

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Estudo da expressão imunohistoquímica do PD-L1 e do CTLA-4
nos mastocitomas caninos**

Mariana Inês Pinto Ribeiro

Orientador: Professora Doutora Andreia Alexandra Ferreira dos Santos

Co-orientador: Doutora Ana Maria Canadas Pereira de Sousa

Porto, 2023

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Estudo da expressão imunohistoquímica do PD-L1 e do CTLA-4
nos mastocitomas caninos**

Mariana Inês Pinto Ribeiro

Orientador: Professora Doutora Andreia Alexandra Ferreira dos Santos

Co-orientador: Doutora Ana Maria Canadas Pereira de Sousa

Porto, 2023

RESUMO

O ramo da oncologia veterinária tem vindo a ganhar cada vez mais destaque, devido ao crescente aumento do número de casos em animais de companhia. Desta forma, a constante investigação nesta área conduz à procura de novas modalidades terapêuticas, para prolongar cada vez mais o tempo de vida com qualidade destes animais. A imunoterapia surge como um tratamento complementar aos tradicionais e tem como alvo as células do sistema imunitário do animal, em particular as células T. O PD-L1 e o CTLA-4 são dois pontos de controlo imunitário, cujo papel é regular negativamente a função imunitária das células T.

O objetivo deste estudo consistiu em determinar a expressão destas duas moléculas nos mastocitomas (MCT) caninos, de forma a estabelecer uma relação entre a sua expressão e o prognóstico clínico, além de compreender se o seu bloqueio tem potencial para constituir uma modalidade terapêutica complementar para este tipo de neoplasia. Foram analisadas 30 amostras de MCT cutâneos e 10 MCT subcutâneos, retiradas do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade do Porto, as quais foram submetidas a uma análise imunohistoquímica utilizando dois anticorpos: anti-PD-L1 e anti-CTLA-4. Todas as 40 amostras expressaram ambas as moléculas em estudo, sugerindo que, efetivamente, o PD-L1 e o CTLA-4 são expressos em células neoplásicas. Os MCT cutâneos apresentaram níveis de expressão significativamente superiores de ambas as moléculas, comparativamente aos subcutâneos. Além disso, verificaram-se também associações estatisticamente significativas entre estes recetores e variáveis clínicopatológicas, nomeadamente entre maiores níveis de CTLA-4 e menor grau histológico (GH) ($p=0,002$), bem como um menor índice mitótico (IM) ($p=0,004$). Também se demonstrou uma associação positiva entre o GH com o tamanho das massas ($p=0,021$) e com o IM ($p<0,001$); e entre o IM e o Ki-67 ($p=0,024$). Por fim, verificou-se que as expressões de CTLA-4 e PD-L1 estavam diretamente associadas ($p=0,007$).

Este foi o primeiro estudo a determinar a expressão do CTLA-4 em MCT caninos, tendo-se concluído que expressam tanto o CTLA-4, como o PD-L1, e que esta expressão está diretamente relacionada entre si e com fatores de prognóstico destas neoplasias.

PALAVRAS-CHAVE: mastocitomas caninos; PD-L1; CTLA-4; anticorpo; imunohistoquímica

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Andreia Santos, pelo enorme apoio, ajuda, rigor, empenho e disponibilidade que lhe são característicos. Sem a professora não seria possível. Será sempre, para mim, um exemplo na Medicina Veterinária e na vida. Obrigada!

À minha co-orientadora, Doutora Ana Canadas, pela ajuda e incentivo no decorrer de todo o projeto. Torna-se mais fácil quando temos pessoas boas ao nosso lado.

À Fátima, por ter sido as mãos deste projeto, por estar sempre disposta a ajudar e pela constante boa disposição durante todos os dias do meu estágio. Não tenho palavras.

À Clara, pela presença e companhia diárias durante o estágio e por me ter feito rir tantas vezes.

Aos meus pais, irmã e avô, por estarem sempre presentes, por aturarem o meu mau feitio (às vezes...) e por me permitirem concretizar este sonho. Não tenho como agradecer.

À minha restante família, por terem sempre uma palavra de incentivo e por desejarem o melhor para mim.

Ao meu Alberto, por ser o pássaro mais bonito e agressivo do mundo.

Ao João, por ser o meu melhor amigo há anos e com quem posso partilhar tudo e mais alguma coisa, a qualquer hora do dia. Sem dúvida, a pessoa mais presente (mesmo à distância) durante todo este percurso. Obrigada “friend”!

À Raquel e à Matilde, pela amizade de anos que se mantém sempre igual e por estarem sempre disponíveis. As pessoas com quem mais me identifico. Obrigada por tudo!

Às minhas ICBABES, Rita, Inês, Carolina, Daniela, Sofia e Raquel, pela amizade incrível que criamos nestes 6 anos e por tudo o que vivemos juntas. O melhor presente que podia levar desta etapa é a vossa amizade. Para sempre!

À Rita, em particular, por ser o meu espelho em quase tudo. Juntas desde o primeiro dia até ao último, e não podia ser de outra forma. Obrigada pela amizade, pela companhia, pelas aventuras, pelas viagens, pelos turnos de urgência, e por tudo o que está por vir.

A todos os professores, que me permitiram ir construindo o conhecimento que tenho hoje.

Ao ICBAS, por ter sido casa durante todos estes anos.

Aos animais, por nos darem tanto sem pedirem nada em troca. Tudo isto é por e para eles.

ÍNDICE

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1.Mastocitomas – patogénese, diagnóstico e tratamento.....	1
1.2.Utilização da imunoterapia no tratamento do cancro	7
1.2.1. Moléculas de controlo imunitário	9
1.2.1.1. PD-1 e PD-L1	9
1.2.1.2. CTLA-4.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1.Amostras	11
3.2.Estudo imunohistoquímico da expressão do PD-L1 e do CTLA-4	12
3.3.Índice de proliferação das neoplasias	13
3.4.Análise estatística dos resultados.....	14
4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1, 2 e 3. Diferentes intensidades de imunomarcação nas células neoplásicas.....	13
Figuras 4, 5 e 6. Comparação entre diferentes níveis de expressão e intensidades de marcação do PD-L1, de acordo com o grau histológico dos MCT.....	20
Figura 7. MCT subcutâneo com nível de expressão intermédio/alto e intensidade de marcação moderada/alta.....	20
Figuras 8, 9 e 10. Comparação entre diferentes níveis de expressão e intensidades de marcação do CTLA-4, de acordo com o grau histológico dos MCT.....	21
Figura 11. MCT subcutâneo com nível de expressão intermédio/alto e intensidade de marcação moderada/alta.....	22

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de estadiamento para MCT, proposto pela OMS.....	4
Tabela 2. Sistema de estadiamento para MCT, proposto por Horta <i>et al.</i> , 2018, adaptado do sistema da OMS.....	5
Tabela 3. Relação entre diferentes tratamentos, em associação com o grau histológico, e o prognóstico, descrito como Intervalo Livre de Doença (ILD) e Tempo Médio de Sobrevida (TMS).....	7
Tabela 4. Dados clínicopatológicos dos 40 pacientes utilizados para este estudo.....	15
Tabela 5. Relação entre o estalão da raça com o grau histológico e origem dos MCT estudados.....	17
Tabela 6. Relação entre o tamanho e o grau histológico.....	17
Tabela 7. Relação estatística entre o índice mitótico com o índice de proliferação Ki-67 e o grau histológico segundo Patnaik e Kiupel.....	18
Tabela 8. Relação estatística entre a origem dos MCT e as variáveis histológicas.....	19
Tabela 9. Relação entre a expressão do PD-L1 e os dados clínicopatológicos dos 40 casos de MCT.....	19
Tabela 10. Relação entre a expressão do CTLA-4 e os dados clínicopatológicos dos 40 casos de MCT.....	21
Tabela 11. Relação estatística entre a expressão de CTLA-4 e PD-L1.....	22

ABREVIATURAS

%	Porcentagem	OMS	Organização Mundial de Saúde
<	Inferior/Menor	ORBEA	Organismo responsável pelo bem-estar animal
>	Superior/Maior	PCNAs	Antigénios proliferativos celulares nucleares
≤	Menor ou Igual	PD-1	<i>Programmed death-1</i>
≥	Maior ou Igual	PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
±	Mais ou Menos	PD-L2	<i>Programmed death-ligand 2</i>
≈	Aproximadamente	SC	Subcutâneo
μm	Micrómetros	SPN	Síndromes paraneoplásicas
°C	Grau <i>Celsius</i>	SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
®	Marca registada	SRD	Sem raça definida
™	<i>Trade mark</i>	TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
AgNORs	Regiões organizadoras nucleares argirofilas	TKIs	Inibidores da tirosina-cinase
CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina	TMS	Tempo médio de sobrevida
cga	Campo de grande ampliação		
cm	Centímetros		
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i>		
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>		
F	Feminino		
GLR	Gânglios linfáticos regionais		
h	Horas		
H&E	Hematoxilina-Eosina		
IHQ	Imunohistoquímica		
ILD	Intervalo livre de doença		
IM	Índice mitótico		
IP	Índice de proliferação		
ITD	<i>Internal tandem duplication</i>		
LabPatVet-UP	Laboratório de patologia veterinária da Universidade do Porto		
M	Masculino		
MCT	Mastocitoma		
N	Número absoluto		

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Mastocitomas – patogênese, diagnóstico e tratamento

Os mastocitomas (MCT) são tumores que se caracterizam por uma proliferação anormal e descontrolada de mastócitos, estando incluídos nas neoplasias de células redondas. Os mastócitos têm origem em células estaminais hematopoiéticas, localizadas na medula óssea, diferenciando-se depois nos tecidos, e são importantes em diversas funções do organismo, tais como reações de hipersensibilidade, imunidade inata, cicatrização de feridas, entre outros (Bellamy & Berlato, 2022). Histologicamente, são células grandes e redondas, cujo citoplasma contém numerosos grânulos metacromáticos, que possuem diversos constituintes bioativos, como por exemplo a heparina e a histamina (Vail *et al.*, 2020; de Nardi *et al.*, 2022).

Segundo Vail *et al.* (2020), a etiologia dos MCT ainda não foi totalmente determinada, tendo já sido relatadas mutações no gene supressor tumoral p53, bem como alterações na expressão das proteínas p21 e p27, contudo ainda não foi estabelecida a sua influência no surgimento destes tumores. Por outro lado, mutações do KIT, um recetor da tirosina cinase, são muitas vezes descritas em MCT (Tamlin *et al.*, 2022), principalmente nos exões 8, 9, 11 e 12 (Klopfleisch, 2016). Pensa-se que 30 % dos MCT caninos possuam uma mutação, denominada *internal tandem duplication* (ITD), nos domínios justamembranar e extracelular do KIT (Klopfleisch, 2016; de Nardi *et al.*, 2022). Das anteriormente mencionadas, a mutação ITD no exão 11 está presente em cerca de 18 % dos MCT cutâneos caninos, estando relacionada com pior prognóstico e maior probabilidade de recorrência e metastização (de Nardi *et al.*, 2022; Tamlin *et al.*, 2022).

Nos cães, os MCT constituem o terceiro subtipo de tumor mais comum e o primeiro a nível cutâneo, representando cerca de 16 a 21 % das neoplasias cutâneas nestes animais (Ettinger & Feldman, 2017; Bellamy & Berlato, 2022). O tronco é o local mais propício ao aparecimento destes tumores (40-50 %), seguido dos membros (30-40 %) e com menos frequência a cabeça e o pescoço (10-15 %) (Oliveira *et al.*, 2020). Alguns locais estão associados ao desenvolvimento de MCT de elevado grau e, por isso, com pior prognóstico, nomeadamente subungueal, oral, mucosas, vulva, prepucial/escrotal, perineal (Vail *et al.*, 2020; Bellamy & Berlato, 2022). Na pele, os MCT classificam-se como cutâneos ou subcutâneos (SC), de acordo com a sua localização na derme ou no tecido subcutâneo, mas existe também uma forma visceral, embora pouco vulgar em cães (Willmann *et al.*,

2021; de Nardi *et al.*, 2022). Geralmente, estes tumores apresentam-se como uma massa solitária, contudo em cerca de 11 a 14 % dos casos podem ter uma apresentação múltipla (Vail *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020; Bellamy & Berlato, 2022). Dada a multiplicidade de aspetos macroscópicos, que podem variar entre massas bem delimitadas, alopecicas, firmes, salientes, eritematosas, pruriginosas, ulceradas e com invasão do tecido subcutâneo, os MCT devem constar de todos os diagnósticos diferenciais de massas cutâneas, já que, por vezes, pode ser difícil distingui-los de outros tipos de lesões como, por exemplo, mastocitoses cutâneas (Kiupel & Camus, 2019; Vail *et al.*, 2020).

Em relação à predisposição para o aparecimento destes tumores, não há evidência que indique que a idade ou género possam ser fatores predisponentes, embora geralmente este tipo de neoplasia surja em animais adultos, com idade média de 9 anos, o que não exclui a sua ocorrência em animais mais jovens, com menos de 1 ano de idade, como já foi relatado (Kiupel & Camus, 2019; Bellamy & Berlato, 2022). No que diz respeito à predisposição racial, embora não seja totalmente claro, pensa-se que possa haver raças com uma maior tendência para o desenvolvimento de MCT, nomeadamente os braquicéfalos (Boxer, Bulldog, Sharpei, Pug, Pit bull, Staffordshire terrier), Labrador retriever, Golden retriever, Beagle, Bull terrier, entre outros (Vail *et al.*, 2020; de Nardi *et al.*, 2022). Além disso, alguns estudos revelam uma possível associação entre a raça e o surgimento de MCT de alto grau, nomeadamente no Sharpei e no Staffordshire terrier (Bellamy & Berlato, 2022).

Relativamente à metastização, os locais mais frequentes para a sua ocorrência são os gânglios linfáticos regionais (GLR), fígado e baço, sendo raro o seu aparecimento na medula óssea, trato digestivo, pulmões e pele (de Nardi *et al.*, 2022).

O diagnóstico dos MCT é relativamente simples, uma vez que esta neoplasia provoca alguns sinais característicos nos pacientes, entre eles prurido, relacionado com a libertação de histamina pelos mastócitos, que por sua vez pode também originar sintomas gastrointestinais. Geralmente são tumores de crescimento rápido, sendo muitas vezes descrita uma variação de tamanho resultante da manipulação do tumor, que desencadeia um fenómeno designado por sinal de *Darier*, caracterizado por edema, formação de pápulas, eritema e prurido (Klopfleisch, 2016; Vail *et al.*, 2020; Willmann *et al.*, 2021). Cerca de 92 a 96 % dos casos são diagnosticados através de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) das massas, contudo este método não fornece informação sobre a classificação histológica, pelo que, para determinar o grau, é necessária a realização de uma biópsia e

subsequente exame histopatológico (Klopfleisch, 2016; Ettinger & Feldman, 2017; Vail *et al.*, 2020; Willmann *et al.*, 2021).

Para a determinação do grau histológico, que é um dos fatores de prognóstico mais importantes nos MCT cutâneos caninos, existem atualmente 2 sistemas: o sistema de Patnaik, desenvolvido em 1984, e que divide os MCT em 3 graus (I, II e III) e o sistema de Kiupel, mais recente, que classifica estes tumores como alto e baixo grau (Patnaik *et al.*, 1984; Kiupel *et al.*, 2011). O sistema proposto por Patnaik baseia-se no grau de invasão dos tecidos, na celularidade, nas morfologias celular e do núcleo, na atividade mitótica, na reação do estroma e na presença de edema/necrose (Patnaik *et al.*, 1984). Por norma, os tumores de grau I têm um melhor prognóstico, enquanto os de grau III estão muitas vezes associados a pior prognóstico, com maiores taxas de metastização e maior probabilidade de recorrência (Bulman-Fleming *et al.*, 2017). Contudo, este sistema de classificação, por ser mais abrangente, conduz a que haja uma elevada prevalência de MCT classificados como grau II, o que gera muitas vezes discordância entre patologistas, uma vez que a maioria destes tumores tem um comportamento clínico benigno, mas cerca de 20 a 50 % podem desenvolver um comportamento agressivo (Bulman-Fleming *et al.*, 2017; Bellamy & Berlato, 2022). De modo a minimizar a discordância e obter uma classificação mais precisa dos MCT, foi proposto um novo sistema, em 2011, por Kiupel, que utiliza critérios como a morfologia nuclear, presença de figuras de mitose, núcleos bizarros e/ou múltiplos e cariomegalia, para dividir os tumores em 2 categorias (Kiupel *et al.*, 2011). Pensa-se que a utilização conjunta dos 2 sistemas permite uma classificação mais fiável, uma vez que o sistema de Kiupel poderá ser útil para a classificação dos tumores de grau II segundo Patnaik, que normalmente são os que geram maior diversidade de opiniões (Bulman-Fleming *et al.*, 2017; de Nardi *et al.*, 2022). É importante referir que estes sistemas não são aplicáveis aos MCT subcutâneos (Chen *et al.*, 2022; de Nardi *et al.*, 2022; Tamlin, *et al.*, 2022).

Uma vez feito o diagnóstico, é necessário proceder ao estadiamento clínico da doença, ou seja, definir qual a sua extensão. De um modo geral, o estadiamento dos MCT engloba a realização de um hemograma completo, bioquímica sérica, CAAF dos GLR (mesmo que não tenham alteração do tamanho), além de CAAF do fígado e baço (Ettinger & Feldman, 2017; Oliveira *et al.*, 2020; Willmann *et al.*, 2021). A radiografia torácica pode também ser realizada, mas dada a baixa probabilidade de metastização dos MCT para o pulmão, pode ser dispensada (Willmann *et al.*, 2021; de Nardi *et al.*, 2022). A classificação do estadio clínico segue o sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (1980), apresentado na Tabela 1 (Vail *et al.*, 2020; Willmann *et al.*, 2021). No entanto, este

sistema apresenta algumas falhas, uma vez que classifica em estadio II um animal com doença metastática nos GLR e em III um animal com múltiplos tumores, mesmo que não possuam metastização, pelo que foi proposta uma melhoria deste sistema de classificação, por Horta *et al.* (2018), descrito na tabela 2 (Vail *et al.*, 2020).

Tabela 1. Sistema de estadiamento para MCT, proposto pela OMS (Adaptado de Vail *et al.*, 2020).

Estadio	Descrição
0	Um tumor incompletamente excisado da derme, identificado histologicamente, sem envolvimento dos GLR
	a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
I	Um tumor confinado à derme, sem envolvimento dos GLR
	a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
II	Um tumor confinado à derme, com envolvimento dos GLR
	a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
III	Múltiplos tumores na derme; tumores de grandes dimensões, infiltrativos, com ou sem envolvimento dos GLR
	a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
IV	Qualquer tumor com metástases à distância, incluindo sangue ou medula óssea

O prognóstico está dependente de vários fatores, sendo eles a idade, raça, número de tumores, tamanho e localização, presença de sinais sistêmicos, síndromes paraneoplásicas (SPN), recorrência, metastização ganglionar e/ou visceral, classificação do grau histológico, taxa de proliferação celular (índice mitótico (IM), regiões organizadoras nucleares argirofilas (AgNORs), expressão de antígenos proliferativos celulares nucleares (PCNAs), Ki-67), padrão de expressão imunohistoquímica (IHQ) do c-kit e mutação do c-kit) (Oliveira *et al.*, 2020; Vail *et al.*, 2020). Entre os anteriores, o grau histológico é considerado como o principal e mais fiável, embora não permita prever completamente o comportamento biológico do tumor, pelo que deve ser utilizado juntamente com outros critérios, nomeadamente os marcadores de IHQ Ki-67, AgNORs, PCNA e c-kit (Oliveira *et al.*, 2020; Bellamy & Berlato, 2022). O Ki-67, que é uma proteína presente no núcleo das células em todas as fases ativas do ciclo celular, destaca-se como o principal marcador de proliferação utilizado e a sua expressão apresenta-se geralmente aumentada nos MCT

com pior prognóstico (Oliveira *et al.*, 2020). O c-kit é um recetor da tirosina-cinase importante para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração dos mastócitos, e encontra-se muitas vezes sobre expresso nos MCT cutâneos caninos, podendo apresentar 3 padrões de expressão, dos quais os padrões II (expressão citoplasmática pontual) e III (expressão citoplasmática difusa) estão associados a MCT biologicamente mais agressivos e, por isso, com pior prognóstico (Kiupel & Camus, 2019). Além disso, as mutações nos exões 8 e 11 do c-kit, anteriormente mencionadas, estão também relacionadas com o prognóstico (Kiupel & Camus, 2019; Vail *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022).

Tabela 2. Sistema de estadiamento para MCT, proposto por Horta *et al.*, 2018, adaptado do sistema da OMS (Adaptado de de Nardi *et al.*, 2022).

Estadio	Descrição
I	Um tumor, sem envolvimento dos GLR
II	Múltiplos tumores (≥ 3), sem envolvimento dos GLR
III	Um tumor, com envolvimento dos GLR
IV	Tumores de grandes dimensões e infiltrativos, sem delimitação, ou múltiplos tumores (≥ 3), com envolvimento dos GLR
V	Qualquer tumor com metástases à distância, incluindo invasão da medula óssea e presença de mastócitos no sangue periférico

Quando nos referimos aos MCT subcutâneos, os fatores de prognóstico mais utilizados são contagem mitótica >4 , presença de multinucleação e padrão de crescimento infiltrativo (de Nardi *et al.*, 2022), sendo que, de uma forma geral, estes tumores estão associados a melhor prognóstico, com baixas taxas de recorrência local (8 %) e de metastização (4 %), bem como tempos médios de sobrevida (TMS) e intervalo livre de doença (ILD) superiores, quando comparados com os cutâneos (Thompson *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2020).

Relativamente ao tratamento, o mais comum e indicado é a remoção cirúrgica da(s) massa(s), idealmente com margens amplas, com 3 cm lateralmente e um plano fascial em profundidade, apesar de estudos mais recentes indicarem que uma margem lateral de 2 cm pode ser suficiente para diminuir a ocorrência de recidiva em MCT com baixo grau

histológico (Ettinger & Feldman, 2017; Oliveira *et al.*, 2020; Bellamy & Berlato, 2022; de Nardi *et al.*, 2022). Além da remoção do tumor, está também indicada a linfadenectomia dos GLR, ainda que os mesmos não tenham alteração de tamanho (Bellamy & Berlato, 2022; de Nardi *et al.*, 2022).

Geralmente, em MCT de baixo grau ou grau I, sem metastização ou fatores de prognóstico negativos e em locais que permitem uma excisão ampla, a cirurgia é curativa, sendo aconselhada a vigilância ativa dos doentes, com exame físico e avaliação dos GLR, 1, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses após a cirurgia e a cada 6 meses daí em diante (Klopfleisch, 2016; Bellamy & Berlato, 2022). No entanto, em MCT de alto grau ou grau III, em locais que não permitem a excisão cirúrgica com margens amplas, com presença de fatores de prognóstico negativos ou metastização ganglionar, a cirurgia não é suficiente, pelo que é necessário o recurso a terapias adjuvantes, nomeadamente radioterapia, eletroquimioterapia, quimioterapia, inibidores da tirosina-cinase (TKIs) ou corticosteroides (como a prednisolona). Habitualmente, estas terapias são também usadas como tratamento neoadjuvante nas situações em que o tamanho do tumor e/ou a sua localização não permitem a remoção com amplas margens, com o objetivo de reduzir o seu tamanho para uma posterior cirurgia (Klopfleisch, 2016).

A quimioterapia adjuvante é indicada para tumores de alto grau ou grau III, com elevado risco de metastização, com o objetivo de atrasar/prevenir a ocorrência de metastização e de recorrência (Oliveira *et al.*, 2020; Bellamy & Berlato, 2022). Pode ser utilizada com um agente único, ou associada à prednisolona, existindo uma grande variedade de protocolos possíveis. O protocolo da vimblastina em combinação com a prednisolona é geralmente o de primeira escolha (Ettinger & Feldman, 2017; de Nardi *et al.*, 2022), embora a lomustina, e menos frequentemente o clorambucilo, sejam agentes quimioterápicos também utilizados. Nos últimos anos, os TKIs foram considerados uma terapia alternativa para MCT, nomeadamente quando a quimioterapia falha, quando os tutores não aceitam os outros tratamentos ou no caso de MCT não extirpáveis. Atualmente, os fármacos disponíveis no mercado são o toceranib (Palladia®), indicado para tumores não operáveis, recorrentes de grau II ou III, e o masitinib (Masivet®), aplicável às mesmas situações que o toceranib, mas também em tumores com mutação do c-kit (Klopfleisch, 2016; Oliveira *et al.*, 2020; de Nardi *et al.*, 2022).

Os animais que apresentam sinais clínicos sistémicos provocados pela desgranulação do MCT e/ou dos tratamentos, nomeadamente problemas gastrointestinais, podem beneficiar do uso de bloqueadores H1 e H2, que limitam os efeitos causados pela

libertação de histamina, bem como inibidores da bomba de prótons (Ettinger & Feldman, 2017; Oliveira *et al.*, 2020; Vail *et al.*, 2020). Na tabela 3, está descrita a relação entre alguns dos tratamentos possíveis, de acordo com o grau histológico, e o prognóstico dos doentes, descrito como ILD e TMS.

Tabela 3. Relação entre diferentes tratamentos, em associação com o grau histológico, e o prognóstico.

Tratamento	Prognóstico	Referência
MCT grau III: remoção cirúrgica incompleta + radioterapia	28 meses (TMS)	Schwab <i>et al.</i> , 2014
MCT grau II (Patnaik) e Ki-67 elevado, sem metastização: remoção cirúrgica + vimblastina + prednisolona	1946 dias (TMS)	Miller <i>et al.</i> , 2016
MCT grau II (Patnaik) e Ki-67 elevado, sem metastização: remoção cirúrgica + masitinib	369 dias (TMS)	Miller <i>et al.</i> , 2016
MCT alto grau: remoção cirúrgica + lomustina + prednisolona	904 dias (TMS)	Hay & Larson, 2019
MCT baixo grau (Kiupel): remoção cirúrgica	>80 semanas (TMS)	Vail <i>et al.</i> , 2020
MCT alto grau (Kiupel): remoção cirúrgica	40 semanas (TMS)	Vail <i>et al.</i> , 2020
MCT grau I: remoção cirúrgica	1128 dias (TMS)	Bellamy & Berlato, 2022
MCT grau I: remoção cirúrgica + quimioterapia adjuvante	1179 dias (TMS)	Bellamy & Berlato, 2022
MCT grau III: remoção cirúrgica incompleta + radioterapia	20 meses (TMS)	Nardi <i>et al.</i> , 2022
MCT grau II/III com metastização: clorambucilo	686 dias (ILD)	Nardi <i>et al.</i> , 2022
MCT grau II/III com metastização: lomustina	107 dias (ILD)	Nardi <i>et al.</i> , 2022

1.2. Utilização da imunoterapia no tratamento do cancro

Ao longo dos anos, a prevalência de neoplasias tanto no Homem, como nos animais, tem vindo a aumentar de forma considerável. Segundo Song *et al.* (2021), estima-se que, nos cães, cerca de 5 300 em cada 100 000 sejam diagnosticados com tumores, anualmente. Sabe-se que as neoplasias caninas são, em grande parte, semelhantes às neoplasias humanas, surgindo de forma espontânea, além de possuírem diversas características em comum, tais como o fenótipo, o comportamento biológico, as vias de sinalização, as respostas imunitárias, entre outras (Dow, 2020).

A ausência de terapias eficazes contra a grande maioria das neoplasias conduz à constante investigação nesta área, em busca de novas modalidades terapêuticas, cujo sucesso se espera que seja superior aos tratamentos atualmente conhecidos e adotados (Maekawa *et al.*, 2016). Deste modo, a imunoterapia surgiu como uma potencial opção

para o tratamento de diversos cânceros, em combinação com as modalidades terapêuticas tradicionais, como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia (Maekawa *et al.*, 2016; Bergman, 2019; Vail *et al.*, 2020). A imunoterapia diferencia-se dos demais tratamentos, uma vez que o seu alvo não são as células tumorais, mas sim as células do sistema imunitário do doente oncológico, nomeadamente as células T, já que estas são capazes de detetar e destruir células anormais, neste caso as cancerígenas (Ariyaratna *et al.*, 2020; Xu, 2020). Na medicina humana, a imunoterapia é utilizada em diversos tipos de cancro com respostas positivas e duradouras e, da mesma forma, é esperado que seja igualmente eficaz em oncologia veterinária (Shosu *et al.*, 2016; Vail *et al.*, 2020).

Segundo Klingemann (2018) e Vail *et al.* (2020), na medicina humana, a imunoterapia com maior sucesso visa a utilização de anticorpos monoclonais, principalmente contra antígenos de linfoma e contra moléculas *checkpoint*, ou seja, moléculas de controlo imunitário, como o PD-1 (*programmed death-1*) e o CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte ligand-4*). Os pontos de controlo imunitário são reguladores do sistema imunitário, tendo como função prevenir a autoimunidade e controlar as respostas imunitárias (Hartley *et al.*, 2017; Xu, 2020). Atualmente, sabe-se que, muitas vezes, as neoplasias conseguem escapar à eliminação pelo sistema imunitário através da desregulação da expressão destas moléculas (Hartley *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). A imunoterapia com anticorpos monoclonais contra estas moléculas, também conhecidos como inibidores dos *checkpoint*, tem como objetivo bloquear a sinalização negativa realizada por elas, desencadeando a atividade citotóxica das células T, além de poder ativar outras respostas imunitárias, com vista a impulsionar o sistema imunitário para o combate contra as células tumorais (Klingemann, 2018, Vail *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

Como mencionado anteriormente, a semelhança entre a oncologia humana e canina possibilita não só a implementação de novos tratamentos promissores nos cães, como também permite que o cão possa funcionar como um modelo com grande utilidade para a investigação do cancro no Homem (Maekawa *et al.*, 2021). Além disso, as expectativas para o sucesso da imunoterapia em oncologia veterinária são bastante elevadas, como tem vindo a ser demonstrado em alguns estudos realizados nesse âmbito (Shosu *et al.*, 2016).

1.2.1. Moléculas de controlo imunitário

1.2.1.1. PD-1 e PD-L1

O PD-1, também conhecido como CD279, é um recetor de superfície celular, com função imunossupressora, pertencente à família CD28, que se expressa principalmente em células T ativadas, mas também em células B, monócitos, células T *natural killer* e células dendríticas (Maekawa *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018; Maekawa *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Este recetor tem como função limitar a atividade das células T e inibir a indução de algumas citocinas (Maekawa *et al.*, 2016; Hartley *et al.*, 2017). O PD-1 possui dois ligandos: PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) e PD-L2 (*programmed death-ligand 2*); enquanto o PD-L2 é expresso em algumas células e tecidos específicos, como macrófagos e células dendríticas, o PD-L1 expressa-se em vários tipos de células, incluindo células T, células dendríticas, mastócitos, macrófagos, bem como em células não hematopoiéticas, não sendo normalmente encontrado em células ou tecidos normais, mas sim em células tumorais (Maekawa *et al.*, 2016; Klingemann, 2018; Sun *et al.*, 2018; Xu, 2020; Song *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). A expressão de ambos os ligandos é induzida através de estímulos inflamatórios (Xu, 2020).

O bloqueio da via PD-1/PD-L1 tem vindo a demonstrar resultados promissores quando aplicado ao cancro, particularmente na medicina humana (Maekawa *et al.*, 2021). Em condições normais, a interação entre estas moléculas provoca uma redução das funções das células T, importantes para as respostas imunitárias, pelo que o seu bloqueio permite uma melhoria da resposta das células T contra diversos antígenos, nomeadamente os das células neoplásicas (Klingemann, 2018; Sun *et al.*, 2018; Maekawa *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021). Pensa-se que estas moléculas sejam frequentemente usadas pelas células cancerígenas como escape ao sistema imunitário, através da indução de uma sobre expressão tanto de PD-1, como de PD-L1, que já foi relatada em diversos estudos de cancros humanos, mas também caninos (Hatch *et al.*, 2018; Xu, 2020; Maekawa *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021). Alguns estudos de medicina humana obtiveram conclusões acerca da relação entre a expressão de PD-L1 e o prognóstico dos pacientes, nomeadamente que uma maior expressão desta molécula pode estar relacionada com um pior prognóstico, com intervalos livres de doença e tempos de semivida mais curtos, além de maior taxa de metastização ganglionar (Ghebeh *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2007). Nos estudos de Shosu *et al.* (2016) e Maekawa *et al.* (2021), não foi possível estabelecer uma relação significativa entre a expressão de PD-L1 e o prognóstico das doenças neoplásicas caninas estudadas (MCT, tumores mamários, sarcoma de tecidos moles, melanoma oral maligno), porém, no estudo de Ariyaratna *et al.* (2020), foi observada uma

associação entre o aumento da produção de PD-L1 e o maior desenvolvimento de doença metastática, bem como a redução do TMS dos doentes caninos com neoplasias mamárias.

1.2.1.2. CTLA-4

O CTLA-4 é uma glicoproteína, que atua como recetor homólogo competitivo do CD28, sendo que possuem funções opostas na ativação de células T (Rowshanravan *et al.*, 2018; Willsmore *et al.*, 2021). Assim sendo, a principal função do CTLA-4 é impedir a sinalização para a proliferação de células T (Zhang *et al.*, 2020; Willsmore *et al.*, 2021), tendo sido o primeiro ponto de controlo identificado e utilizado para imunoterapia (Regan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Desde que foi identificado como molécula inibitória, em 1995, por Krummel & Allison, é considerado um regulador importante da homeostase imunitária, sendo reconhecido como um dos principais pontos de controlo (Xu, 2020). Esta molécula sinalizadora é expressa predominantemente em vesículas intracelulares de células T ativadas em órgãos linfoides secundários regionais, mas também noutros tipos de células, quer normais, quer neoplásicas (Salvi *et al.*, 2012; Rowshanravan *et al.*, 2018; Willsmore *et al.*, 2021). À semelhança do PD-1, o CTLA-4 possui ligandos, os quais partilha com o CD28, sendo a sua afinidade para os mesmos cerca de 100 vezes superior à do CD28; dentro destes, destacam-se o B7-1 (CD80) e o B7-2 (CD86), que após a ligação com o CTLA-4, conduzem a uma diminuição da proliferação das células T, da produção e secreção de citocinas e também da progressão do ciclo celular (Salvi *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020).

O bloqueio do CTLA-4 é amplamente utilizado como modalidade terapêutica oncológica na medicina humana, uma vez que, não havendo repressão do sistema imunitário, é possível estimular ou ampliar uma resposta mais forte no combate às células tumorais (Salvi *et al.*, 2012; Xu, 2020; Kern & Panis, 2021). Na medicina veterinária, há ainda poucos estudos acerca do papel do CTLA-4 na imunoterapia oncológica, destacando-se, por exemplo, o estudo publicado por Ariyarathna *et al.* (2020), que aborda a expressão do CTLA-4, e também do PD-L1, em tumores mamários malignos de cadela, tendo sido demonstrada a expressão deste recetor, sobretudo nos tumores malignos que desenvolveram metástases; além disso, foi também descrita uma relação entre uma maior expressão do CTLA-4 e uma diminuição do tempo de sobrevivência dos animais.

2. OBJETIVOS

Este projeto de investigação teve como principal objetivo o estudo da expressão IHQ do PD-L1 e do CTLA-4 nos MCT caninos. Que seja do nosso conhecimento, até à data, não há nenhum estudo que tenha caracterizado a expressão do CTLA-4 nos MCT caninos e apenas dois descreveram a marcação IHQ do PD-L1: Shosu *et al.* (2016) em 4 casos e Maekawa *et al.* (2016) em 5 casos. Desta forma, numa amostra consideravelmente maior, pretende-se averiguar se estas neoplasias expressam estas moléculas de controlo imunitário e se os níveis de expressão estão relacionados com parâmetros clínicopatológicos associados ao prognóstico dos MCT, nomeadamente origem (cutânea versus subcutânea), tamanho tumoral, grau histológico (GH), índice mitótico (IM), expressão do Ki-67 e metastização. Por fim, foi nossa ambição compreender se estas moléculas apresentam valor prognóstico e se os inibidores dos *checkpoints* poderão ser incluídos como uma modalidade terapêutica complementar no tratamento dos MCT caninos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

O estudo incluiu amostras parafinadas de MCT caninos recolhidas do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade do Porto (LabPatVet-UP), num total de 40 casos diagnosticados entre 2018 e 2022, incluindo 10 MCT cutâneos de grau I, 10 MCT de grau II, 10 MCT de grau III e 10 MCT subcutâneos. O estudo foi aprovado pela comissão de ética e bem-estar animal (ORBEA) do ICBAS – UP (ORBEA Nº 442/2022).

As massas tumorais foram removidas cirurgicamente e imediatamente fixadas em formol tamponado a 10 % por 48 a 72 horas, avaliadas, seccionadas macroscopicamente em fatias e processadas. Posteriormente, as amostras foram incorporadas em blocos de parafina, por sua vez seccionados em fatias de 2 µm de espessura, seguindo-se a montagem das lâminas, que foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E). O diagnóstico histopatológico foi realizado através da análise microscópica das lâminas pelo patologista veterinário, e as neoplasias classificadas quanto à sua origem (cutânea versus subcutânea) e o grau histológico foi determinado de acordo com ambos os sistemas de Patnaik (grau I, II e III, segundo os critérios descritos por Patnaik *et al.*, 1984) e Kiupel (alto e baixo grau, segundo os critérios descritos por Kiupel *et al.*, 2011). Em 7 casos foi também realizada a marcação IHQ com c-kit para apoio ao diagnóstico.

Nas fichas clínicas e relatórios de histopatologia foram recolhidos os dados acerca do sexo, idade, raça, número e tamanho do eixo maior das massas, índice mitótico e metastização. Vinte e seis amostras correspondiam a fêmeas e as restantes 14 eram de machos. Relativamente à diversidade de raças, a distribuição foi a seguinte: 14 Labrador Retriever, 11 Sem Raça Definida (SRD), 4 Bulldog Francês, 3 Pit Bull, 1 Yorkshire Terrier, 1 Border Collie, 1 Boxer, 1 Golden Retriever, 1 Pinscher, 1 Podengo, 1 Pug e 1 Schnauzer. As amostras foram divididas pelo estalão da raça de acordo com o definido pelo *American Kennel Club* (raça miniatura; raça pequena; raça média; raça grande e raça gigante).

Os 30 casos de MCT cutâneos foram divididos em 3 grupos, consoante o respetivo grau (I, II, III), de acordo com o sistema de Patnaik *et al.* (1984) e em 2 grupos (baixo e alto grau), de acordo com a classificação de Kiupel *et al.* (2011). Relativamente ao tamanho, os casos foram agrupados em <2 cm ou ≥ 2 cm, e quanto ao índice mitótico, em <5 mitoses/10cga e ≥ 5 mitoses/10cga, de acordo com o seu valor prognóstico reportado na bibliografia (Romansik *et al.*, 2007; Lelyveld *et al.*, 2015; Bulman-Fleming *et al.*, 2017).

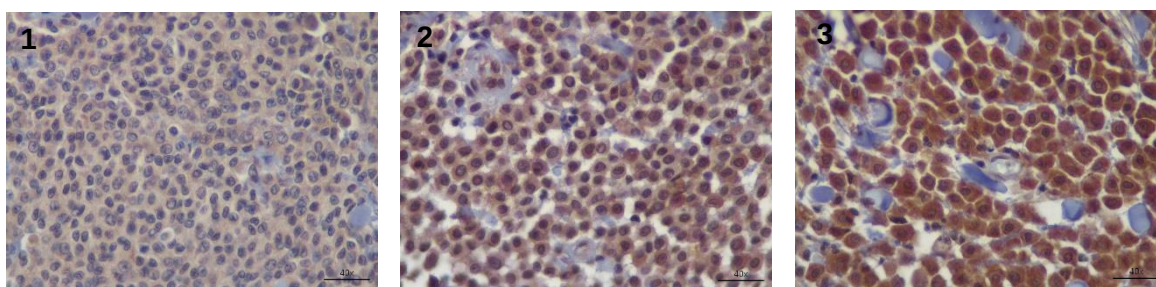
3.2. Estudo imunohistoquímico da expressão do PD-L1 e do CTLA-4

Os blocos de parafina foram seccionados em fatias de 4 μ m de espessura, que foram colocadas em lâminas adesivadas e dispostas na estufa a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram desparafinadas em xilol e hidratadas em álcool a 100, 95 e 70 %. A técnica de recuperação antigénica foi realizada com solução *Target Retrieval Solution* a 10 % (Dako, pH 6), em banho-maria, durante 30 minutos. Relativamente às diluições dos anticorpos utilizados: o anticorpo anti-PD-L1 (anticorpo policlonal de coelho, ab233482, Abcam) foi utilizado na diluição 1:100 e o anticorpo anti-CTLA-4 (anticorpo monoclonal de camundongo, clone F-8; sc-376016, Santa Cruz Biotechnology) foi usado na diluição 1:50. Estes anticorpos tinham sido previamente testados em neoplasias caninas no estudo de Ariyaratna *et al.* (2020). Todas as etapas da técnica de IHQ foram idênticas para ambos os anticorpos.

Após a recuperação antigénica, procedeu-se a duas lavagens de 5 minutos cada em solução *Tris-Buffered Saline* (TBS), previamente preparada no laboratório, seguindo-se a adição de *Protein Block* (Novocastra™) durante 1 hora, em câmara húmida, para impedir a ligação de proteínas não específicas. De seguida, procedeu-se a nova lavagem em solução TBS, e posteriormente, passou-se à incubação com o anticorpo a 4 °C, durante cerca de 16 horas. No dia seguinte, realizou-se novamente lavagem em TBS e em seguida o bloqueio da peroxidase endógena, através da adição de *Peroxidase Block* (Novocastra™), durante 5 minutos. Após lavagem das lâminas em TBS, adicionou-se a

solução *Post Primary* (Novocastra™), por 30 minutos, em câmara húmida. A este passo seguiu-se nova lavagem e adição da solução *Polymer* (Novolink™), novamente durante 30 minutos, após os quais se realizou uma última lavagem em TBS. Por fim, para a revelação antigénica, foi adicionada a solução *DAB Substrate Buffer* (Novolink™) + *DAB Chromogen* (Novocastra™), durante 5 minutos. A técnica de IHQ foi concluída com uma lavagem das lâminas em água corrente, durante 10 minutos, seguida de coloração com hematoxilina. Para ambos os anticorpos, foram testados como controlo positivo amígdala humana e gânglio linfático canino, tendo-se optado pelo último para a realização do ensaio final. Como controlo negativo, substituiu-se o anticorpo primário pela solução tampão de diluição do anticorpo.

A expressão IHQ do anticorpo anti-PD-L1 foi reconhecida pela marcação citoplasmática e/ou membranar com cor acastanhada. Para o anticorpo anti-CTLA-4, a expressão reconheceu-se apenas através da marcação citoplasmática. Para ambos os anticorpos, a classificação das amostras foi baseada no método utilizado por Ariyaratna *et al.* (2020), considerando a percentagem de células neoplásicas marcadas e a intensidade da imunomarcação, em que a mesma foi classificada segundo um *score* de 0 a 3 (0- ausente, 1- ligeira, 2- moderada e 3- intensa). Esta análise foi realizada através da contagem e avaliação de 200 células neoplásicas, identificadas nas áreas de maior expressão (*hotspots*) com a ampliação de 400x. Nas figuras 1, 2 e 3 estão representados, respetivamente, exemplos das intensidades de marcação ligeira, moderada e intensa, utilizando uma ampliação de 400x.



Figuras 1, 2 e 3. Diferentes intensidades de imunomarcação nas células neoplásicas (ampliação 400x). A figura 1 corresponde a uma marcação ligeira de um MCT grau II; a figura 2 diz respeito a uma marcação moderada de um MCT grau II; a figura 3 demonstra uma marcação intensa de um MCT grau I. Em todas as imagens foi utilizado o anticorpo anti-CTLA-4.

3.3. Índice de proliferação das neoplasias

Realizou-se um estudo imunohistoquímico com Ki-67, de forma a determinar o índice de proliferação das 40 neoplasias em estudo, através da determinação da

percentagem de núcleos positivos em 500 células tumorais, em campos de grande ampliação (400x). A técnica de IHQ realizada foi idêntica à mencionada para os anticorpos anti-PD-L1 e anti-CTLA-4, com a diferença de ter sido utilizado o anticorpo anti-Ki-67 (anticorpo monoclonal de ratinho, clone MIB-1, Dako, diluição 1:50).

Para a análise estatística, os casos foram agrupados segundo um *cut-off* de Ki-67 de 1,8 %, dado que apresenta valor prognóstico documentado (Maglennon *et al.*, 2008; Něčová *et al.*, 2021).

3.4. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente com o *software* SPSS (versão 27.0, SPSS Inc.), utilizando o teste chi-quadrado de Pearson (para variáveis categóricas com 3 ou mais grupos) e o teste exato de Fisher (para variáveis categóricas com 2 grupos), de forma a determinar possíveis associações estatísticas entre a expressão do PD-L1 e do CTLA-4 e as variáveis histológicas, nomeadamente o grau histológico (I, II e III; baixo e alto grau), a origem do MCT (cutânea ou subcutânea), tamanho da massa (<2; ≥2 cm), índice de proliferação Ki-67 (<1,8; ≥1,8 %), índice mitótico (<5; ≥5 mitoses/cga) e metastização (presente/ausente). Além disso, estes testes foram também usados para averiguar a relação entre o grau histológico e variáveis como o sexo, estalão da raça, índice de proliferação Ki-67, presença de metástases, tamanho da massa e índice mitótico; as mesmas associações foram feitas para a origem, cutânea ou subcutânea, em relação com as variáveis mencionadas. Por fim, foi ainda analisada a relação estatística entre o índice mitótico e o índice de proliferação Ki-67, e também a relação entre a expressão de CTLA-4 com a de PD-L1. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para propósito das análises estatísticas mencionadas, a expressão de PD-L1 e de CTLA-4 foram classificadas de acordo com um *score* baseado no estudo de Ariyaratna *et al.* (2020), em que se realizou uma conversão das percentagens de marcação ≤25 %, 26-50 %, 51-75 % e >75 % em 1, 2, 3 e 4, respetivamente, e também das intensidades de marcação ausente, ligeira, moderada e intensa em 0, 1, 2 e 3, respetivamente. De seguida, foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{score} = 0 \times \% \text{ marcação} + 1 \times \% \text{ marcação} + 2 \times \% \text{ marcação} + 3 \times \% \text{ marcação}$$

Para o PD-L1, os resultados da aplicação da fórmula ficaram compreendidos entre 9 e 22, tendo-se agrupado os casos como: expressão baixa (9-13), moderada (14-17) e alta (18-

22). Para o CTLA-4, os resultados obtidos ficaram entre 8 e 22, e foram considerados para efeitos da análise estatística apenas 2 grupos de expressão: baixa (8-14) e alta (15-22).

4. RESULTADOS

Na tabela 4, encontram-se resumidos os dados acerca da raça, idade, sexo, origem do tumor, dimensões das massas, presença de metastização, índice mitótico e índice de proliferação Ki-67 de todos os cães incluídos neste estudo. A média das idades dos pacientes foi $8,82 \pm 3,30$ anos, tendo-se verificado uma maior prevalência das neoplasias em fêmeas, que constituíram 65 % dos casos. Além disso, houve igualmente uma maior prevalência de MCT cutâneos em fêmeas, com 20 casos (66,7 %), do que em machos; em relação às neoplasias subcutâneas, não se verificou uma diferença significativa de género, tendo sido o número de casos semelhante para ambos (6 em fêmeas e 4 em machos).

Tabela 4. Dados clinicopatológicos dos 40 pacientes utilizados para o estudo.

Caso	Grau	Origem	Raça	Idade (anos)	Sexo	Tamanho (cm)	Metastização	IM	Ki-67 (%)
1	I	Cutânea	SRD	10	F	1,2	Ausente	0	3,8
2	I	Cutânea	Labrador retriever	5	F	0,5	Ausente	0	4,8
3	I	Cutânea	SRD	0	F	0,8	Ausente	0	3,6
4	I	Cutânea	Schnauzer	12	F	1	Ausente	1	1
5	I	Cutânea	SRD	11	F	0,5	Ausente	0	2,2
6	I	Cutânea	Labrador retriever	7	F	1,3	Ausente	1	0,6
7	I	Cutânea	Labrador retriever	8	F	1,5	Ausente	0	6,8
8	I	Cutânea	Labrador retriever	11	F	0,7	Ausente	0	1
9	I	Cutânea	Labrador retriever	9	F	1	Ausente	0	4,8
10	I	Cutânea	SRD	10	M	0,7	Ausente	0	0,2
11	II	Cutânea	Labrador retriever	10	M	2	Presente	3	9,4
12	II	Cutânea	SRD	13	F	0,6	Ausente	1	1
13	II	Cutânea	SRD	12	M	-	Presente	4	22,6
14	II	Cutânea	Boxer	7	M	1	Ausente	1	6,4
15	II	Cutânea	Pit bull	7	M	2	Ausente	4	5,2
16	II	Cutânea	SRD	11	F	2	Ausente	0	7,2
17	II	Cutânea	Bulldog francês	3	F	-	Ausente	1	0,4
18	II	Cutânea	Labrador retriever	14	F	-	Presente	1	1,5
19	II	Cutânea	Labrador retriever	5	M	4,5	Presente	0	13,8

Tabela 4. Continuação.

Caso	Grau	Origem	Raça	Idade (anos)	Sexo	Tamanho (cm)	Metastização	IM	Ki-67 (%)
20	II	Cutânea	Labrador retriever	9	F	1,5	Ausente	2	11.2
21	III	Cutânea	Bulldog francês	6	F	-	Ausente	7	16.6
22	III	Cutânea	SRD	10	M	-	Presente	10	9
23	III	Cutânea	Labrador retriever	8	M	-	Presente	9-10	4.3
24	III	Cutânea	Podengo	15	F	1,5	Presente	8	13.8
25	III	Cutânea	Pit bull	9	F	-	Presente	2-3	5
26	III	Cutânea	Pit bull	4	F	3,5	Ausente	9	7.2
27	III	Cutânea	SRD	11	M	-	Ausente	8	3.6
28	III	Cutânea	Labrador retriever	6	F	-	Ausente	6	7.4
29	III	Cutânea	Pug	13	F	2,5	Ausente	4-5	6.4
30	III	Cutânea	Bulldog francês	3	M	1,5	Ausente	3	1.4
31	-	Subcutânea	Pinscher	12	F	0,5	Ausente	0	2.8
32	-	Subcutânea	Labrador retriever	11	M	-	Ausente	0	6.8
33	-	Subcutânea	Labrador retriever	10	F	-	Ausente	0	0.8
34	-	Subcutânea	SRD	13	M	1	Ausente	0	0.6
35	-	Subcutânea	SRD	7	M	1,2	Ausente	1	5.2
36	-	Subcutânea	Golden retriever	9	F	0,8	Ausente	1	3.9
37	-	Subcutânea	Labrador retriever	8	F	-	Ausente	0	1.6
38	-	Subcutânea	Bulldog francês	5	M	2	Ausente	0-1	1
39	-	Subcutânea	Border collie	9	F	3	Ausente	2	1.6
40	-	Subcutânea	Yorkshire terrier	10	F	2	Ausente	1	0.2

Para os 29 cães de raça conhecida, verificou-se uma maior prevalência de MCT nos animais de raça grande/gigante, com 16 casos ($\approx 55\%$). Não se verificou nenhuma associação significativa entre o estalão da raça e o grau histológico segundo Patnaik ($p=0,192$), nem com a origem do MCT ($p=0,744$) (Tabela 5). No entanto, nos cães de raça grande/gigante, a maioria dos MCT eram de origem cutânea, com um total de 12 casos, e apenas 4 eram de origem subcutânea (Tabela 5). Além disso, foi estabelecida uma relação estatisticamente significativa entre o estalão da raça e o grau histológico segundo Kiupel ($p=0,017$), na qual se verificou uma relação inversa entre estas duas variáveis, isto é, os cães de raça grande/gigante apresentaram mais tumores de baixo grau, comparativamente com os de raças mais pequenas (Tabela 5).

Relativamente às dimensões das neoplasias, a relação entre o tamanho (<2 cm e ≥ 2 cm) e o grau histológico segundo Patnaik mostrou-se estatisticamente significativa ($p=0,021$), tendo-se observado que os tumores de menor tamanho (<2 cm) apresentavam graus histológicos mais baixos; com efeito, todos os tumores de grau I tinham tamanho inferior a 2 cm (Tabela 6). A associação desta variável com o grau histológico segundo os

critérios de Kiupel não foi significativa ($p=0,292$), no entanto, verificou-se que os tumores de baixo grau tiveram maioritariamente tamanho <2 cm, com 13 casos (76,5 %).

Tabela 5. Relação entre o estalão da raça com o grau histológico e origem dos MCT estudados. Nesta tabela estão expressos o número absoluto (N) e a percentagem (%) correspondente.

N=29	N	Estalão da raça (N e %)*			p
		Miniatura/Pequena	Média	Grande/Gigante	
Grau segundo Patnaik (N=21)**					0,192
<i>Grau I</i>	6	1 (16,7)	0 (0,0)	5 (83,3)	
<i>Grau II</i>	7	1 (14,3)	1 (14,3)	5 (71,4)	
<i>Grau III</i>	8	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	
Grau segundo Kiupel (N=21)**					0,017
<i>Baixo grau</i>	14	2 (14,3)	1 (7,1)	11 (78,6)	
<i>Alto grau</i>	7	3 (42,9)	3 (42,9)	1 (14,2)	
Origem (N=29)**					0,744
<i>Cutânea</i>	21	5 (23,8)	4 (19,1)	12 (57,1)	
<i>Subcutânea</i>	8	3 (37,5)	1 (12,5)	4 (50,0)	

Notas: O estalão da raça está marcado com * porque não foi possível classificá-lo em 11 casos, dado os animais serem SRD. Os campos com ** têm menor N, uma vez que não foi possível determinar os dados de algumas amostras.

Tabela 6. Relação entre o tamanho das massas e o grau histológico. Nesta tabela estão expressos o número absoluto (N) e a percentagem (%) correspondente.

N=21	N	Tamanho das massas (N e %)		p
		<2 cm	≥ 2 cm	
Grau histológico segundo Patnaik				0,021
<i>Grau I</i>	10	10 (100,0)	0 (0,0)	
<i>Grau II</i>	7	3 (42,9)	4 (57,1)	
<i>Grau III</i>	4	2 (50,0)	2 (50,0)	
Grau histológico segundo Kiupel				0,292
<i>Baixo grau</i>	17	13 (76,5)	4 (23,5)	
<i>Alto grau</i>	4	2 (50,0)	2 (50,0)	

No que diz respeito à origem dos MCT, cutânea ou subcutânea, estabeleceu-se uma associação estatisticamente positiva entre esta variável e o índice de Ki-67 ($p=0,014$), em que a maioria dos tumores cutâneos (≈ 73 %) expressaram um valor de Ki-67 $\geq 1,8$ % (Tabela 7). Todas as outras relações entre a origem e as restantes variáveis clínicopatológicas, nomeadamente com o sexo, estalão da raça, tamanho, índice mitótico e presença de metástases, não foram significativas (Tabela 7).

Tabela 7. Relação estatística entre a origem dos MCT e as variáveis histológicas. Nesta tabela estão expressos o número absoluto (N) e a percentagem (%) correspondente.

N=40	N	Origem (N e %)		
		Cutânea	Subcutânea	<i>p</i>
Sexo				0,702
<i>Feminino</i>	26	20 (76,9)	6 (23,1)	
<i>Masculino</i>	14	10 (71,4)	4 (28,6)	
Estalão da raça (N=29)*				0,744
<i>Miniatura/Pequena</i>	8	5 (62,5)	3 (37,5)	
<i>Média</i>	5	4 (80,0)	1 (20,0)	
<i>Grande/Gigante</i>	16	12 (75,0)	4 (25,0)	
Ki-67				0,014
<1,8 %	15	8 (53,3)	7 (46,7)	
≥1,8 %	25	22 (88,0)	3 (12,0)	
Tamanho (N=28)**				0,483
<2 cm	19	15 (78,9)	4 (21,1)	
≥2 cm	9	6 (66,7)	3 (33,3)	
Índice mitótico				0,093
<5/cga	33	23 (69,7)	10 (30,3)	
≥5/cga	7	7 (100,0)	0 (0,0)	
Metastização				0,068
<i>Ausente</i>	32	22 (68,8)	10 (31,2)	
<i>Presente</i>	8	8 (100,0)	0 (0,0)	

Notas: O estalão da raça está marcado com * porque não foi possível classificá-lo em 11 casos, dado os animais serem SRD. Os campos com ** têm menor N, uma vez que não foi possível determinar os dados de algumas amostras.

Foi também demonstrada uma associação positiva entre o índice mitótico e o índice de proliferação Ki-67 ($p=0,024$), assim como entre o índice mitótico e o grau histológico segundo Patnaik ($p<0,001$) e também segundo Kiupel ($p<0,001$) (Tabela 8).

Relativamente aos *checkpoints* do sistema imunitário estudados, nomeadamente o ligando do PD-1 (PD-L1) e o CTLA-4, foi observado que ambos foram expressos pelas 40 amostras utilizadas neste estudo. A relação entre a expressão do PD-L1 e os dados clínicopatológicos dos MCT, como origem cutânea ou subcutânea, grau histológico, tamanho da massa, índice de proliferação Ki-67, índice mitótico e metastização, encontra-se sumariada na tabela 9. Verificou-se que os níveis de expressão do PD-L1 eram estatisticamente inferiores nos MCT de origem subcutânea ($p=0,013$), e que existe uma associação inversa com o índice mitótico ($p=0,046$), ou seja, os tumores com menor índice mitótico apresentaram maiores níveis de expressão comparativamente com o grupo de casos com índice mitótico elevado (≥ 5 mitoses/cga). As figuras 4, 5 e 6 demonstram a

comparação entre os níveis de expressão e intensidades de marcação do PD-L1 e os diferentes graus histológicos dos tumores cutâneos, utilizando uma ampliação de 40x. A figura 7 diz respeito à marcação IHQ do PD-L1 num MCT subcutâneo, com uma ampliação de 40x.

Tabela 8. Relação estatística entre o índice mitótico com o índice de proliferação Ki-67 e o grau histológico segundo Patnaik e Kiupel. Nesta tabela estão expressos o número absoluto (N) e a percentagem (%) correspondente.

N=40	N	Índice mitótico (N e %)		
		<5/cga	≥5/cga	p
Ki-67				0,024
<1,8 %	15	15 (100,0)	0 (0,0)	
≥1,8 %	25	18 (72,0)	7 (28,0)	
Grau segundo Patnaik (N=30)				<0,001
<i>Grau I</i>	10	10 (100,0)	0 (0,0)	
<i>Grau II</i>	10	10 (100,0)	0 (0,0)	
<i>Grau III</i>	10	3 (30,0)	7 (70,0)	
Grau segundo Kiupel (N=30)				<0,001
<i>Baixo grau</i>	21	20 (95,2)	1 (4,8)	
<i>Alto grau</i>	9	3 (33,3)	6 (66,7)	

Notas: Os campos com * têm menor N, uma vez que não foi possível determinar os dados de algumas amostras.

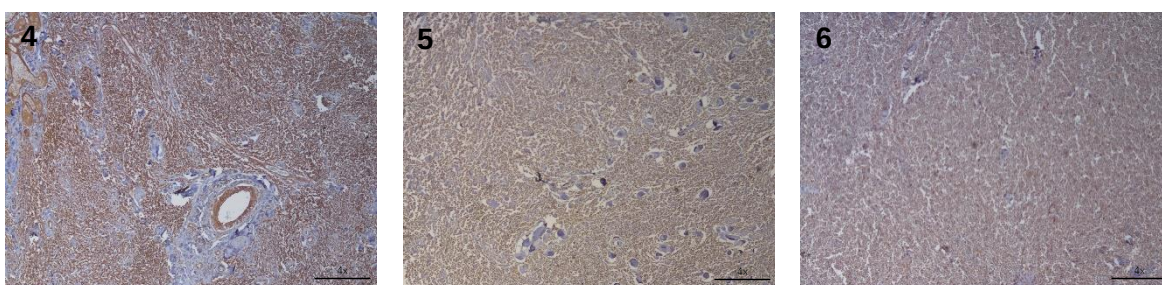
Tabela 9. Relação entre a expressão do PD-L1 e os dados clinicopatológicos dos 40 casos de MCT. Nesta tabela estão expressos o número absoluto (N) e a percentagem (%) correspondente.

N=40	N	Expressão do PD-L1 (N e %)			
		Baixa	Moderada	Elevada	p
Origem					0,013
<i>Cutânea</i>	30	6 (20,0)	19 (63,3)	5 (16,7)	
<i>Subcutânea</i>	10	7 (70,0)	2 (20,0)	1 (10,0)	
Grau segundo Patnaik (N=30)					0,067
<i>Grau I</i>	10	0 (0,0)	8 (80,0)	2 (20,0)	
<i>Grau II</i>	10	1 (10,0)	7 (70,0)	2 (20,0)	
<i>Grau III</i>	10	5 (50,0)	4 (40,0)	1 (10,0)	
Grau segundo Kiupel (N=30)					0,091
<i>Baixo grau</i>	21	2 (9,5)	15 (71,4)	4 (19,1)	
<i>Alto grau</i>	9	4 (44,4)	4 (44,4)	1 (11,1)	
Tamanho (N=28)*					0,1
<2 cm	19	2 (10,5)	13 (68,4)	4 (21,1)	
≥2 cm	9	4 (44,4)	3 (33,3)	2 (22,2)	
Ki-67					0,721
<1,8 %	15	4 (26,7)	8 (53,3)	3 (20,0)	
≥1,8 %	25	9 (36,0)	13 (52,0)	3 (12,0)	

Tabela 9. Continuação.

N=40	N	Expressão do PD-L1 (N e %)			
		Baixa	Moderada	Elevada	p
Índice mitótico					0,046
< 5/hpf	33	8 (24,2)	19 (57,6)	6 (18,2)	
≥ 5/hpf	7	5 (71,4)	2 (28,6)	0 (0,0)	
Metastização					0,817
Ausente	32	11 (34,4)	16 (50,0)	5 (15,6)	
Presente	8	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	

Notas: Os campos com * têm menor N, uma vez que não foi possível determinar os dados de algumas amostras.



Figuras 4, 5 e 6. Comparação entre diferentes níveis de expressão e intensidades de marcação do PD-L1, de acordo com o grau histológico dos MCT (ampliação 40x). A figura 4 corresponde a um MCT grau I com nível alto de expressão e com intensidade de marcação maioritariamente intensa; a figura 5 diz respeito a um MCT grau II, com nível de expressão alto e intensidade de marcação moderada; a figura 6 refere-se a um MCT de grau III, com nível de expressão intermédio a alto e intensidade de marcação ligeira.

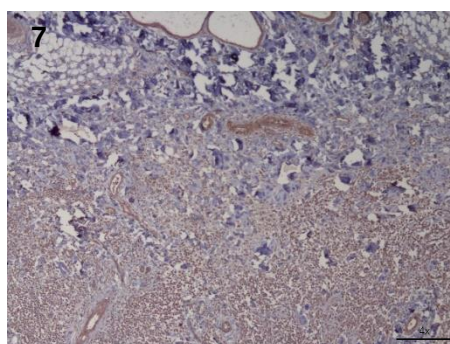


Figura 7. MCT subcutâneo, marcado com o anticorpo anti-PD-L1, com nível de expressão intermédio e intensidade de marcação moderada (ampliação 40x).

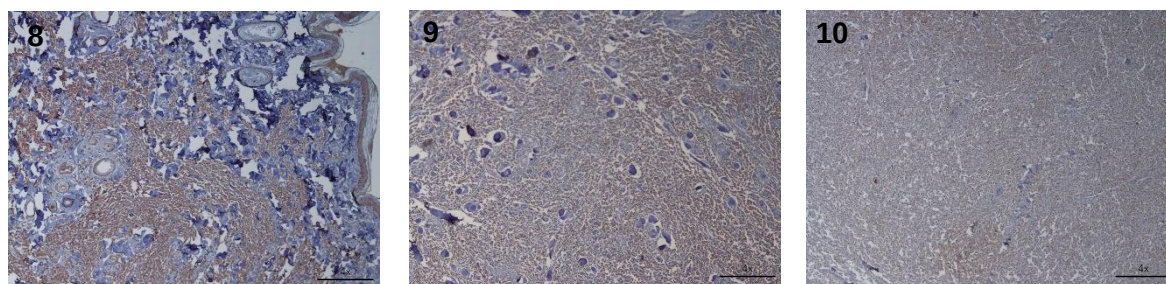
No que diz respeito ao CTLA-4, a relação entre a sua expressão e as diferentes variáveis clínicopatológicas está demonstrada na tabela 10. Neste caso também foi possível verificar uma tendência para maior expressão no caso dos MCT cutâneos, embora não tenha atingido significância estatística ($p=0,09$). No entanto, demonstrou-se que os níveis de expressão do CTLA-4 estão significativamente associados com o grau histológico segundo Patnaik ($p=0,002$) e Kiupel ($p=0,004$) e com o índice mitótico ($p=0,004$), em que

os casos com menor expressão eram os que tinham maiores graus e índices mitóticos mais altos. Nas figuras 8, 9 e 10 está representada uma comparação entre os níveis de expressão e intensidades de marcação do CTLA-4, em relação com o grau histológico dos MCT cutâneos, usando uma ampliação de 40x. A figura 11 demonstra o nível de expressão e intensidade de marcação do CTLA-4 num MCT subcutâneo, com uma ampliação de 40x.

Tabela 10. Relação entre a expressão do CTLA-4 e os dados clinicopatológicos dos 40 casos de MCT. Nesta tabela estão expressos o número absoluto e a percentagem correspondente.

N=40	N	Expressão do CTLA-4 (N e %)		
		Baixa	Alta	p
Origem				0,09
<i>Cutânea</i>	30	9 (30,0)	21 (70,0)	
<i>Subcutânea</i>	10	6 (60,0)	4 (40,0)	
Grau segundo Patnaik (N=30)				0,002
<i>Grau I</i>	10	0 (0,0)	10 (100,0)	
<i>Grau II</i>	10	2 (20,0)	8 (80,0)	
<i>Grau III</i>	10	7 (70,0)	3 (30,0)	
Grau segundo Kiupel (N=30)				0,004
<i>Baixo grau</i>	21	3 (14,3)	18 (85,7)	
<i>Alto grau</i>	9	6 (66,7)	3 (33,3)	
Tamanho (N=28)*				0,201
<i><2 cm</i>	19	4 (21,1)	15 (78,9)	
<i>≥2 cm</i>	9	4 (44,4)	5 (55,6)	
Ki-67				0,354
<i><1,8 %</i>	15	7 (46,7)	8 (53,3)	
<i>≥1,8 %</i>	25	8 (32,0)	17 (68,0)	
Índice mitótico				0,004
<i><5/hpf</i>	33	9 (27,3)	24 (72,7)	
<i>≥5/hpf</i>	7	6 (85,7)	1 (14,3)	
Metastização				0,414
<i>Ausente</i>	32	11 (34,4)	21 (65,6)	
<i>Presente</i>	8	4 (50,0)	4 (50,0)	

Notas: Os campos com * têm menor N, uma vez que não são conhecidos os dados de algumas amostras.



Figuras 8, 9 e 10. Comparação entre diferentes níveis de expressão e intensidades de marcação do CTLA-4, de acordo com o grau histológico dos MCT (ampliação 40x). A figura 8 corresponde a um MCT grau I com nível

alto de expressão e com intensidade de marcação intensa; a figura 9 diz respeito a um MCT grau II, com nível de expressão alto e intensidade de marcação moderada; a figura 10 refere-se a um MCT de grau III, com nível de expressão intermédio e intensidade de marcação ligeira.

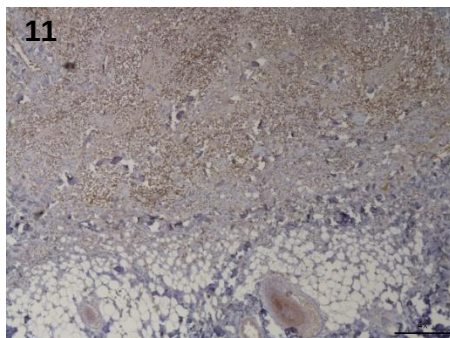


Figura 11. MCT subcutâneo, marcado com o anticorpo anti-CTLA-4, com nível de expressão intermédio e intensidade de marcação moderada (ampliação 40x).

É de salientar que foi também observada uma relação significativamente positiva entre os níveis de expressão do CTLA-4 e do PD-L1 (Tabela 11).

Tabela 11. Relação estatística entre a expressão de CTLA-4 e PD-L1.

N=40	N	Expressão do CTLA-4 (N e %)		
		Baixa	Alta	<i>p</i>
Expressão do PD-L1 (N e %)				0,007
<i>Baixa</i>	13	9 (69,2)	4 (30,8)	
<i>Moderada</i>	21	6 (28,6)	15 (71,4)	
<i>Elevada</i>	6	0 (0,0)	6 (100,0)	

5. DISCUSSÃO

O cancro é uma doença comum ao Homem e aos animais, surgindo de forma espontânea em ambos, sendo que, por vezes, as modalidades terapêuticas convencionais não são suficientes para atingir a cura (Maekawa *et al.*, 2016). A imunoterapia surge no sentido de complementar os tratamentos já existentes e a investigação para a sua aplicação na medicina veterinária tem ganho cada vez mais importância. Até à data, a procura pela expressão do PD-L1 e do CTLA-4 nas neoplasias caninas é um pouco escassa, havendo ainda poucos estudos com foco nesta área, entre os quais os de Maekawa *et al.* (2016), Soshu *et al.* (2016), Hartley *et al.* (2017), Ariyaratna *et al.* (2020), Maekawa *et al.* (2021) e Song *et al.* (2021). O facto de estas moléculas de controlo imunitário estarem muito escassamente investigadas nos MCT motivou a realização do presente estudo, por forma a avaliar se podem constituir uma mais-valia para o seu

prognóstico e tratamento. Que seja do nosso conhecimento, a expressão do CTLA-4 ainda não foi descrita nesta neoplasia.

Neste estudo, não se verificou a existência de uma relação entre a idade e o desenvolvimento de MCT, embora a idade média dos animais do grupo em estudo tenha sido muito próxima à descrita na literatura (8,82 e 8-9 anos, respetivamente) (Klopfleisch, 2016; Bellamy & Berlato, 2022); além disso, apesar de não estar descrita uma predisposição de género, verificou-se uma maior prevalência das neoplasias em fêmeas (65 %). No que toca à predisposição racial, verificou-se uma concordância com a bibliografia, visto que dos 40 cães incluídos, 35 % eram Labrador retriever, que é uma das raças mais predispostas ao aparecimento de MCT (Vail *et al.*, 2020; de Nardi *et al.*, 2022); foi também possível verificar a existência de 4 Bulldog francês e 3 Pit bull, igualmente raças predispostas. Ainda relativamente à predisposição racial, verificou-se que os cães de raça grande/gigante apresentavam significativamente maior número de tumores de baixo grau de Kiupel, ao contrário dos cães de raça pequena/média, sugerindo uma predisposição das raças grandes para terem neoplasias menos agressivas, enquanto as raças mais pequenas parecem ter tumores mais agressivos; estas conclusões são apoiadas pelo estudo de Śmiech *et al.* (2019), em que raças grandes, como Boxer, Labrador retriever e Golden retriever, foram associadas a maiores taxas de desenvolvimento de MCT de baixo grau.

A existência de uma associação positiva entre o tamanho do tumor e grau histológico de Patnaik permitiu concluir que os tumores com <2 cm de eixo longo têm significativamente maior probabilidade de serem de grau I, não se tendo verificado nesta amostra tumores de grau I com tamanho ≥2 cm. Com efeito, segundo de Nardi *et al.* (2022), o tamanho do tumor parece ter uma relação direta com o prognóstico, tendo reportado que tumores com menor eixo longo estão associados a melhor prognóstico.

O estudo do índice de proliferação (IP) celular, através da análise IHQ da expressão do Ki-67, permitiu concluir que os tumores com maior IP eram os de grau II e III, o que corrobora a literatura, uma vez que a expressão deste marcador está geralmente aumentada em casos associados a pior prognóstico, como é o caso dos tumores de grau III (Oliveira *et al.*, 2020). Comparando a origem cutânea versus subcutânea dos MCT, foi possível observar que as neoplasias subcutâneas apresentam significativamente IP mais baixos, ao contrário dos MCT cutâneos, o que apoia a aparente menor agressividade dos MCT subcutâneos, tal como já reportado (Thompson *et al.*, 2011; Bellamy & Berlato, 2022; Chen *et al.*, 2022; de Nardi *et al.* 2022). De facto, apesar de os MCT subcutâneos possuírem fatores de prognóstico comuns com os cutâneos, os principais a ter em conta são o IM, presença de multinucleação e padrão de crescimento infiltrativo (Thompson *et*

al., 2011; Bellamy & Berlato, 2022; Chen *et al.*, 2022; de Nardi *et al.*, 2022). Ainda sobre o IP, verificou-se uma associação positiva com o IM, sendo que os MCT com maior IP também tiveram maior IM, tal como seria esperado, dado serem ambos parâmetros de avaliação da proliferação celular, estando ambos diretamente associados ao prognóstico dos MCT, tendo já sido descrito que estes dois marcadores de proliferação possuem uma capacidade semelhante para prever a sobrevivência de animais com MCT cutâneos (Berlato *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2020). O IM também demonstrou uma associação direta significativa com os graus histológicos de Kiupel e de Patnaik, reforçando o seu valor prognóstico, tal como descrito anteriormente na literatura (Bulman-Fleming *et al.*, 2017; de Nardi *et al.*, 2022).

Relativamente aos *checkpoints* imunitários estudados, verificou-se que tanto o PD-L1 como o CTLA-4 foram expressos nos 40 casos de MCT, sugerindo que a imunoterapia com anticorpos monoclonais contra estas moléculas poderá ser útil no seu tratamento. De facto, relativamente ao PD-L1, os resultados desta investigação apoiam os estudos de Soshu *et al.* (2016) e Maekawa *et al.* (2016), os quais também obtiveram marcação IHQ deste recetor em MCT; já em relação ao CTLA-4, a descoberta da sua expressão pelos MCT é pioneira, uma vez que nunca foi reportado na literatura, o que abre portas a uma maior investigação neste ramo.

No que diz respeito aos níveis de marcação IHQ destas moléculas, verificou-se que os MCT subcutâneos apresentaram níveis de expressão mais baixos do que os cutâneos, o que pode ser explicado pelo seu comportamento biológico benigno em cerca de 90 % dos casos (Kiupel, 2017), já que nestes os mecanismos de evasão ao sistema imunitário poderão estar diminuídos e/ou inativos comparativamente aos tumores com comportamento biológico mais agressivo.

Nos MCT cutâneos, as percentagens de marcação mais intensas, para os dois anticorpos, ocorreram nos tumores de graus mais baixos, particularmente no grau I, enquanto os tumores de grau III demonstraram marcações menos intensas, tendo esta associação atingido significância estatística no caso do CTLA-4. Além disso, as neoplasias com maior IM e, no caso do CTLA-4, também com maior IP, apresentaram níveis de expressão significativamente mais baixos destes *checkpoints*. Estes resultados são, de certa forma, contrários ao esperado, já que era expectável que os tumores de graus mais elevados e/ou com maior IP/IM e, portanto, com pior prognóstico associado, tivessem uma maior e mais intensa expressão destas moléculas, escapando à vigilância imunológica, dado que é um dos mecanismos associados a tumores potencialmente mais agressivos.

Avaliando as associações estatísticas de ambos os recetores com o tamanho tumoral, apesar de não terem sido significativas, verificou-se que a maior percentagem de expressão tanto do PD-L1, como do CTLA-4, corresponde aos tumores de menor tamanho (<2 cm), o que, mais uma vez, está de acordo com os resultados obtidos quanto ao grau e quanto à proliferação celular, sugerindo que os MCT cutâneos com fatores de melhor prognóstico são os que expressam níveis mais altos dos *checkpoints* estudados. Da mesma forma, não se encontrou uma associação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão destas moléculas e o desenvolvimento de metastização, contudo o número de casos metastizados nesta amostra foi reduzido (N=8) pelo que se deve avaliar estes resultados com precaução.

A expressão do CTLA-4 nas células neoplásicas dos 40 MCT deste estudo vem reforçar a literatura que descreve que este recetor não é apenas expresso em linfócitos, mas também noutros tipos de células, quer normais, quer neoplásicas, como por exemplo em cancros humanos, nomeadamente leiomiossarcomas, sarcomas do estroma endometrial, carcinomas pulmonares de células não-pequenas, melanomas, neuroblastomas, rabdomiossarcomas e osteossarcomas (Contardi et al., 2005; Zhang et al., 2019; Samiei et al., 2022), e também em neoplasias caninas, como tumores mamários malignos e melanomas orais (Ariyaratna et al., 2020; Porcellato et al., 2021).

Neste estudo, verificou-se também que a expressão de CTLA-4 e de PD-L1 estavam diretamente correlacionadas estatisticamente, ou seja, os casos de MCT com maior expressão de CTLA-4 eram também os que tinham maior expressão de PD-L1, o que também foi relatado por Zhang et al. (2019) em carcinomas pulmonares humanos de células não-pequenas; estes autores verificaram que o CTLA-4 pode induzir a expressão de PD-L1 através de uma ligação na superfície celular da célula tumoral, que predispõe à ativação da via EGFR (*epidermal growth factor receptor*). É possível que o mesmo mecanismo aconteça nos MCT caninos, mas é necessário desenvolver estudos futuros para avaliar potenciais vias de sinalização autócrinas e parácrinas entre as moléculas de *checkpoint* imunitário.

Para alguns autores, como Klingemann (2018) e Bergman (2019), a imunoterapia parece ser mais eficaz em casos com menor carga tumoral e com doença residual mínima, aliada aos tratamentos tradicionais de cirurgia, quimioterapia e/ou radiação. Atendendo aos resultados preliminares deste estudo, poder-se-á equacionar a sua utilização como terapia adjuvante em casos de MCT de baixo grau removidos incompletamente. Não obstante, será conveniente a realização de mais estudos de forma a aprofundar as razões pelas quais os níveis de expressão destas moléculas foram mais baixos em MCT de alto grau,

que, de certa forma, foram resultados inesperados; assim, algumas hipóteses possíveis para suportar estes resultados podem ser, por exemplo, a existência de variações no microambiente tumoral entre os diferentes graus histológicos; o facto de os tumores de baixo grau, de uma forma geral, se desenvolverem mais lentamente e, dessa forma, permitindo que haja mais tempo para a instalação de mecanismos de supressão imunológica; e/ou à utilização de outros mecanismos, por parte dos MCT de alto grau, para escapar à vigilância imunitária, visto que há algumas neoplasias com maior capacidade para o fazer do que outras (Bates *et al.*, 2018), tais como produção de citocinas imunossupressoras, entre outros (Seliger, 2005).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível verificar que tanto os MCT cutâneos como os subcutâneos expressaram ambos os pontos de controlo imunitário PD-L1 e CTLA-4, o que permite concluir que, efetivamente, estes recetores são expressos em células neoplásicas e, em particular, neste tipo de neoplasia, algo que ainda não tinha sido demonstrado para o CTLA-4. Simultaneamente, foi também possível perceber que a expressão IHQ destes *checkpoints* é superior nos casos de MCT cutâneos e que está associada com fatores de prognóstico como GH, Ki-67 e IM.

Atendendo aos resultados obtidos, conclui-se que a utilização da imunoterapia com anticorpos anti-PD-L1 e anti-CTLA-4 como modalidade terapêutica poderá ser útil em casos de MCT cutâneos de baixo grau, e que estas moléculas poderão ajudar também na determinação do prognóstico destas neoplasias, pelo que seria uma mais-valia aprofundar a investigação desta área neste tipo de tumores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ariyaratna H, Thomson N, Aberdein D, Perrott M, Munday J (2020). "Increased programmed death ligand (PD-L1) and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) expression is associated with metastasis and poor prognosis in malignant canine mammary gland tumours". **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 230
- Bates J, Derakhshandeh R, Jones L, Webb T (2018). "Mechanisms of immune evasion in breast cancer". **BMC Cancer**, 18(1)
- Bellamy E, Berlato D (2022). "Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours: a narrative review". **Journal of Small Animal Practice**, 497-511, 63(7)

- Bergman P (2019). "Cancer Immunotherapies". **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, 881-902, 49(5)
- Berlato D, Murphy S, Monti P, Stewart J, Newton J, Flindall A, Maglennon G (2015). "Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours". **Veterinary and Comparative Oncology**, 143-150, 13(2)
- Buchbinder E, Desai A (2016). "CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences and implications of their inhibition". **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, 98-106, 39(1)
- Bulman-Fleming O, Clifford C, Garrett L, Hershey B, Intile J, Jones P, Kamstock P, Pavuk A, Peauroi J, Powell R, Liptak J (2017). "Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours". **VCS Oncology-Pathology Working Group**
- Chen P, Marconato L, Sabattini S, Kiupel M (2022). "Mutations in Exons 8 and 11 of c-kit gene in canine subcutaneous mast cell tumours and their association with cell proliferation". **Veterinary Sciences**, 9(9)
- Contardi E, Palmisano G, Tazzari P, Martelli A, Falà F, Fabbi M, Kato T, Lucarelli E, Donati D, Polito L, Bolognesi A, Ricci F, Salvi S, Gargaglione V, Mantero S, Alberghini M, Ferrara G, Pistillo M (2005). "CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction". **International Journal of Cancer**, 538-550, 117(4)
- De Nardi A, Dos Horta R, Fonseca-Alves C, De Paiva F, Linhares L, Firmo B, Sueiro F, De Oliveira K, Lourenço S, De Strefezzi R, Brunner C, Rangel M, Jark P, Castro J, Ubukata R, Batschinski K, Sobral R, Da Cruz N, Nishiya A, Fernandes S, Dos Santos Cunha S, Gerardi D, Challoub G, Biondi L, Laufer-Amorim R, de Oliveira P, Lavalle G, Huppel R, Grandi F, De Vasconcellos C, Dos Anjos D, Luzo Â, Matera J, Vozdova M, Dagli M (2022). "Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors". **Cells**, 11(4)
- Dow S (2020). "A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research". **Frontiers in Immunology**, 10
- Ettinger S, Feldman E (2017). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Elsevier, 8th Edition
- Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime S (2006). "The B7-H1 (PD-L1) T-lymphocyte inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: Correlation with important high-risk prognostic factors". **Neoplasia**, 190-198, 8(3)

- Hartley G, Faulhaber E, Caldwell A, Coy J, Kurihara J, Guth A, Regan D, Dow S (2017). "Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression". **Veterinary and Comparative Oncology**, 534-549, 15(2)
- Hatch E, Geeze M, Martin C, Salama M, Hartmann K, Eisenwort G, Blatt K, Valent P, Gotlib J, Lee J, Chen L, Ward H, Lidke D, George T (2018). "Variability of PD-L1 expression in mastocytosis". **Blood Advances**, 189-199, 2(3)
- Hay J, Larson V (2019). "Lomustine (CCNU) and prednisone chemotherapy for high-grade completely excised canine mast cell tumors". **Canadian Veterinary Medical Association**, 1326-1330
- Kern R, Panis C (2021). "CTLA-4 Expression and Its Clinical Significance in Breast Cancer". **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 69(1)
- Kiupel M, Camus M (2019). "Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors". **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, 819-836, 49(5)
- Kiupel M, Webster J, Bailey K, Best S, DeLay J, Detrisac C, Fitzgerald S, Gamble D, Ginn P, Goldschmidt M, Hendrick M, Howerth E, Janovitz E, Langohr I, Lenz S, Lipscomb T, Miller M, Misdorp W, Moroff S, Mullaney T, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase T, Schulman F, Sledge D, Smedley R, Smith K, Snyder P, Southorn E, Stedman N, Steficek B, Stromberg P, Valli V, Weisbrode S, Yager J, Heller J, Miller R (2011). "Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior". **Veterinary Pathology**, 147-155, 48(1)
- Meuten D (2017). **Tumors in Domestic Animals**. Wiley, 5th Edition, cap. 6, 176-202
- Klingemann H (2018). "Immunotherapy for dogs: Running behind humans". **Frontiers in Immunology**, 9
- Kern R, Panis C (2021). "CTLA-4 expression and its clinical significance in breast cancer". **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 69(1)
- Klopffleisch R (2016). **Veterinary Oncology: A Short Textbook**. Springer
- Maekawa N, Konnai S, Nishimura M, Kagawa Y, Takagi S, Hosoya K, Ohta H, Kim S, Okagawa T, Izumi Y, Deguchi T, Kato Y, Yamamoto S, Yamamoto K, Toda M, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K (2021). "PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma". **Precision Oncology**, 5(1)
- Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Kato Y, Murata S, Ohashi K (2016). "Immunohistochemical

analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma". **PLOS ONE**, 11(6)

- Maglennon G, Murphy S, Adams V, Miller J, Smith K, Blunden A, Scase T (2008). "Association of Ki-67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary and Comparative Oncology**, 268-274
- Miller R, Van Lelyveld S, Warland J, Dobson J, Foale R (2016). "A retrospective review of treatment and response of high-risk mast cell tumours in dogs". **Veterinary and Comparative Oncology**, 361-370, 14(4)
- Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S (2007). "Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers". **Cancer Immunology Immunotherapy**, 1173-1182, 56(8)
- Něčová S, Mason S, North S (2021). "Outcome of dogs with intermediate grade low mitotic index, high Ki-67 mast cell tumours treated with surgery and single agent lomustine". **Australian Veterinary Journal**, 146-151, 99(5)
- Oliveira M, Campos M, Lamego L, Magalhães D, Menezes R, Oliveira R, Patanita F, Ferreira D (2020). "Canine and Feline Cutaneous Mast Cell Tumor: A Comprehensive Review of Treatments and Outcomes". **Topics in Companion Animal Medicine**, 41
- Patnaik A, Ehler W, MacEwen E (1984). "Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, 469-474, 21(5)
- Porcellato I, Brachelente C, Cappelli K, Menchetti L, Silvestri S, Sforza M, Mecocci S, Iussich S, Leonardi L, Mechelli L (2021). "FoxP3, CTLA-4 and IDO in canine melanocytic tumors". **Veterinary Pathology**, 42-52, 58(1)
- Regan D, Guth A, Coy J, Dow S (2016). "Cancer immunotherapy in veterinary medicine: current options and new developments". **Veterinary Journal**, 20-28, 207
- Reynolds B, Thomson M, O'Connell K, Morgan E, Gummow B (2019). "Patient and tumour factors influencing canine mast cell tumour histological grade and mitotic index". **Veterinary and Comparative Oncology**, 338-344, 17(3)
- Romansik E, Reilly C, Kass P, Moore P, London C (2007). "Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors". **Veterinary Pathology**, 335-341, 44(3)
- Rowshanravan B, Halliday N, Sansom D (2018). "CTLA-4: A moving target in immunotherapy". **Blood**, 58-67, 131(1)
- Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G (2015). "Histologic grading of canine mast cell tumors: is 2 better than 3?". **Veterinary Pathology**, 70-73, 52(1)

- Salvi S, Fontana V, Boccardo S, Merlo D, Margallo E, Laurent S, Morabito A, Rijavec E, Dal Bello M, Mora M, Ratto G, Grossi F, Truini M, Pistillo M (2012). "Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer". **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 1463-1472, 61(9)
- Samiei A, Gjertson D, Memarzadeh S, Konecny G, Moatamed N (2022). "Expression of immune checkpoint regulators programmed death-ligand 1 (PD-L1/PD-1), cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), and indoleamine-2, 3-deoxygenase (IDO) in uterine mesenchymal tumors". **Diagnostic Pathology**, 17(1)
- Schwab T, Popovitch C, DeBiasio J, Goldschmidt M (2014). "Clinical Outcome for MCTs of Canine Pinnae Treated with Surgical Excision". **Journal of the American Hospital Association**, 187-191, 50(3)
- Seliger B (2005). "Strategies of Tumor Immune Evasion". **Novel Therapeutic Strategies**, 347-354
- Shosu K, Sakurai M, Inoue K, Nakagawa T, Sakai H, Morimoto M, Okuda M, Noguchi S, Mizuno T (2016). "Programmed cell death ligand 1 expression in canine cancer". **In vivo**, 30: 195-204
- Śmiech A, Lsopuszyński W, Ślaska B, Bulak K, Jasik A (2019). "Occurrence and distribution of canine cutaneous mast cell tumour characteristics among predisposed breeds". **Journal of Veterinary Research (Poland)**, 141-148, 63(1)
- Song D, Ro W, Park H (2021). "Evaluation of circulating PD-1 and PD-L1 as diagnostic biomarkers in dogs with tumors". **Journal of Veterinary Science**, 1-10, 22
- Sun C, Mezzadra R, Schumacher T (2018). "Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint". **Immunity**, 434-452, 48(3)
- Tamlin V, Bottema C, Woolford L, Dobson E, Kessell A, Peaston A (2022). "Canine mast cell tumours part I: Clinical and survival outcomes". **Veterinary Medicine and Science**, 1409-1420, 8(4)
- Thompson J, Pearl D, Yager J, Best S, Coomber B, Foster R (2011). "Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices". **Veterinary Pathology**, 156-168, 48(1)
- Vail D, Thamm D, Liptak J (2020). **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Elsevier, 6th Edition
- van Lelyveld S, Warland J, Miller R, Maw H, Foale R, Goodfellow M, Dobson J (2015). "Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumours". **Journal of Small Animal Practice**, 312-319, 56(5)

- Wang F, Ye W, Wang S, He Y, Zhong H, Wang Y, Zhu Y, Han J, Bing Z, Ji S, Liu H, Yao X (2021). "Discovery of a new inhibitor targeting PD-L1 for cancer immunotherapy". **Neoplasia**, 281-293, 23(3)
- Willmann M, Yuzbasiyan-Gurkan V, Marconato L, Dacasto M, Hadzijusufovic E, Hermine O, Sadovnik I, Gamperl S, Schneeweiss-Gleixner M, Gleixner K, Böhm T, Peter B, Eisenwort G, Moriggl R, Li Z, Jawhar M, Sotlar K, Jensen-Jarolim E, Sexl V, Horny H, Galli S, Arock M, Vail D, Kiupel M, Valent P (2021). "Proposed diagnostic criteria and classification of canine mast cell neoplasms: a consensus proposal". **Frontiers in Veterinary Science**, 8
- Willsmore Z, Coumbe B, Crescioli S, Reci S, Gupta A, Harris R, Chenoweth A, Chauhan J, Bax H, McCraw A, Cheung A, Osborn G, Hoffmann R, Nakamura M, Laddach R, Geh J, MacKenzie-Ross A, Healy C, Tsoka S, Spicer J, Josephs D, Papa S, Lacy K, Karagiannis S (2021). "Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action". **European Journal of Immunology**, 544-556, 51(3)
- Xu J (2020). **Regulation of Cancer Immune Checkpoints**. Springer
- Zhang H, Dai Z, Wu W, Wang Z, Zhang N, Zhang L, Zeng W, Liu Z, Cheng Q (2021). "Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer". **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, 40(1)
- Zhang C, Chen J, Song Q, Sun X, Xue M, Yang Z, Shang J (2020). "Comprehensive analysis of CTLA-4 in the tumor immune microenvironment of 33 cancer types". **International Immunopharmacology**, 85
- Zhao Y, Yang W, Huang Y, Cui R, Li X, Li B (2018). "Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy". **Cellular Physiology and Biochemistry**, 721-734, 47(2)