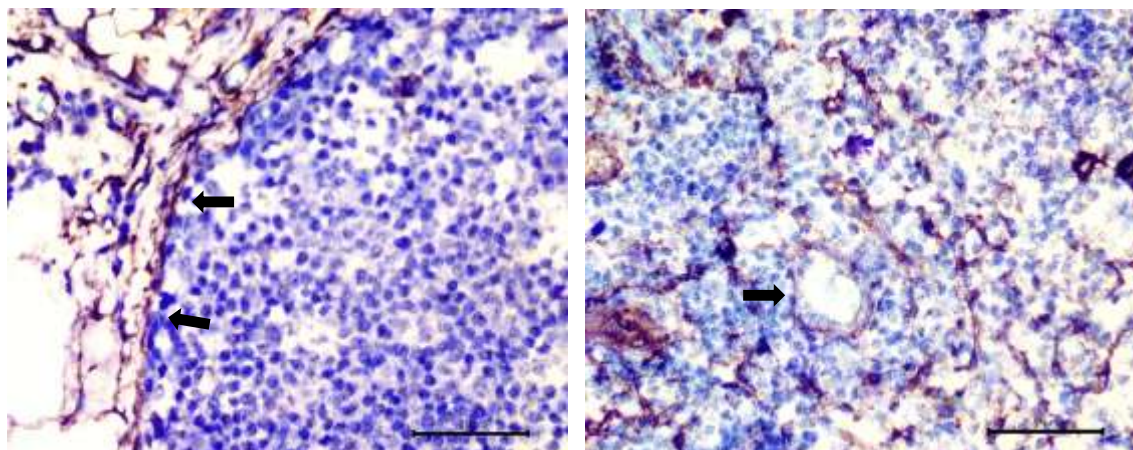


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando imunomarcção para actina de músculo liso concentrada em área capsular (setas), DAB contracorada com Giemsa. 400x.

Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando imunomarcção para actina de músculo liso em região paracortical, com destaque para a imunomarcção pericítica em parede de vênula de endotélio alto (seta). DAB contracorada com Giemsa. 400x.

Nos linfonodos invadidos por mastócitos neoplásicos, estes se dispuseram predominantemente em tapetes, ocupando principalmente as regiões entre e abaixo dos folículos linfoides, em padrões HN2 e HN3, com frequente infiltração eosinofílica associada (Figura 6).

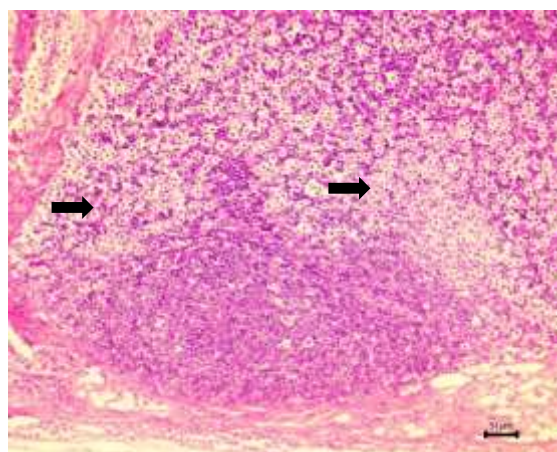


Figura 6. Fotomicrografia de linfonodo colonizado por células neoplásicas (HN3), que se dispõe em tapete em região paracortical (setas). Hematoxilina-eosina. 100x.

Ainda nos sítios de colonização metastática nodal foi identificada, com frequência, a substituição de endotélio cúbico característico nas vênulas pós-

capilares por células pavimentosas (Figuras 7 e 8).

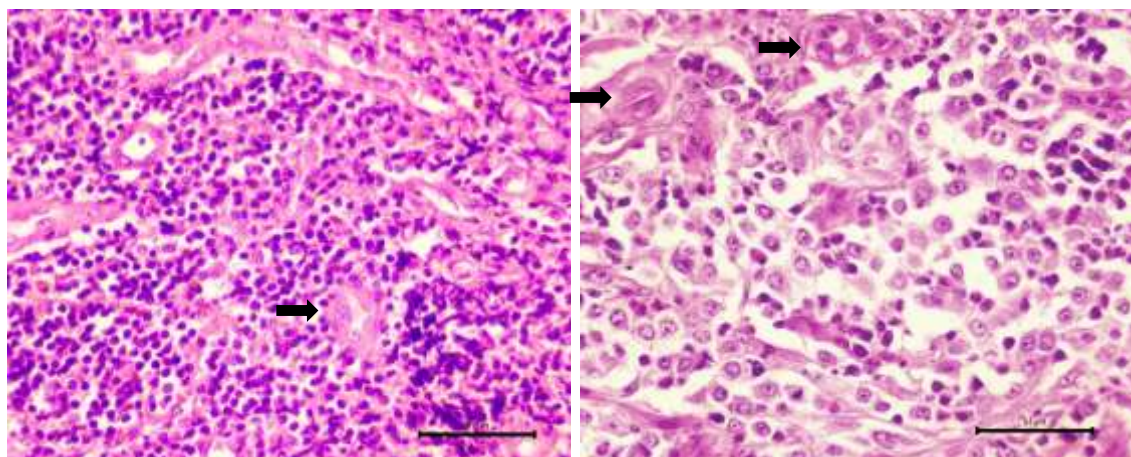


Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo reacional (HN0), evidenciando vênulas de endotélio alto em região paracortical (seta). Hematoxilina-eosina. 400x.

Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando colonização por mastócitos neoplásicos (HN2), exibindo o predomínio de vênulas revestidas por endotélio pavimentoso (setas). Hematoxilina-eosina. 400x.

Nestes locais identificou-se uma maior deposição de colágeno, evidenciada e quantificada em cortes corados pelo tricrômico de Masson (Figuras 9 e 10). Para a avaliação morfométrica foram avaliados “hot spots” colonizados por mastócitos, predominantemente em paracórtex, considerando-se seu equivalente topográfico em linfonodos HN0, totalizando 16 amostras. Foi mensurado o percentual do campo ocupado por fibras colágenas, conforme referido no item 2.3. A média da área colagênica foi de 1,87% em linfonodos classificados como HN0 (N=6); 0,89% no único caso HN1; 12,70% em casos HN2 (N=4); e 14,56% em lesões HN3 (N=5), caracterizando-se diferença estatisticamente significativa entre linfonodos HN0 e HN2/HN3 ($p < 0,0001$, teste T de Student não pareado) (Figura 11). Não houve diferença relativa à deposição colagênica entre os padrões HN2 e HN3. Não foi possível estabelecer a comparação com o grupo HN1 devido a amostragem reduzida. Foi comparada também a deposição de colágeno relacionada à graduação tumoral, evidenciando-se que embora mastocitomas de alto grau tenham sido mais eficientes em termos metastáticos, não mostraram diferença em relação a indução de desmoplasia quando comparados aos mastocitomas de baixo grau

Em relação à imunopositividade para a actina de músculo liso, houve uma distinção relativa aos compartimentos nodais, com rarefação de marcação em folículos e intensificação em territórios em seu entorno, em particular paracórtex, com ou sem colonização neoplásica, porém sem diferença estatisticamente significativa, tanto entre os padrões nodais, HN0, HN2, HN3, quanto em relação as amostras de mastocitomas de baixo e alto grau de malignidade (teste T de Student, não pareado) (Figuras 13 a 17).

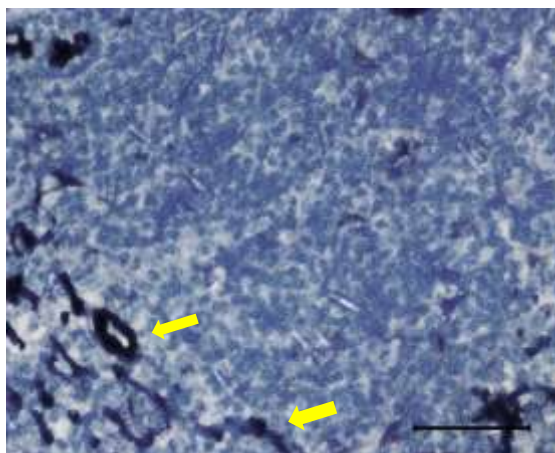


Figura 13. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando área folicular com rarefação estromal, acompanhada em periferia por densificação estromal e imunopositividade para 1a4 (setas). DAB contracorado com Giemsa. 400x.

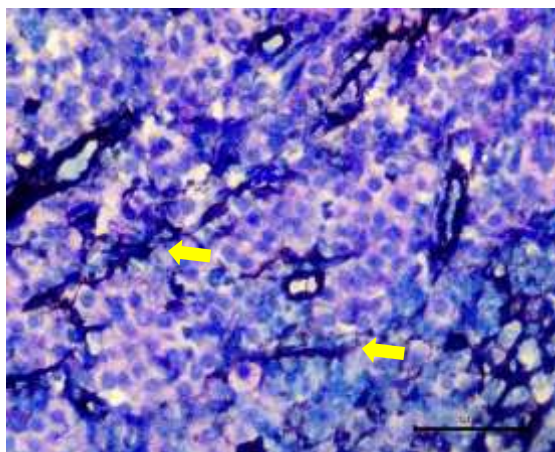


Figura 14. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando colonização por mastócitos neoplásicos (HN2), acompanhados por densificação estromal e imunopositividade para 1a4 em trave conjuntiva (setas). DAB contracorado com Giemsa. 400x.

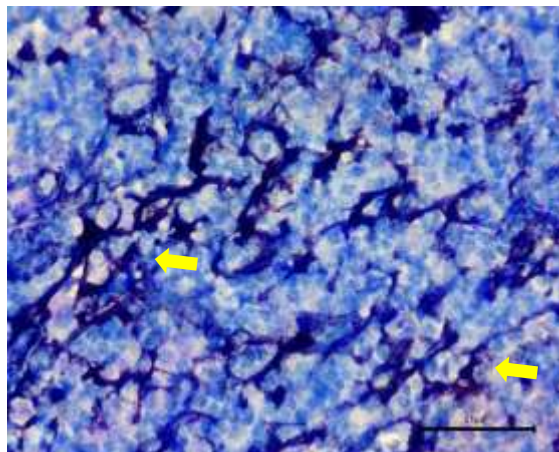


Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo apresentando região interfolicular apresentando estroma denso com imunopositividade para 1a4 (setas). DAB contracorado com Giemsa. 400x.

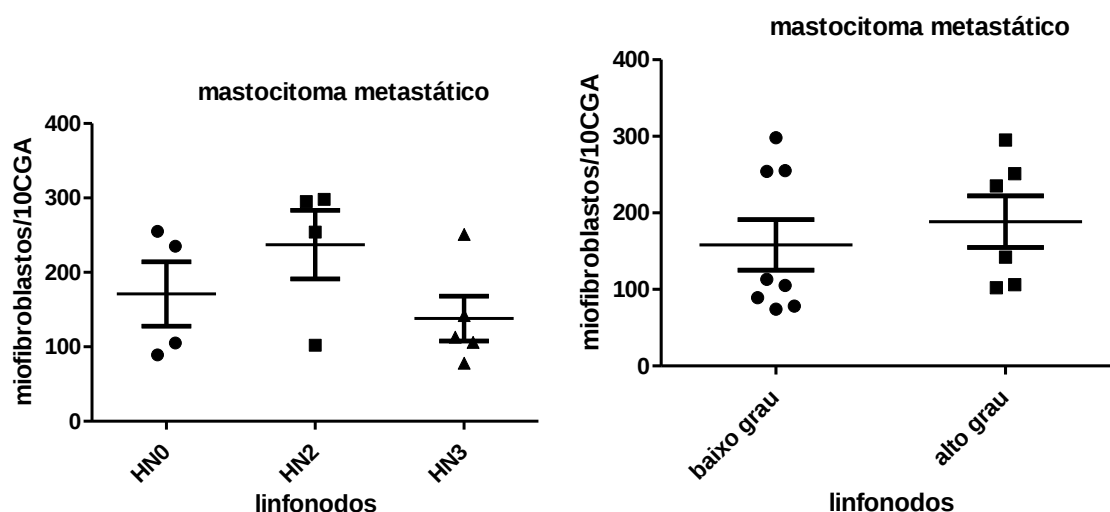


Figura 16. Contagem de miofibroblastos em “hot spots” de linfonodos com padrão HN0, HN2 e HN3 em cães portadores de mastocitoma cutâneo, de baixo e alto grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à imunomarcção com anticorpo 1a4, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p > 0,05$. (N=13) (teste T de Student, não pareado).

Figura 17. Contagem de miofibroblastos em “hot spots” nodais, provenientes de cães portadores de mastocitoma cutâneo, de baixo e alto de grau de malignidade, a partir de cortes submetidos à imunomarcção com anticorpo 1a4, evidenciando ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p > 0,05$ (N=14), (Teste T de Student não pareado).

4. DISCUSSÃO

A elevada frequência dos mastocitomas cutâneos em cães, sua tendência à colonizar secundariamente os linfonodos, e a escassez de informações acerca dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral nesse território (PEREIRA et al., 2015), tornam a investigação da relação entre o mastocitoma cutâneo canino e o linfonodo relevantes. A análise das alterações estromais no linfonodo, envolvendo a população de células reticulares fibroblásticas e a MEC nodal pode desvendar potenciais indicadores prognósticos e eventuais alvos terapêuticos.

As amostras estudadas permitiram inferir que os pacientes estudados são idosos, com idade média aproximada de 11 anos, conforme descrito por diversos autores (SHOOP et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2020). Apesar da maioria das amostras serem provenientes de cães SRD, algumas raças destacadas como predispostas apareceram neste estudo como o labrador retriever, o golden retriever e o buldogue (PALMA et al., 2009). Os pacientes estudados em sua maioria são fêmeas, embora não haja descrição de predileção sexual para a condição. Já a localização das neoplasias primárias nos membros, sobretudo os pélvicos, foi predominante em consonância com descrições anteriores (GROSS et al., 2005; KIUPEL, 2017). Nesse sentido também a colonização nodal é caracteristicamente o principal sítio metastático no paciente com mastocitoma (RIBEIRO, 2022; TAMLIN et al., 2022), sendo que não houve referência a outros focos metastáticos nos cães avaliados.

A relação entre graduação histológica e disseminação nodal em mastocitomas cutâneos caninos é controversa. Para otimizar o rastreamento de mastócitos neoplásicos, conforme indicado por Sabattini et al. (2022) todos os linfonodos examinados foram submetidos às colorações de hematoxilina-eosina e azul de toluidina. Nos pacientes avaliados neste estudo, o índice metastático apresentou-se mais elevado naqueles diagnosticados com mastocitomas de alto grau (75%), quando comparados aos portadores de mastocitomas de baixo grau (56,25%). Os achados de Stefanello et al. (2015), trabalhando com uma amostragem total de 386 animais, apontaram no mesmo sentido, sendo a

frequência de metástases nodais de 14,6% nos casos de mastocitoma de baixo grau e de 29,7% nos portadores de lesões de alto grau. Esses dados reforçam um maior potencial metastático por parte dos mastocitomas de alto grau. Em contrapartida, dois estudos recentes não encontraram relação entre grau histopatológico tumoral e metástase nodal (FERRARI et al., 2018; FERRARI et al., 2021).

A análise dos dados referentes aos linfonodos classificados como HN1 foi impossibilitada devido à reduzida quantidade de casos que se enquadravam nessa graduação. Tal fato pode estar relacionado com o tamanho amostral estudado, reforçando a necessidade de estudos futuros para melhor elucidação dos eventos iniciais da metástase nodal.

A disseminação neoplásica para linfonodos é marcada pela migração via linfática, evento que evidencia a relevância da linfangiogênese no processo, desde o preparo do nicho pré-metastático até o ingresso a partir do sistema sinusal (GILLOT et al., 2021; HU et al., 2022), permitindo a identificação das células tumorais ocupando o sistema sinusal (SOBIN et al., 2009). Nos casos examinados foi usual a colonização do parênquima nodal, em regiões entre e abaixo dos folículos linfoides, ocupando principalmente paracórtex, sendo frequente a presença de folículos linfoides secundários, circundados por tapetes de mastócitos neoplásicos. O emprego da contracoloração com Giemsa mostrou-se uma estratégia útil favorecendo a co-localização da população neoplásica em paralelo à visualização dos miofibroblastos imunomarcados. Esse parâmetro topográfico foi importante como referência para a comparação entre a disposição dos elementos estromais, miofibroblastos e colágeno, nos grupos HN2/HN3, e sem tumor, HN0.

Nos linfonodos com colonização metastática houve uma aparente rarefação nos vasos delimitados por endotélio cúbico, morfologia característica das vênulas pós-capilares paracorticais, sendo frequente a delimitação por células pavimentosas, à semelhança do descrito em amostras murinas e humanas nas mesmas condições, fato que pode estar relacionado a ativação e destacamento das células reticulares fibroblásticas da parede venular, com consequente comprometimento de suas atividades tróficas sobre o endotélio (VELLA et al., 2023).

Nesse sentido cabe a reflexão acerca das especificidades teciduais. No

microambiente nodal a principal célula vocacionada para a síntese colagênica é a célula reticular fibroblástica. No entanto essa população também está, notadamente pela liberação de citocinas, envolvida na regulação da movimentação celular e na modulação da condição imunitária no microambiente nodal (PANOCHA et al., 2025). No contexto da invasão neoplásica, são possivelmente as principais células a integrarem a população dos CAFs, que exibem origem variada e heterogeneidade molecular (IKUTA et al., 2018; SAHAI et al., 2020). Desempenham papel importante na produção e remodelamento de componentes da MEC, o que facilita a progressão tumoral. De maneira geral foi identificada expressão de actina de músculo liso associada a cápsula, trabéculas nodais e paracórtex, com rarefação em áreas foliculares em todas as amostras, independentemente da invasão tumoral. Tais achados divergem de relatos que referem incremento miofibroblástico associado a colonização tumoral, em malignidades como carcinomas de mama, carcinomas colorretais e carcinomas espinocelulares humanos (ITOU et al., 2019). Além disso, foi demonstrado que em carcinoma mamário humano os CAFs observados em linfonodos são dos mesmos subtipos daqueles observados no tumor primário, demonstrando que o microambiente nodal tende a mimetizar o microambiente tumoral (PELON et al., 2020).

Embora não tenha sido caracterizado um aumento na celularidade miofibroblástica, nas amostras caninas avaliadas houve uma densificação estromal nos sítios de colonização metastática, possivelmente em consequência do aumento em sua atividade. Li et al. (2020) demonstraram a atuação de miofibroblastos nodais na síntese de colágeno tipo I mediante estímulo por mastócitos. Em condições oncológicas a ativação miofibroblástica apresenta motivações variadas, podendo relacionar-se ao silenciamento de PTEN, por mutação ou por evento epigenético, assim como à hiperexpressão de oncogenes, como Kras, que em associação com o fator transcricional Snail fomentam a transição epitélio-mesenquimal e a deposição de colágeno (XU et al., 2019).

Daniel et al. (2019) descreveram uma relação inversa entre deposição colagênica e agressividade tumoral em mastocitomas cutâneos caninos, relacionando a rarefação do colágeno à menor sobrevida do animal. Na literatura

essa relação é ambivalente, visto que o colágeno pode atuar tanto como uma barreira em certos estágios do câncer, como também pode fomentar sua expansão em outros momentos, sendo que os próprios subprodutos derivados de sua degradação podem incrementar a angiogênese e a invasão celular (Xu et al., 2019). Nos linfonodos o remodelamento da MEC integra, em associação com a linfangiogênese, as modificações envolvidas no preparo do nicho pré-metastático, devendo-se principalmente a atividade de macrófagos (BIENIASZ-KRZYWIEC et al., 2019). Rizwan et al. (2015) encontraram maior densidade colagênica nos linfonodos metastáticos de carcinoma mamário humano, o que foi relacionado à progressão tumoral. Essa modificação na paisagem tecidual associa-se a alterações na rigidez tecidual, na imunidade tumoral e em seu potencial metastático (DISCHER et al., 2017; YAMAUCHI et al., 2018). Estudos em diferentes condições neoplásicas têm mostrado que a interação da célula tumoral com o colágeno é capaz de modificar sua atividade. Como exemplo, o colágeno I, com frequência o mais abundante no estroma neoplásico, ao interagir com integrinas expressas pelas células tumorais pode determinar a redução da expressão de E-caderina e beta catenina, redução na diferenciação celular, indução de TEM e aumento de população de células tronco tumorais em carcinoma colorretal (KIRKLAND, 2009). Foi demonstrado que o contato com o colágeno I também pode afetar a via da caspase-3/PI3K/AKT inibindo a apoptose em pacientes com câncer cervical (LIU, LIAO & LI, 2017).

Curiosamente, apesar da elevada incidência de mastocitomas cutâneos em cães, há uma escassez de dados na literatura acerca da modulação microambiental nos sítios metastáticos nessa condição, em particular no microambiente nodal. Essa abordagem justifica-se não apenas por contribuir para a compreensão da biologia dos mastocitomas, que representam um desafio ao oncologista, dada a sua diversidade comportamental, mas também por inserir no cenário em que predominam os carcinomas um modelo de sarcoma (TARPEY et al., 2013).

A ampliação da amostragem e a investigação de parâmetros clínicos adicionais, como a taxa de recidiva e metastatização tumorais e a sobrevida dos animais são fundamentais para elucidar a relevância desses achados em termos de qualidade de vida e devir dos cães. Por fim, a percepção da desmoplasia na história natural da disseminação em mastocitomas pode contribuir para a

inclusão de estratégias terapêuticas complementares, incluindo o colágeno como alvo, enfocando principalmente a antagonização à sua produção, restringindo, por exemplo a atividade dos CAFs (SHERMAN et al., 2014), ou induzindo a sua degradação (DONG et al., 2019).

5. CONCLUSÕES

A disseminação nodal foi um evento frequente em cães portadores de mastocitomas cutâneos, acompanhando o grau histopatológico de malignidade, caracterizando-se pela colonização preferencial de sítios paracorticais, em associação com a modulação fenotípica das vênulas pós-capilares e o incremento na deposição colagênica local.

6. REFERÊNCIAS

- AGUADÉ-GORGORIÓ, G.; ANDERSON, A. R. A.; SOLÉ, R. Modeling tumors as complex ecosystems. **iScience**. v. 27, n. 9, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39280631/>
- BAGINSKI, H.; DAVIS, G.; BASTIAN, R. P. The prognostic value of lymph node metastasis with grade 2 MCTs in dogs: 55 cases (2001–2010). **J Am Anim Hosp Assoc**. v. 50, n. 2, p. 89-95, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24446400/>
- BEER, P.; ROHRER-BLEY, C.; NOLFF, M. C. Near-infrared fluorescent image-guided lymph node dissection compared with locoregional lymphadenectomies in dogs with mast cell tumours. **J Small Anim Pract**. v. 63, n. 9, p. 670-678, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35815663/>
- BIENIASZ-KRZYWIEC, P.; PÉREZ-MARTÍN, R.; EHLING, M.; GARCÍA-CABALLERO, M.; PINIOTI, S.; PRETTO, S.; KROES, R.; ALDENI, C.; MATTEO, M. D.; PRENEN, H.; TRIBULATTI, M. V.; CAMPETELLA, O.; SMEETS, A.; NOEL, A.; FLORIS, G.; VAN GINDERACHTER, J. A.; MAZZONE, M. IESS, S. Podoplanin-expressing macrophages promote lymphangiogenesis and lymphoinvasion in breast cancer. **Cell Metabolism**. v. 30, n. 5, p. 917-936, 2019. [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(19\)30428-0](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(19)30428-0)
- BOER, M.; VAN DIJCK, J. A. A. M.; BULT, P.; BORM, G. F.; TJAN-HEIJNEN, V. C. G. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 102, n. 6, p. 410-425, 2010. <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/102/6/410/950177?login=false>
- CHALFON, C.; SABATTINI, S.; FINOTELLO, R.; FARONI, E.; GUERRA, D.; PISONI, L.; CIAMMAICHELLA, L.; VASCONI, M. E.; ANNONI, M. MARCONATO, L. Lymphadenectomy improves outcome in dogs with resected Kiupel high-grade cutaneous mast cell tumours and overtly metastatic regional lymph nodes. **J Small Anim Pract**. v. 63, n. 9, p. 661-669, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35733233/>

DANIEL, J.; BARRA, C. N.; PULZ, L. H.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L.; NISHIYA, A. T.; FUKUMASU, H.; STREFEZZI, R. F. Intratumoral collagen index predicts mortality and survival in canine mast cell tumours.

Veterinary Dermatology. v. 30, n. 2, 2019.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30693578/>

DE NARDI, A. B.; HORTA, R. S.; FONSECA-ALVES, C. E.; PAIVA, F. N.; LINHARES, L. C. M.; FIRMO, B. F.; SUEIRO, F. A. R.; OLIVEIRA, K. D.; LOURENÇO, S. V.; STREFEZZI, R. F.; BRUNNER, C. H. M.; RANGEL, M. M. M.; JARK, P. C.; CASTRO, J. L. C.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; SOBRAL, R. A.; CRUZ, N. O.; NISHIYA, A. T.; FERNANDES, S. C.; CUNHA, S. C. S.; GERARDI, D. G.; CALLOUB, G. S. G.; BIONDI, L. R.; LAUFER-AMORIM, R.; PAES, P. R. O.; LAVALLE, G. E.; HUPPES, R. R.; GRANDI, F.; VASCONCELLOS, C. H. C.; ANJOS, D. S.; LUZO, A. C. M.; MATERA, J. M.; VOZDOVA, M. DAGLI, M. L. Z. Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. **Cells.** v. 11, n. 4, 2022.

<https://www.mdpi.com/2073-4409/11/4/618>

DE NARDI, A. B.; GOMES, C. O. M. S.; FONSECA-ALVES, C. E.; PAIVA, F. N.; LINHARES, L. C. M.; CARRA, G. J. U.; HORTA, R. S.; SUEIRO, F. A. R.; JARK, P. C.; NISHIYA, A. T.; VASCONCELLOS, C. H. C.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; SOBRAL, R. A.; FERNANDES, S. C.; BIONDI, L. R.; STREFEZZI, R. F.; MATERA, J. M. RANGEL, M. M. M.; ANJOS, D. S.; BRUNNER, C. H. M.; LAUFER-AMORIM, R.; CADROBBI, K. G.; CIRILLO, J. V.; MARTINS, M. C.; REIS FILHO, N. P.; LESSA, D. F. S.; PORTELA, R.; CARNEIRO, C. S.; LUCAS, S. R. R.; FUKUMASU, H.; FELICIANO, M. A. R.; QUITZAN, J. G.; DAGLI, M. L. Z. Diagnosis, prognosis, and treatment of canine hemangiosarcoma: a review based on a consensus organized by the brazilian association of veterinary oncology, ABROVET. **Cancers.** v.15, n. 7, 2023.

<https://www.mdpi.com/2072-6694/15/7/2025>

DISCHER, D. E.; SMITH, L.; CHO, S. COLASURDO, M.; GARCIA, A. J. SAFRAN, S. Matrix mechanosensing: from scaling concepts in 'Omics data to mechanisms in the nucleus, regeneration, and cancer. **Annu Rev Biophys.** v. 46, p. 295-315, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28532215/>

DONG, X.; LIU, H. J.; FENG, H. Y.; YANG, S. C.; LIU, X. L.; LAI, X.; LU, Q. LOVELL, J. F.; CHEN, H. Z.; FANG, C. Enhanced drug delivery by nanoscale integration of a nitric oxide donor to induce tumor collagen depletion. **Nano Lett.** v. 19, p. 997-1008, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30676760/>

FERRARI, R.; MARCONATO, L.; BURACCO, P.; BORACCHI, P.; GIUDICE, C.; IUSSICH, S.; GRIECO, V.; CHITI, L. E.; FAVRETTO, E.; STEFANELLO, D. The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: a multicentric retrospective study. **Vet Comp Oncol.** v. 16, n. 4, p. 505-510, 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29893066/>

FERRARI, R.; BORACCHI, P.; CHITI, L. E.; MANFREDI, M. GIUDICE, C.; ZANI, D.; SPEDIACCI, C.; RECORDATI, C.; GRIECO, V.; GARIBOLDI, E. M.; STEFANELLO, D. Assessing the risk of nodal metastases in canine integumentary mast cell tumors: is sentinel lymph node biopsy always necessary? **Animals Basel.** v. 11, n. 8, 2021. <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/8/2373>

GARCÍA-SILVA, S.; PEINADO, H. Mechanisms of lymph node metastasis: an extracellular vesicle perspective. **Eur J Cell Biol.** v. 103, n. 3, 2024. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39116620/>

GILKES, D. M.; CHATURVEDI, P.; BAJPAI, S.; WONG, C. C.; WEI, H.; PITCAIRN, S.; HUBBI, M. E.; WIRTZ, D.; SEMENZA, G. L. Retracted: collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. **Cancer Research.** v. 73, n. 11, p. 3285-3296, 2013. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/73/11/3285/583992/RETRACTED-Collagen-Prolyl-Hydroxylases-Are>

GILLOT, L.; BAUDIN, L.; ROUAUD, L.; KRIDELKA, F.; NOËL, A. The pre-metastatic niche in lymph nodes: formation and characteristics. **Cell Mol. Life Sci.** v. 78, n. 16, p. 5987-6002, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8316194/>

GLABMAN, R. A.; CHOYKE, P. L.; SATO, N. Cancer-associated fibroblasts: tumorigenicity and targeting for cancer therapy. **Cancers.** v. 14, n. 16, 2022.

<https://www.mdpi.com/2072-6694/14/16/3906>

GRANT, S. M.; LOU, M.; YAO, L.; GERMAIN, R. N.; RADTKE, A. J. The lymph node at a glance - how spatial organization optimizes the immune response. **J Cell Sci.** v. 133, n. 5, 2020. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7063836/>

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol.** v. 32, p. 659-702, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24655300/>

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Mast cell tumors. In: GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. (Ed) **Skin diseases of the dog na cat: clinical and histopathologic diagnosis** 2 ed Blackwell 2005 p. 853-865.

HAYAKAWA, M.; KOBAYASHI, M.; HOSHINO, T. Direct contact between reticular fibers and migratory cells in the paracortex of mouse lymph nodes: a morphological and quantitative study. **Arch. Histol. Cytol.** v. 51, n. 3, p. 233–240, 1988. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3140852/>

HONSELMANN, K. C.; PERGOLINI, I.; CASTILLO, C. F. D.; DESHPANDE, V.; TING, D. S. K.; TAYLOR, M. S.; BOLM, L.; QADAN, M.; WELLNER, U. F.; SANDINI, M.; BAUSCH, D.; WARSHAW, A. L.; LILLEMÖE, K. D.; KECK, T.; FERRONE, S. Timing but not patterns of recurrence is different between node-negative and node-positive resected pancreatic cancer. **Ann. Surg.** v. 272, n. 2, p. 357-365, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32675550/>

HU, C.; HUANG, Q.; SUN, Q. The regulation of lymph node pre-metastatic niche formation in head and neck squamous cell carcinoma. **Front Oncol.** v. 12, 2022. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9094482/>

IKUTA, D.; MIYAKE, T.; SHIMIZU, T.; SONODA, H.; MUKAISHO, K. I.; TOKUDA, A.; UEKI, T.; SUGIHARA, H.; TANI, M. Fibrosis in metastatic lymph nodes is clinically correlated to poor prognosis in colorectal cancer. **Oncotarget.** v. 9, n. 51, p. 29574-29586, 2018. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6049853/>

ITOU, R. A.; UYAMA, N.; HIROTA, S.; KAWADA, N.; WU, S.; MIYASHITA, S.; NAKAMURA, I.; SUZUMURA, K.; SUEOKA, H.; OKADA, T.; HATANO, E.;

TSUTSUI, H.; FUJIMOTO, J. Immunohistochemical characterization of cancer-associated fibroblasts at the primary sites and in the metastatic lymph nodes of human intrahepatic cholangiocarcinoma. **Human Pathology**. v. 83, p. 77-89, 2019.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0046817718303319>

KAPLAN, R. N.; RIBA, R. D.; ZACHAROULIS, S.; BRAMLEY, A. H.; VINCENT, L.; COSTA, C.; MACDONAL, D. D.; JIN, D. K.; SHIDO, K.; KERNS, S. A.; ZHU, Z.; HICKLIN, D.; WU, Y.; PORT, J. L.; ALTORKI, N.; PORT, E. R.; RUGGERO, D.; SHMELKOV, S. V.; JENSEN, K. K.; RAFII, S.; LYDEN, D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**. v. 438, p. 820-827, 2005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16341007/>

KIM, S.; BOK, E.; LEE, S.; LEE, H. J.; CHOE, Y.; KIM, N. H.; LEE, W. J.; RHO, G. J.; LEE, S. L. Metastasis prognostic factors and cancer stem cell-related transcription factors associated with metastasis induction in canine metastatic mammary gland tumors. **J. Vet. Sci.** v. 22, n. 5, 2021. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8460459/>

KIRKLAND, S. C. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. **Br J Cancer**. v. 101, p. 320–326, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19568234/>

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MILLER, M. A.; MISDORP, W. MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; SNYDER, P. W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Vet. Pathol.** v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8369849/pdf/nihms-1726631.pdf>

KIUPEL, M. Mast cell tumors. In: MEUTEN, D. (Ed). **Tumor in domestic animals**. 5 ed. 2017. Wiley Blackwell p. 176-202.

KRICK, E. L.; BILLINGS, A. P.; SHOFER, F. S.; WATANABE, S.; SORENMO, K. U. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival*. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 7, n. 2, p. 130-138, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19453367/>

LAPSLEY, J.; HAYES, G. M.; JANVIER, V.; NEWMAN, A. W.; PETERS-KENNEDY, J.; BALKMAN, C.; SUMNER, J. P.; JOHNSON, P. Influence of locoregional lymph node aspiration cytology vs sentinel lymph node mapping and biopsy on disease stage assignment in dogs with integumentary mast cell tumors. **Vet Surg**. v. 50, n. 1, p. 133–141, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33169849/>

LI, X.; ZHAO, J.; KASINATH, V.; UEHARA, M.; JIANG, L.; BANOUNI, N.; MCGRATH, M. M.; ICHIMURA, T.; FIORINA, P.; LEMOS, D. R.; SHIN, S. R.; WARE, C. F.; BROMBERG, J. S.; ABDI, R. Lymph node fibroblastic reticular cells deposit fibrosis-associated collagen following organ transplantation. **J Clin Invest**. v. 130, n. 8, p. 4182-4194, 2020. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7410068/#:~:text=Here%2C%20we%20show%20that%20donor,milieu%20within%20a%20fibrotic%20DLN.>

LIU, Y.; CAO, X. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. **Cancer Cell**. v. 14, n. 30, p. 668-681, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27846389/>

LIU, S.; LIAO, G.; LI, G. Regulatory effects of COL1A1 on apoptosis induced by radiation in cervical cancer cells. **Cancer Cell Int**. v. 17, 2017. <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-017-0443-5>

LIU, J.; XU, M.; WU, J.; ZHANG, H.; YANG, L.; LUN, D; HU, Y.; LIU, B. Picrosirius-polarization method for collagen fiber detection in tendons: a mini-review. **Orthop. Surg**. v. 13, n. 3, p. 701-707, 2021. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/os.12627>

MARCONATO, L.; POLTON, G.; STEFANELLO, D.; MORELLO, E.; FERRARI,

R.; HENRIQUES, J.; TORTORELLA, G.; BENALI, S. L.; BERGOTTINI, R.; VASCONI, M. E.; ANNONI, M.; SABATTINI, S. Therapeutic impact of regional lymphadenectomy in canine stage II cutaneous mast cell tumours. **Vet Comp Oncol.** v. 16, n. 16, p. 580–589, 2018.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30047226/>

MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Cancer metabolism: looking forward. **Nat Rev Cancer.** v. 21, n. 10, p. 669-680, 2021.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34272515/>

MONTERAN, L.; EREZ, N. The dark side of fibroblasts: cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment.

Front Immunol. v. 10, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31428105/>

OLIVEIRA, M. T.; CAMPOS, M.; LAMEGO, L.; MAGALHÃES, D.; MENEZES, R.; OLIVEIRA, R.; PATANITA, F.; FERREIRA, D. A. Canine and feline cutaneous mast cell tumor: a comprehensive review of treatments and outcomes. **Topics in Companion Animal Medicine.** v. 41, 2020.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1938973620300702>

PALMA, H. E.; MARTINS, D. B.; BASSO, P. C.; AMARAL, A. S.; TEIXEIRA, L. V.; LOPES, S. T. A. Mastocitoma cutâneo canino: revisão. **Ver. Cient. Med. Vet.** v. 7, n. 23, p. 523-528, 2009. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-1502>

PANOCHA, D. ROET, J. E. G.; KUIPERS, J. E.; WINDE, C. M.; MEBIUS, R. E. Lymph node fibroblast-produced extracellular matrix shapes immune function.

Trends Immunol. v. 46, n. 3, p. 229-243, 2025.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40023738/>

PELON, F.; BOURACHOT, B.; KIEFFER, Y.; MAGAGNA, I.; MERMET-MEILLON, F.; BONNET, I.; COSTA, A.; GIVEL, A. M.; ATTIEH, Y.; BARBAZAN, J.; BONNEAR, C.; FUHRMANN, L.; DESCROIX, S.; VIGNJEVIC, D.; SILBERZAN, P.; PARRINI, M. C.; VINCENT-SALOMON, A.; MECHTA-GRIGORIOU, F. Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms.

Nat. Commun. v. 11, 2020. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-14134->

[w#citeas](#)

PEREIRA, E. R.; JONES, D. JUNG, K.; PADERA, T. P. The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. **Seminars in Cell & Developmental**. v. 38, p. 98-105, 2015. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1084952115000191>

QUALI, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**. v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013. <https://www.nature.com/articles/nm.3394>

RIBEIRO, P. R.; BIANCHI, M. V.; BANDINELLI, M. B.; ROSA, R. B.; ECHENIQUE, J. V. Z.; STOLF, A. S.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P. Pathological aspects of cutaneous mast cell tumors with metastases in 49 dogs. **Veterinary Pathology**. v. 59, n. 6, p. 922-930, 2022. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/03009858221114468>

RIZWAN, A.; BULTE, C.; KALAICHELVAN, A.; CHENG, M.; KRISHNAMACHARY, B.; BHUJAWALLA, Z. M.; JIANG, L.; GLUNDE, K. Metastatic breast cancer cells in lymph nodes increase nodal collagen density. **Scientific Reports**. v. 5, 2015. <https://www.nature.com/articles/srep10002>

SABATTINI, S.; FARONI, E.; RENZI, A.; GHISONI, G.; RIGILLO, A.; BETTINI, G.; PASQUINI, A.; ZANARDI, S.; GUERRA, D.; MARCONATO, L. Longitudinal lymph node step-sectioning for the identification of metastatic disease in canine mast cell tumor. **Veterinary Pathology**. v. 59, n. 5, p. 768-772, 2022. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/03009858221088780#tab-contributors>

SABATTINI, S.; KIUPEL, M.; FINOTELLO, R.; STEFANELLO, D.; FARONI, E.; BERTAZZOLO, W.; BONFANTI, U.; RIGILLO, A.; MAGNO, S. D.; FOGLIA, A.; ARESU, L. GAMBINI, M.; CANIATTI, M.; MARCONATO, L. A retrospective study on prophylactic regional lymphadenectomy versus nodal observation only in the management of dogs with stage I, completely resected, low-grade cutaneous mast cell tumors. **BMC Vet Res**. v. 17, n. 1, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34649575/>

SASHA, S.; PHILIMON, B.; EFESON, M.; HELINA, A.; ELGAMAL, M. H.; KIYA, G.; HILKIAH, S.; ARORA, M. L.; WIESE, D.; KITAGAWA, Y. The role of sentinel lymph node mapping in colon cancer: detection of micro-metastasis, effect on survival, and driver of a paradigm shift in extent of colon resection. **Clin. Exp. Metastasis**. v. 39, p. 109–115, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10121-y>

SHERMAN, M. H.; YU, R. T. ENGLE, D. D.; DING, N.; ATKINS, A. R. TIRIAC, H.; COLLISSON, E. A.; CONNOR, F.; VAN DYKE, T.; KOZLOV, S.; MARTIN, P.; TSENG, T. W.; DAWSON, D. W.; DONAHUE, T. R.; MASAMUNE, A.; SHIMOSEGAWA, T.; APTE, M. V.; WILSON, J. S.; NG, B.; LAU, S. L.; GUNTON, J. E.; WHAL, G. M.; HUNTER, T.; DREBIN, J. A.; O'DWYER, P. J.; LIDDLE, C.; TUVESON, D. A.; DOWNES, M.; EVANS, R. M. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. **Cell**. v. 159, p. 80–93, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25259922/>

SHOOP, S. J.; MARLOW, S.; CHURCH, D. B.; ENGLISH, K.; MCGREEVY, P. D.; STELL, A. J.; THOMSON, P. C.; O'NEILL, D. G.; BRODBELT, D. C. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. **Canine Genet Epidemiol**. v. 2, n. 1, 2015. <https://link.springer.com/article/10.1186/2052-6687-2-1#citeas>

SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICK, M. K.; WITTEKIND, C. H. **TNM classification of malignant tumours**. 7 ed. Wiley-Blackwell, 336p, 2009.

STEFANELLO, D.; BURACCO, P.; SABATTINI, S.; FINOTELLO, R.; GIUDICE, C.; GRIECO, V.; IUSSICH, S.; TURSI, M.; SCASE, T.; PALMA, S. D.; BETTINI, G.; FERRARI, R.; MARTANO, M.; GATTINO, F.; MARRINGTON, M.; MAZZOLA, M.; VASCONI, M. E.; ANNONI, M.; MARCONATO, L. Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009-2014). **Journal of the American Veterinary Medical Associations**. v. 246, n. 7, p. 765-769, 2015. <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/246/7/javma.246.7.765.xml>

TAMLIN, V. S.; BOTTEMA, C. D. K.; WOOLFORD, L.; DOBSON, E. C.;

KESSELL, A. E.; PEASTON, A. E. Canine mast cell tumours part I: clinical and survival outcomes. **Veterinary Medicine and Science**. v. 8, n. 4, p. 1409-1420, 2022. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/vms3.812>

TARPEY, P. S.; BEHJATI, S.; COOKE, S. L.; VAN LOO, P.; WEDGE, D. C.; PILLAY, N.; MARSHALL, J.; O'MEARA, S.; DAVIES, H.; NIK-ZAINAL, S.; BEARE, D.; BUTLER, A.; GAMBLE, J.; HARDY, C.; HINTON, J.; JIA, M. M.; JAYAKUMAR, A.; JONES, D.; LATIMER, C.; MADDISON, M.; MARTIN, S.; MCLAREN, S.; MENZIES, A.; MUDIE, L.; RAINE, K.; TEAGUE, J. W.; TUBIO, J. M. C.; HALAI, D.; TIRABOSCO, R.; AMARY, F.; CAMPBELL, P. J.; STRATTON, M. R.; FLANAGAN, A. M.; FUTREAL, P. A. Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. **Nat Genet**. v. 45, p. 923–926, 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770606/>

TROPEA, S.; DEL FIORE, P.; MAURICHI, A.; PATUZZO, R.; SANTINAMI, M.; RIBEIRO, S.; QUAGLINO, P.; CALIENDO, V.; BORGOGNONI, L.; SESTINI, S.; GIUDICE, G.; NACCHIERO, E.; CARACÒ, C.; CORDOVA, A.; SOLARI, N.; PIAZZALUNGA, D.; TAUCERI, F.; CARCOFORO, P.; LOMBARDO, M.; CAVALLARI, S.; MOCELLIN, S. The role of sentinel node tumor burden in modeling the prognosis of melanoma patients with positive sentinel node biopsy: an Italian melanoma intergroup study (N = 2,086). **BMC Cancer**. v. 22, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09705-y>

VELLA, G.; HUA, Y.; BERGERS, G. High endothelial venules in cancer: Regulation, function, and therapeutic implication. **Cancer Cell**. v. 41, n. 3, p. 527-545, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36827979/>

WANG, Y.; JIA, J.; WANG, F.; FANG, Y.; YANG, Y.; ZHOU, Q.; YUAN, W.; GU, X.; HU, J.; YANG, S. Pre-metastatic niche: formation, characteristics and therapeutic implication. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. v. 9, n. 236, 2024. <https://www.nature.com/articles/s41392-024-01937-7>

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Vet. Pathol**. v. 44, p. 298-308, 2007. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1354/vp.44-3-298>

WEISHAAR, K. M.; THAMM, D. H.; WORLEY, D. R.; KAMSTOCK, D. A. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. **J. Comp. Path.** v. 151, p. 329-338, 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25172053/>

WILK, S. S.; ZABIELSKA-KOCZYWAS, K. A. Molecular mechanisms of canine osteosarcoma metastasis. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, n. 7, 2021. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3639>

XIONG, G.; DENG, L.; ZHU, J.; RYCHAHOU, P. G.; XU, R. Prolyl-4-hydroxylase α subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. **BMC Cancer.** v. 14, n. 1, 2014. <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2407-14-1>

XU, S.; XU, H.; WANG, W.; LI, S.; LI, H.; LI, T.; ZHANG, W.; YU, X.; LIU, L. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. **J Transl Med.** v. 17, n. 1, 2019. <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-019-2058-1>

YAMAUCHI, M.; BARKER, T. H.; GIBBONS, D. L.; KURIE, J. M. The fibrotic tumor stroma. **J Clin Invest.** v. 128, p. 16–25, 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29293090/>

ZHU, Y.; LIN, J. G.; YAN, Y.; ZHENG, K.; ZHANG, H.; WU, K.; KONG, L.; CHEN, L.; CHEN, X. Delphian lymph node metastasis is a novel indicator of tumor aggressiveness and poor prognosis in papillary thyroid cancer. **J. Surg. Oncol.** v. 123, p. 1521-1528, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33713443/>