

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA PD-1/PDL-1 E DAS  
PROTEÍNAS CTLA-4, RANK-RANK-L E IFN- $\gamma$  EM  
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS DE ALTO GRAU EM CÃES:  
NOVAS PERSPECTIVAS DE USO DA IMUNOTERAPIA.**

**Noelia Carolina Talavera Guillén**  
Médica veterinária zootecnista

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA PD-1/PDL-1 E DAS  
PROTEÍNAS CTLA-4, RANK-RANK-L E IFN- $\gamma$  EM  
MASTOCITOMAS CUTÂNEOS DE ALTO GRAU EM CÃES:  
NOVAS PERSPECTIVAS DE USO DA IMUNOTERAPIA.**

**Noelia Carolina Talavera Guillén**

**Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**

**Coorientador: Prof. Dr. Wagner Jose Fávaro**

**Dissertação apresentada á Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias -  
UNESP- Câmpus de Jaboticabal, como  
parte das exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Medicina Veterinária.**

G958a

Guillén, Noelia Carolina Talavera

Avaliação da expressão da via PD-1/PD-L1 e das proteínas CTLA-4, RANK-RANK-L e IFN- $\gamma$  em mastocitomas cutâneos caninos de alto grau: novas perspectivas de uso da imunoterapia / Noelia Carolina Talavera Guillén. -- Jaboticabal, 2021

93 p. + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andriago Barboza de Nardi

Coorientador: Wagner José Fávaro

1. Cães. 2. Imunoterapia. 3. Imunohistoquímica. 4. Neoplasia. 5. Mastocitoma. I.

Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA PD-1/PDL-1 E DAS PROTEÍNAS CTLA-4, RANK-RANK-L E IFN- $\gamma$  EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS DE ALTO GRAU EM CÃES: NOVAS PERSPECTIVAS DE USO DA IMUNOTERAPIA

**AUTORA: NOELIA CAROLINA TALAVERA GUILLÉN**

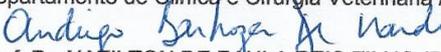
**ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI**

**COORIENTADOR: WAGNER JOSÉ FÁVARO**

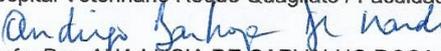
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. NAZILTON DE PAULA REIS FILHO (Participação Virtual)  
Hospital Veterinário Roque Quagliato / Faculdades Qualittas - São Paulo/SP



Profa. Dra. ANA LUCIA DE CARVALHO ROSA PASCOLI (Participação Virtual)  
Universidade Regional de Blumenau-FURB / Blumenau/SC

Jaboticabal, 02 de janeiro de 2021

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**NOELIA CAROLINA TALAVERA GUILLÉN** – nascida no dia 10 de outubro de 1989, natural de Trujillo, La Libertad , Peru. Graduada no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidad Peruana Cayetano Heredia - UPCH no ano de 2013. Durante a graduação, participou de vários cursos e estágios nacionais e internacionais, principalmente na área de Clínica Médica de Pequenos Animais. No período de 2015 a 2017 cursou a especialidade em clínica médica de animais de companhia na Universidade Peruana Cayetano Heredia obtendo o segundo lugar. Trabalhou em diferentes clínicas veterinárias na cidade de Lima, Peru. Liderou um grupo de médicos veterinários em duas clínicas veterinárias e foi médica veterinária no serviço da Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Peruana Cayetano Heredia (2019). Em Novembro de 2019 foi aprovada no Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária (Clínica Médica), na FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi e Coorientação do Prof. Dr. Wagner José Fávaro. Durante o mestrado teve a oportunidade de ministrar diversas aulas, palestras e apresentações de trabalhos em congressos internacionais, abordando principalmente temas relacionados às áreas de Clínica Médica e Oncologia veterinária, além de Imunologia e eletroquimioterapia de Pequenos Animais. Em 2019 participou do atendimento especializado no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Em 2020, foi convidada para ser sócia ativa da Sociedad Latino-americana de Oncologia Veterinária. Em novembro de 2020 foi aprovada no curso de Doutorado pelo mesmo programa de Pós-Graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

A primeira pessoa que agradeço é a minha mãe, por sempre estar ao meu lado, por ser cúmplice de todos meus sonhos e porque me ensinou a ser perseverante, determinada e guerreira como ela é.

A meu orientador Professor Andrigo Barboza De Nardi por me dar essa oportunidade, por ter muita paciência comigo, me guiar e confiar em mim, os agradecimentos em palavras ficam muito pequenos, devido a tamanha gratidão que sinto por ele.

A meu co-orientador Professor Wagner José Fávaro, por ter me recebido e confiado em mim para formar parte dessa equipe de pesquisadores e sobretudo seres humanos maravilhosos que ele lidera, obrigada professor.

A todos meus colegas do Serviço de Oncologia Veterinária, por toda ajuda na coleta de dados, nas disciplinas e na aplicação das imunoterapias, muito obrigada.

A minhas queridas amigas do Perú que foram cúmplices desde o começo desse novo desafio pra mim, que mesmo com a distância deram apoio nos muitos momentos em que precisei.

A meu amigo Sergio Salgado del Prado, meu parceiro da Oncologia, tentamos crescer juntos e ao mesmo tempo enriquecer esse ramo da medicina veterinária no Perú, obrigada por tudo, com certeza você contribui muito para minha vida e me incentivava bastante.

A minha amiga Stella Habib que foi minha parceira nesse projeto, foi meu ombro amigo nos momentos fáceis mas também nos momentos difíceis, esse trabalho também é seu amigo.

A minha amiga Milena Magrin, minha parceira de atendimento, mas também meu braço direito, por ter me ensinado tanto, e ser cúmplice de todo o avanço desse trabalho, você sem dúvida contribuiu muito para minha vida.

A minha querida amiga Marla Tereza Frasson, obrigada por tudo, você contribuiu e muito, já te falei, você é meu exemplo de batalhadora, nessa etapa da pós-graduação.

A meu querido amigo Jorge Alvarez, ele foi a pessoa que abriu as portas para que eu conseguisse cumprir esse grande sonho. Me ofereceu apoio emocional, profissional e familiar aqui no Brasil, serei eternamente grata a ele, esse trabalho é dedicado a você.

Ao Daniel, obrigada por toda paciência, atenção, e incentivo para que eu pudesse estar onde estou hoje, e por ser tão especial na minha vida.

A Queila Dias, obrigada por ter me ensinado tanto, por ter me permitido ganhar experiência e conhecimentos importantes no laboratório, e por toda ajuda que me forneceu nesse período, sem você nada disso poderia ter sido alcançado. Você é uma grande pessoa.

A Alexandra Pineiros, por ter me acolhido nesse tempo como se fosse uma filha, obrigada por toda a disposição que sempre teve comigo.

Aos colegas do programa de pós-graduação, e aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal, por toda ajuda e colaboração.

A todos os proprietários dos pacientes que colaboraram com a realização deste trabalho, que possuem muita dedicação e amor aos seus animais, mas sobretudo obrigada aos pacientes que participaram desse trabalho, vocês com certeza me ensinaram muito e colaboraram com a ciência por ajudar outros animais e pessoas com essa doença que é o câncer através dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS-----	1
Introdução_____	1
Revisão De Literatura_____	2
1.1.- Fatores Prognósticos E Diagnóstico-----	6
1.2- Opções De Tratamento_____	10
1.3 Vias de Inibição dos Checkpoints PD-1 seu ligando PD-L1 e CTLA-4-----	13
1.4- Receptores Toll Like (Tlrs) e sua função na imunoterapia -----	18
1.5 Complexo de Fosfato Inorgânico <sup>1</sup> (MRB-CF1-1) - Oncotherad-----	21
Referências_____	23
CAPITULO 2 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS CHECKPOINTS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS DE ALTO GRAU EM CÃES: NOVAS PERSPECTIVAS DE USO DA IMUNOTERAPIA_____	38
Resumo_____	38
Abstract_____	39
Introdução_____	40
Material E Métodos_____	42
Amostras_____	42
Imunomarcção dos antígenos: PD1/PDL1, RANK , RANK-L , CTLA-4 E IFN- $\gamma$ , Proteína Ctla-4_____	43
Resultados-----	46
Discussão_____	68
Conclusão-----	73
Anexo 1_____	76
Anexo 2_____	77



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da resposta biológica da eletroquimioterapia associada ao Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1) em pacientes caninos com mastocitoma cutâneo graus II e III**”, protocolo nº 08466/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de julho de 2019.

Vigência do Projeto	01/08/2019 a 31/12/2020
Espécie / Linhagem	<i>Cannis lupus familiaris</i>
Nº de animais	15 Machos e 15 fêmeas
Peso / Idade	Indiferente
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Rotina de atendimento do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV Unesp Jaboticabal.

Jaboticabal, 04 de julho de 2019.

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

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil  
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

## **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA PD-1/PDL-1 E DAS PROTEÍNAS CTLA-4, RANK-RANK-L E IFN- $\gamma$ EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINO DE ALTO GRAU: NOVAS PERSPECTIVAS DE USO DA IMUNOTERAPIA.**

**RESUMO** - O mastocitoma cutâneo (MCT) é o tumor cutâneo mais comum nos cães, sendo que os MCTs de alto grau possuem comportamento mais agressivo. A escolha do tratamento depende dos fatores prognósticos e do grau histopatológico relacionado ao tumor, porém até o momento não existem marcadores que relacionem a expressão dos tumores e possam prever a presença de metástase linfática. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão da via PD-1/PD-L1 no linfonodo metastásico e no MCT de alto grau, assim como também avaliar a expressão da via RANK/RANK-L e das proteínas CTLA-4 e INF  $\gamma$  nesse tipo neoplásico, com o objetivo de determinar se trata-se de um tumor que pode ser responsivo a imunoterapia. Foram selecionados 9 pacientes com MCT de alto grau, e avaliados quanto aos dados de resenha, como idade, sexo e raça, localização do tumor, número de nódulos, presença de metástase regional e a distância, estágio clínico, tempo de sobrevivência e avaliação da expressão dos checkpoints, via RANK/RANKL e do IFN $\gamma$  com imunomarcação variando de moderada a intensa. Os MCT de alto grau com tamanho superior a 3 cm tiveram diferença estatística, concluindo que os tumores de 3 cm ou mais independentemente das características próprias do tumor podem já estar associados com a presença de metástase linfática. Adicionalmente, o grupo de cães incluídos apresentavam características epidemiológicas variáveis, porém podemos concluir que no caso dos MCT de alto grau independente de raça, sexo, idade e estágio clínico, a presença das vias PD1-PD-L1, RANK/RANK-L e proteínas CTLA-4 e IFN- $\gamma$  estão ativas. Concluiu-se que o MCT parece ser um tumor passível de manipulação imunológica através do uso da imunoterapia, sendo uma nova ferramenta para auxiliar no tratamento desses tumores.

**Palavras-chave:** cães, checkpoints, metástases linfática.

## EVALUATION OF IMMUNE CHECKPOINTS IN HIGH-GRADE CUTANEOUS MAST CELL TUMOR: A NEW PERSPECTIVE IN CANCER IMMUNOTHERAPY

**ABSTRACT** - Cutaneous mast cell tumor (MCT) is the most common skin tumor in dogs, and high-grade MCTs have a more aggressive behavior. The choice of treatment depends on prognostic factors and the histopathological grade related to the tumor, however, to date, there are no markers that relate the expression of the tumors and can predict the presence of lymphatic metastasis. Thus, the present study aimed to evaluate the expression of the PD-1 / PD-L1 pathway in the metastatic lymph node and high-grade MCT, as well as also to evaluate the expression of the RANK / RANK-L pathway and CTLA-4 proteins and INF $\gamma$  in this neoplastic type, in order to determine if it is a tumor that can be responsive to immunotherapy. Nine patients with high-grade MCT were selected and evaluated for review data, such as age, sex and race, tumor location, number of nodules, presence of regional metastasis and distance, clinical stage and survival time and evaluation expression of checkpoints, via RANK / RANKL and IFN $\gamma$  with immunostaining ranging from moderate to intense. High-grade MCTs larger than 3 cm had a statistical difference, concluding that tumors of 3 cm or more regardless of the tumor's own characteristics may already be associated with the presence of lymphatic metastasis. Additionally, the group of dogs included had variable epidemiological characteristics, but we can conclude that in the case of high-grade MCTs regardless of race, sex, age, and clinical stage, the presence of the PD1-PD-L1, RANK / RANK-L and CTLA-4 and IFN- $\gamma$  proteins are active. We conclude that MCT appears to be a tumor amenable to immunological manipulation through the use of immunotherapy, which is a new tool to assist in the treatment of these tumors.

**Keyword:** dogs, checkpoints, metastases lymph nodes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – Celulas apresentadoras de antígeno
- Ag – Antígenos
- AgNORs – Região organizadora nucleolar argirofílica
- CD – Celulas dendríticas
- CTLA-4 – antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
- DAMPs – Padrões moleculares associado a danos.
- IFN – Interferon
- IL – Interleucinas
- IM – Índice mitótico
- KIT– Tirosine quinase
- MCT- Mastocitoma cutâneo
- NK – Células natural killer
- PAMPs – Padrões
- PD1 – Proteína de morte celular programada 1
- PD-L1 – Ligando da proteína de morte celular programada 1
- RANK – Fator de transcrição nuclear kB
- RANK-L– Ligante do factor de transcrição nuclear kB
- TLR–Toll like receptors
- TME – Microambiente tumoral
- TNF– Fator de necrose tumoral
- Tregs – Células T regulatorias
- VEGF – Fator de crescimento vascular estimulante

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

**Tabela 1:** Estadiamento Clínico para Mastocitoma Canino, feito pela Organização mundial da saúde (WHO).

**Tabela 2.** Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcção utilizados em MCT canino.

**Tabela 3:** Distribuição dos casos acompanhados durante o estudo, organizada segundo características epidemiológicas como idade, raça e sexo. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.

**Tabela 4:** Padrão de imunomarcção frente aos anticorpos primários PD1/PD-L1 em linfonodos metastásicos e MCT de alto grau em cães atendidos pelo Serviço de Oncologia (SOV), Jaboticabal, 2020.

**Tabela 5:** Associação entre a intensidade da marcação da via PD1/PD-L1 no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2020.

**Tabela 6:** Associação entre a intensidade da marcação da via PD1/PD-L1 no linfonodo regional com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2020.

**Tabela 7:** Associação entre a intensidade da marcação da proteína CTLA-4 no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020

**Tabela 8:** Associação entre a intensidade da marcação da via RANK/RANKL no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia (SOV), Jaboticabal, 2020.

**Tabela 9:** Associação entre a intensidade da marcação da via RANK/RANK-L no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.

**Tabela 10:** Associação entre a intensidade da marcação da proteína IFN- $\gamma$  no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.

**Gráfico 1:** Características dos tumores incluindo tamanho, número de nódulos e ulcerações (Kiupel, et al 2011). Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.

**Gráfico 2:** Distribuição da localização dos MCT alto grau. Serviço de Oncologia Veterinária, Jaboticabal, 2020.

**Gráfico 3:** Distribuição gráfica relacionada a metástase aos linfonodos regionais. Serviço de oncologia veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020

**Gráfico 4:** Distribuição gráfica dos estágios clínicos de todos os animais com MCT alto grau. Serviço de oncologia veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020

**Gráfico 5:** Distribuição gráfica dos MCT alto grau recidivantes. Serviço de oncologia veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020

**Gráfico 6.** Fotomicrografia mostrando a intensidade da imunomarcagem de PD1/PD-L1 em MCT alto grau canino. A: MCT com marcação intensa nuclear e citoplasmática. B: Linfonodo metastático com marcação intensa, nuclear e citoplasmática. C: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: Linfonodo metastático com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 um. Campinas, 2020

**Gráfico 7.** Fotomicrografia mostrando a intensidade da imunomarcagem da via RANK/RANK-L, e das proteínas CTLA-4 e IFN $\gamma$  em MCT alto grau canino. A: MCT com marcação intensa nuclear e citoplasmática. B: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT alto grau com marcação intensa, nuclear e citoplasmática. D: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. G: MCT com marcação intensa nuclear e citoplasmática. H: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 um. Campinas, 2020.

# CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1.- INTRODUÇÃO

A prevalência do câncer em cães e gatos é crescente, isso ocorre por diversos fatores, sendo um dos mais importantes a expansão da longevidade proporcionada através dos avanços médicos e, tecnológicos dos cuidados em medicina veterinária. O câncer é a primeira causa de morbidade e mortalidade em cães e gatos, atualmente ao menos quatro milhões de cães e quatro milhões de gatos desenvolvem câncer por ano no mundo (HANSEN; KHANNA, 2004; ADAMS et al., 2010).

Os cães desenvolvem naturalmente o câncer, isso permite compreender melhor a biologia do câncer, os métodos de prevenção e novos tratamentos que podem ser aplicados na medicina humana e veterinária, de forma que a medicina veterinária desempenha um importante papel na oncologia comparativa (LEBLANC et al., 2016).

A função do sistema imune no câncer por muito tempo não foi considerada porque os tumores conseguem suprimir o sistema imune ativando vias regulatórias negativas, também conhecidas como os “checkpoints” que estão associados com o equilíbrio imune ou adotam funções para o escape (TOPALIAN et al., 2015).

Os dois checkpoints mais estudados na medicina humana são o linfócito citotóxico proteína 4 (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada (PD -1) e seu ligante 1 (PD-L1) (CHEN; MELLMAN, 2017). A inibição desses checkpoints resulta no incremento na produção de IFN $\gamma$  permitindo a eliminação das células tumorais (CHEN et al., 2009; PENG et al., 2012). No entanto, a sinalização entre o fator nuclear- $\kappa$ B (RANK) e seu ligante (RANKL) é importante na diferenciação e reabsorção dos osteoclastos, mas também na proliferação, migração e metástase das células tumorais, podendo ser encontrado no microambiente tumoral e sobreexpressão em diferentes células, sendo indicador de prognóstico desfavorável (VAM et al., 2019).

Na medicina humana há alguns anos a imunoterapia tem revolucionado o tratamento contra o câncer, aumentando o tempo de sobrevida em pacientes nas fases

terminais da doença. Na medicina veterinária, mais recentemente, tem-se observado novo campo de pesquisa nesta área para o tratamento dos tumores de maior desafio.

O mastocitoma cutâneo (MCT) é o tumor cutâneo mais comum nos cães, em geral tem possui um comportamento muito variável, mas os MCTs de alto grau possuem comportamento mais agressivo, portanto o tratamento e prognóstico são um desafio para o clínico veterinário.

A escolha do tipo de tratamento está relacionada com os fatores prognósticos presentes, principalmente os relacionados ao tumor, como grau histopatológico, expressão de marcadores de proliferação celular e presença de mutação c-kit, porém até o momento não existem marcadores que relacionem a expressão dos tumores e possam prever a metástase linfática.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão da via PD-1/PD-L1 no linfonodo metastásico e no tumor MCT de alto grau, assim como também avaliar a expressão da via RANK/RANK-L e das proteínas CTLA-4 e INF $\gamma$  nesse tipo tumoral determinar a responsividade à imunoterapia.

## **2.- REVISÃO DE LITERATURA**

O mastocitoma canino (MCT) é uma proliferação de mastócitos neoplásicos derivados de precursores hematopoiéticos na medula óssea (WELLE et al, 2008; BLACKWOOD et al., 2012; LONDON; THAMM, 2013). O mastocitoma pode acometer as camadas da pele, tecido subcutâneo ou tecido visceral, e corresponde entre 16 a 21% das neoplasias cutâneas e subcutâneas diagnosticadas em pequenos animais (DE NARDI et al., 2002; LONDON; THAMM, 2013), sendo considerado o tumor maligno cutâneo mais frequente em cães (VILLAMIL 2011). Possui maior incidência em cães idosos, de 8 a 9 anos de idade em média, embora haja relatos de casos de manifestação em cães mais jovens (MILLER, 1995; LONDON et al., 2009; KIUPEL et al., 2011; MAHLER, 2012).

As raças com maior incidência são os cães sem raça definida, porém várias raças podem apresentar predisposição, como aquelas raças descendentes do Bulldog (Boxers, Pugs, Boston Terrier, Buldogue Inglês), Labrador, Golden Retriever, Cocker Spaniel, Schnauzer, terriers, Beagle, Teckel, Sharpei. O aumento da incidência em certas raças sugere a possibilidade do desenvolvimento desse tipo tumoral estar ligado a fatores genéticos (ARENDDT et al., 2015; MOCHIZUKI et al., 2017; ŠMIECH, et al., 2017). Um recente estudo de associação do genoma, identificou que polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) dentro do gene GNAI2 e genes da hialuronidase estão associados a um risco elevado de MCTs em Golden Retrievers (ARENDDT et al., 2015).

A etiologia ainda não está bem compreendida, existe uma teoria que relaciona a inflamação crônica observada na histologia devido a aplicação de substâncias irritantes, ou a presença de carcinógenos tópicos com maior chance de desenvolvimento tumoral, porém a epidemiologia da doença em cães não confirma essa relação no caso do desenvolvimento do mastocitoma cutâneo (LONDON; THAMM, 2020).

As mudanças genéticas associadas com a doença em cães ainda não estão bem compreendidas. Alterações no gene supressor tumoral p53 foi relatada em alguns cães, mas a perturbação na expressão das proteínas p21 e p27 (inibidores da cíclica - quinase dependente), também foi identificada em vários cães com MCTs (WU; HAYASHI; INOUE., 2004). A expressão do fator de crescimento angiogênico (VEGF) e seu receptor VEGFR2 foi demonstrado em vários cães com MCTs sugerindo que a ativação do VEGFR2 esteja relacionada com resultados pós-cirúrgicos inferiores (THOMPSON et al., 2016; DA SILVA et al., 2017).

O receptor tirosina quinase (KIT) é produto do proto-oncogene c-kit que é expressado em diferentes tecidos como, glioblastoma, cérebro, precursores hematopoiéticos, melanócitos, basófilos e mastócitos. O ligante do receptor KIT, fator células-tronco (SCF) também conhecido como fator de crescimento de mastócitos, é responsável pela proliferação, maturação, migração, degranulação, supressão da apoptose e na adesão da fibronectina . (GALLI et al., 1993; ROSKOSKI, 2005).

Foi descoberto que as mutações na região de codificação da justamembrana do proto-oncogene c-kit foram identificadas em vários MCTs caninos, o que pode desempenhar um papel importante na transformação neoplásica mesmo na ausência da ligação com o SCF. O aumento da fosforilação e/ou localização aberrante no citoplasma, pode estar associado com a desregularização do KIT (THOMPSON et al., 2016). Um número significativo de mastócitos expressa a mutação c-KIT principalmente no éxon 11. Em cães, a ativação do c-KIT está presente em 25 a 30% dos MCTs de médio e alto grau, sugerindo que essa ativação pode estar relacionada à aumento da recorrência local, presença de metástase e a um prognóstico mais desfavorável (LONDON et al., 1999; MA et al., 1999; DOWNING et al., 2002; YUZBASIIAN-GURKAN, 2002); ZEMKE; YAMINI; YUZBASIIAN-GURKAN, 2002; WEBSTER et al., 2006; REGUERA et al., 2000).

Outra via que está sendo estudada atualmente é a via de sinalização P13K / AKT / mTOR (fosfatidilinositol 3 quinase / proteininoquinase B / alvexamicina em mamíferos) que é responsável pela regulação de uma variedade de processos celulares, entre eles a sobrevivência, migração, síntese protéica e progresso no ciclo celular, sendo considerada a segunda via mais alterada em processos neoplásicos (JIANG; LIU, 2009).

A ativação dos receptores tirosina-quinase induz a ativação da via PI3K/AKT/mTOR (KNOWLDEN et al., 2008). A via P13K desempenha um papel fundamental no crescimento, sobrevivência e funcionamento de mastócitos não neoplásicos, recentemente observada como uma via muito importante no desenvolvimento de mastocitomas caninos (FERREIRA, et al 2016) .

A manifestação clínica do mastocitoma cutâneo é muito variável e, por vezes, a lesão pode ser imperceptível ou pode ser confundida com outras lesões cutâneas não neoplásicas (LONDON; THAMM, 2013). Nenhum fator isolado prevê com precisão o comportamento biológico ou a resposta ao tratamento dos MCT caninos (LONDON; THAMM, 2020).

Os mastocitomas cutâneos bem diferenciados tendem a ser solitários, de tamanho pequeno, crescimento lento e podem apresentar um período de evolução

longo, geralmente não são ulcerados, mas frequentemente geram alopecia local. Já os mastocitomas indiferenciados são caracterizados por crescimento rápido, maior extensão, presença de ulceração, e comumente produzem considerável irritação acompanhada de edema e inflamação periférica (DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008; LONDON; THAMM 2013). Somente 11 a 14% dos cães apresentam lesões múltiplas (VAN PELT; FOWLER; LEIGHTON, 1986; MULLINS et al., 2006; WELLE et al., 2008).

A localização do tumor é considerado como um potencial indicador prognóstico (MULLINS et al., 2006; THAMM; TUREK; VAIL, 2006). Os tumores na região do prepúcio/inguinal, base da cauda e regiões mucocutâneas (cavidade oral e períneo) são associados com comportamento mais agressivo (LONDON; THAMM, 2020). Aproximadamente 50 a 60% dos mastocitomas cutâneos estão no tronco e na região perianal, 40% nos membros e 10 a 15% na cabeça e pescoço. Na região inguinal, prepucial e perianal são de manifestação pouco comum (WELLE et al., 2008), e estão relacionados com maior índice metastásico e recorrência (MACY et al., 1985; MACY et al., 1986) porém Cahalane e colaboradores (2004) observaram que mesmo os cães com MCT na região do prepúcio e perianal com o tratamento adequado podem ter um tempo de sobrevida maior que o esperado.

Existem relatos de mastocitomas cutâneos que ocorreram em outras áreas, incluindo a conjuntiva ocular, glândula salivar, nasofaringe, laringe, cavidade oral, ureter e medula espinhal (STEFFEY et al., 2004; MULLINS et al., 2006).

O MCT é potencialmente metastásico, acometendo primariamente os linfonodos e posteriormente o fígado, baço, intestino, e raramente o pulmão (Welle et al., 2008; London e Thamm, 2013). Nos casos de disseminação sistêmica, os mastócitos malignos podem estar presentes na medula óssea e no sangue periférico (Thamm; VAIL, 2007). Qualquer mastocitoma, independente de seu grau pode potencialmente desenvolver metástase. A taxa de metástase dos mastocitomas indiferenciados varia entre 55% e 96%, sendo que a sobrevida média para esse grupo costuma ser inferior a um ano (HUME et al., 2011).

O estadiamento clínico foi desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (WHO siglas em inglês) e esta dividido em cinco estágios (tabela 1), porém Horta e colaboradores (2018), propuseram um estágio adicional na classificação WHO, dividindo o estágio III em dois subestágios, onde cães com metástase linfática regional apresentam um estágio superior, enquanto os cães com múltiplos tumores sem acometimento dos linfonodos regionais apresentam um estágio inferior (HORTA et al., 2018).

**Tabela 1:** Estadiamento Clínico para Mastocitoma Canino, feito pela Organização mundial da saúde (WHO).

ESTADIO	DESCRIÇÃO
0	Tumor removido de forma incompleta sem metástase linfática a: Sem sinais sistêmicos b: Com sinais sistêmicos
I	Um nódulo na pele sem metastástase linfática a: Sem sinais sistêmicos b: Com sinais sistêmicos
II	Único nódulo com metástase linfática a: Sem sinais sistêmicos b: Com sinais sistêmicos
III	Múltiplos nódulos ou neoplasia de gran tamanho infiltrativo, com o sem metástase linfática a: Sem sinais sistêmicos b: Com sinais sistêmicos
IV	Qualquer tipo de tumor com metástase a distância ou tumor recorrente (incluindo sangue o a M. O) a: Sem sinais sistêmicos b: Com sinais sistêmicos

## 2.1.- FATORES PROGNÓSTICOS E DIAGNÓSTICO

A avaliação clínica com correto estadiamento é fundamental para determinar o prognóstico e a opção terapêutica mais adequada, já que o mastocitoma pode ser uma doença de alto potencial metastático. Ainda há controvérsias no prognóstico de mastocitomas múltiplos, vários estudos indicam que não há diferença no comportamento entre um mastocitoma cutâneo solitário e outro com múltiplas lesões (MURPHY et al., 2004; MULLINS et al., 2006; THAMM; TUREK; VAIL, 2006), no entanto, outros autores sugeriam pior prognóstico para cães com múltiplos tumores (KIUPEL et al., 2005;PREZIOSI; SARLI; PALTRINIERI, 2007). A detecção da metástase linfática

ainda é um ponto controverso, alguns linfonodos metastásicos não possuem alteração macroscópica evidente, por esse motivo a punção citológica dos linfonodos locorre-gionais é importante, mesmo que os mesmos não estejam aumentados de tamanho (GARRETT, 2014). Em um estudo feito por Baginski e colaboradores (2014), avaliaram 55 cães com MCTs já com presença de metástase linfática e demonstraram uma sensibilidade de 71% e uma especificidade de apenas 54% para palpação dos linfonodos como um preditor de metástase, 16 de 35 cães (46%) com linfonodos de tamanho normal ao exame físico apresentavam metástase na avaliação histopatológica. Enquanto Lejeune e colaboradores (2015), avaliaram 8 de 21 animais (38%) que apresentavam linfonodos de tamanho normal apresentavam metástase linfonodal. O envolvimento dos linfonodos é associado a um pior prognóstico.

Diversos estudos relatam um tempo de sobrevida maior em pacientes que receberam tratamento local associado ao tratamento sistêmico (radioterapia, quimioterapia adjuvante e cirurgia). Os tratados com associação de terapias costumam apresentar melhor prognóstico do que os não tratados (THAMM et al., 1999; OZAKI et al., 2002; MICHELS et al., 2002; MURPHY et al., 2004). No estudo de Humme e colaboradores (2011), foi realizado uma comparação entre os mastocitomas cutâneos pouco diferenciados. Um grupo foi submetido a linfadenectomia, enquanto no outro grupo não foi realizado a ressecção dos linfonodos. Sendo que a média de sobrevida foi de 240 dias para o primeiro grupo contra 42 dias para o segundo grupo (Humme et al., 2011). Bae e colaboradores (2020) descreveram que os pacientes com metástase em linfonodo regional possuem maior tempo de sobrevida quando comparados com aqueles cães com metástase a distância.

Em geral, todos os pacientes devem realizar os exames complementares de estadiamento. A aspiração dos linfonodos para posterior análise citológica é importante sobretudo naqueles cães com fatores prognósticos negativos associados ao MCT (GARRETT, 2014).

As radiografias torácicas são indicadas para avaliação do linfonodo esternal se a massa estiver presente no abdômen. Pelo fato do MCT raramente metastatizar para o pulmão, as radiografias não são indicadas para avaliar a disseminação pulmonar. Recentemente foi demonstrado que o ultrassom tem uma baixa sensibilidade para a detecção de metástases no baço (43%) e no fígado (0%), sugerindo a necessidade

de realização de punção ecoguiada e posterior estudo citológico e/ou histopatológico do órgão alvo de metástase em todos os casos de mastocitoma (BOOK et al., 2011).

O diagnóstico é feito associando-se os sinais clínicos em associação aos exames citológicos e histopatológicos, sendo a graduação histopatológica a ferramenta diagnóstica mais importante para o mastocitoma cutâneo canino, válida para complementar as informações do estadiamento clínico (PATNAIK et al., 1984; PREZIOSI; MORINI; SARLI, 2004; KIUPEL et al., 2011; THOMPSON et al., 2011).

Vários sistemas de graduação foram propostos, mas o sistema de Patnaik et al. (1984) divide o MCT em 3 graus baseado na celularidade, morfologia celular, grau de invasão, atividade mitótica e presença de reação estromal. De acordo com isso, classifica-se:

Grau I (baixo grau) os cães apresentam um bom prognóstico a longo prazo e geralmente o tratamento local com cirurgia é suficiente para controlar a doença;

Grau II (Grau intermediário): 75% dos cães com tumores intermediários têm uma sobrevida longa se forem tratados cirurgicamente (MICHELS et al., 2002; MURPHY et al., 2004; MULLINS et al., 2006; SCHULTHEISS et al., 2011). Porém, o comportamento dos MCTs de Grau II é mais difícil de prever, sendo a maioria tratada com cirurgia ampla, mas 5% a 22% desenvolvem metástases.

Grau III (alto grau): é considerado o tipo mais severo, mais de 80% metastatizam, e a metástase é a causa mais frequente de morte, portanto é recomendável após tratamento local com cirurgia complementar com tratamento sistêmico através de quimioterapia (WELLE et al., 2008).

Em 2011, Kiupel e colaboradores propuseram uma nova classificação que divide os tumores apenas em alto e baixo grau, para reduzir a incerteza do grau intermediário. Para serem classificados em alto grau de malignidade os tumores devem ter ao menos 7 figuras de mitose contadas em 10 campos de grande aumento, pelo menos 3 células multinucleadas, 3 núcleos com características pleomórficas e cariomegalia (representando 10% de células neoplásicas). Para pacientes que possuem tumores com essas características, o tempo de sobrevida é, em média, de quatro meses ou menos. Os mastocitomas que não possuem as características supracitadas são considerados de baixo grau e estima-se que o tempo de sobrevida seja superior

a 24 meses. No estudo original, este novo sistema de classificação demonstrou um alto valor diagnóstico (96,8%) e também prognóstico (KIUPEL et al., 2011).

A classificação histológica dos MCTs pode nos fornecer informações sobre o potencial metastático desses tumores, mas não permite, por si só, prever seu comportamento biológico. Assim para uma caracterização mais completa, é necessário indicar provas moleculares, como a avaliação de marcadores de proliferação (Ki-67, AgNOR, PCNA e KIT), a detecção da mutação do gene c-KIT e o índice mitótico (OLIVEIRA et al., 2020). Todos esses fatores podem agregar mais informação para o grau do tumor e tentar ajudar a estimar o comportamento clínico do MCT (KRICK et al., 2017).

O índice mitótico (IM) é caracterizado como um método para mensurar a atividade proliferativa celular. É fácil de usar e consiste na contagem de 10 figuras mitóticas por grande campo de magnificação, realizado durante o estudo histopatológico, de modo que neoplasmas com maior índice mitótico estão relacionados com pior prognóstico (DE NARDI et al., 2016). Adicionalmente, o IM maior está associado com um aumento do risco de metástase, porém a localização da metástase não é previsível. Diversos estudos reportam diferentes valores de corte, mas foi proposto considerar o valor de 7 de IM para ser parte do novo estadiamento do MCT (PREZIOSI; MORINI; SARLI, 2004; ROMANSIK et al., 2007; KIUPEL et al., 2011; THOMPSON et al., 2011).

A proteína Ki-67 é expressa em todas as fases do ciclo celular exceto na fase G0 e na fase precoce do G1. A expressão de Ki-67 indica divisão celular, sendo considerado um marcador prognóstico importante no MCT (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; SCASE et al., 2006).

As proteínas AgNOR são proteínas associadas à transcrição ribossômica do RNA, e seu número aumenta proporcionalmente à proliferação celular. A contagem de AgNORs por núcleos e o índice de Ki-67 demonstrou que estão relacionados com a recorrência de MCT (local e distante) e o risco de metástase assim como também a causa de morte por MCT. O resultado da multiplicação dos dois escores é um preditor de comportamento natural do MCT quando comparado com os parâmetros utilizados separadamente (Webster et al., 2007). Já no estudo de Ozaki e colaboradores (2007),

foi associado a presença de valores altos de Ki-67 com tempo mais curto de sobrevivência, porém não foi relacionado com a recorrência do tumor e/ou a presença de metástase em cães com MCT de margens comprometidas.

A desregulação do KIT tem um papel importante no prognóstico dos MCTs. Três padrões foram identificados mediante a imunohistoquímica: membrana, focal/pontilhado e coloração citoplasmática difusa. A presença ativa da mutação do c-kit tem sido associada com alto índice de recorrência local, metástase e óbito relacionado ao tumor, confirmando que a desregularização do KIT é o fenótipo mais agressivo dos MCTs (DOWNING et al., 2002; WEBSTER et al., 2004; ROBAT et al., 2012). Os cães com mutação no exon 11 do c-kit possuem pior prognóstico (DOWNING et al., 2002). A presença da mutação do c-kit e marcação citoplasmática tem sido associadas com aumento do índice de Ki-67 e alta contagem de AgNORs (WEBSTER et al., 2007).

Em diversos estudos não está esclarecido se a causa de morte por MCT é por recorrência do tumor primário, crescimento de novos tumores ou por conta da presença de metástases locais ou regionais. A associação entre todos esses fatores prognósticos e a presença da metástase no linfonodo regional não está bem estudada. No entanto, a metástase linfática regional é a primeira manifestação de metástase dos MCT mais agressivos (LONDON et al., 2013).

## **2.2.- OPÇÕES DE TRATAMENTO**

A escolha do tratamento dependerá da presença ou ausência de fatores prognósticos negativos, estadiamento histológico e estadiamento clínico incluindo a presença de metástase em linfonodo regional. Para os tumores localizados em áreas que permitem ampla excisão, a cirurgia é o tratamento de escolha (THAMM; VAIL, 2007).

Com relação às margens cirúrgicas, desde a década de 1960, considera-se padrão a realização de três centímetros em todas as direções laterais e ao menos um plano fascial profundo (LONDON; SEGUIN, 2003; SCASE et al., 2006; THAMM; VAIL, 2007). Alguns estudos demonstraram que os MCT grau I e II ou de baixo grau, menores que cinco centímetros de diâmetro podem ser empregadas margens de dois centímetros laterais em todas as direções e um plano fascial profundo, e se necessário é importante considerar remover um plano muscular, por conta do risco de recorrência

local ou metástase em período inferior a dois anos de pós-operatório (SIMPSON et al., 2004; FULCHER et al., 2006).

Todas as margens cirúrgicas devem ser estudadas histologicamente para confirmar a excisão completa do tumor, sendo importante considerar nos casos em que a localização seja de difícil ressecção, uma biópsia incisional para confirmar o grau e determinar a terapia que será estabelecida posteriormente à cirurgia (LONDON et al., 2013).

Terapia adjuvante sistêmica deve ser considerada em cães com fatores prognósticos pobres como os MCT indiferenciados, de grau intermediário, com metástase regional ou a distância, tumores de alto grau, tumores com alta atividade proliferativa, ou naqueles localizados na mucosa ou na região de transição mucocutânea (THAMM; TUREK; VAIL, 2006; HILLMAN et al., 2010). Pode ser indicado tratamento neo-adjuvante (citorredução tumoral, para após alcançar redução do tamanho tumoral para que o mesmo seja removido cirurgicamente com margens livres) ou após a excisão de mastocitomas grau III/alto grau. Além de ser indicada também para os MCT recorrentes e de remoção incompleta ou na presença tumoral de MCT grau I, II/baixo grau que não podem ser cirurgicamente tratados (WELLE et al., 2008).

O MCT grau III/ alto grau com metástase linfática, possui prognóstico desfavorável, de forma que um adequado tratamento (através de cirurgia ou radioterapia) no linfonodo podem aumentar o tempo de sobrevida. Hahn e colaboradores (2004) demonstraram que os cães tratados com cirurgia combinada com radioterapia na área do linfonodo regional metastásico, tiveram um tempo médio de sobrevida de 840 dias. O tratamento profilático com radioterapia no linfonodo pode aumentar o tempo de sobrevida em cães com MCT alto grau, em relação aqueles que receberam tratamento quimioterápico com vimblastina (VBL) e prednisona (THAMM; TUREK; VAIL, 2006).

Adicionalmente, Hume e colaboradores (2004) reportaram que 27 dos 43 cães com MCT grau III apresentaram recorrência local e/ou metástase regional e somente cinco cães desenvolveram metástase a distância, demonstrando que os MCT alto grau tem baixo risco de desencadear metástase a distância.

Existem diversos protocolos quimioterápicos para o tratamento do MCT, no entanto, o protocolo de vimblastina e prednisona e/ou lomustina são os mais comumente

empregados. A vimblastina, é um alcalóide vegetal que inibe a polimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, bloqueia a metáfase e conseqüentemente atua na mitose. É associada aos corticóides como a prednisona, por essa contribuir na resposta anti-tumoral diminuindo o edema peritumoral e a inflamação. Em um relato foi descrito que a resposta dos MCT aos corticóides estaria relacionada com a expressão de receptores específicos, portanto aqueles tumores que não expressam esses receptores a resposta seria mínima (MATSUDA et al., 2011). O protocolo com vimblastina e prednisona para tratar MCT agressivos sem evidência macroscópica de metástases é de oito ciclos. Se houver doença mensurável, o tratamento será baseado no efeito clínico por doze semanas contínuas até a resposta máxima, para depois seguir com a administração a cada duas semanas, diminuindo a frequência de administração o máximo possível para manter o controle do tumor (MCNIEL et al., 2006; BAILEY et al., 2008).

A lomustina (CCNU) é um agente quimioterápico alquilante que atua inibindo a síntese de DNA e RNA, sendo um fármaco inespecífico do ciclo celular. Estudos recentes avaliaram a taxa de resposta dos diferentes protocolos citotóxicos e foi relatada uma resposta superior a 64% para a lomustina, no entanto os protocolos com multia-gentes podem obter uma taxa superior de resposta do que aquelas terapias de um único agente citotóxico (THAMM; MAULDIN; VAIL, 1999; CAMPS-PALAU et al., 2007; COOPER et al., 2009; RASSNICK et al., 2010). A combinação de prednisona, CCNU e vimblastina foi usada em MCT com margens comprometidos com alto risco de disseminação, e gerou um tempo livre de doença de 865 dias (CAMPS-PAUL et al., 2007; DE NARDI et al., 2016).

Como já foi discutido anteriormente, os MCT expressam o receptor KIT, porém uma minoria dos cães (20 a 40%) possuem a mutação genética c-kit que torna a proteína do KIT construtivamente ativa. Foram aprovados para uso dois medicamentos inibidores da tirosina quinase (TKIs), o Toceranib (TOC; Palladia, Zoetis) e Masitinib (MAS; Masivet, AB Science) (LONDON, et al., 2003; HANH, et al., 2008)

Os inibidores de tirosina quinase (TKI) são indicados para o MCT grau II/baixo grau, MCTs alto grau resistentes a múltiplas drogas, MCTs inoperáveis, para tumores com presença de metástase regional e/ou a distância, recidivas ou por fim, como terapia de resgate (HANH et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012).

Em um estudo os cães com MCTs recorrentes e inoperáveis foram tratados com Masitinib, e observado aumento no tempo de sobrevida (12 a 24 meses) e longo tempo de controle da doença em comparação ao grupo controle (40% e 15%, respectivamente) (HANN et al., 2010). O Toceranib, é um fármaco que além de ter atividade no receptor KIT, tem atividade no fator de crescimento endotelial vascular e no receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas, possuindo efeito antitumoral e antiangiogênico. Os cães com a presença de mutação no gene c-kit têm uma resposta biológica de 82%, em comparação com os cães que não apresentam a mutação (54%). A administração é feita pela via oral (VO), 3 vezes por semana, começando com uma dose de 2,75 mg/kg. Robot e colaboradores (2012) estão avaliando a possibilidade de associar TOC com vimblastina (1,6 mg/m<sup>2</sup>), observando-se uma taxa de resposta de 71%.

Os inibidores JAK2/STAT5, inibidores HSP90, inibidores da histona desacetilase, TRAIL e inibidores polo semelhante ao kinase - 1, são os novos tratamentos médicos que podem ser considerados para o tratamento do MCTs (KISSEBERTH et al., 2008; LIN et al., 2008; KELLER et al., 2018;). Porém, a possibilidade de considerar os tratamentos de imunoterapia através de inibidores de checkpoints pode ser uma nova linha de tratamento nos pacientes com MCT de alto grau.

### **2.-3 VIAS DE INIBIÇÃO DOS CHECKPOINTS PD-1/ PD-L1 E CTLA-4**

Na medicina humana na última década com as ferramentas da biologia molecular e maior compreensão dos mecanismos de controle do sistema imunológico, a imunoterapia é uma nova classe terapêutica que oferece uma abordagem mais direcionada, e, portanto, precisa para o tratamento do câncer proporcionando ganhos surpreendentes na sobrevida para um grupo de pacientes que anteriormente tinham poucas opções de tratamento. Sendo reconhecida como um dos pilares do tratamento juntamente com a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (BERGMAN, 2019).

Na medicina veterinária, abordagens semelhantes estão sendo desenvolvidas para o tratamento do câncer canino, porém poucos reagentes imunológicos específicos foram desenvolvidos até o momento (ADDISSIE; KLINGEMANN, 2018).

As células neoplásicas são capazes de fazer moléculas imunossupressoras trabalharem em sua vantagem, inibindo os linfócitos anti-tumorais e assim escapando da destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro (MICHOT et al., 2016). No microambiente tumoral, moléculas imunossupressoras como o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico, (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) são fortemente sobreexpressadas (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011).

A CTLA-4 atenua principalmente a ativação de células T na fase de iniciação por meio de mecanismos intrínsecos e extrínsecos das células, já a PD-1 atenua principalmente na atividade de células T em tecidos periféricos, por meio de mecanismos intrínsecos de células (WALKER; SANSOM, 2011; TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2012).

Com base nisso, foram desenvolvidas novas opções terapêuticas como o Ipilimumab (anti-CTLA-4), pembrolizumb (anti-PD-1), atezolizumb (anti-PD-L1) que representam uma das abordagens de maior sucesso na descoberta de medicamentos contra o câncer nos últimos anos, inclusive com uso aprovado recentemente pela FDA (PENTO, 2017). De fato, os inibidores dos checkpoints induzem regressão tumoral e estabilização prolongada da doença em pacientes com estados avançados do melanoma metastásico, câncer do pulmão de células não pequenas (NSCLC), carcinoma de células renais e carcinoma urotelial (PARDOLL, 2012).

A superexpressão dos checkpoints pelos tumores, o recrutamento de células imunossupressoras, fatores benéficos para o microambiente tumoral como a diminuição da apresentação do antígeno imunogênico pelo tumor, adequam o microambiente imunológico a um estado imunossupressor por meio de um processo denominado “imunoeedição”. Esse processo tumorigênico apresenta três fases sendo: 1) eliminação inicial do tumor seguido por 2) um estado de equilíbrio entre o hospedeiro e o tumor e 3) o tumor evita a vigilância imunológica (KAJA, 2017).

A proteína PD-1 possui dois ligantes PD-L1 e PD-L2 que são membros da família B7. São expressadas pelas células T CD4 e CD8, algumas natural killers (NK), células dendríticas (CD), mastócitos, macrófagos e linfócitos B (CEERAZ; NOWAK; NOELLE, 2013; MUENST et al., 2015). Em contraste com os ligantes B7, PD-L1 também é expresso em uma ampla gama de células endoteliais e vários tipos de células

epiteliais (FREEMAN et al., 2000; KEIR et al., 2008). Sinais inflamatórios incluindo os Interferons (IFN) tipo I e tipo II e fator de necrose tumoral (TNF) resultam em indução adicional de PD-L1 em células hematopoiéticas, endoteliais e epiteliais. De forma que a ampla distribuição da expressão de PD-L1, apoia a importância das interações PD1/PD-L1 na regulação das respostas de células T reguladoras (Tregs) em tecidos periféricos saudáveis, particularmente em locais de inflamação. Portanto, a expressão do PD-L1 nos tecidos ativa a proteína PD-1 na superfície das células T produzindo a tolerância imunológica (MAHONEY; RENNERT; FREEMAN, 2015).

Foi demonstrado que o PD-1 regula o desenvolvimento, a manutenção e a função das Tregs, especificamente, a expressão de PD-L1 por as APCs que desempenham um papel crítico na indução da diferenciação das Treg e na manutenção de sua função supressora. Dada a expressão proeminente de PD-L1 por tumores e o papel estabelecido das Tregs como inibidores das respostas imune específicas do tumor, a via PD-1/PD-L1 mediada pelas Tregs dentro do microambiente tumoral pode demonstrar um mecanismo adicional de evasão tumoral (FREEMAN et al., 2000; LATCHMAN, et al., 2001; BROWN et al., 2003).

Várias linhas de pesquisa sugerem que o PD-1 e seus ligantes regulam negativamente as respostas imunes, inclusive mostraram que o microambiente tumoral manipula a via PD-1/PD-L1 e a indução da expressão de PD-L1 nas células tumorais, portanto leva à inibição das respostas imunes anti-cancerígenas, permitindo a progressão e metástase do câncer. Em um experimento em murinos com melanoma, observaram que a indução de PD-L1 em tumores inflamados é mediada primariamente por IFN- $\gamma$  que é produzido pelas células T infiltradas que expressaram o Ag e portanto, expressam PD-1 (SPRANGER et al., 2013; ABIKO et al., 2015).

É, importante ressaltar que esta supressão é reversível, e o bloqueio da via PD1/PD-L1 usando anticorpos anti-PD-1 ou PD-L1, pode restaurar as funções efetoras das células T, incluindo as capacidades de proliferação celular e secreção de citocinas (WONG et al., 2007; CHEN; HAN, 2015).

Os inibidores PD-1/PDL-1 evitam farmacologicamente a interação PD-1/PD-L1 facilitando uma resposta positiva anti-tumoral. Embora, esses inibidores possuem claros benefícios anti-tumorais, precisam ter uma população de células T capazes de reconhecer o tumor por meio das células APCs (CHEN; HAN, 2015).

Embora o câncer em cães possui um comportamento muito semelhante ao câncer dos humanos, incluindo a localização, progressão e resposta aos tratamentos, as populações de linfócitos caninos são menos definidas que os humanos e os reagentes de coloração e bloqueio que têm como alvo as vias de controle imunológico específicas, ainda não estão amplamente disponíveis (CHOI et al., 2020).

Portanto, novos estudos nessas vias inibidoras de “checkpoints” são essenciais para melhorar o desenvolvimento de uma imunoterapia eficaz que pode induzir resposta antitumoral em cães.

Maekawa e colaboradores (2014) descobriram que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 pelo anticorpo PD-L1 aumenta a produção de IFN- $\gamma$  a partir das células tumorais infiltradas em cães com tumores. Essas observações demonstram que existem possibilidades que as vias PD-1/PD L1 possam ser um alvo terapêutico para o tratamento dos tumores em cães. O outro checkpoint importante é o CTLA-4, que é uma proteína transmembrana do tipo I, membro da família dos B7/CD28, que tem afinidade com CD28 uma molécula co-estimuladora, que também se liga aos ligantes B7 como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Embora o CD28 seja detectado tanto em células T em repouso, quanto em células T ativadas, CTLA-4 é encontrado principalmente em células T ativas e células Treg, resultando na inibição da ativação e proliferação das células T e secreção de IL-12 (ALEGRE, et al., 1996; STOJANOVIC et al., 2014)

CTLA-4 é expresso sempre pelas células Treg, mas também pode ser expresso transitoriamente na superfície por outras células T em 24 a 48 horas, especialmente células T CD4+ após a ativação (CHAN et al., 2014). As células T esgotadas são frequentemente caracterizadas pela expressão de CTLA-4.

O CTLA-4 está localizado principalmente em vesículas intracelulares do complexo de Golgi e é apenas expresso após sinapse imunológica, antes de ser rapidamente endocitado (SEIDEL; OTSUKA; KABASHIMA, 2018). Como CD80 e CD86 são expressos nas APCs, mas não em células tumorais não hematológicas, a supressão da imunidade anti-tumoral por CTLA-4 foi observada principalmente em órgãos linfóides secundários, nos quais ocorre ativação das células T, e não dentro do microambiente tumoral (TME) (TOPALIAN et al., 2015). CTLA-4 também pode remover CD80 e CD86 (incluindo seus domínios citoplasmáticos) das superfícies das células apre-

sentadoras de Ag via trans- endocitose, reduzindo, portanto, a desses receptores estimuladores para outras células T que expressam CD28. É considerado um mecanismo importante pelo qual as Treg medeiam à supressão imunológica em células expectadoras (WING; YO, 2008).

As vias de sinalização específicas pelas quais CTLA-4 inibe a ativação de células T ainda estão em pesquisa, embora a ativação da via fosfato tirosine com o domínio da região 2 (SHP2) para reduzir a ativação das células T é fundamental para manter a tolerância periférica, demonstrado pela linfoproliferação e o início da autoimunidade em camundongos CTLA-4  $-/-$  (WATERHOUSE et al., 1995; MARENGERE et al., 1996; LEE, et al., 1998).

Com base no papel do CTLA-4 como regulador negativo da ativação das células T, tornou-se um alvo atraente para aumentar a atividade efetora dos linfócitos T. No contexto da imunidade anti-tumoral, estudos em murinos e pacientes humanos com câncer, demonstraram que o bloqueio da CTLA-4 baseado em anticorpos monoclonais inibe a supressão imunológica associada a Treg e promove a função efetora das células T CD4+ e CD8 + (PEGGS, 2009; WEI et al., 2017).

Ensaio clínico com dois inibidores anti- CTLA-4 humanos denominados ipilimumab, anticorpo monoclonal humano com uma vida média de 12 a 14 dias, foi o primeiro inibidor checkpoint aprovado. E o Tremelimumab anticorpo humano IgG2a com uma vida média de 22 dias, demonstraram sucesso em estudos clínicos com pacientes com melanoma em estágio avançado, ambos anticorpos foram eficazes em induzir redução do tamanho tumoral e a chance do desencadeamento de metástases (PARDOL; DRAKE, 2012).

O ipilimumab está sendo investigado como tratamento para uma variedade de tipos de câncer, incluindo, carcinomas de células renais (RCC), carcinoma de células não pequenas do pulmão (NSCLC), câncer de próstata, carcinoma urotelial, carcinoma de células escamosas (JENKINS; BARBIE; FLAHERTY, 2018).

Na medicina veterinária, a expressão do PD-L1 e CTLA-4 em células linfoides neoplásicas são fator prognóstico em cães com linfoma de alto grau com fenótipo B (TAGAWA et al., 2018). Ariyarathna, e colaboradores (2020) estudaram a expressão de PD-L1 o CTLA-4 em tumores mamários caninos malignos e observaram que na-

queles que subsequentemente desenvolviam metástase, a imunomarcacão foi significativamente mais alta quando comparados com aqueles que não desenvolviam a presença de metástase detectável clinicamente, além disso, maiores escores de imunomarcacão de PD-L1 ou CTLA-4 foram associados com tempos de sobrevida mais curtos em cões com neoplasias mamárias malignas. Apesar do papel imunossupressor bem conhecido de CTLA-4, a associação entre a expressão da proteína CTLA-4 pelas células cancerígenas o resultado da doença não está claro, possivelmente devido ao número ainda limitado de pesquisas (YU et al., 2015; SEIDEL; OTSUKA; KABASHIMA, 2018).

#### **2.4.- RECEPTORES TOLL LIKE (TLRS) E SUA FUNÇÃO NA IMUNOTERAPIA**

O sistema imune está composto por APCs, macrófagos e DCs, que em condições normais são células imaturas, mas se ativam após se apresentarem ao Ag. O processo de captura do Ag requer a utilidade de vários receptores de reconhecimento de padrão transmembrana, os secretores (PRRs). Um dos PRRs mais bem caracterizados, são os receptores Toll-like (TLRs), um tipo de proteína tipo 1 com ectodomínios que contêm repetições ricas em leucina e desempenham papéis importantes no estabelecimento da imunidade inata e adaptativa (ADAMS, 2009).

Podem reconhecer uma ampla gama de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) incluindo certos Ag tumorais e microorganismos e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) de células mortas e danificadas por causa da inflamação, tendo como função mais relevante o recrutamento de leucócitos para tecidos infectados e indução da resposta imune adaptativa (AKIRA; TAKEDA, 2004; GALLI et al., 2010; SATOH; AKIRA, 2016).

Várias células, incluindo macrófagos, CD4, neutrófilos, NKs, e fibroblastos expressam receptores Toll-like (TLRs) que são ativados pelo sistema imunológico (JANEWAY; MEXZHITOW, 2002; AKIRA; UEMATSU TAKEUCHI, 2006).

Ao receber sinais por parte das APCs, as células T naíve podem se diferenciar em diferentes células T efetoras, incluindo células T CD4+ e CD8+ e juntamente com as NK modulam o microambiente tumoral eliminando posteriormente as células cancerosas. Os TLRs são expressos principalmente em APCs, mas também podem ser

expressos em células epiteliais e tumorais, portanto alguns os consideram um gatilho para a progressão do tumor, enquanto outros como um alvo para o tratamento do câncer (HUANG et al., 2008; AMES; MURPHY, 2014; FESNAK et al., 2016).

A expressão dos TLR está regulada positivamente em muitos tumores humanos como os de cólon, estômago, próstata, mama, ovários e cérebro, nos quais a sinalização pelos TLRs foi implicada no aumento da secreção de citocinas imunomoduladoras (OLBERT et al., 2015). O tumor se mantém em crescimento e evita a detecção do sistema imune estabelecendo um ambiente pro-tumor imunossupressor.

Os checkpoints vão regular negativamente a coestimulação necessária para a ativação de células T antitumorais no linfonodo e em tecidos tumorais. Além das ações imunossupressoras que o tumor induz, as células supressoras derivadas do mieloide suprimem a imunidade inata e adaptativa modificando a ativação das células T, desenvolvendo reações inflamatórias no microambiente tumoral e promovendo outras células imunossupressoras que estimulam o crescimento do tumor e a resistência imunológica (PARKER; BEURY; OSTRAND-ROSENBERG, 2015).

Um grupo de TLRs é expresso na membrana plasmática, que é caracterizada pelo reconhecimento de lipídios e proteínas de ligação (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) e grupo de TLRs detecta diferentes ácidos nucleicos virais que estão localizados em espaços lisossomais. Como TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004; GALLI et al., 2010; ZHOU, 2014; SATOH; AKIRA, 2016). Curiosamente, o TLR3 não é apenas expresso intracelularmente em DCs, mas também na superfície de outras células como as epiteliais e nos fibroblastos (MUZIO et al., 2000). A sinalização de TLR induz a ativação de genes de citocinas inflamatórias, como interferon tipo I, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10 para induzir apoptose; como também a expressão de moléculas co-estimulantes em células dendríticas e macrófagos. Cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra os patógenos estimulantes (AKIRA; TAKEDA, 2004; GALLI et al., 2010; SATOH; AKIRA, 2016).

A ativação de TLRs na superfície das células epiteliais induz a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM), as quais desempenham um papel fundamental na implantação e adesão de leucócitos (SATOH; AKIRA, 2016).

Todos os TLRs com exceção do TLR3 utilizam a resposta primária de diferenciação da via dependente mieloide 88 (MyD88) e da proteína ativadora do domínio TIR (TIRAP); que é responsável pela produção do TNF- $\alpha$ , interleucina 1 (IL-1), IL-6 e outras citocinas que são dependentes do fator nuclear kappa B (RANKs) (AKIRA; TAKEDA, 2004)..

O TLR3 sinaliza por meio de uma via independente de MyD88 envolvendo interferon- $\beta$  indutor de adaptador contendo domínio TIR (TRIF)/ molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (AKIRA; TAKEDA, 2004; BROAD; KIRBY; JONES, 2007). O TLR 4 é o único receptor que utiliza quatro moléculas adaptadoras (MyD88, TRIF, TRAM), e pode desempenhar sua sinalização (AKIRA. TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). Induz produção de IFN e conseqüentemente induz o TRAIL, que é um potente indutor da morte de células tumorais (LUO et al., 2004).

A transmissão de sinais a partir de TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras, que desencadeiam uma cascata de sinalização relacionando o fator de transcrição nuclear K $\beta$  (RANK), da produção de moléculas inflamatórias e de sobrevivência celular, como TNF- $\alpha$ , IL-1-IL-6 proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteína quinases c-jun - terminal N (JNKs) sinalização extracelular da proteína quinase reguladora (ERKs) e fatores reguladores de interferon (IRF3, IRF5 e IRF7) (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004; SATOH; AKIRA, 2016).

Vários agonistas de TLRs foram investigados como adjuvantes em vacinas contra o câncer em ensaios clínicos, inclusive para o tratamento do câncer de pulmão, próstata, ovário, mama, melanoma e linfoma com resultados promissores quanto a segurança e eficácia. O mecanismo proposto dos agonistas de TLR é de que os sinais da interação TLR-ligante podem induzir a secreção de algumas citocinas, incluindo IL-1, IL-6 e IL-12 pelas DCs. Essas citocinas são críticas para a diferenciação das células T, que são as peças-chaves na batalha contra as células cancerosas. A ativação indireta de células NK também é relatada em resposta à utilização de agonistas de TLRs para estimulação APCs (MEDZHITOV, 2001; LINK et al., 2006; MANEGOLD et al., 2008; GOLDINGER et al., 2012).

Um comportamento de interesse para a resposta antitumoral é o macrófago "classicamente ativado", usando TLR4a e IFN- $\gamma$ , produzem citocinas e quimiocinas

pró inflamatórias essenciais para combater microambientes tumorais supressores, incluindo IL-12, IL-13, TNF, quimiocinas CC e síntese de óxido nítrico (GRETEN; GRIVENNIKOV,2019).

IFN- $\gamma$  é um tipo de citocina produzida principalmente pelos linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTLs), NKs e macrófagos e é importante para a imunidade inata e adaptativa. Genericamente é considerada uma citocina inflamatória que promove imunidade celular contra infecções virais, bacterianas e contra o desenvolvimento do tumor, através do estímulo a várias vias anti-proliferativas e anti-tumorais regula a diferenciação e função efetora de vários tipos de células do sistema imunológico e inibe o crescimento e sobrevivência das células cancerígenas (LI et al., 2007; MARTINI et al., 2010; ALSHAKER; MATALKA, 2011; TATE et al., 2012).

O mecanismo de detecção imune inata de tumores imunogênicos que levam às respostas de células T adaptativas permanece indefinido, embora os IFNs estejam implicados neste processo (DIGHE et al., 1994; STREET; CRETNEY; SMYTH 2001). Woo et al. (2014) identificaram que a ativação espontânea de células T CD8<sup>+</sup> contra tumores foi defeituosa em camundongos sem o fator estimulante do complexo de genes de interferon (STING), mas não em outras vias de sinalização inatas, sugerindo o envolvimento de uma via de detecção de DNA citosólico. *In vitro*, a produção de IFNs e a ativação de células dendríticas foram desencadeadas por DNA derivado de células tumorais, através de STING e IRF-3. No entanto, no microambiente tumoral in vivo, o DNA de células tumorais foi detectado no interior de células apresentadoras de antígeno do hospedeiro, o que se correlacionou com a ativação da via de STING e a produção de IFNs (WOO et al., 2014). O trabalho de Woo et al. (2014) demonstrou que o mecanismo principal para a detecção imune inata do câncer ocorre através da via hospedeira STING, descoberta associada a implicações importantes para a imunoterapia do câncer.

## **2.5.- COMPLEXO DE FOSFATO INORGÂNICO1 (MRB-CFI-1) - ONCOTHERAD**

Tendo todos esses estudos e conhecimentos como base e sabendo que os agonistas das TLRs podem desenvolver uma boa resposta como tratamento para o câncer, a equipe de pesquisa do Laboratório NanoBIOSS (Instituto de Química - UNI-

CAMP) liderada pelos professores Nelson Duran e Wagner José Fávaro, desenvolveram um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas, denominado Modificador de Resposta Biológica - Complexo de Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1). É um composto nanométrico de fosfato e sais metálicos associados a uma proteína glicosilada de tamanho entre 420 - 530 nm que é patenteada na fase inicial nacional do PCT (número: BR 10201700127680) pela agência de inovação INOVA - UNICAMP (FÁVARO; DURÁN, 2017). Possui marca registrada e logotipo (Oncotherad). Este composto atua como um modificador da resposta biológica, desenvolvendo a estimulação do sistema imune através da Fosforilação de aminoácidos hidroxilados como serina, treonina e tirosina pelos compostos que apresentam sais de fosfato. Além disso, o MRB-CFI-1 promove a ativação local do sistema imunológico no microambiente tumoral (FÁVARO; DURÁN, 2017). Tem sido demonstrado que a administração intra-tumoral de certos compostos de fosfato ativam o sistema imune no microambiente tumoral, causando uma importante regressão tumoral (SHIROTA et al., 2012; CORRALES et al., 2015). Fávaro e colaboradores (2019), avaliaram a resposta do Oncotherad intravesical em camundongos com carcinoma urotelial e observaram que nos pacientes tratados com imunoterapia as lesões neoplásicas diminuíram em 80% dos animais. Os níveis de TLR4 aumentaram com o uso do Oncotherad, portanto os TLR4 provocam uma resposta local inflamatória com infiltração dos macrófagos, granulócitos e linfócitos, produzindo citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12), IFN e TNF- $\alpha$ , conseqüentemente a resposta induz a produção dos T helper tipo 1 (Th1) ocasionando a ablação do tumor (GANDHI; MORALES; LAMM, 2013). Outro estudo realizado com o BRP-IFC-1 foi testado em ratos Fischer 344 com a administração intra-peritoneal do nanofármaco a cada 72 horas, foi observado que após a terceira aplicação, os animais tratados com o MRB-CFI-1 apresentaram sinais intensos de inflamação peritoneal, os quais foram caracterizados por rubor, aumento da vascularização e presença de pontos hemorrágicos, além de pequenos aglomerados de cristais de fosfatos na cavidade abdominal. Assim, tais resultados revelaram que o composto MRB-CFI-1 foi capaz de induzir a resposta inflamatória local, o que justifica sua avaliação como imunomodulador nos experimentos em animais com câncer de bexiga invasivo de musculatura (CBNMI) induzidos quimicamente (FÁVARO; DURÁN, 2017). Em relação à atividade imunomodulatória do MRB-CFI-1, foram

analisados os níveis proteicos para TLR4, TRIF, IRF3, IFN- $\gamma$  e iNOS nas bexigas urinárias dos animais induzidos quimicamente ao CBNMI. Os níveis proteicos para TLR4, TRIF, IRF3, IFN- $\gamma$  e iNOS foram significativamente maiores na bexiga urinária dos animais tratados com MRB-CFI-1 via intravesical (FÁVARO; DURÁN, 2017). Além disso, acrescenta-se que o grupo de investigação da UNICAMP trabalhou com dois casos de mastocitoma cutâneo canino de alto grau com estágio clínico V, sem resposta à quimioterapia (vimblastina e lomustina), que foram tratados com o MRB-CFI-1 em associação com a quimioterapia, e obtiveram uma resposta favorável reduzindo o tamanho das lesões em 80%, deixando um campo aberto para continuar investigando tanto a estrutura química, mecanismos anti-tumorais e imunomodulatórios nas células tumorais dos mastocitomas cutâneos, podendo considerar novas associações terapêuticas do MRB-CFI-1 e fortalecer uma possível nova linha terapêutica para esses tumores.

## REFERÊNCIAS

1. ABADIE, J.J.; AMARDEILH, M.A.; DELVERDIER, M.E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumours from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 215, p. 1629-1634, 1999.
2. ABIKO, K., MATSUMURA, N., HAMANISHI, J., HORIKAWA, N., MURAKAMI, R., YAMAGUCHI, K., ... e MANDAI, M. IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. **British journal of cancer**, n.112(9), p.1501-1509,2015.
3. ADAMS, V. J., EVANS, K. M., SAMPSON, J., e WOOD, J. L. N. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. **Journal of Small Animal Practice**, n.51(10), p. 512-524.
4. ADAMS. S Toll-like receptor agonists in cancer therapy, **Immunotherapy** n.1(6), p.949-964,2009.
5. ADDISSIE, S., E KLINGEMANN, H. Cellular immunotherapy of canine cancer. **Veterinary sciences**, n.5(4), p.100,2018.
6. AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell** n.124, p.783–801, 2010.

7. AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-Like Receptor Signalling. **Nat Rev Immunol.**; v.4, p.499–511, 2004.
8. ALEGRE, M. L., NOEL, P. J., EISFELDER, B. J., CHUANG, E., CLARK, M. R., REINER, S. L., e THOMPSON, C. B. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. **The Journal of Immunology**, n.157(11), p.4762-4770,1996.
9. ALSHAKER, H.A.; MATAKA, K.Z. IFN- $\gamma$ , IL-17 and TGF- $\beta$  involvement in shaping the tumor microenvironment: the significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. **Cancer Cell Int.**; n.11, p.33, 2011.
10. ARENDT, M. L., MELIN, M., TONOMURA, N., KOLTOOKIAN, M., COURTAY-CAHEN, C., FLINDALL, N., ... e MURPHY, S. Genome-wide association study of golden retrievers identifies germ-line risk factors predisposing to mast cell tumours. **PLoS genetics**, n.11(11), p. e1005647,2015.
11. ARIYARATHNA, H., THOMSON, N. A., ABERDEIN, D., PERROTT, M. R., & MUNDAY, J. S. 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**, n.230, p.110142,2020.
12. BAE, S., MILOVANCEV, M., BARTELS, C., IRVIN, V. L., TUOHY, J. L., TOWNSEND, K. L., e LEEPER, H. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. **Veterinary and Comparative Oncology**,2020.
13. BAGINSKI, H; DAVIS, G; BASTIAN, R.P. The prognostic value of lymph node metastasis with grade 2 MCTs in dogs: 55 cases (2001–2010). **Journal of the American Animal Hospital Association**, n. 50(2), p. 89-95,2014.
14. BAGINSKI, H.; DAVIS, G.; BASTIAN, R.P. The prognostic value of lymph node metastasis with grade 2 MCTs in dogs: 55 cases (2001–2010). **Journal of the American Animal Hospital Association**, n. 50(2), p. 89-95, 2014.
15. BERGMAN, PHILIP J. Cancer immunotherapies. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, n.49(5),p. 881-902, 2019.
16. BLACKWOOD, L., MURPHY, S., BURACCO, P., DE VOS, J. P., DE FORNEL" THIBAUD, P., HIRSCHBERGER, J., ... e ARGYLE, D. J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and comparative oncology**, n.10(3), p. e1-e29, 2012.
17. BOOK, A. P., FIDEL, J., WILLS, T., BRYAN, J., SELLON, R., & MATTOON, J. Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the

- clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. ***Veterinary Radiology & Ultrasound***, v. 52(5), p. 548-554, 2011.
18. BROAD A, KIRBY JA, JONES DE. Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production. ***Immunology***, n.120(1), p.103–11,2007.
  19. BROWN, J. A., DORFMAN, D. M., MA, F. R., SULLIVAN, E. L., MUNOZ, O., WOOD, C. R., ... e FREEMAN, G. J. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. ***The Journal of Immunology***, n. 170(3), p.1257-1266, 2003.
  20. CAHALANE, A. K., PAYNE, S., BARBER, L. G., DUDA, L. E., HENRY, C. J., MAULDIN, G. E., ... e MOORE, A. S. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994–2002). ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, n.225(3), p.401-408,2004.
  21. CHAN, D. V., GIBSON, H. M., AUFIERO, B. M., WILSON, A. J., HAFNER, M. S., MI, Q. S., e WONG, H. K. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. ***Genes & Immunity***, n.15(1), p.25-32,2014.
  22. CHEN, H., LIAKOU, C. I., KAMAT, A., PETTAWAY, C., WARD, J. F., TANG, D. N., ... E SHARMA, P. Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ ICOS<sup>hi</sup> T cell frequency and IFN- $\gamma$  levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, n. 106(8), p.2729-2734,2009.
  23. CHEN, L; HAN, X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. ***The Journal of clinical investigation***, n. 125(9), p. 3384-3391, 2015.
  24. CHOI, J. W., WITHERS, S. S., CHANG, H., SPANIER, J. A., DE LA TRINIDAD, V. L., PANESAR, H., ... e MCSORLEY, S. J. Development of canine PD-1/PD-L1 specific monoclonal antibodies and amplification of canine T cell function. ***PloS one***, n. 15(7), 2020.
  25. CORRALES, L.; GLICKMAN, L.H.; MCWHIRTER, S.M.; KANNE, D.B.; SIVICK, K.E.; KATIBAH, G.E.; WOO, S.R.; LEMMENS, E.; BANDA, T.; LEONG, J.J.; METCHETTE, K.; DUBENSKY, T.W. JR.; GAJEWSKI, T.F. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. ***Cell Rep.***; n.11, p.1018-1030, 2015.
  26. DA SILVA, L., FONSECA"ALVES, C. E., THOMPSON, J. J., FOSTER, R. A., WOOD, G. A., AMORIM, R. L., e COOMBER, B. L. Pilot assessment of vascular

- endothelial growth factor receptors and trafficking pathways in recurrent and metastatic canine subcutaneous mast cell tumours. **Veterinary Medicine and Science**, n.3(3), p.146-155,2017.
27. DE NARDI, A. B., RODASKI, S., SOUSA, R. S., COSTA, T. A., MACEDO, T. R., RODIGHIERI, S. M., ... e PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, n.7(2),2002.
  28. DIGHE, A. S., RICHARDS, E., OLD, L. J., e SCHREIBER, R. D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN $\gamma$  receptors. **Immunity**, n. 1(6), 447-456,1994.
  29. DOBSON, J. M., e SCASE, T. J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, n.48(8), p.424-431,2007.
  30. DOWNING, S., CHIEN, M. B., KASS, P. H., MOORE, P. F., e LONDON, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. **American journal of veterinary research**, 63, n.12, p. 1718-1723, (2002).
  31. DOWNING, S., CHIEN, M. B., KASS, P. H., MOORE, P. F., e LONDON, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. **American journal of veterinary research**, n.63(12),p. 1718-1723,2002.
  32. FÁVARO, W. J., IANTAS, S. R., GONÇALVES, J. M., DIAS, Q. C., REIS, I. B., BILLIS, A., ... e ALONSO, J. C. C.Role of OncoTherad immunotherapy in the regulation of toll-like receptors-mediated immune system and RANK/RANKL signaling: New therapeutic perspective for non-muscle invasive bladder cancer, **Journal of Clinical Oncology**, n. 37(15), 2019.
  33. FÁVARO, W.F.; DURÁN, N. Process of obtaining a nanostructured complex (CFI-1), associated to nanostructured CFI-1 with a protein (MRB-CFI-1) and its use.**Brazilian Patent**, 2017.
  34. FERREIRA, M. G. P. A., REIS FILHO, N. P., PASCOLI, A. L., AROSTI, B. M., PAZZINI, J. M., HUPPES, R. R., ... e LAUFER-AMORIM, R.The importance of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in canine neoplasms: Literature review. **Archivos de Medicina Veterinaria**, n.48(2),p. 139-143,2016.
  35. FESNAK, A.D, JUNE, C.H, LEVINE, B.L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy, **Nature Reviews Cancer**, n.16(9),p.566-581,2016.

36. FREEMAN, G. J., LONG, A. J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., ... e HONJO, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. ***The Journal of experimental medicine***, n. 192(7), p.1027-1034, 2000.
37. FULCHER, R. P., LUDWIG, L. L., BERGMAN, P. J., NEWMAN, S. J., SIMPSON, A. M., & PATNAIK, A. K. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, n. 228(2), p. 210-215, 2006).
38. GALLI, R.; STARACE, D.; BUSÀ, R.; ANGELINI, D.F.; PAONE, A.; DE CESARIS, P.; FILIPPINI, A.; SETTE, C.; BATTISTINI, L.; ZIPARO, E.; RICCIOLI, A. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. ***J Immunol.***; v.184, p.6658-6669, 2010.
39. GALLI, S.J.; ZSEBO, K.M.; GEISLER, E.N. The kit ligand, stem cell factor. ***Advances in immunology***, p. 1-96, 1993.
40. GANDHI, N. M., MORALES, A., e LAMM, D. L. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for genitourinary cancer. ***BJU international***, n.112(3), p. 288-297, 2013.
41. GARRETT, L.D. Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. ***Veterinary Medicine: Research and Reports***, v. 5, p. 49-58, 2014.
42. GOLDINGER, S. M., DUMMER, R., BAUMGAERTNER, P., MIHIC-PROBST, D., SCHWARZ, K., HAMMANN-HAENNI, A., ... SPEISER, D. E. Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and-9 ligands triggers memory and effector CD 8+ T-cell responses in melanoma patients. ***European journal of immunology***, n.42(11), p.3049-3061, 2012.
43. GRETEN, Florian R.; GRIVENNIKOV, Sergei I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. ***Immunity***, n. 51(1), p. 27-41, 2019.
44. HAHN, K. A., OGLIVIE, G., RUSK, T., DEVAUCHELLE, P., LEBLANC, A., LEGENDRE, A., ... e HERMINE, O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. ***Journal of Veterinary Internal Medicine***, n.22(6), p.1301-1309, 2008.
45. HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development, ***Eur J Cancer***, n. 40, p. 858–880, 2004.
46. HORTA, R. S., LAVALLE, G. E., MONTEIRO, L. N., SOUZA, M. C., CASSALI, G. D., e ARAÚJO, R. B. Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. ***Veterinary pathology***, n.55(2), p.212-223, 2018.

47. HUANG, B.J. ZHAO, J.C. UNKELESS, Z.H. FENG, H. XIONG, TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword, **Oncogene**, n.27,p.218-224,2008.
48. HUME, C. T., KIUPEL, M., RIGATTI, L., SHOFER, F. S., SKORUPSKI, K. A., & SORENMO, K. U. Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997–2007). **Journal of the American Animal Hospital Association**, n. 47(1), p. 37-44, (2011).
49. JANEWAY CA, JR, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol** v. 20, p.197–216, 2002.
50. JENKINS, R. W., BARBIE, D. A., e FLAHERTY, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. **British journal of cancer**, n.118(1),p. 9-16,2018.
51. JIANG, B. H., & LIU, L. Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Advances in cancer research**, n. 102,p. 19-65,2009.
52. KAJA, S. L., KIRAN, S. S., KATTAPAGARI, K. K., CHITTURI, R. T., CHOWDARY, S. D., e REDDY, B. V. R.A review on tumor immunology. **Journal of Orofacial Sciences**, n.9(1), p.7,2017.
53. KEIR, M.E., BUTTE, M. J., FREEMAN, G. J., e SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, n.26;p. 677-704,2008.
54. KELLER, A., WINGELHOFER, B., PETER, B., BAUER, K., BERGER, D., GAMPERL, S., ... e VALENT, P. The JAK2/STAT5 signaling pathway as a potential therapeutic target in canine mastocytoma. **Veterinary and comparative oncology**, n.16(1), p.55-68,2018.
55. KRICK, E. L., KIUPEL, M., DURHAM, A. C., THAIWONG, T., BROWN, D. C., & SORENMO, K. U. Investigating associations between proliferation indices, c-kit, and lymph node stage in canine mast cell tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**, n53(5), p.258-264,2017.
56. KISSEBERTH, W. C., MURAHARI, S., LONDON, C. A., KULP, S. K., e CHEN, C. S. Evaluation of the effects of histone deacetylase inhibitors on cells from canine cancer cell lines. **American journal of veterinary research**, n.69(7), p.938-945,2008.
57. KIUPEL, M., WEBSTER, J. D., BAILEY, K. L., BEST, S., DELAY, J., DETRISAC, C. J., ... & MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary pathology**, n.48(1),p. 147-155, 2011.

58. KIUPEL, M., WEBSTER, J. D., MILLER, R. A., & KANEENE, J. B. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.52(6), p. 280-286, (2005).
59. KNOWLDEN, J. M., JONES, H. E., BARROW, D., GEE, J. M., NICHOLSON, R. I., e HUTCHESON, I. R. Insulin receptor substrate-1 involvement in epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor signalling: implication for Gefitinib ('Iressa') response and resistance. **Breast cancer research and treatment**, n.111(1), p.79-91,2008.
60. LATCHMAN, Y., WOOD, C. R., CHERNOVA, T., CHAUDHARY, D., BORDE, M., CHERNOVA, I., ... & FREEMAN, G. J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nature immunology**, n,2(3),p. 261-268,2001.
61. LEBLANC, A. K., BREEN, M., CHOYKE, P., DEWHIRST, M., FAN, T. M., GUSTAFSON, D. L., ... e KHANNA, C. Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. **Science translational medicine**, n.8(324), p.324,2016.
62. LEE, K. M., CHUANG, E., GRIFFIN, M., KHATTRI, R., HONG, D. K., ZHANG, W., ... e BLUESTONE, J. A Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. **Science**, n.282(5397),p. 2263-2266,1998.
63. LEJEUNE, A., SKORUPSKI, K., FRAZIER, S., VANHAEZEBROUCK, I., REBHUN, R. B., REILLY, C. M., e RODRIGUEZ JR, C. O. Aggressive local therapy combined with systemic chemotherapy provides long-term control in grade II stage 2 canine mast cell tumour: 21 cases (1999–2012). **Veterinary and comparative oncology**, n.13(3),p. 267-280,2015.
64. LIN, T. Y., BEAR, M., DU, Z., FOLEY, K. P., YING, W., BARSOUM, J., & LONDON, C. The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit-dependent and-independent malignant mast cell tumors. **Experimental hematology**, n.36(10), p.1266-1277,2008.
65. LINK, B. K., BALLAS, Z. K., WEISDORF, D., WOOLDRIDGE, J. E., BOSSLER, A. D., SHANNON, M., ... e WEINER, G. J. Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma. **Journal of Immunotherapy**, n.29(5), p.558-568,2006.
66. LONDON CA e SEGUIN B. Mast cell tumours in the dog. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**; n.33, p. 473 – 489, 2003.
67. LONDON, C. A., GALLI, S. J., YUUKI, T., HU, Z. Q., HELFAND, S. C., & GEISLER, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental hematology**, n. 27(4), p.689-697, 1999.

68. LONDON, C. A., HANNAH, A. L., ZADOVOSKAYA, R., CHIEN, M. B., KOLLIAS-BAKER, C., ROSENBERG, M., ... e CHERRINGTON, J. M. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. **Clinical Cancer Research**, n.9(7), p.2755-2768,2003.
69. LONDON, C. A., e THAMM, D. H. 2013 Mast cell tumors. **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**, WB Saunders pp. 335-355.
70. LUO, J. L., MAEDA, S., HSU, L. C., YAGITA, H., e KARIN, M. Inhibition of NF- $\kappa$ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF $\alpha$  to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer cell**, n.6(3),p.297-305,2004.
71. MA, Y., LONGLEY, B. J., WANG, X., BLOUNT, J. L., LANGLEY, K., e CAUGHEY, G. H. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **Journal of Investigative Dermatology**, n.112(2), p.165-170,1999.
72. MACY D. W. Canine mast cell tumors. The Veterinary clinics of North America. **Small animal practice**, n.15(4), p.783–803, 1985.
73. MACY, D. W. Canine and feline mast cell tumors: biologic behavior, diagnosis, and therapy. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, n. 1(1), p. 72,1986.
74. MAEKAWA, N., KONNAI, S., IKEBUCHI, R., OKAGAWA, T., ADACHI, M., TAKAGI, S., ... e OHASHI, K. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- $\gamma$  production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. **PLoS one**, n.9(6), p.e98415,2014.
75. MAHLER, Stephan. Mast cell tumour in a young boxer dog. **Veterinary Record**, n. 171(7), p. 182-182, 2012.
76. MAHONEY, K. M., RENNERT, P. D., & FREEMAN, G. J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. **Nature reviews Drug discovery**, n.14(8), p. 561-584,2015.
77. MANEGOLD, C., GRAVENOR, D., WOYTOWITZ, D., MEZGER, J., HIRSH, V., ALBERT, G., ... e LEICHMAN, C. G. Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, n.26(24), p.3979-3986,2008.
78. MARENGERE, L. E., WATERHOUSE, P., DUNCAN, G. S., MITTRÜCKER, H. W., FENG, G. S., e MAK, T. W. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine

- phosphatase SYP association with CTLA-4. **Science**, n.272(5265),p1170-1173,1996.
79. MARTINI, M.; TESTI, M.G.; PASETTO, M.; PICCHIO, M.C.; INNAMORATI, G.; MAZZOCCO, M. IFN-Gamma-Mediated Upmodulation of MHC Class I Expression Activates Tumor-Specific Immune Response in a Mouse Model of Prostate Cancer. **Vaccine**; n.28, p.3548–3557, 2010.
  80. MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity, **Nature Reviews Immunology**, n. 1(2) , p.135-145, 2001.
  81. MELLMAN, I., COUKOS, G., e DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, n,480(7378), p.480-489,2011.
  82. MICHELS, G. M., KNAPP, D. W., DENICOLA, D. B., GLICKMAN, N., & BONNEY, P. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.38(5), p.458-466, 2002.
  83. MICHELS, G. M., KNAPP, D. W., DENICOLA, D. B., GLICKMAN, N., e BONNEY, P. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, n.38(5), p.458-466,2002.
  84. MICHOT, J. M., BIGENWALD, C., CHAMPIAT, S., COLLINS, M., CARBONNEL, F., POSTEL-VINAY, S., ... e MASSARD, C. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. **European journal of cancer**, n.54,p.139-148,2016.
  85. MILLER, D. M. The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 7(3),p. 360-363, 1995.
  86. MOCHIZUKI, H., MOTSINGER"REIF, A., BETTINI, C., MOROFF, S., e BREEN, M. Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, n.15(3), p.829-839, 2017.
  87. MUENST, S., SOYSAL, S. D., TZANKOV, A., e HOELLER, S. The PD-1/PD-L1 pathway: biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, n.19(2), p.201-211,2015.
  88. MULLINS, M. N., DERNELL, W. S., WITHROW, S. J., EHRHART, E. J., THAMM, D. H., & LANA, S. E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without

- adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 228(1), p.91-95, 2006.
89. MULLINS, M. N., DERNELL, W. S., WITHROW, S. J., EHRHART, E. J., THAMM, D. H., & LANA, S. E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.228(1),p. 91-95,2006.
90. MURPHY, S., SPARKES, A. H., BLUNDEN, A. S., BREARLEY, M. J., & SMITH, K. CEffects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Record**, n. 158(9), p.287-291,2006.
91. MURPHY, S., SPARKES, A. H., BREARLEY, M. J., SMITH, K. C., & BLUNDEN, A. S. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **Veterinary Record**, 154(24), 743-746, 2004.
92. MURPHY, S., SPARKES, A. H., BREARLEY, M. J., SMITH, K. C., e BLUNDEN, A. S. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **Veterinary Record**, n. 154(24),p. 743-746,2004.
93. MUZIO, M., BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., D'AMICO, G., STOPPACCIARO, A., MANCINELLI, R., ... e MANTOVANI, A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **The Journal of Immunology**, n. 164(11),p5998-6004,2000.
94. OLBERT, P. J., KESCH, C., HENRICI, M., SUBTIL, F. S., HONACKER, A., HE-GELE, A., ... e HÄNZE, J.TLR4-and TLR9-dependent effects on cytokines, cell viability, and invasion in human bladder cancer cells. In Urologic Oncology: **Seminars and Original Investigations** ,Elsevier. N. 33 (3), p. 110-e19,2015.
95. OLIVEIRA, M. T., CAMPOS, M., LAMEGO, L., MAGALHÃES, D., MENEZES, R., OLIVEIRA, R., ... e FERREIRA, D. A. Canine and feline cutaneous mast cell tumour: a comprehensive review of treatments and outcomes. **Topics in Companion Animal Medicine**,100472,2020.
96. OZAKI, K., YAMAGAMI, T., NOMURA, K., e NARAMA, I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. **Veterinary Pathology**, n.39(5),p. 557-564,2002.
97. OZAKI, K., YAMAGAMI, T., NOMURA, K., e NARAMA, I. Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. **Journal of Veterinary Medical Science**, n.69(11), p.1117-1121,2007.

98. PARDOLL, D., e DRAKE, C. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. **Journal of Experimental Medicine**, n.209(2), p.201-209,2012.
99. PARDOLL, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, 2012, n. 12(4) p. 252-264.
100. PARKER, K.H.; BEURY, D.W.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Myeloid-derived suppressor cells: critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment. In: **Advances in cancer research**. Academic Press,p.95-139,2015.
101. PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary pathology**, n. 21(5), p. 469-474,1984.
102. PEGGS, K. S., QUEZADA, S. A., CHAMBERS, C. A., KORMAN, A. J., e ALLISON, J. P. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, n.206(8), p.1717-1725,2009.
103. PENG, W., LIU, C., XU, C., LOU, Y., CHEN, J., YANG, Y., ... e HWU, P. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- $\gamma$  inducible chemokines. **Cancer research**, n.72(20), p.5209-5218,2012.
104. PENTO, J.T. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. **Anticancer research**, n. 37(11), p. 5935-5939, 2017.
105. PREZIOSI, R; MORINI, M; SARLI, G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, n. 16(6), p.554-561,2004.
106. PREZIOSI, R., SARLI, G., e PALTRINIERI, M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary research communications**, n.31(3), p.287-296, 2007.
107. REGUERA, M. J., RABANAL, R. M., PUIGDEMONT, A., & FERRER, L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **The American journal of dermatopathology**, n.22(1),p. 49-54,2000.
108. RENNERT, P., SCHNEIDER, P., CACHERO, T. G., THOMPSON, J., TRABACH, L., HERTIG, S., ... & TSCHOPP, J.A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. **Journal of Experimental Medicine**, n.192(11),p. 1677-1684,2000.
109. ROBAT, C., LONDON, C., BUNTING, L., MCCARTAN, L., STINGLE, N., SELTING, K., ... e VAIL, D. M. Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: a phase I dose-finding study. **Veterinary and comparative oncology**, n.10(3), p.174-183,2012.

110. ROMANSIK, E. M., REILLY, C. M., KASS, P. H., MOORE, P. F., & LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary pathology*, n.44(3), p.335-341,2007.
111. ROSKOSKI JR,R. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, n. 337(1),p. 1-13, 2005.
112. SATOH, T., e AKIRA, S.Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Myeloid Cells in Health and Disease: A Synthesis*, p.447-453, 2017.
113. SCASE, T. J., EDWARDS, D., MILLER, J., HENLEY, W., SMITH, K., BLUNDEN, A., & MURPHY, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n.20(1), p.151-158, 2006.
114. SCHULTHEISS, P. C., GARDINER, D. W., RAO, S., OLEA-POPELKA, F., & TUOHY, J. L. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, n. 238(11), p.1464-1469, 2011.
115. SEIDEL, J. A., OTSUKA, A., e KABASHIMA, K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Frontiers in oncology*, n.8, p.86,2018.
116. SHIROTA, Y.; SHIROTA, H.; KLINMAN, D.M. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.*; n.188, p.1592-1599, 2012.
117. ŚMIECH, A., JASIK, A., ŚLASKA, B., ŁOPUSZYŃSKI, W., SZCZEPANIK, M., & WILKOŁEK, P.Epidemiological study of canine mast cell tumours according to the histological malignancy grade. *Polish journal of veterinary sciences*,2017.
118. SPRANGER, S., SPAAPEN, R. M., ZHA, Y., WILLIAMS, J., MENG, Y., HA, T. T., e GAJEWSKI, T. F. Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Science translational medicine*, n.5(200), 2013.
119. STEFFEY, M., RASSNICK, K. M., PORTER, B., e NJAA, B. L. Ureteral mast cell tumor in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, n.40(1), p.82-85, 2004.
120. STOJANOVIC, A., FIEGLER, N., BRUNNER-WEINZIERL, M., e CERWENKA, A. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK cell IFN- $\gamma$

production in response to mature dendritic cells. *The Journal of Immunology*, n.192(9),p. 4184-4191,2014.

121. STREET, S. EA; CRETNEY, E.; SMYTH, M.J. Perforin and interferon- $\gamma$  activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, n. 97(1), p. 192-197,2001.
122. TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, n.16(1),p.3–9,2004.
123. TATE JR., D.J.; PATTERSON, J.R.; VELASCO-GONZALEZ, C.; CARROLL, E.N.; TRINH, J.; EDWARDS, D.; et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. *Int J Biol Sci.*; n.8, p.1109–1120, 2012.
124. THAMM DH e VAIL DM Mast cell tumours. In: **Small Animal Clinical Oncology.4edn.**, SJ Withrow and DM Vail, eds., St. Louis, Saunders-Elsevier, p402 – 424, 2007.
125. THAMM, D. H., TUREK, M. M., e VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, n.68(6), p. 581-587,2006.
126. THAMM, D.H.; MAULDIN, E.A.; VAIL, D.M. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor—41 cases (1992–1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n. 13( 5), p. 491-497, 1999.
127. THOMPSON, J. J., MORRISON, J. A., PEARL, D. L., BOSTON, S. E., WOOD, G. A., FOSTER, R. A., & COOMBER, B. L. Receptor tyrosine kinase expression profiles in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, n.53(3), p.545-558, 2016.
128. THOMPSON, J. J., YAGER, J. A., BEST, S. J., PEARL, D. L., COOMBER, B. L., TORRES, R. N., ... e FOSTER, R. A. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. *Veterinary Pathology*, n.48(1), p.169-181,2011.
129. TOPALIAN, S.L.; DRAKE, C.G.; PARDOLL, D.M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*, n. 27(4), p. 450-461, 2015.
130. TOPALIAN, S.L.; DRAKE, C.G.; PARDOLL, D.M. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology*, n. 24(2), p. 207-212, 2012.

131. VAN DAM, P. A., VERHOEVEN, Y., TRINH, X. B., WOUTERS, A., LARDON, F., PRENEN, H., ... e LAMMENS, M. RANK/RANKL signaling inhibition may improve the effectiveness of checkpoint blockade in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, n.133, p.85-91,2019.
132. VAN DAM, P. A., VERHOEVEN, Y., TRINH, X. B., WOUTERS, A., LARDON, F., PRENEN, H., ... e LAMMENS, M. RANK/RANKL signaling inhibition may improve the effectiveness of checkpoint blockade in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, n.133,p. 85-91,2019.
133. VAN PELT, D.R.; FOWLER, J.D.; LEIGHTON, F.A. Multiple cutaneous mast cell tumors in a dog: a case report and brief review. **The Canadian Veterinary Journal**, n 27(7), p. 259, 1986.
134. VILLAMIL, J. A., HENRY, C. J., BRYAN, J. N., ELLERSIECK, M., SCHULTZ, L., TYLER, J. W., & HAHN, A. W. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.239(7),p. 960-965,2011.
135. WATERHOUSE, P., PENNINGER, J. M., TIMMS, E., WAKEHAM, A., SHAHINIAN, A., LEE, K. P., ... MAK, T. W. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. **Science**, n.270(5238), p.985-988,1995.
136. WEBSTER, J. D., YUZBASIYAN-GURKAN, V., KANEENE, J. B., MILLER, R., RESAU, J. H., e KIUPEL, M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, n. 8(2), p.104-111,2006.
137. WEBSTER, J.D.; KIUPEL, M.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; The use of kit and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumor. **Vet Pathol**; n.41, pp.371-377, 2004.
138. WEBSTER, J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R.; 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, pp.298-308, 2007.
139. WEI, S. C., LEVINE, J. H., COGDILL, A. P., ZHAO, Y., ANANG, N. A. A., ANDREWS, M. C., ... e ALLISON, J. P. Distinct cellular mechanisms underlie anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint blockade. **Cell**, n.170(6),p. 1120-1133,2017.
140. WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RUFENACHT, S. Canine Mast Cell Tumours: A Review Of The Pathogenesis, Clinical Features, Pathology And Treatment. **Veterinary Dermatology**, n(19), p. 321-339, 2008.

141. WING, K., YO, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, S. Sakaguchi. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function, **Science** n.322(5899) p.271-275,2008.
142. WONG, R. M., SCOTLAND, R. R., LAU, R. L., WANG, C., KORMAN, A. J., KAST, W. M., WEBER, J. S. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *International immunology*, n.19(10), p.1223-1234,2007.
143. WOO, S.R.; FUERTES, M.B.; CORRALES, L.; SPRANGER, S.; FURDYNA, M.J.; LEUNG, M.Y.; DUGGAN, R.; WANG, Y.; BARBER, G.N.; FITZGERALD, K.A.; ALEGRE, M.L.; GAJEWSKI, T.F. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. **Immunity**; n.41, p.830-842, 2014.
144. WU, H., HAYASHI, T., e INOUE, M. Immunohistochemical expression of p27 and p21 in canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas. **Veterinary pathology**, n.41(3), p.296-299,2004.
145. YU, H., YANG, J., JIAO, S., LI, Y., ZHANG, W., & WANG, J. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, n.64(7), p.853-860,2015.
146. ZEMKE, D., YAMINI, B., e YUZBASCIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary pathology**, n.39(5), p.529-535,2002.
147. ZHOU, J. Advances and prospects in cancer immunotherapy. **New Journal of Science**, n. 2014, 2014.

## **CAPITULO 2 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS CHECKPOINTS EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS DE ALTO GRAU EM CÃES: NOVAS PERSPECTIVAS DE USO DA IMUNOTERAPIA.**

RESUMO.- O mastocitoma (MCT) é a neoplasia cutânea mais comum nos cães, os MCTs de alto grau possuem comportamento mais agressivo. A escolha do tratamento é definida pelos fatores prognósticos presentes relacionados ao grau histopatológico, expressão de marcadores de proliferação celular e presença de mutação no gene c-kit, porém até o momento não existem marcadores que relacionem a expressão dos tumores com a detecção da metástase linfática. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão da via PD-1/PD-L1 no linfonodo metastásico e no tumor MCT de alto grau, assim como também avaliar a expressão da via RANK/RANK-L e das proteínas CTLA-4 e INF $\gamma$  no MCT alto grau. Foram 9 MCT alto grau com diversas características relacionadas ao paciente ( idade, sexo, raça) assim como ao tumor (localização, numero de nódulos, metástase regional e a distância, estágio clínico e tempo de sobrevida) obtendo como resultado a expressão da via PD1/PD-L1 e CTLA-4, via RANK/RANKL e do IFN $\gamma$  com imunomarcção moderada a intensa, concluindo que os MCTs de alto grau indistintamente das variáveis próprias dos animais e do tumor expresam fortemente os checkpoints, via RANK/RANK-L e INF $\gamma$  ressaltando que os tumores maior aos 3 cm podem expresar fortemente ditos marcadores independentemente das características macroscópicas que possam apresentar, adicionalmente o MCT alto grau pode responder a novas terapias como a imunoterapia.

**Palavras chaves:** checkpoints, cães, mastocitoma metástases linfática, imunoterapia

## **CHAPTER 2.- IDENTIFICATION OF EXPRESSION OF THE CHECKPOINTS IN CANINE MAST CELL TUMOR HIGH GRADE: NEW IMMUNOTHERAPIES PERSPECTIVE.**

**ABSTRACT-** Cutaneous mast cell tumor (MCT) is the tumor most common in dogs, being the high-grade MCTs with the most aggressive behavior. The choice of treatment is related to the prognostic factors present related to histopathological degree, expression of markers of cell proliferation, c-kit mutation and clinical characteristics but so far there are no markers that relate the expression of the tumors with the early detections of lymphatic metastasis. Thus, the present study aimed to evaluate the expression of the PD-1 / PD-L1 pathway in the metastatic lymph node and in the high-grade MCT tumor, as well as also to evaluate the expression of the RANK / RANK-L pathway and CTLA-4 proteins and IFN $\gamma$  in the tumor. Were included 9 high-grade MCT with several characteristics related to the patient (age, sex, race) as well as the tumor (location, number of nodules, regional metastasis and distance, clinical stage and survival time) resulting in the expression of checkpoints, via RANK / RANKL and IFN $\gamma$  with moderate to intense immunostaining. Concluding that high-grade MCTs without distinction from epidemiological variables and tumor's characteristics the checkpoints and RANK/RANK-L pathway and IFN $\gamma$  are expressed, in addition; the size tumor it is a negative factor prognosis regardless macroscopic characteristics that may be present, in addition MCT high grade could be response new options of treatments, like immunotherapy.

**Key word:** checkpoints, dogs, mast cell tumor, metastases lymph nodes,

## INTRODUÇÃO

O mastocitoma canino (MCT) corresponde a 16 a 21% das neoplasias cutâneas diagnosticadas (Blackwood et al., 2012; London e Thamm, 2013), sendo considerado o tumor maligno cutâneo mais frequente em cães (Furlani et al., 2008).

É potencialmente metastásico acometendo primariamente os linfonodos e posteriormente fígado, baço, intestino e, raramente, o pulmão (Welle et al. 2008 e London e Thamm, 2013). Nos casos de disseminação sistêmica, os mastócitos malignos podem estar infiltrados na medula óssea e no sangue periférico (Thamm, et al., 2007).

Qualquer mastocitoma, independente de seu grau, pode desenvolver metástase. A taxa de metástase dos mastocitomas indiferenciados varia entre 55% e 96%, e a maioria dos animais afetados apresenta sobrevida média inferior à um ano (Humm et al., 2011). Portanto, a avaliação clínica e o estadiamento são fundamentais para determinar o prognóstico e o tratamento. (Mullins et al., 2006, Murphys et al., 2004, Thamm, Turek & Vail). 2006).

Já que o envolvimento dos linfonodos é associado à um pior prognóstico, Horta e colaboradores (2018) propuseram um estágio adicional na classificação de WHO, dividindo o estadiamento III em dois subtipos, propondo aos cães com metástase linfática regional um estágio superior, enquanto aos cães com múltiplos tumores porém sem acometimento dos linfonodos regionais, um estágio inferior.

A classificação histológica dos MCTs pode nos fornecer informações sobre o potencial metastático dos MCTs, mas não permite, por si só, prever o comportamento biológico dos tumores. Assim, para uma caracterização mais completa, é necessário solicitar provas moleculares, como a avaliação de marcadores de proliferação (Ki-67, AgNORa, PCNA e KIT), a detecção da mutação do gene c-KIT (Oliveira et al., 2020). Todos esses fatores podem agregar mais informações para o grau do tumor na tentativa de conseguir prever o comportamento clínico do MCT (Krick et al., 2017).

A disseminação linfática regional é a primeira manifestação de metástase dos MCT mais agressivos (London et al 2013). Por esse motivo, é interessante pesquisar novos marcadores que possam dar maior informação a respeito do risco de desencadear metástase linfática regional, conseqüentemente como uma ferramenta útil para auxiliar o clínico na escolha do tratamento.

Na medicina, há alguns anos a imunoterapia tem revolucionado o tratamento contra o câncer, aumentando o tempo de sobrevida em pacientes nas fases terminais. Portanto, na medicina veterinária se abre um novo campo de pesquisa para o tratamento dos tumores de maior desafio.

As células neoplásicas são capazes de fazer moléculas imunossupressoras trabalharem em sua vantagem, inibindo os linfócitos anti-tumorais e assim escapando da destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro (Michot, et al., 2016). No microambiente tumoral, moléculas imunossupressoras como o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico, (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) são fortemente expressadas (Mellman, Coukos & Dranoff (2011), sendo os dois checkpoints mais estudados na medicina (Chen & Mellman, 2017).

A inibição desses checkpoints resulta no incremento na produção de IFN $\gamma$  permitindo a eliminação das células tumorais (Chen et al., 2009; Pen et al., 2012). Porém, a sinalização entre o fator nuclear-kB (RANK) e seu ligante (RANKL) é importante na diferenciação e reabsorção dos osteoclastos, mas também na proliferação, migração e metástase das células tumorais, pode ser encontrado no microambiente tumoral e a super expressão em diferentes células é indicador de prognóstico desfavorável (Dam et al., 2019).

Maekawa et al. (2015) descobriram que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 pelo anticorpo PD-L1 aumenta a produção de IFN- $\gamma$  a partir das células tumorais infiltradas em cães . Essas observações sugerem que existem possibilidades da via PD-1/PD L1 possa ser um alvo terapêutico para o tratamento dos tumores em cães.

Na medicina veterinária a expressão do PD-L1 e CTLA-4 em células linfoides neoplásicas são fator prognóstico negativo em cães com linfoma de alto grau de imunofenótipo B. Harsha e colaboradores (2020) estudaram a expressão de PD-L1 e CTLA-4 em tumores mamários caninos malignos e observaram que aqueles que subsequentemente desenvolviam metástase, a imunomarcagem foi significativamente mais alta do que aqueles que não desenvolviam a presença de metástase clínica. Além disso, maiores escores de imunomarcagem de PD-L1 ou CTLA-4 foram associados com tempos de sobrevida mais curtos em cães com neoplasias mamárias malignas.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão da via PD-1/PD-L1 no linfonodo metastático e no tumor MCT de alto grau, assim como também avaliar a expressão da via RANK/RANK-L e das proteínas CTLA-4 e INF $\gamma$  no MCT alto grau para futuras opções de tratamentos com imunoterapia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras**

O presente estudo foi conduzido pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, no período de março 2019 a março de 2020. Foram incluídos neste estudo 10 cães com MCT diagnosticados por meio de exame citológico e histopatológico. Os tutores responsáveis pelos animais foram completamente esclarecidos do conteúdo da pesquisa e concordaram em participar por meio da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

Dos animais participantes, foram coletados dados de resenha e anamnese incluindo raça, idade, sexo, tempo de evolução (tempo transcorrido entre a detecção da neoformação pelo tutor até o momento do diagnóstico), ocorrência de recidivas; além de características pertinentes ao tumor como graduação histológica, localização, pre-

sença de ulceração, se tratava-se de um nódulo único ou múltiplos, tamanho, velocidade de crescimento e presença de metástase no linfonodo regional e/ou órgãos à distância.

Como critério de inclusão foram considerado todos os animais com MCT alto grau em base a classificação do Kiupel et. al 2011 sem exclusão de idade, raça, sexo e estagio clínico.

O estadiamento clínico dos pacientes foi realizado segundo o World Health Organization Clinical Staging System for Mast Cell Tumors (ANEXO 2), que leva em consideração o número e tamanho do tumor, presença de metástase em linfonodos e à distância além da presença de sinais sistêmicos.

Todos os pacientes foram submetidos a avaliações laboratoriais (hemograma, bioquímica sérica hepática e renal), exames de imagen (ultrassonografia abdominal e radiografia torácica).

Para a identificação do linfonodo sentinela foi considerada a localização anatômica do tumor primário ou do tumor recorrente, baseada no mapa de Suami et al., 2013. No mesmo dia do procedimento cirúrgico foi aplicado azul patente 0.1 mg/kg intradérmico ao redor do linfonodo e no caso dos pacientes com MCT em cabeça ou pescoço foi indicado retirar 2 linfonodos (mandibular e o retrofaríngeo) usando o sistema de imagem no infravermelho próximo (NIR) (Alvarez, 2020). O tumor e os linfonodos foram armazenados em solução do formol a 10% para avaliação histopatológica.

Para a avaliação do tempo de sobrevida dos pacientes, foi realizado seguimento clínico a cada 3 meses, depois dos 6 meses foram feita as ligações telefônicas até após de um ano de tratamento. Todos esses dados foram recopilados e distribuídos em tabelas no programa de Excel.

Imunomarcção dos antígenos: PD1/PDL1, RANK , RANK-L , CTLA-4 e IFN- $\gamma$

Para as análises de imunohistoquímica, foram utilizadas amostras do tumor primário ou tumor recorrente e linfonodo dos cães com mastocitoma participantes deste estudo. As amostras foram previamente fixadas, processadas e emblocadas em parafina pelo Serviço de Patologia Veterinária da UNESP- Câmpus de Jaboticabal.

A seguir foram obtidos cortes com 5 µm de espessura no micrótomo rotativo SLEE CUT5062 RM 2165 (Slee Mainz, Mainz, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas. O kit Easy Path foi utilizado para detecção dos antígenos de acordo com as instruções do fabricante. O bloqueio da peroxidase endógena foi através do Bloqueador de Peroxidase (EP12-20523) com posterior incubação em solução bloqueadora Soro de Cabra (EP-12-20532) 5% por 10 minutos em temperatura ambiente.

Posteriormente, os antígenos PD1/PDL1, RANK, RANK-L, CTLA-4 e IFN-γ foram localizados através dos anticorpos primários específicos (Tabela 2), diluídos em Soro de Cabra (EP-12-20532) 1% e armazenados overnight a 4 °C. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com polímero-HRP Easy Link One (EP-12-20503) por 25 minutos e, posteriormente, revelados com diaminobenzidina (DAB), contra corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio DM2500 (Leica, Munique, Alemanha).

Para avaliar a intensidade das imunorreações dos antígenos em células de mastocitomas e linfonodos caninos foram examinados dez campos com aumento de 400x por animal e para cada anticorpo. Os resultados das imunomarcações foram analisados por porcentagem de imunorreatividade, através da quantificação da intensidade da marcação obtida nas diferentes situações pelo programa de análise de imagens ImageJ.

Além da porcentagem de imunorreatividade de cada grupo experimental, classificamos as imunomarcações por Escores (0 - 4) usando-se os seguintes critérios de intensidade: Escore 0 (ausência de imunorreatividade); 1 (muito fraca) 1-25% ; 2 (fraca) 25-50%; 3 (moderada) 50-75%; e 4 (intensa imunorreatividade) >75% de células positivas ou imunorreativas para o anticorpo analisado (O'Malley et al., 2019; Salvi et al., 2012; Sou et al., 2016).

## Análise estatística

As associações entre os resultados imunohistoquímicos (porcentagem de marcação em núcleo e citoplasma) e os parâmetros clínicos nos grupos, foram realizadas pelo Teste do Qui-Quadrado. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com  $P < 0,05$ , e o software de análise utilizado foi o Graphpad Prism versão 9.0.

**Tabela 2.** Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcação utilizados em MCT canino.

<b>Anticorpos Primários</b>	<b>Espécie hospedeira</b>	<b>Código</b>	<b>Fonte</b>
PD1/PD-L1	Rato, monoclonal	sc-18027	<i>DAKO, EUA</i>
CTLA-4	Rato, monoclonal	sc-376016	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
RANK	Rato, monoclonal	sc374360	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
RANK-L	Rato, monoclonal	sc-52950	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
IFN- $\gamma$	Coelho, policlonal	sc-12755	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>

## RESULTADOS

Dos 9 animais que foram incluídos neste estudo, os dados epidemiológicos, características clínicas dos pacientes e dos tumores estão compilados na tabela 2 e nos gráficos (Gráfico 1, 2 e 3).

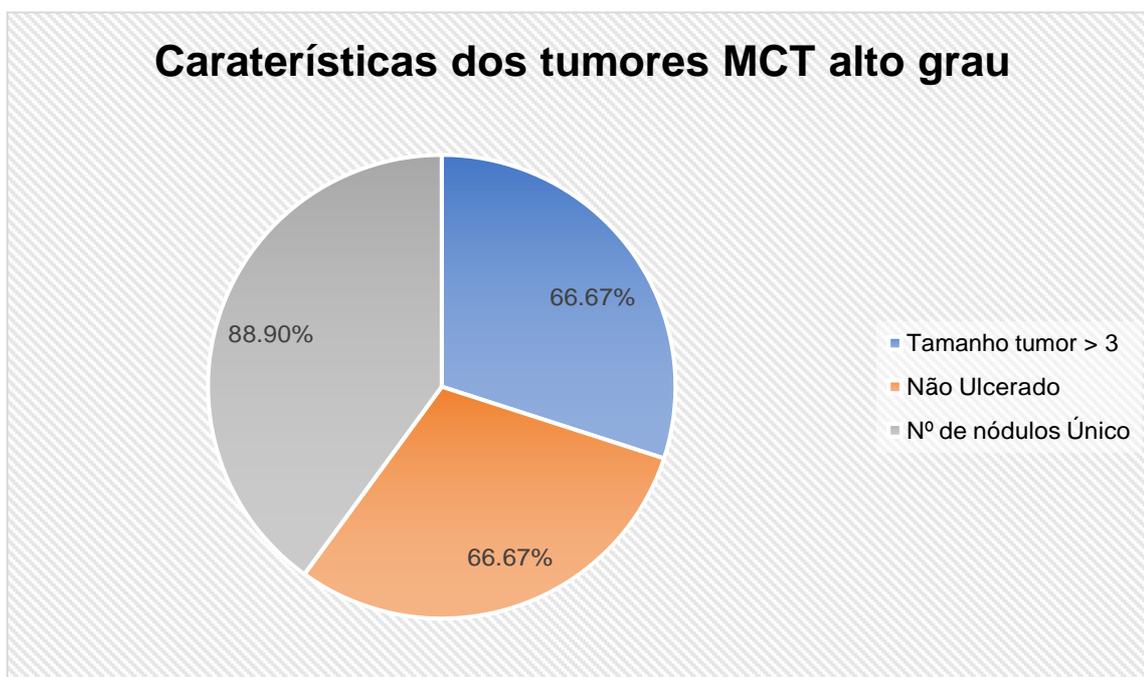
A idade média dos 9 animais incluídos nesse estudo foi de 8 anos, sendo que um cão da raça Pug tinha apenas 6 meses de idade. O grupo das raças puras, foi a mais representada correspondendo a 66,7% dos casos, dentre essas raças destacam-se o Golden Retriever, Labrador Retriever, Pug, Sharpei, Pinscher e Dachshund terrier. Em relação ao sexo, 55,6% dos pacientes eram fêmeas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Distribuição dos casos acompanhados durante o estudo, organizada segundo características epidemiológicas como idade, raça e sexo. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.

Nº de caso	Idade(anos)	Raça	Sexo
Caso 1	9	Golden Retriever	Fêmea
Caso 2	0.6	Pug	Fêmea
Caso 3	6.6	Shar-pei	Macho
Caso 4	8	Dachshund	Fêmea
Caso 5	12	SRD	Fêmea
Caso 6	7	Boxer	Macho
Caso 7	13	SRD	Macho
Caso 8	7	Labrador	Macho
Caso 9	10	SRD	Fêmea

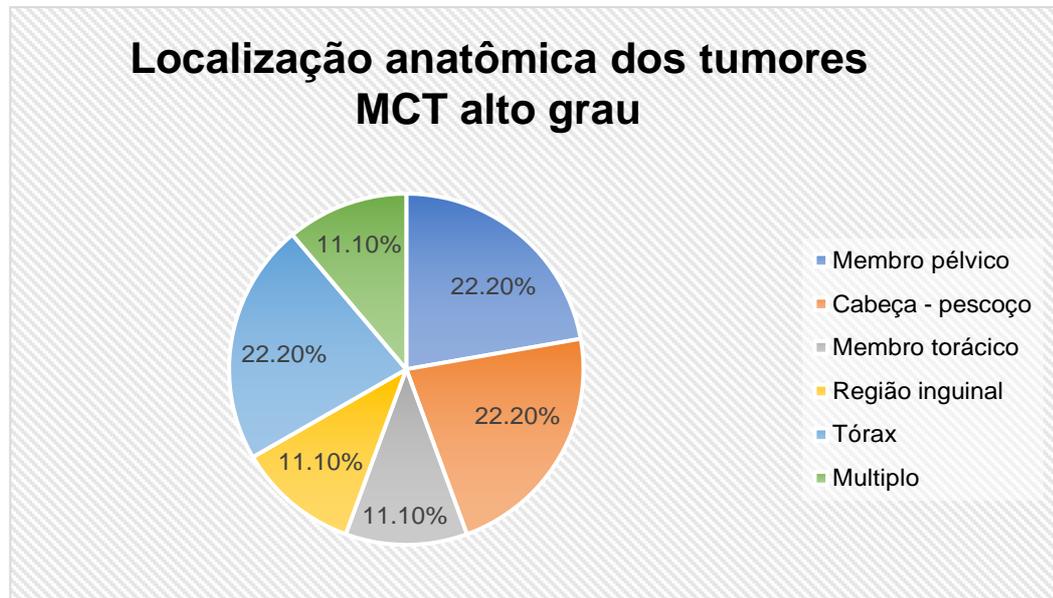
Os tumores foram divididos em 2 grupos baseados em tamanho e características macroscópicas. Observou-se que 66,7% dos tumores apresentavam tamanho superior à 3 cm. Em relação a presença de ulceração, em 66,7% dos casos tal característica estava ausente, 88.9% dos pacientes apresentavam tumores únicos. Um único animal apresentou múltiplos nódulos (Gráfico 1).

**Gráfico 1:** Características dos tumores incluindo tamanho, número de nódulos e ulcerações (Kiupel, et al 2011). Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.



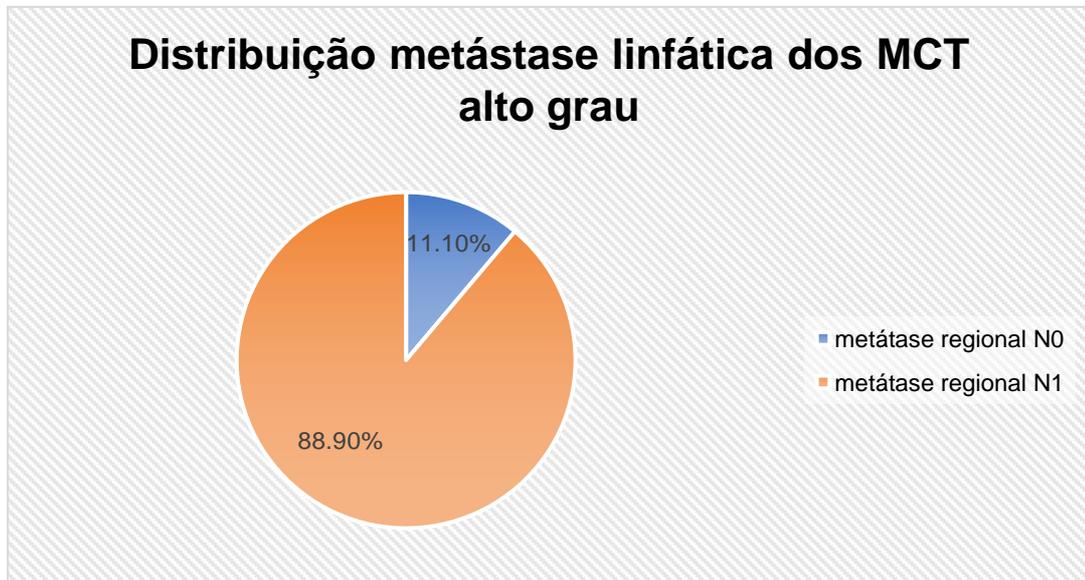
Em relação à localização, 2 animais (22,2%) possuíam os tumores nos membros pélvicos e 1 animal apresentou a formação no membro torácico (11,1%), dois (22,2%) apresentavam na região de cabeça e pescoço, um na região inguinal (11,1%), e dois (22,2%) animais apresentaram na região torácica e um animal apresentou múltiplos nódulos em diferentes localizações (11,1%). (Gráfico 2).

**Gráfico 2:** Distribuição da localização dos MCT alto grau. Serviço de Oncologia Veterinária, Jaboticabal, 2020.

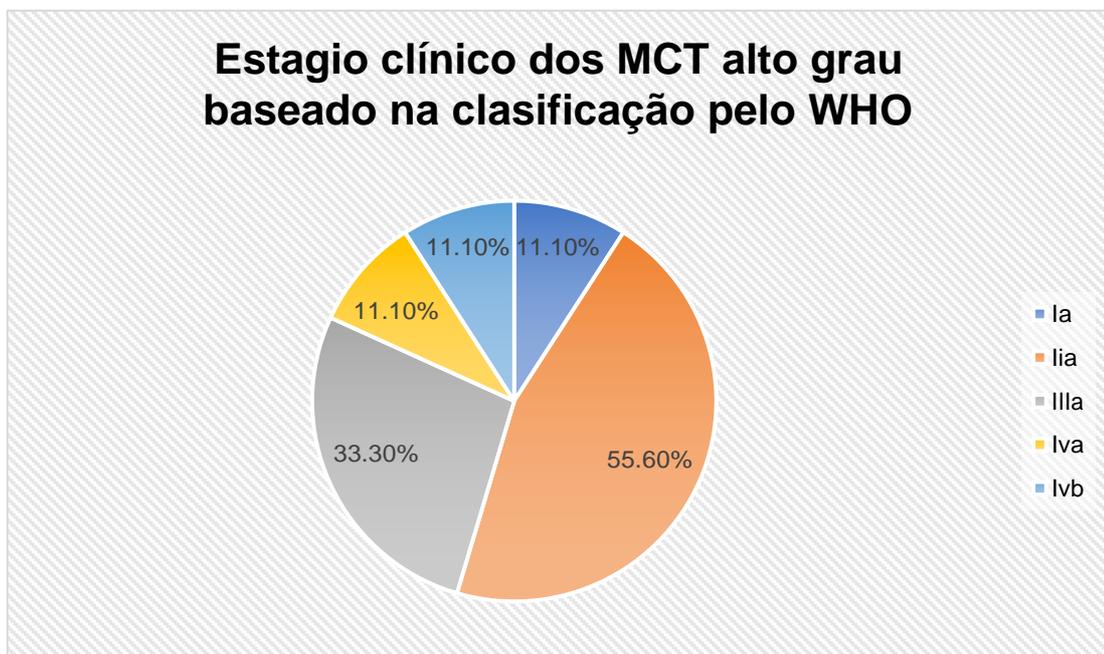


Um dado interessante foi em respeito da ocorrência de metástase em linfonodos regionais correspondendo a 88,9 % dos pacientes, não se observou metástase a distância em nenhum paciente. Em relação ao estágio clínico, 55,6% dos cães foram classificados no estágio IIa, sendo também mais da metade dos MCT recorrentes (66,6%). (Gráfico 3,4,5).

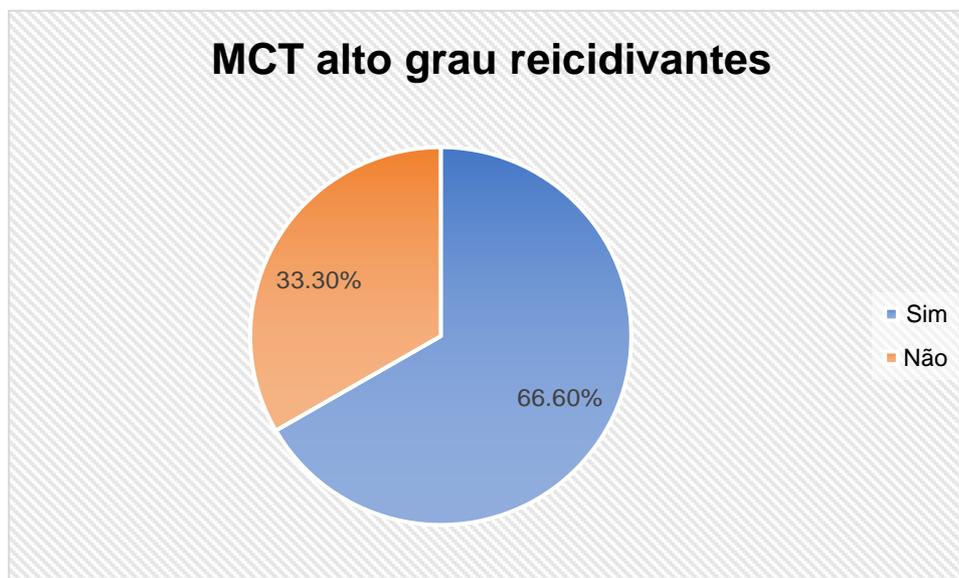
**Gráfico 3:** Distribuição gráfica relacionada a metástase aos linfonodos regionais. Serviço de oncologia veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020



**Gráfico 4:** Distribuição gráfica dos estágios clínicos de todos os animais com MCT alto grau. Serviço de oncologia veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020



**Grafico 5:** Distribuição gráfica dos MCT alto grau recidivantes. Serviço de oncologia veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020

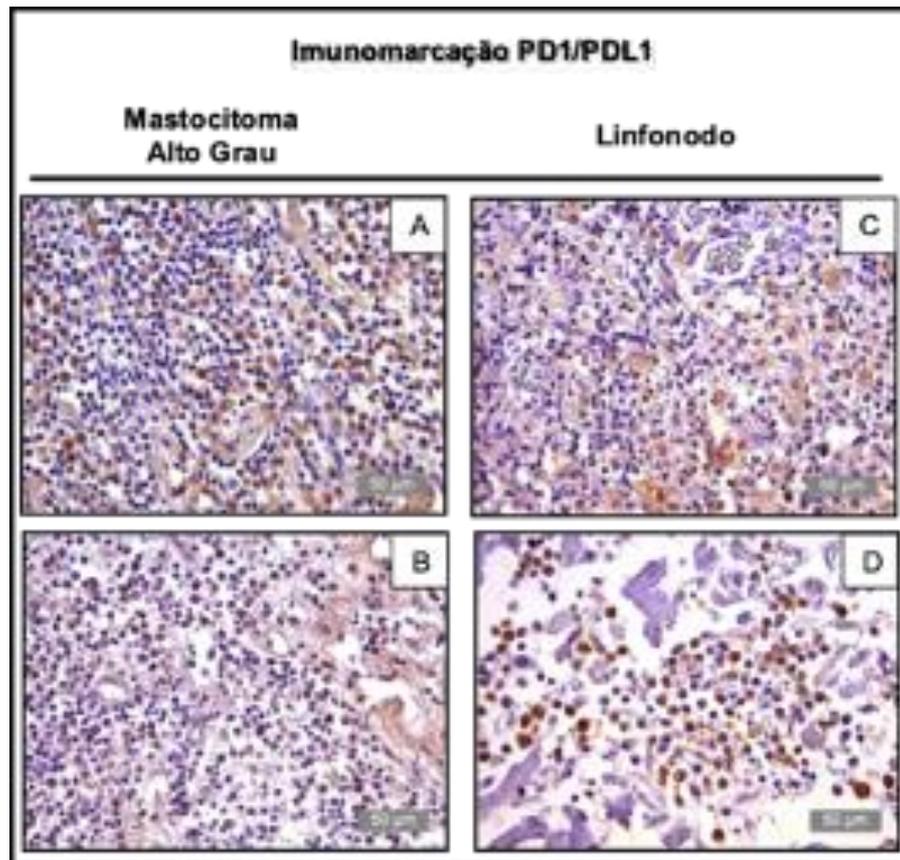


#### IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA PD-1/PD-L1

No caso do linfonodo regional metastásico, o padrão de imunomarcção da via PD1/PDL-1 foi de escore moderado à intenso. Tendo a porcentagem mais alta de 86.88% correspondendo ao escore 4 (intenso). Com relação ao tamanho do tumor e intensidade da imunomarcção se observou diferença significativa ( $P=0,0112$ ). Pode-se notar que os tumores maiores que 3 cm de diâmetro tiveram uma imunomarcção celular mais intensa (79.95%) em 6 cães com MCT alto grau, quando comparado aos tumores com tamanho inferior a 3 cm, no quais a imunomarcção celular foi moderada (66.34%) (Figura 1, Tabela 4,5).

A imunomarcção da via PD1/PD-L1 no MCT de alto grau, foi predominantemente moderada a intensa e somente um caso teve imunomarcção fraca correspondendo ao score 2 (46.57%) A porcentagem mais alta que foi expresso foi de 80.5%

correspondendo também ao escore 4 (intenso). Com relação a características clínicas como raça, idade, sexo, estágio clínico e presença de metástase (regional e a distância), localização, características próprias do tumor e recorrência não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (Gráfico 6, Tabela 2,4).



**Gráfico 6.**

Fotomicrografia mostrando a intensidade da imunomarcacão de PD1/PD-L1 em MCT alto grau canino. A: MCT com marcação intensa nuclear e citoplasmática. B: Linfonodo metastático com marcação intensa, nuclear e citoplasmática. C: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: Linfonodo metastático com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-coloração Hematoxilina. Barra = 50 um. Campinas, 2020

Imunomarcção PD1/PDL1		
Amostra	MCT alto grau	Linfonodo metastásicos
<b>Nº caso</b>		
CASO 1	3 (59.06 %)	3 (69,70%)
CASO 2	3 (68.29%)	3 (70.90%)
CASO 3	<b>4 (80,50 %)</b>	<b>4 (78,53 %)</b>
CASO 4	3 (70.58 %)	3 (75.04 %)
CASO 5	<b>4 ( 80.50 %)</b>	<b>4 (77.29 %)</b>
CASO 6	3 (73.77 %)	<b>4 (83,53 %)</b>
CASO 7	3 (74.83 %)	3 (63.12 %)
CASO 8	3 (69.02 %)	<b>4 (86.88 %)</b>

**Tabela 4:** Padrão de imunomarcção frente aos anticorpos primários PD1/PD-L1 em linfonodos metastásicos e MCT de alto grau em cães atendidos pelo Serviço de Oncologia (SOV), Jaboticabal, 2020.

**Tabela 5:** Associação entre a intensidade da marcação da via PD1/PD-L1 no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2020.

PD1/PD-L1 (intensidade)					
VARIÁVEIS	N	n (%)			P
		Ausência de marcação	Fraca	Moderada	Intensa
Raça					

Srd	3		3 (71,12%)	1 (80.50%)	<b>0.5258</b>
Raça	6	1 (46.57%)	4 (64.29%)	1 (80.50%)	
<b>Idade</b>					
0 - 8 anos	5	1 (46.57%)	3 (66.03%)	1 (80.50%)	<b>0.3575</b>
> 8 anos	4		4 (68.11%)	1 (80.50%)	
<b>Sexo</b>					
Fêmea	5	1 (46.57%)	4 (66.74%)	1 (80.50%)	<b>0.3575</b>
Macho	4		3 (67.85%)	1 (80.50%)	
<b>Estágio</b>					
Ia	1		1 (74.83%)		<b>0.5923</b>
Ila	5		4 (66.74%)	1 (80.50%)	
Ilb	0				
IIla	3	1 (46.57%)	1 (54.96%)		
Iva	1		1 (73.77%)		
IVb	1			0 (0%)	
<b>T (tamanho do tumor)</b>					
> 3 cm	6		5 (65.48%)	1 (80.50%)	<b>0.2765</b>
< 3 cm	3	1 (46.57%)	2 (71.56%)		
<b>N (linfonodo metastásico)</b>					
N1	9	1 (46.57%)	7 (65.95%)	1 (80.50%)	<b>0.8515</b>
N0	0		1 (74.83%)		
<b>M (metástase a distância)</b>					
M0	9	1 (46.57%)	7 (67.22%)	1 (80.50%)	<b>&gt;1</b>
M1	0			0 (0%)	
<b>Localização</b>					

Cabeça e pescoço	2		1 (68.29%)	1 (80.50%)	
Membros pélvicos - torácico	3		3 (67.28%)	0 (0%)	
Tórax	2		2 (72.71%)		<b>0.1169</b>
Região inguinal	1	1 (46.57%)			
Múltiplos	1		1 (54.96%)		
<b>Recidiva</b>					
Sim	6	1 (46.57%)	4 (62.83%)	2 (80.50%)	<b>0.5258</b>
Não	3		3 (73.06%)		
<b>Número de nódulos</b>					
Único	8	1 (46.57%)	6 (69.26%)	1 (80.50%)	<b>0.8515</b>
Múltiplos	1		1 (54.96%)		
<b>Ulceração</b>					
Sim	3		2 (64.04%)	1 (80.50%)	<b>0.2765</b>
Não	6	1 (46.57%)	5 (68.49%)		

**Tabela 6:** Associação entre a intensidade da marcação da via PD1/PD-L1 no linfonodo regional com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Jaboticabal, 2020.

<b>PD1/PD-L1 no linfonodo (intensidade)</b>					
<b>VARIÁVEL</b>	<b>N</b>	<b>n (%)</b>			<b>P</b>
		Ausência de marcação	Fraca	Moderada	Intensa
<b>Raça</b>					
SRD	5			1 (65%)	4 (81%)
Raça	5			3 (67.91%)	2 (77.87%)
<b>Idade</b>					

0 - 8 anos	3	2 (67.01%)	1 (77.29%)	0.2598
> 8 anos	7	2 (67.35%)	5 (80.48%)	

**Sexo**

Fêmea	6	3 (68.53%)	3 (80.15%)	0.4292
Macho	4	1 (63.12%)	3 (79.75%)	

**Estágio**

Ia	1	1 (63.12%)		0.4159
Ila	5	2 (70.30%)	3 (79.74%)	
IIb	1		1 (78.44%)	
IIIa	1	1 (65.00%)		
Iva	1		1 (83.53%)	
IVb	1		1 (78.53%)	

**T (tamanho do tumor)**

> 3 cm	7	1 (69.70%)	6 (79.95%)	0.0112
< 3 cm	3	3 (66.34%)		

**N (linfonodo metastásico)**

N1	9	3 (51.40%)	6 (79.95%)	0.1967
N0	1	1 (63.12%)		

**M (metástase a distância)**

M0	8	4 (67.18%)	4 (80.69%)	0.1967
M1	2		2 (78.49%)	

**Localização**

Cabeça e pescoço	2	1 (70.90%)	1 (77.29%)	0.8415
------------------	---	------------	------------	--------

Membros pélvicos - torácico	5	2 (67.35%)	3 (82.98%)	
Tórax	2	1 (63.12%)	1 (75.04%)	
Região inguinal	1		1 (78.44%)	
Múltiplos	1			
<hr/>				
<b>Recidiva</b>				
Sim	5	2 (70.30%)	3 (79.72%)	>0.9999
Não	5	2 (64.06%)	3 (75.50%)	
<hr/>				
<b>Número de nódulos</b>				
Único	10	4 (67.18%)	6 (79.95%)	*
Múltiplos	0			
<hr/>				
<b>Ulceração</b>				
Sim	5	1 (69.70%)	4 (80.29%)	0.1967
Não	5	3 (66.34%)	2 (79.29%)	

### 1.3 PROTEÍNA CTLA-4

Das 9 amostras de cães com MCT nas quais foram avaliadas as características epidemiológicas e as variáveis relacionadas ao tumor, a média de imunomarcção da proteína CTLA-4 foi moderada (score ) com uma média de 72,6% de células imunorreativas. Não foram observadas diferenças significativas das porcentagens de imunomarcção celular com as características epidemiológicas e clínicas ( $P=0.005$ ). Com relação as características propias do tumor, o tamanho do tumor (>3 cm) e a porcentagem de imunomarcção celular, observou-se diferença significativa ( $P=0.057$ ) (Gráfico 7, Tabela 7).

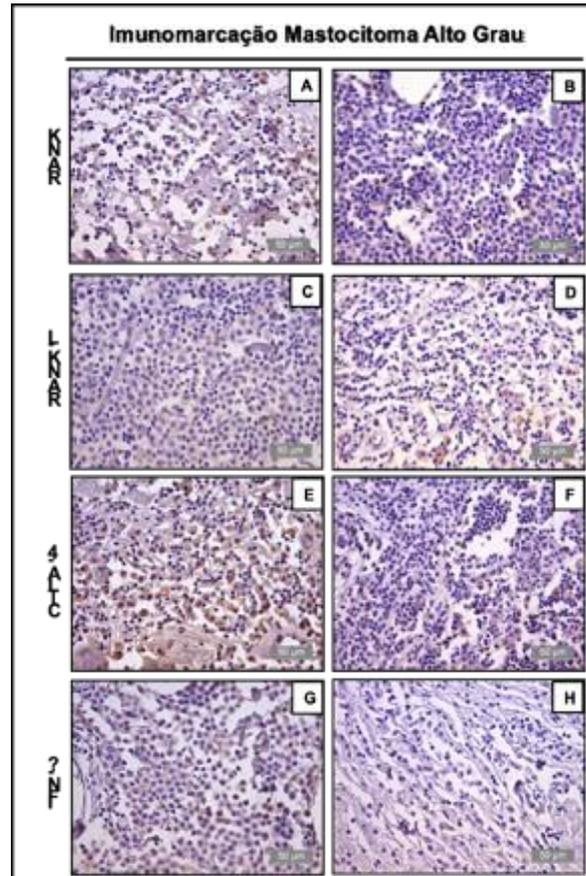
#### 1.4 PROTEINA DA VIA RANK/RANK-L

No caso da via RANK/RANK-L a imunomarcagem foi intensa (escore 4) para o RANK e com a média de 62,48% de células reativas. E em relação ao RANK-L a imunomarcagem foi moderada, com um escore 3 e uma média de 71,75% de células imunomarcadas. (Gráfico 7, Tabela 8)

Não foi observada associação significativa entre os escores das proteínas da via RANK/RANK-L e os parâmetros dos pacientes tais como raça, sexo, estadiamento clínico, metástase regional ou sistêmica, recidivas, localização, características próprias do tumor ( $P=0.005$ ). Entretanto, a idade (0-8 anos) e o tamanho tumoral (>3 cm ) tiveram diferença significativa a imunomarcagem celular da proteína RANK-L ( $P=0.0578$ ) e ( $P=0.027$ ) respectivamente (Gráfico 7, Tabela 9).

#### 1.5 PROTEINA IFN- $\gamma$

No caso do INF $\gamma$  a imunomarcagem foi moderada (escore 3) com uma média de 70,08% de células reativas na proteína. Com relação aos parâmetros clínicos dos pacientes e dos tumores e os achados imunohistoquímicos (escore e porcentagem de expressão) foi observada associação significativa ( $P=0.047$ ). (Gráfico 7, Tabela 10).



**Figura 7.**

Fotomicrografia mostrando a intensidade da imunomarcação da via RANK/RANK-L, e das proteínas CTLA-4 e IFN $\gamma$  em MCT alto grau canino. A: MCT com marcação intensa nuclear e citoplasmática. B: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. C: MCT alto grau com marcação intensa, nuclear e citoplasmática. D: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. G: MCT com marcação intensa nuclear e citoplasmática. H: MCT alto grau com marcação moderada, nuclear e citoplasmática. Imuno-histoquímica, DAB, contra-colora o Hematoxilina. Barra = 50  $\mu$ m. Campinas, 2020.

**Tabela 7:** Associação entre a intensidade da marcação da proteína CTLA-4 no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020

**CTLA-4 (intensidade)**

VARIÁVEL	N	n (%)			P
		Ausência de marcação	Fraca	Moderada	
<b>Raça</b>					
Srd	3		1 (71.67%)	2 (76.04%)	<b>0.6353</b>
Raça	6		3 (66.38%)	3 (76.90%)	
<b>Idade</b>					
0 - 8 anos	5		2 (64.17%)	3 (76.90%)	<b>0.7642</b>
> 8 anos	4		2 (71.24%)	2 (76.04%)	
<b>Sexo</b>					
Fêmea	5		2 (71.24%)	3 (75.73%)	<b>0.7642</b>
Macho	4		2 (64.17%)	2 (77.79%)	
<b>Estágio</b>					
Ia	1			1 (79.48%)	<b>0.5489</b>
Ila	5		3 (68.45%)	2 (75.84%)	
IIb	0				
IIIa	2		1 (65.47%)	1 (75.52%)	
Iva	1			1 (76.10%)	
IVb	0				
<b>T (tamanho do tumor)</b>					
> 3 cm	6		4 (67.70%)	2 (76.04%)	<b>0.0578</b>
< 3 cm	3			3 (76.90%)	
<b>N (linfonodo metastásico)</b>					
N1	8		4 (67.70%)	4 (75.83%)	<b>0.3428</b>
N0	1			1 (79.48%)	
<b>M (metástase a distância)</b>					
M0	9		4 (67.70%)	5 (76.56%)	
M1	0				

<b>Localização</b>				
Cabeça e pescoço	2	1 (62.88%)	1 (75.70%)	
Membros pélvicos - torácico	3	1 (70.80%)	2 (76.04%)	
Tórax	2	1 (71.67%)	1 (79.48%)	<b>0.6899</b>
Região inguinal	1		1 (75.52%)	
Múltiplos	1	1 (65.47%)		
<b>Recidiva</b>				
Sim	6	3 (66.38%)	3 (75.73%)	<b>0.6353</b>
Não	3	1 (71.67%)	2 (77.79%)	
<b>Número de nódulos</b>				
Único	8	3 (68.45%)	5 (76.56%)	<b>0.2357</b>
Múltiplos	1	1 (65.47%)		
<b>Ulceração</b>				
Sim	3	2 (66.84%)	1 (75.98%)	<b>0.3428</b>

**Tabela 8:** Associação entre a intensidade da marcação da via RANK/RANKL no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia (SOV), Jaboticabal, 2020.

VARIÁVEL	N	RANK (intensidade)			P
		Ausência de marcação	Fraca	Moderada	
<b>Raça</b>					
Srd	3		2 (67.99%)	1 (78.34%)	<b>&gt;0.999</b>
Raça	6		4 (67.92%)	2 (78.34%)	
<b>Idade</b>					
0 - 8 anos	5		3 (67.77%)	2 (78.34%)	<b>0.6353</b>
> 8 anos	4		3 (68.09%)	1 (78.34%)	
<b>Sexo</b>					
Fêmea	5		4 (68.07%)	1 (78.38%)	<b>0.3428</b>
Macho	4		2 (67.64%)	2 (78.32%)	
<b>Estágio</b>					
Ia	1			1 (78.29%)	<b>0.1447</b>
Ila	5		4 (67.91%)	1 (78.38%)	
IIb	0				
IIla	2		2 (67%)		
Iva	0			0 (0%)	
IVb	1		1 (70%)		
<b>T (tamanho do tumor)</b>					
> 3 cm	6		5 (67.94%)	1 (78.34%)	<b>0.2262</b>
< 3 cm	3		1 (68.02%)	2 (78.34%)	

<b>N (linfonodo metastásico)</b>				
N1	8	6 (67.95%)	2 (78.36%)	<b>0.1336</b>
N0	1		1 (78.29%)	
<b>M (metástase a distância)</b>				
M0	9	6 (67.61%)	3 (78.34%)	
M1	0	0 (0%)		
<b>Localização</b>				
Cabeça e pescoço	2	1 (69.30%)	1 (78.38%)	
Membros pélvicos - torácico	3	2 (67.76%)	1 (78.34%)	
Tórax	2	1 (69.07%)	1 (78.29%)	<b>0.8266</b>
Região inguinal	1	1 (68.02%)		
Múltiplos	1	1 (65.99%)		
<b>Recidiva</b>				
Sim	6	5 (67.76%)	1 (78.38%)	<b>0.2262</b>
Não	3	1 (69.07%)	2 (78.32%)	
<b>Número de nódulos</b>				
Único	8	5 (67.93%)	3 (78.34%)	<b>0.4533</b>
Múltiplos	1	1 (65.99%)		
<b>Ulceração</b>				
Sim	3	3 (67.53%)		<b>0.1336</b>
Não	6	3 (67.69%)	3 (78.34%)	

**Tabela 9:** Associação entre a intensidade da marcação da via RANK/RANK-L no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.

VARIÁVEL	N	RANK-L (intensidade)			P	
		Ausência de marcação	Fraca	Moderada		Intensa
		n (%)				
<b>Raça</b>						
Srd	3		3 (69.40%)		<b>0.1336</b>	
Raça	6		3 (67.07%)	3 (78.79%)		
<b>Idade</b>						
0 - 8 anos	5		2 (65.88%)	3 (78.79%)	<b>0.0578</b>	
> 8 anos	4		4 (69.41%)			
<b>Sexo</b>						
Fêmea	5		3 (68.80%)	2 (78.91%)	<b>0.6353</b>	
Macho	4		3 (67.66%)	1 (78.55%)		
<b>Estágio</b>						
Ia	1			1 (78.55%)	<b>0.3691</b>	
Ila	5		4 (68.75%)	1 (82.30%)		
IIb	0					
IIIa	2		1 (63.19%)	1 (75.52%)		
Iva	1		1 (71.23%)			
IVb	1					
<b>T (tamanho do tumor)</b>						
> 3 cm	6		6 (68.23%)		<b>0.0027</b>	
< 3 cm	3			3 (78.79%)		

<b>N (linfonodo metastásico)</b>				
N1	8	6 (67.63%)	2 (78.91%)	<b>0.1336</b>
N0	1		1 (78.55%)	
<b>M (metástase a distância)</b>				
M0	9	6 (68.23%)	3 (78.79%)	*
M1	0			
<b>Localização</b>				
Cabeça e pescoço	2	1 (68.57%)	1 (82.30%)	<b>0.3425</b>
Membros pélvicos - torácico	3	3 (69.29%)		
Tórax	2	1 (69.76%)	1 (78.55%)	
Região inguinal	1		1 (75.52%)	
Múltiplos	1	1 (63.19%)		
<b>Recidiva</b>				
Sim	6	4 (67.10%)	2 (78.91%)	<b>&gt;0.9999</b>
Não	3	2 (70.50%)	1 (78.55%)	
<b>Número de nódulos</b>				
Único	8	5 (69.24%)	3 (78.79%)	<b>0.4533</b>
Múltiplos	1	1 (63.19%)		
<b>Ulceração</b>				
Sim	4	3 (68.41%)	1 (75.52%)	<b>0.6353</b>
Não	5	3 (68.06%)	2 (80.43%)	

**Tabela 10:** Associação entre a intensidade da marcação da proteína IFN- $\gamma$  no MCT de alto grau com as variáveis clínicas dos pacientes e características tumorais. Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), Jaboticabal, 2020.

VARIÁVEL	N	IFN- $\gamma$ (intensidade)			P
		Ausência de marcação			
		Fraca	Moderada	Intensa	
<b>Raça</b>					
Srd	3	3 (66.61%)			0.2059
Raça	5	3 (67.70%)	2 (78.87%)		
<b>Idade</b>					
0 - 8 anos	4	2 (66.59%)			0.1025
> 8 anos	4	4 (67.44%)			
<b>Sexo</b>					
Fêmea	4	3 (65.05%)			>0.999
Macho	4	3 (69.25%)			
<b>Estágio</b>					
Ia	1	1 (79.12%)			0.2917
Ila	5	4 (66.96%)			
Ilb	0				
IIla	1	1 (60.51%)			
Iva	1	1 (74.58%)			
IVb	0				
<b>T (tamanho do tumor)</b>					
> 3 cm	6	6 (67.15%)			0.0047
< 3 cm	2	2 (78.87%)			

<b>N (linfonodo metastásico)</b>					
N1	7	6 (67.15%)	1 (78.61%)	0.0641	
N0	1		1 (79.12%)		
<b>M (metástase distância)</b>					
M0	8	6 (67.15%)	2 (78.87%)	*	
M1	0				
<b>Localização</b>					
Cabeça e pescoço	2	1 (72.67%)	1 (78.61%)	0.4459	
Membros pélvicos - torácico	3	3 (68.57%)			
Tórax	2	1 (64.02%)	1 (79.12%)		
Região inguinal	0				
Múltiplos	1	1 (60.51%)			
<b>Recidiva</b>					
Sim	5	4 (66.08%)	1 (78.61%)		0.6733
Não	3	2 (69.30%)	1 (79.12%)		
<b>Número de nódulos</b>					
Único	7	5 (68.48%)	2 (78.87%)	0.5371	
Múltiplos	1	1 (60.51%)			
<b>Ulceração</b>					
Sim	3	3 (67.94%)		0.2059	
Não	5	3 (66.37%)	2 (78.87%)		

## DISCUSÃO

O comportamento biológico do MCT cutâneo é altamente variável, desde relativamente benignos até altamente metastásicos e invasivos (Murphy et al., 2004; Schultheiss et al., 2011). O MCT de alto grau corresponde de 19% a 39% de todos os MCTs (Patnaik et al., 1984; Hottendorf et al., 1967). Por ter um comportamento biológico mais agressivo e metastásico, no presente estudo foi incluído somente os animais com MCT alto grau.

A média de idade dos pacientes do presente estudo foi 8 anos, porém a faixa etária dos pacientes foi bem variada, incluindo um paciente com 6 meses de idade. Em contraste com diferentes estudos, a faixa etária média (8 – 9 anos) reportada é similar a desse estudo sendo a faixa de maior incidência de MCT descrita por Miller 1995, London et al. 2009, Kiupel et al. 2011 e Mahler 2012. Em contrapartida, diferentes estudos reportaram casos de MCT em cães jovens (Miller, 1995), porém poucos reportes foram mencionados em cães com idade inferior a um ano (Davis et al., 1992; Miller 1995; London et al., 2009; Mahler, 2012).

No presente estudo 66,7% da população incluíram cães de raça pura. O MCT é uma neoplasia cutânea com maior prevalência descrita em algumas raças incluindo o Golden e Labrador Retrievers, Bulldogs, Boxers, Pug, Sharpei entre outras raças (Dobson, 2013; Warland & Dobson, 2013; Arendent et al., 2015; Mochizuki et al., 2017; Smiech et al., 2017). Diversos estudos relacionam a raça com mutações genéticas, por exemplo, um recente estudo que avaliou a associação do genoma, identificou um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) dentro do gene GNAI2, além disso, genes da hialuronidase estão associados a um risco elevado do desenvolvimento de MCTs em Golden Retrievers (Arendent et al., 2015).

Adicionalmente, McNiel e colaboradores (2006), reportaram que a raça Pug, possui predisposição para apresentar MCTs multinodulares, que costumam apresentar um comportamento benigno, embora não tenha sido pesquisada a presença de metástase nos linfonodos regionais. Em contraste neste estudo, o único Pug avaliado apresentou um nódulo único na base da orelha com presença de metástase no linfonodo regional retrofaríngeo, alcançando com o tratamento empregado um tempo de

sobrevida superior à um ano. Kiupel e colaboradores (2005) avaliaram a localização dos MCT como fator prognóstico e observaram que aqueles MCT localizados em cabeça e pescoço tinham maior predisposição de desenvolver novos MCT a distância sendo um fator prognóstico negativo, porém nesse caso não foi observado dito comportamento portanto pode-se associar possíveis mutações genéticas próprias do animal e da raça.

As fêmeas foram o grupo com maior porcentagem correspondendo ao 55.6%, dito resultado é similar a outros estudos como de London e Seguin, 2003, porém Kiupel e colaboradores (2005) relataram que os cães machos têm menor tempo de sobrevivência e baixa resposta aos tratamentos quimioterapêuticos associado às vias hormonais relacionadas com a agressividade dos MCT, porém eles recomendam novas pesquisas associadas a sexo e tempo de sobrevivência.

Com relação às imunomarcações, interessante o grupo etário correspondente à faixa de 0 a 8 anos de idade, apresentaram diferença significativa com a imunomarcação do RANK-L. A expressão do RANK-L nos MCT alto grau em pacientes com idade mais nova pode estar relacionada com a mobilização dos osteoclastos e os osteofitos que contribuem na remodelação óssea (Boyce e Xing, 2008). Essa marcação costuma estar presente nos tumores ósseos primários e aquelas neoplasias que fazem metástase óssea (Azim, 2013).

Na medicina há estudos que relacionam a expressão dessa proteína com expressão gênica e progressão tumoral em tumores mamários de mulheres jovens (Ibrahim et al., 2010). Porém a sinalização da via RANK/RANK-L está presente na tumorigênese, desde a formação tumoral até a migração das células tumorais aos órgãos a distância (Renema et al., 1997). Apesar do comportamento metastático do MCT não compromete os tecidos ósseos, a intensa expressão do RANK-L no tumor MCT alto grau pode ser relacionado com agressividade e metástase dito tumor indistintamente da idade do paciente.

Interessante, na medicina, o desenvolvimento de imunoterapias inibidoras do RANK-L como Denosumab, é utilizado em aqueles tumores metastáticos aumentando o tempo de sobrevivência em aqueles pacientes (Groot et al., 2018)

sugerindo que aqueles MCT alto grau que expressem o RANKL poderiam ser associado ao comportamento mais agressivo e poderiam ser responsivos a novas terapias associadas a imunoterapia.

O tamanho tumoral, a presença de ulcerações e a localização estão relacionados com maior ou menor ocorrência de recidivas e metástases, considerando pior prognóstico para aqueles tumores maiores e ulcerados (Dobson e Scase, 2007; Welle et al., 2008, London e Thamm 2013). No presente estudo, 66,7% dos tumores apresentaram tamanho superior a 3 cm e o 66,7% não apresentaram ulcerações, entretanto, 88,9% apresentaram a presença de metástase nos linfonodos regionais.

Deve-se ressaltar que os tumores de tamanho superior a 3 cm apresentaram diferença significativa na relação da imunomarcção celular nas proteínas estudadas. A diferença significativa da relação do tamanho tumoral e a expressão de PD1/PD-L1 no linfonodo regional foi de ( $P=0.05$ ). O PD1/PD-L1 está activado nas células tumorais e atenuado nos linfocitos infiltrados no tumor (TILs) bloqueando a resposta imunológica local e portanto inibindo a função das células T, facilitando a progressão e proliferação das células tumorais (Blomberg et al., 2018; Wang et al., 2019). No MCT gera mais comumente a metástase em linfonodos regionais, apenas a minoria dos cães irá desenvolver metástase sistêmica, como foi relatado no estudo do Krick e colaboradores (2017).

A taxa de metástase dos MCT alto grau varia entre 55% e 96%, sendo a metástase do linfonodo regional a mais comum, correspondendo a 49% dos casos (Patnaik et al., 1984; Bostock et al., 1973; Hume et al., 2011). No presente estudo, dos 9 MCT de alto grau 88,9% apresentavam metástase no linfonodo regional e somente 11,1% ( $n=1$ ), apresentou metástases em fígado e baço diagnosticado por citologia ecoguiada. Krick e colaboradores (2017), reportaram que a maior porcentagem dos cães com MCT grau III desse estudo apresentaram metástase linfática regional e a metástase a distância foi observada em apenas 5% dos casos.

Por tanto ressaltamos que o tamanho do tumor é um fator prognóstico importante indistintamente das características macroscópicas que deve ser considerado em todas avaliações clínicas dos pacientes, por conta que foi demonstrado que nos MCT

alto grau expressam os checkpoints e pode ser associado a um pior prognóstico associado com metástase regional. Além disso, o resultado de intensa imunomarcagem no tumor e no linfonodo pode indicar que o MCT alto grau pode ser responsivo a imunoterapia como os inibidores dos checkpoints.

Outra proteína que apresentou diferença estatística relacionada ao tamanho tumoral é a expressão do CTLA-4. Essa proteína dos checkpoints está relacionada com a esfoliação celular, sobrevivência das células tumorais na circulação sanguínea e linfática e estabilidade nos sítios à distância (Green et al., 2013; Santos et al., 2014).

Existe pouca informação da expressão do CTLA-4 no tumor como fator prognóstico preditivo (Seidel et al., 2018). Harsha e colaboradores (2020) estudaram a expressão de checkpoints (PD1/PDL-1 e CTLA-4) nos tumores mamários, observando que os tumores que expressavam essas proteínas obtiveram maior índice metastático e progressão da doença em relação aos que não expressaram, porém a expressão nos linfonodos regionais não foi avaliada.

Tagawa e colaboradores (2018) pesquisaram a expressão dos checkpoints nos cães com linfoma de alto grau com imunofenótipo B, demonstrando que os pacientes com a doença tiveram uma maior expressão PD1/PD-L1 e CTLA-4 em relação ao grupo controle. Entretanto, a função do CTLA-4 como fator prognóstico dentro da oncologia ainda é controverso, apesar disso, a alta imunomarcagem desse marcador está relacionado com um pior prognóstico, relatado em diversos tipos de câncer incluindo o linfoma de alto grau. Adicionalmente, o CTLA-4 é um imunodulador negativo, expressado pelas células T efectoras, as quais possuem a função de suprimir a imunidade anti-tumoral (Nakayama et al., 2017; Hu et al., 2017).

Conseqüentemente o aumento da expressão dos checkpoints em MCT de alto grau parece facilitar a ocorrência de metástases, por inibição da resposta imunitária do hospedeiro mas também podem ser utilizados como novos marcadores de prognóstico, ou seja, ferramentas que possam complementar os métodos de diagnóstico e prognóstico já existentes, com o objetivo de aprimorar os meios diagnósticos e impactar positivamente no desfecho clínico.

A expressão da IFN- $\gamma$  e o tamanho do tumor também tiveram diferença significativa ( $P=0.047$ ). Esta relação pode ser associada com a maior infiltração de linfóci-

tos no tumor (TILs) que podem contribuir com a evasão tumoral promovendo a tumorigênese e angiogênese (Ni & Lu, 2018). A importância clínica da expressão do IFN- $\gamma$  no câncer foi observada por Higgs et al. (2018), que constataram que os pacientes com carcinoma pulmonar de células pequenas e carcinoma urotelial em estágio avançado tiveram uma melhor resposta aos inibidores dos checkpoints (PD-L1), sugerindo que a expressão do IFN- $\gamma$  pode ser considerada como um marcador preditivo da resposta às imunoterapias bloqueadoras de checkpoints (Karachaliou, 2018).

O IFN- $\gamma$  induz a expressão do CTLA-4, PD-L1 nas células tumorais. A relação da expressão do IFN- $\gamma$  e CTLA-4 em humanos foi reportado nos pacientes com melanoma oral, observando que os inibidores de CTLA-4 (ipilimumab) aumentam a resposta dos pacientes que apresentam maior expressão (Mo et al., 2018).

Em condições normais o IFN- $\gamma$  induz a expressão do PD-L1 nas células apresentadoras de antígeno e em outras células ativadoras das células T, para evitar o dano nos tecidos, porém no ambiente tumoral, a expressão do PD-L1 é usado como estratégia de escape por parte das células tumorais. Belluci et al (2015). demonstrou que o aumento da expressão do PD-L1 pelo tumor gera resistência à lise por parte das células Natural Killers (NK), no momento de bloquear a sinalização do IFN $\gamma$ /JAK permite a lise tumoral por parte das NK. Esses mesmos achados foram observados em carcinomas gástricos, a expressão do PD-L1 teve relação importante com a expressão do IFN $\gamma$  observando que aqueles pacientes com alta expressão de IFN $\gamma$  podem responder melhor ao uso de inibidores de PD-L1 (Mimura et al. 2018). Por tanto, a maior tamanho tumoral no MCT alto grau pode se relacionar com possível maior infiltração de células T no tumor e maior expressão do IFN $\gamma$  e por conta que o MCT alto grau é um tumor que expressa PD1/PD-L1 os tratamentos inibidores dos checkpoints pode responder melhor.

O Oncotherad é a imunoterapia desenvolvida no Brasil, é um agonista dos Toll like receptors (TLR) 2 e 4 os quais são responsáveis pela ativação do IFN $\gamma$  que consequentemente ativa as células dendríticas (CDs) apresentando os antígenos tumorais nos linfonodos, adicionalmente inibe a expressão dos RANK/RANK-L inibindo a proliferação e progressão das células tumorais. Na veterinária, já têm ótimos resultados no carcinoma urotelial, melanoma oral e agora em mastocitoma cutâneo alto grau.

## CONCLUSÕES

Os MCT alto grau têm expressão forte dos checkpoints PD1/PD-L1 e CTLA-4 assim como a via RANK/RANK-L e IFN $\gamma$ , indistintamente das características próprias do animal e do tumor, ressaltando que, os tumores maiores a 3 cm é um fator prognóstico negativo independentemente das características macroscópicas que possa apresentar o próprio tumor. Adicionalmente, a expressão desses marcadores abre as portas a novas opções terapêuticas como a imunoterapia.

## REFERÊNCIAS

Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., ... & Argyle, D. J. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and comparative oncology*, 10(3), e1-e29.

Chen H, Liakou CI, Kamat A, et al. (2009). Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOShi T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. n(106),p.2729-2734.

Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321-330.

Dam, P. A., van Dam, P. J. H., Rolfo, C., Giallombardo, M., Van Berckelaer, C., Trinh, X. B., ... & Van Laere, S. (2016). In silico pathway analysis in cervical carcinoma reveals potential new targets for treatment. *Oncotarget*, 7(3), 2780.

De Nardi, A. B., Rodaski, S., Sousa, R. S., Costa, T. A., Macedo, T. R., Rodigheri, S. M., ... E Piekarz, C. H.(2002). Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, n.7(2).

Fávaro, W. J., Iantas, S. R., Gonçalves, J. M., Dias, Q. C., Reis, I. B., Billis, A., ... E Alonso, J. C. C. (2019). Role of OncoTherad immunotherapy in the regulation of toll-like receptors-mediated immune system and RANK/RANKL signaling: New therapeutic perspective for non-muscle invasive bladder cancer, *Journal of Clinical Oncology*, n. 37(15).

Furlani, J. M.; Daleck, C. R.; Vicenti, F. A. M.; De Nardi, A. B.; Pereira, G. T.; Santana, A. E.; Eurides, D.; Silva, L. A. F. (2008). Mastocitoma Canino: Estudo Retrospectivo. *Ciência Animal Brasileira*, V.9, N.1, P. 242-50.

Horta, R. S., Lavallo, G. E., Monteiro, L. N., Souza, M. C., Cassali, G. D., & Araújo, R. B. (2018). Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. *Veterinary pathology*, 55(2), 212-223.

Hume, C. T., Kiupel, M., Rigatti, L., Shofer, F. S., Skorupski, K. A., & Sorenmo, K. U. (2011). Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997–2007). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(1), 37-44.

Kiupel, M., Webster, J. D., Miller, R. A., & Kaneene, J. B. (2005). Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 52(6), 280-286.

Krick, E. L., Kiupel, M., Durham, A. C., Thaiwong, T., Brown, D. C., & Sorenmo, K. U. (2017). Investigating Associations Between Proliferation Indices, C-kit, and Lymph Node Stage in Canine Mast Cell Tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 53(5), 258-264.

London, C. A., E Thamm, D. H. (2013) Mast cell tumors. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*, WB Saunders pp. 335-355.

London, C. A., Galli, S. J., Yuuki, T., Hu, Z. Q., Helfand, S. C., & Geissler, E. N. (1999) Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental hematology*, n. 27(4), p.689-697.

Maekawa, N., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Adachi, M., Takagi, S., ... & Ohashi, K. (2014). Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- $\gamma$  production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PloS one*, 9(6), e98415.

Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480-489.

Michot, J. M., Bigenwald, C., Champiat, S., Collins, M., Carbonnel, F., Postel-Vinay, S., ... & Massard, C. (2016). Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European journal of cancer*, 54, 139-148.

Mullins, M. N., Dernell, W. S., Withrow, S. J., Ehrhart, E. J., Thamm, D. H., & Lana, S. E. (2006). Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(1), 91-95.

Murphy, S., Sparkes, A. H., Brearley, M. J., Smith, K. C., & Blunden, A. S. (2004). Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Veterinary Record*, 154(24), 743-746.

Oliveira, M. T., Campos, M., Lamego, L., Magalhães, D., Menezes, R., Oliveira, R., ... & Ferreira, D. A. (2020). Canine and feline cutaneous mast cell tumour: a comprehensive review of treatments and outcomes. *Topics in Companion Animal Medicine*, 100472.

Peng W, Liu C, Xu C, et al.(2012). PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-gamma inducible chemokines. *Cancer Res.*n(72), p.5209-5218.

Reguera, M. J., Rabanal, R. M., Puigdemont, A., & Ferrer, L. (2000). Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *The American journal of dermatopathology*, n.22(1),p. 49-54.

Śmiech, A., Jasik, A., Ślaska, B., Łopuszyński, W., Szczepanik, M., & Wilkołek, P.(2017).Epidemiological study of canine mast cell tumours according to the histological malignancy grade. *Polish journal of veterinary sciences*.

Thamm DH and Vail DM Mast cell tumours.(2007) In: *Small Animal Clinical Oncology*.4edn., SJ Withrow and DM Vail, eds., St. Louis, Saunders-Elsevier, p. 402 – 424.

Thamm, D. H., Turek, M. M., & Vail, D. M. (2006). Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(6), 581-587.

Villamil, J. A., Henry, C. J., Bryan, J. N., Ellersieck, M., Schultz, L., Tyler, J. W., & Hahn, A. W.(2011). Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, n.239(7),p. 960-965.

Welle, M. M.; Bley, C. R.; Howard, J.; Rufenacht, S.(2008). Canine Mast Cell Tumours: A Review Of The Pathogenesis, Clinical Features, Pathology And Treatment. *Veterinary Dermatology*, V. 19, P. 321-339.

Zhang, J., Medeiros, L. J., & Young, K. H. (2018). Cancer immunotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Frontiers in oncology*, 8, 351.

## ANEXO 1

### Declaração de Consentimento

Fui devidamente esclarecido (a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal (is) pelo(s) qual (is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal (is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal (is), identificado(s) a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e a outra com o pesquisador.

Campinas, \_\_\_/\_\_\_\_\_/2018

Assinatura do Responsável  
sador

Assinatura do Pesqui-

Assinatura do Pesquisador Responsável

#### **Responsável:**

Nome:

Documento de Identidade:

#### **Identificação do(s) animal (is):**

Nome: Número de/identificação:

Espécie: Raça:

## ANEXO 2

### 1A: Escala de Qualidade de Vida

Mais de 5 é aceitável em cada categoria. Um total de 35 pontos ou mais é aceitável para um bom Pawspice. Adaptado de Villalobos, A.E., Quality of life scale helps make final call, VPN, September, p:304, 2004.

D- 0-10	DOR: O controle da dor é adequado, incluindo a capacidade respiratória, em primeiro lugar escala. A dor do animal de estimação é gerenciada com sucesso? O oxigênio é necessário?
A - 0-10	ALIMENTAÇÃO: O animal está comendo o suficiente? A alimentação manual ajuda? O paciente requer um tubo de alimentação?
H - 0-10	HIDRATAÇÃO: O paciente está desidratado? Para pacientes que não bebem o suficiente, usar fluidos via subcutânea uma ou duas vezes ao dia para complementar a ingestão de líquidos
H - 0-10	HIGIENE: O paciente deve ser mantido escovado e limpo, particularmente após a defecação e micção, Evite feridas de decúbito e mantenha todas as feridas limpas
F- 0-10	FELICIDADE: O animal de estimação expressa alegria e interesse? Ele é sensível às coisas ao redor dele (família, brinquedos, etc)? O animal de estimação está deprimido, solitário, ansioso, entediado ou com medo? O animal de estimação descansa perto das atividades da família e não está isolado?
M- 0-10	MOBILIDADE: O paciente pode se levantar sem assistência? O animal de estimação precisa de seres humanos ou ajuda mecânica (por exemplo, um carrinho)? Ele sente vontade de dar uma volta? Ele está tendo convulsões ou tropeçando? (Alguns cuidadores sentem que a eutanásia é preferível à amputação, mas um animal que tem mobilidade limitada, mas ainda está alerta e responsivo pode ter uma boa qualidade de vida, desde que seus cuidadores estão comprometidos em ajudá-lo.)

M – 0-10	<p>MAIS DIAS BONS QUE MAUS: Quando há muitos dias ruins seguidos, a qualidade da vida é muito comprometida. Quando um vínculo humano-animal saudável não é mais possível, o tutor deve ser informado de que o fim está próximo. A decisão precisa ser tomada se o animal estiver em sofrimento. Se a morte vem pacificamente e sem dor, tudo bem.</p>
----------	---