

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DO PERFIL IMUNOLÓGICO ATRAVÉS DE IMUNO-
HISTOQUÍMICA PARA DESENVOLVIMENTO DE UM
IMUNOSCORE PARA MELANOMA ORAL EM CÃES**

Milena Giovana Magrin
Médica Veterinária

**T
E
S
E

/

M
A
G
R
I
N

M.
G.

2
0
2
5**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DO PERFIL IMUNOLÓGICO ATRAVÉS DE IMUNO-
HISTOQUÍMICA PARA DESENVOLVIMENTO DE UM
IMUNOSCORE PARA MELANOMA ORAL EM CÃES**

Discente: Milena Giovana Magrin

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi

Coorientadora: Dra. Alexandra Pinheiro Fantinatti

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

M212a Magrin, Milena Giovana
Análise do perfil imunológico através de imuno-histoquímica
para desenvolvimento de um imunoscore para melanoma oral
em cães / Milena Giovana Magrin. -- Jaboticabal, 2025
79 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Andrigo Barboza de Nardi
Coorientadora: Alexandra Pinheiro Fantinatti

1. Oncologia veterinária. 2. Cães. 3. Melanoma. 4. Boca. 5.
Imunoscore. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados
fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa propõe um imunosscore para o melanoma oral canino, contribuindo para o diagnóstico e prognóstico mais precisos da doença. Espera-se impactar positivamente o bem-estar animal, auxiliar nas decisões terapêuticas e promover avanços na oncologia veterinária.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research proposes an immunoscore for canine oral melanoma, contributing to more accurate diagnosis and prognosis. It is expected to positively impact animal welfare, assist therapeutic decisions, and foster advances in veterinary oncology.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DO PERFIL IMUNOLÓGICO ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSCORE PARA MELANOMA ORAL EM CÃES

AUTORA: MILENA GIOVANA MAGRIN

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORIENTADORA: ALEXANDRA PINHEIRO FANTINATTI

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

Pesquisadora Dra. ALEXANDRA PINHEIRO FANTINATTI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas/SP

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRA PINHEIRO FANTINATTI**
Data: 02/04/2025 09:33:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO DOS SANTOS HORTA**
Data: 07/04/2025 15:38:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **MIRELA TINUCCI COSTA**
Data: 02/04/2025 10:36:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ALINE DE MARCO VIOTT (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Veterinárias / Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Palotina/PR

Documento assinado digitalmente
 **ALINE DE MARCO VIOTT**
Data: 23/04/2025 16:15:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
gov.br RENEE LAUFER AMORIM
Data: 07/04/2025 16:24:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. RENEE LAUFER AMORIM (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Veterinária / FMVZ UNESP Botucatu

Jaboticabal, 31 de março de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Milena Giovana Magrin, nascida em Curitiba, estado do Paraná, no dia 30 de maio de 1989, é bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), título obtido em agosto de 2013. Durante a graduação, participou de um intercâmbio acadêmico na Università Degli Studi di Pisa, na Itália, no período de setembro de 2010 a fevereiro de 2011. Concluiu o curso de pós-graduação *latu sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pela Faculdade Qualittas, em Curitiba-PR, entre fevereiro 2014 a fevereiro 2016. Atuou como residente no Programa de Residência Médico-Veterinária em Clínica Cirúrgica de Animais de Companhia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), de fevereiro de 2015 a julho de 2017. Em fevereiro de 2018, ingressou como aluna regular do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV-UNESP), nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi, defendendo sua dissertação e obtendo o título de Mestra em Cirurgia Veterinária em 29 de julho de 2020. Posteriormente, deu continuidade à formação acadêmica no mesmo programa, ingressando como doutoranda em 03 de agosto de 2020, novamente sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi.

"A verdadeira ciência investiga e traz à tona as maravilhas da natureza."

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho à minha mãe Jussara, meu pai Luiz Carlos e ao meu irmão Gabriel, por todo amor, apoio e compreensão ao longo desta jornada acadêmica. Aos meus amigos, que tornaram os desafios mais leves e os momentos de alegria ainda mais significativos. Aos meus professores e colegas, por compartilharem conhecimento e experiências enriquecedoras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela saúde, equilíbrio e forças que me permitiram trilhar este caminho e me dedicar à realização dos meus sonhos.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Jussara, por me darem a vida e seguirem ao meu lado incondicionalmente, garantindo que jamais me faltasse nada – seja emocional, físico ou financeiramente. O amor, incentivo e apoio de vocês foram fundamentais em cada etapa desta jornada.

Ao meu irmão, Gabriel, pelo companheirismo e suporte, não apenas neste projeto, mas em toda a nossa trajetória juntos. Obrigada pelos ensinamentos acadêmicos e científicos e pela ajuda valiosa em diversas etapas deste trabalho e da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, pela orientação cuidadosa e assertiva, sempre com paciência e dedicação. Sua forma de ensinar e conduzir esta pesquisa foi essencial para meu crescimento profissional. Sou grata pela oportunidade de ter aprendido tanto sob sua supervisão.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Alexandra Fantinatti, por sua receptividade e generosidade. Sua orientação e apoio foram essenciais ao longo desse percurso. Sua empatia e dedicação tornaram a ciência um ambiente mais acolhedor. Sem você, esse trabalho não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Wagner Fávaro, por me aceitar e me acolher como parte da sua equipe e por abrir as portas do seu laboratório na Unicamp, possibilitando a realização das análises laboratoriais. Sua disponibilidade, confiança e dedicação à ciência são admiráveis.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP, Câmpus Jaboticabal, por ter sido meu lar acadêmico durante esse período, proporcionando oportunidades inestimáveis de crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudos concedida, fundamentais para realização desta pesquisa e minha formação como cientista.

Ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP

- Jaboticabal, em especial ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), por ter sido meu espaço de aprendizado e trabalho ao longo desses anos. Agradeço a cada profissional, desde professores e médicos veterinários residentes e pós-graduandos até funcionários, colaboradores, enfermeiros, que, direta ou indiretamente, contribuíram para este projeto.

Aos meus colegas do SOV, pelo apoio, pela amizade e parceria no cuidado com os nossos pacientes oncológicos. Além dos aprendizados acadêmicos, foi uma experiência enriquecedora e marcante estar com vocês. Agradeço especialmente àqueles que compartilharam comigo tantos momentos desta jornada.

À minha querida amiga Noelia Talavera, parceira de todas as horas, dentro e fora da academia. Com você, enfrentei atendimentos oncológicos desafiadores no SOV, aulas, cursos, seminários, congressos, estudos e pesquisas, mas também celebrei conquistas e encontrei suporte incondicional. Sua amizade tornou esta caminhada muito mais leve e significativa. Só nós sabemos, né amiga!? Te amo hoje e sempre!

À equipe do Laboratório de Carcinogênese Urotelial e Imunoterapia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – SP, pela parceria, ensinamentos, auxílio na confecção das lâminas e análises imuno-histoquímicas. Em especial, agradeço a Alexandra, Gabriela Oliveira, Gabriela Camargo, Beatriz, Carol, Manu e Bruna, que, com generosidade e comprometimento, foram essenciais para a execução desta pesquisa. Muito obrigada!

Aos pacientes desse estudo, aqueles que conheci e tratei, e os que, mesmo sem conhecer pessoalmente, fizeram parte desta pesquisa por meio de seus dados clínicos. Meu desejo é que, com o trabalho realizado, tenha contribuído para proporcionar mais conforto, qualidade de vida e esperança para cada um deles e para tantos outros animais no futuro.

Ao meu namorado, Felipe, por chegar no momento em que eu mais precisava. Mesmo não tendo acompanhado toda essa trajetória, esteve presente nos momentos finais, oferecendo carinho, amor, compreensão e suporte. Obrigada por dividir esse período comigo e por tornar tudo mais leve.

Aos meus amigos e amigas de Curitiba/PR, minha amada cidade natal, que sempre se fizeram presentes, mesmo à distância. Em especial, agradeço as minhas

irmãs de coração: Bruna Rubert, Marina Rodacki, Paola da Silva, Thayana Queiroz, Vanessa Grendel e Marina Castilhos Martins. Nossa amizade transcende o tempo e a distância. Obrigada por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!

Um agradecimento especial ao Daniel Rocha, sócio do laboratório R.D Patologia Veterinária em Curitiba-PR, pela amizade e parceria, além da disponibilidade e auxílio com minhas dúvidas nas análises imuno-histoquímica deste experimento. Sua ajuda foi fundamental!

Por fim, mas com um espaço único no meu coração, agradeço às minhas fiéis companheiras: Tarsila, Nina e Sagú. Pelo amor incondicional, pela companhia nos dias bons e nos difíceis, pelo carinho silencioso que tantas vezes foi meu refúgio. Vocês tornam minha vida mais leve e completa. Sinto muito pela minha ausência em muitos momentos dessa jornada acadêmica.

Em especial, à minha amada Tarsila. Desde 2008, quando entrou na minha vida, esteve comigo em cada passo dessa jornada. Me acompanhou desde o primeiro ano da faculdade de Medicina Veterinária, passou ao meu lado pela residência, pós-graduação, mestrado e agora doutorado. Em cada desafio e conquista, lá estava você, me lembrando do verdadeiro significado de lealdade e amor. Hoje, já com seus 16 anos, sigo fazendo tudo o que está ao meu alcance para te proporcionar felicidade e qualidade de vida, assim como você fez e ainda faz por mim. Nossa história juntas é um presente que levo comigo para sempre.

Espero retribuir todo esse amor não apenas a vocês, minhas meninas, mas também a cada animal que cruzar meu caminho ao longo da vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo Principal.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Melanoma oral canino (MOC).....	5
3.2 Microambiente do melanoma oral canino e marcadores imunológicos	7
3.3 Imunoscore.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Aspectos éticos	12
4.2 Seleção de amostras	12
4.3 Critérios de inclusão	13
4.4 Critérios de exclusão	13
4.5 Análise Imuno-histoquímica.....	13
4.6 Desenvolvimento dos imunosscores	16
4.7 Análise Estatística	17
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Caracterização demográfica dos cães com melanoma oral	20
5.2 Análise das variáveis categóricas de cães com melanoma oral.....	21
5.3 Análise das variáveis contínuas (numéricas) de cães com melanoma oral....	23
5.4 Comparação da sobrevida entre grupos clínicos e histopatológicos.	24
5.5 Análise da imunorreatividade do melanoma oral canino.	25
5.6 Correlação entre a sobrevida e os marcadores imuno-histoquímicos.	29

5.7	Intercorrelação entre os marcadores imuno-histoquímicos.	30
5.8	Comparação de perfis imunológicos e desfechos clínicos.	32
5.9	Análise dos imunosscores para melanoma oral canino.....	34
6.	DISCUSSÃO	42
6.1	Limitações do estudo.....	45
7.	CONCLUSÕES	46
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o projeto intitulado **"Análise do perfil imunológico através de imunoistoquímica para desenvolvimento de um imunoscóreo para melanoma oral em cães"**, protocolo n.º 004689/23, 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.

Vigência do Projeto	20/06/2023 a 20/12/2023
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	20
Peso / Idade	Qualquer peso
Sexo	Qualquer sexo
Origem	Amostras de tecido tumoral em blocos de parafina do laboratório de Patologia Animal da Unesp - Jaboticabal

Jaboticabal, 14 de junho de 2023.

Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

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

ANÁLISE DO PERFIL IMUNOLÓGICO ATRAVÉS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSCORE PARA MELANOMA ORAL EM CÃES

RESUMO - O melanoma oral canino (MOC) é a neoplasia maligna mais frequente na cavidade oral de cães, caracterizando-se pelo comportamento agressivo e prognóstico reservado. Este estudo teve como objetivo desenvolver um imunosscore para o MOC, avaliando o microambiente tumoral por meio da imuno-histoquímica e sua correlação com o estadiamento TNM e a sobrevida dos pacientes. Foram analisados prontuários clínicos e amostras histológicas de 16 cães atendidos no Hospital Veterinário da UNESP – Jaboticabal. O perfil imunológico foi determinado pela expressão de CD3, CD8, CD4, PD-L1, FOXP3, CD163, CTLA-4, CX3CR1, CD68 e Ki-67. Os resultados revelaram que 87,5% (14/16) dos pacientes era idosos, sem raça definida (50% - 8/16) e fêmeas castradas (68,7% - 11/16), predominando o estadiamento TNM III (81,2% - 13/16), com maior frequência de tumores na mandíbula caudal (43,7% - 7/16) e melanomas pigmentados (81,2% - 13/16). O microambiente apresentou perfil imunogênico, com altos níveis de CD8 e CD3, porém associado à expressão elevada de PD-L1 e moderada de CTLA-4 e FOXP3, indicando mecanismos de evasão imunológica. A baixa expressão de CX3CR1, CD163, CD68 e CD4 sugere menor recrutamento de células auxiliares. Foram desenvolvidos quatro modelos de imunosscore, baseados e adaptados de literatura precedente. O binário apresentou associação significativa com maior probabilidade de sobrevida na curva de Kaplan-Meier ($p = 0.00023$). O trinário não demonstrou associação com o prognóstico ($p = 0.1827$). O Imunosscore denominado como S1 apresentou melhor capacidade de discriminação prognóstica, enquanto o S2 não foi estatisticamente significativo ($p = 0.62$). O imunosscore binário e o S1 mostraram potencial para estratificação prognóstica, complementando a classificação TNM e contribuindo na tomada de decisões terapêuticas. No entanto, devido ao baixo tamanho amostral, estudos futuros são necessários para validar esses achados e avaliar a aplicabilidade clínica do imunosscore na oncologia veterinária.

Palavras-chave: oncologia veterinária, cães, imuno-oncologia, imunosscore, melanoma oral, microambiente tumoral.

ANALYSIS OF THE IMMUNE PROFILE THROUGH IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR THE DEVELOPMENT OF AN IMMUNOSCORE FOR ORAL MELANOMA IN DOGS

ABSTRACT - Canine oral melanoma (MOC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity in dogs, characterized by aggressive behavior and poor prognosis. This study aimed to develop an immunoscore for MOC by evaluating the tumor microenvironment through immunohistochemistry and assessing its correlation with TNM staging and patient survival. Medical records and histological samples from 16 dogs treated at the Veterinary Hospital of UNESP – Jaboticabal were analyzed. The immune profile was determined based on the expression of CD3, CD8, CD4, PD-L1, FOXP3, CD163, CTLA-4, CX3CR1, CD68, and Ki-67. The results showed that 87.5% (14/16) of the patients were elderly, 50% (8/16) were mixed-breed, and 68.7% (11/16) were spayed females, with a predominance of TNM stage III (81.2% – 13/16), tumors located in the caudal mandible (43.7% – 7/16), and pigmented melanomas (81.2% – 13/16). The tumor microenvironment exhibited an immunogenic profile with high CD8 and CD3 expression but was also associated with elevated PD-L1 and moderate CTLA-4 and FOXP3 expression, indicating immune evasion mechanisms. Low expression of CX3CR1, CD163, CD68, and CD4 suggested limited recruitment of auxiliary immune cells. Four immunoscore models were developed, based on and adapted from previous literature. The binary model showed a significant association with higher survival probability in the Kaplan-Meier curve ($p = 0.00023$). The ternary model showed no association with prognosis ($p = 0.1827$). The S1 immunoscore demonstrated better prognostic discrimination, while the S2 model was not statistically significant ($p = 0.62$). Both the binary immunoscore and S1 showed potential for prognostic stratification, complementing the TNM classification and assisting in therapeutic decision-making. However, due to the small sample size, further studies are needed to validate these findings and assess the clinical applicability of the immunoscore in veterinary oncology.

Keywords: veterinary oncology, dogs, tumor immunology, immunoscore, oral melanoma, tumor microenvironment.

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Anticorpos utilizados para o estudo de imuno-histoquímica.....	14
Quadro 2 - Resultado da classificação dos Imunoscores binário e trinário.....	35
Quadro 3 - Resultados e classificações dos imunoscores S1 e S2.....	38

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Dados demográficos de cães com melanoma oral.....	20
Tabela 2 - Frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas de cães com melanoma oral.....	21
Tabela 3 - Medidas-resumos das variáveis numéricas de cães com melanoma oral.....	23
Tabela 4 - Modelos de regressão logística entre a variável resposta “Estadiamento TNM” e os perfis imunológicos.....	33
Tabela 5 - Modelos de regressão linear múltiplos entre a variável resposta “Sobrevida” e os perfis imunológicos.....	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema ilustrativo do método e definição do imunoscore (extraído de Galon <i>et al.</i> 2012a).....	10
Figura 2 - Médias de imunorreatividade total em melanoma oral canino.....	25
Figura 3 - Gráfico de barra da distribuição dos marcadores CD3, CD4 e CD8.....	26
Figura 4 - Correlação entre a média de imunorreatividade e os marcadores.....	27
Figura 5 - Comparação das imunorreatividades de CD3, CD4 e CD8.....	28
Figura 6 - Correlação de Spearman entre marcadores imuno-histoquímicos e sobrevida de cães com melanoma oral.....	29
Figura 7 - Correlação de Spearman entre marcadores imuno-histoquímicos de cães com melanoma oral.....	30
Figura 8 - Dendrograma de clusterização hierárquica para os marcadores CD3 e CD8.....	35
Figura 9 - Gráficos boxplot para a relação dos Imunoscores binário e trinário com a sobrevida.....	36
Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier de Sobrevida X Imunoscore Binário...	37
Figura 11 - Distribuição do imunoscore 1 (IS1) por categoria.....	39
Figura 12 - Distribuição do imunoscore 2 (IS2) por categoria.....	39
Figura 13 - Curva de Kaplan-Meier de Sobrevida para imunoscore 1 (IS1).....	41
Figura 14 - Curva de Kaplan-Meier de Sobrevida para imunoscore 2 (IS2).....	42

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um local frequentemente acometido por neoplasias em cães e gatos, representando 6% de todos os tumores em cães e 3% em gatos (de Nardi *et al*, 2016). Entre os tumores orais malignos, o melanoma é o mais comum em cães, enquanto o carcinoma de células escamosas (CCE) predomina em gatos (Mikiewicz *et al*, 2019).

Em cães, as neoplasias melanocíticas apresentam um comportamento biológico notavelmente variável, abrangendo desde melanocitomas cutâneos benignos até melanomas orais altamente malignos, com capacidade significativa de metástase para gânglios linfáticos e órgãos internos (Smedley *et al*, 2022).

O melanoma oral em cães é particularmente desafiador, e associado a prognósticos desfavoráveis. Essas lesões apresentam comportamento localmente invasivo, causando lise óssea e inflamação grave nos tecidos moles circundantes. O prognóstico varia de acordo com o tamanho do tumor primário, envolvimento dos linfonodos regionais e a presença de metástases distantes, com tempos médios de sobrevida relativamente curto, variando de 4 a 8 meses (Kim *et al*, 2021). Diante disso, a identificação de marcadores prognósticos e preditivos é de grande interesse na medicina veterinária, especialmente para neoplasias heterogêneas como o melanoma oral canino (MOC).

A avaliação das características do microambiente tumoral e do perfil imunológico tem demonstrado potencial para aprimorar a precisão prognóstica e possibilitar o desenvolvimento de terapias personalizadas (Garcia *et al*, 2022). Estudos recentes destacam que o tumor deve ser analisado não como uma entidade isolada, mas em relação ao seu microambiente e à resposta imune do hospedeiro. Essa abordagem contribui para determinação da progressão tumoral e para o prognóstico do paciente. Nesse contexto, o imunosscore tem se destacado como uma ferramenta amplamente estudada, particularmente no câncer colorretal humano, onde é incorporado pelos clínicos juntamente com o estágio TNM como um marcador preditivo e prognóstico (Furguele *et al*, 2022). O Imunosscore é um sistema de classificação imunológica baseado na quantificação dos linfócitos infiltrantes no tumor, utilizado para prever prognóstico e resposta terapêutica (Galon *et al*, 2012).

Este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de desenvolvimento de um imunoscore para o MOC e sua correlação com os estágios TNM estabelecidos. Essa abordagem visa aprimorar a capacidade prognóstica e oferecer subsídios para decisões terapêuticas mais assertivas.

Embora a cirurgia seja a base do tratamento, acompanhada frequentemente de radioterapia adjunta para controle local, a eficácia da quimioterapia é limitada e não oferece benefícios adicionais de sobrevida em relação à cirurgia. Alternativas como a eletroquimioterapia têm sido estudadas e propostas, enquanto a imunoterapia surge como a modalidade mais promissora na extensão dos tempos médios de sobrevida quando adjunta a cirurgia (Pazzi *et al*, 2022). Entretanto, ainda há necessidade de avaliações mais robustas que correlacionem as características imunológicas do tumor com o prognóstico.

Os linfócitos infiltrantes do tumor (TILs) têm um papel crucial na imunidade antitumoral. No MOC, a avaliação dos TILs pode contribuir significativamente para prever a agressividade tumoral e o prognóstico do paciente (Yasumaru *et al*, 2021). Análises retrospectivas de grandes coortes de pacientes com câncer demonstraram o impacto prognóstico do componente imunológico nos tumores, com o imunoscore emergindo como um teste robusto e amplamente aplicável na prática clínica. Além disso, o conhecimento do perfil imunológico pode auxiliar na previsão da resposta a diferentes terapias e abrir novas possibilidades terapêuticas antitumorais (Galon *et al*, 2014).

Diante desse cenário, a presente pesquisa propôs responder à seguinte questão: o desenvolvimento de um imunoscore para o MOC e sua correlação com os estágios TNM estabelecidos representam uma abordagem eficaz para o prognóstico e orientação terapêutica dessa neoplasia? A relevância desse estudo é reforçada pela limitada eficácia terapêutica atual e pelas altas taxas de morbidade e mortalidade associadas ao MOC. A detecção tardia e as opções terapêuticas restritas representam desafios significativos para médicos veterinários e tutores de animais de companhia. Esta pesquisa, além de ser pioneira na aplicação do imunoscore na medicina veterinária, tem potencial de beneficiar diretamente os pacientes caninos e seus cuidadores ao proporcionar uma base sólida para decisões terapêuticas mais

precisas. Do ponto de vista científico, o estudo contribui para elucidação dos mecanismos biológicos do MOC e para o avanço da oncologia veterinária.

Com base nessas premissas, a presente pesquisa formulou a hipótese de que o imunoscore é um preditor significativo de sobrevida em cães com melanoma oral, sendo capaz de fornecer informações adicionais ao estadiamento tradicional. Se confirmada, essa abordagem poderá representar um avanço na estratificação prognóstica e no manejo clínico dos pacientes, auxiliando na tomada de decisões terapêuticas mais individualizadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Desenvolver um imunoscore para o melanoma oral canino (MOC) por meio de análises de imuno-histoquímica, utilizando diferentes modelos baseados na densidade e interação de marcadores imunológicos, e avaliar seu valor prognóstico em comparação com o estadiamento TNM.

2.2 Objetivos específicos

- Conduzir um estudo clínico retrospectivo para avaliar o estadiamento TNM e tempo de sobrevida global de cães diagnosticados com melanoma oral.
- Analisar o perfil linfocitário do MOC por meio de imuno-histoquímica, utilizando os marcadores CD3, CD4 e CD8.
- Classificar os melanomas orais em cães em dois grupos de perfil imunológico:
 - Resposta imunossupressora: avaliada por FOXP3 e CD163.
 - Resposta citotóxica: avaliada por CD68, CX3CR1, PD-L1 e CTLA4.
- Desenvolver e aplicar quatro modelos de imunoscore:
 - Imunoscore binário, baseado na densidade de CD3 e CD8, categorizando os pacientes em *High* e *Low*.

- Imunoscore trinário, também baseado em CD3 e CD8, com categorização em *Low*, *Intermediate* e *High*, segundo os percentis 33% e 66%.
- Imunoscore S1, calculado pela razão entre os marcadores de resposta citotóxica (CD8 e CX3CR1) e de imunossupressão (CD163 e FOXP3).
- Imunoscore S2, um modelo ampliado que utiliza CD8, CD3 e CX3CR1 no numerador, e CD163, FOXP3 e PD-L1 no denominador, refletindo de forma abrangente o equilíbrio entre a ativação imune e os mecanismos de evasão imunológica tumoral.
- Correlacionar os perfis imunológicos e os imunoscores desenvolvidos com o estadiamento TNM.
- Avaliar a correlação dos imunoscores com o tempo de sobrevida dos pacientes verificando seu valor prognóstico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Melanoma oral canino (MOC)

O melanoma é a neoplasia oral maligna mais comum em cães, representando entre 30% e 40% de todas as neoplasias orais caninas e cerca de 7% de todos os tumores malignos em cães (Prouteau e André, 2019; Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022). Não há predileção por gênero, mas há uma associação significativa com maior pigmentação da mucosa oral (Scattone *et al.*, 2021; Prouteau e André, 2019). Ele é frequentemente diagnosticado em raças como poodles, golden retrievers, dachshunds, terriers escoceses e chow chows, com maior prevalência em cães de meia-idade a idosos (De Carvalho *et al.*, 2022). Os locais mais comuns de ocorrência incluem gengiva, lábios, língua, palato duro e tonsilas, em ordem decrescente de frequência (Mikiewicz *et al.*, 2019).

As neoplasias melanocíticas em cães apresentam um espectro biológico amplo, desde melanocitomas cutâneos benignos até melanomas orais altamente malignos, que possuem grande propensão para metástases em linfonodos regionais e órgãos internos (Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022). Embora o diagnóstico de melanomas pigmentados seja relativamente simples com aspirado por agulha fina, a confirmação diagnóstica e um prognóstico preciso exigem biópsia cirúrgica e análise histopatológica, especialmente em casos de melanomas amelanóticos (Fonseca-Alves *et al.*, 2021; Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022).

A etiologia exata do MOC permanece desconhecida, mas fatores genéticos e predisposição racial são apontados como possíveis contribuintes. Diferente do melanoma cutâneo humano, a exposição à radiação ultravioleta não é considerada um fator etiológico relevante no MOC (Prouteau e André, 2019; Silveira *et al.*, 2021). Estudos sugerem que bactérias associadas à doença periodontal, como *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*, podem atuar como fatores de risco (de Carvalho *et al.*, 2022). Por outro lado, não há evidências que associem o papilomavírus canino ao desenvolvimento do MOC (de Carvalho *et al.*, 2022).

Fatores de risco adicionais incluem idade avançada (10 - 11 anos), maior pigmentação da mucosa oral e a raça do animal. Os sinais clínicos do MOC incluem

o aparecimento de massas orais com ou sem pigmentação, que podem variar de pequenas e escuras a grandes e planas. Outros sintomas incluem halitose, disfagia, salivação excessiva, sangramento e, em casos avançados, fraturas ósseas devido à invasão local do tumor (Prouteau e André, 2019; Kim, Vinayak e Powers, 2021). A lise óssea e a inflamação dos tecidos moles circundantes são manifestações comuns do comportamento invasivo do MOC (Kim, Vinayak e Powers, 2021).

O diagnóstico é baseado na análise histopatológica e imuno-histoquímica. Melanomas pigmentados geralmente apresentam diagnóstico direto, enquanto melanomas amelanóticos requerem imuno-histoquímica com anticorpos específicos, como Melan-A, PNL-2 e TRP-1 (Fonseca-Alves *et al.*, 2021; Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022). A avaliação dos linfonodos sentinelas, por meio de técnicas seriadas e imuno-histoquímica, é essencial para determinar a extensão da doença (Fonseca-Alves *et al.*, 2021; Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022).

O tratamento primário para o MOC é a ressecção cirúrgica com margens amplas. Em casos de margens cirúrgicas estreitas ou incompletas, a radioterapia adjuvante pode ser utilizada para controle local, melhorando o tempo médio de sobrevida (Kim, Vinayak e Powers, 2021; Pazzi, Steenkamp e Rixon, 2022). A quimioterapia, embora com eficácia limitada em melhorar a sobrevida, pode ser combinada à radioterapia em casos avançados (Kim, Vinayak e Powers, 2021).

A imunoterapia tem emergido como uma abordagem promissora, especialmente quando combinada com cirurgia. Vacinas para melanoma canino, que utilizam terapia genética e vacinação autóloga, têm demonstrado potencial em prolongar a sobrevida em pacientes com MOC (Fonseca-Alves *et al.*, 2021; Palma *et al.*, 2021).

O prognóstico é geralmente reservado, com tempos médios de sobrevida variando de 3 a 24 meses, dependendo do estágio da doença e da modalidade terapêutica empregada (Prouteau e André, 2019; Pazzi, Steenkamp e Rixon, 2022). Tumores orais apresentam os piores prognósticos, especialmente quando associados à metástase linfonodal ou pulmonar, invasão óssea e alta taxa mitótica (mais de 4 mitoses por 10 campos) (Prouteau e André, 2019; Silveira *et al.*, 2021). Critérios patológicos como baixa pigmentação, atipia nuclear elevada e altos níveis de Ki-67 (>19,5%) também estão associados a desfechos desfavoráveis (Prouteau e André,

2019). Apesar disso, melanomas orais bem diferenciados e de crescimento lento podem ter prognósticos mais favoráveis (Prouteau e André, 2019).

A pesquisa no MOC busca identificar novas estratégias terapêuticas e prognósticas, utilizando abordagens translacionais entre humanos e cães. Estudos genômicos e moleculares comparativos têm o potencial de revelar alvos terapêuticos compartilhados, enquanto a análise do microambiente tumoral, incluindo linfócitos infiltrantes, pode abrir caminho para imunoterapias mais eficazes (Palma *et al.*, 2021; Brocca *et al.*, 2019). A exploração de vias de sinalização específicas, como as envolvidas na progressão tumoral, promete avanços no desenvolvimento de terapias personalizadas (Silveira *et al.*, 2021). A melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao MOC é essencial para melhorar o manejo dessa doença altamente agressiva.

3.2 Microambiente do melanoma oral canino e marcadores imunológicos

O microambiente tumoral do MOC é altamente complexo, composto por uma variedade de células e vias de sinalização que desempenham papéis fundamentais na progressão tumoral e na resposta imune (Prouteau e André, 2019; de Carvalho *et al.*, 2022). Entre os elementos celulares presentes no microambiente, destacam-se os linfócitos infiltrantes do tumor (TILs), que incluem linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD20+) e subpopulações como linfócitos T CD8+ e T CD4+ (Silveira *et al.*, 2021; de Carvalho *et al.*, 2022). A presença de TILs está associada à resposta imunológica antitumoral, sendo que padrões de infiltração "viva", caracterizados por maior densidade de linfócitos T CD8+ e menor presença de células T reguladoras (Tregs, CD4+/CD25+/FoxP3+), estão relacionados a melhor prognóstico e maior sobrevida (Scattone *et al.*, 2021). Em contrapartida, uma infiltração abundante de Tregs favorece a imunossupressão, correlacionando-se com desfechos clínicos desfavoráveis (Prouteau e André, 2019).

Além dos TILs, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) também desempenham um papel relevante, com altos níveis de macrófagos CD204+, CD163+ e Iba1+ no estroma tumoral estando associados a pior prognóstico (Prouteau e André, 2019; de Carvalho *et al.*, 2022). Esses macrófagos podem influenciar o microambiente

de forma pró ou antitumoral, dependendo de sua polarização. Outros componentes celulares, como células mieloides supressoras (MDSCs), são ativados por vias como a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), promovendo imunossupressão no microambiente tumoral (Guillén *et al.*, 2021).

As células tumorais primárias do MOC, os melanócitos neoplásicos, apresentam características que refletem o comportamento agressivo do tumor, incluindo variabilidade na pigmentação, alta atipia nuclear e proliferação na junção dermoepidérmica (de Carvalho *et al.*, 2022; Nordio *et al.*, 2021). Essas características, em combinação com a infiltração de outras células estromais, como fibroblastos e células endoteliais, contribuem para a evolução tumoral (Kim, Vinayak e Powers, 2021).

Além disso, a via PD-1/PD-L1 é um mecanismo crucial de imunoevasão, no qual a expressão de PD-L1 por células tumorais e imunológicas inibe a ativação de linfócitos T, mas que pode ser revertida pelo bloqueio terapêutico dessa via (Fonseca-Alves *et al.*, 2021). Outras vias imunossupressoras, como a mediada por CTLA-4 e IDO, desempenham papéis semelhantes, criando um ambiente que favorece o crescimento tumoral (Guillén *et al.*, 2021; Porcellato *et al.*, 2021).

Diversos marcadores prognósticos foram identificados no MOC, abrangendo aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares. O estadiamento clínico, baseado no sistema TNM, continua sendo um dos principais parâmetros prognósticos, com tumores em estágios avançados e presença de metástases linfonodais ou distantes associados a piores desfechos (Prouteau e André, 2019; Silveira *et al.*, 2020). O tamanho e a localização do tumor também influenciam o prognóstico, sendo que tumores maiores e localizados na maxila ou mandíbula frequentemente apresentam comportamento mais agressivo (Scattone *et al.*, 2021; Mikiewicz *et al.*, 2019).

Os marcadores moleculares e imuno-histoquímicos, como Ki-67, MELAN-A, PD-L1 e FoxP3, têm sido amplamente investigados por sua relevância na estratificação de risco. A alta expressão de Ki-67, por exemplo, está associada a alta proliferação celular e pior prognóstico, enquanto a expressão de PD-L1 está correlacionada à imunossupressão e à evasão imune (Prouteau e André, 2019; Fonseca-Alves *et al.*, 2021; Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022).

O microambiente tumoral do MOC também inclui vias metabólicas e de sinalização que modulam a progressão da doença. Genes relacionados ao metabolismo da matriz extracelular, como CCND1, e mecanismos de angiogênese são essenciais para o crescimento tumoral e a formação de metástases (Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022; Smedley *et al.*, 2022). Adicionalmente, a compreensão dessas vias de sinalização tem possibilitado o desenvolvimento de terapias direcionadas, como imunoterapias e inibidores específicos para as vias MAPK, KIT e PD-1/PD-L1 (Smedley, Sebastian e Kiupel, 2022; Fonseca-Alves *et al.*, 2021; Porcellato *et al.*, 2021).

A interação entre as células tumorais e o microambiente tumoral é essencial para a progressão do melanoma oral canino. O entendimento detalhado dessas interações e das vias de sinalização subjacentes tem o potencial de melhorar a estratificação prognóstica e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direcionadas, como imunoterapias e terapias antiangiogênicas (de Carvalho *et al.*, 2022; Guillén *et al.*, 2021; Smedley *et al.*, 2022).

3.3 Imunoscore

O conceito de imunoscore foi desenvolvido como uma resposta à necessidade de aprimorar a classificação prognóstica de tumores, indo além do tradicional sistema TNM (tumor, nódulos, metástase). Entre 2012 e 2015, o Conselho “*Worldwide Imunoscore*”, composto por 23 centros de pesquisa de 17 países e envolvendo mais de 3.000 pacientes, realizou um estudo retrospectivo mundial para validar o uso do imunoscore no câncer colorretal. Com o apoio do Conselho Mundial de Imunoterapia (WIC), da Sociedade de Imunoterapia do Câncer (SITC) e outras organizações, o imunoscore foi formalizado como uma ferramenta complementar ao sistema TNM, sendo designado como TNM-I (TNM Imunoscore) (Galon, 2017).

Esse sistema de pontuação inovador baseia-se na quantificação de duas populações de linfócitos T (CD3/CD45R0, CD3/CD8 ou CD8/CD45R0), localizadas tanto no centro do tumor quanto na margem invasiva (figura 1). O imunoscore classifica a densidade desses linfócitos em uma escala de 0 (baixa densidade em ambas as regiões) a 4 (alta densidade em ambas as regiões), permitindo prever de

forma mais precisa a sobrevida livre de doença, a sobrevida específica da doença e a sobrevida global, mesmo em estágios iniciais do câncer (Galon, 2017; Pagès *et al.*, 2018; Kirilovsky *et al.*, 2022). Estudos demonstraram que valores elevados de imunoscore estão associados a melhores prognósticos e menores riscos de recorrência, enquanto valores baixos indicam maior agressividade tumoral e piores desfechos clínicos (Bouquet *et al.*, 2022; Galon e Lanzi, 2020).

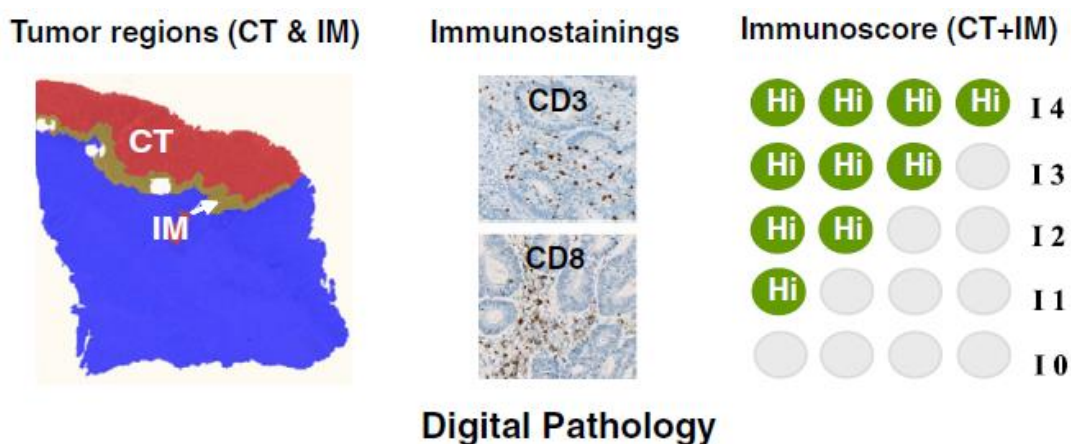


Figura 1: Esquema ilustrativo do método e definição do imunoscore (Fonte: Extraído de Galon *et al.* 2012^a).

A motivação para o desenvolvimento do imunoscore surgiu da limitação do sistema TNM em incorporar o papel crítico do microambiente imunológico na progressão tumoral. Estudos têm destacado a relevância da interação entre o tumor e a resposta imunológica adaptativa do hospedeiro, que influencia diretamente o comportamento biológico das neoplasias (Galon e Lanzi, 2020; Kirilovsky *et al.*, 2016; Galon *et al.*, 2014b). Assim, o imunoscore não apenas fornece um marcador prognóstico objetivo, mas também oferece insights valiosos sobre a biologia tumoral, facilitando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como imunoterapias baseadas em anti-CTLA4, anti-PD-1 e anti-PD-L1 (Mlecnik *et al.*, 2023; Galon e Lanzi, 2020; Marliot, Pagès e Galon, 2020).

A determinação do imunoscore segue uma metodologia rigorosa e padronizada. Primeiramente, amostras tumorais em blocos contendo o centro do tumor (CT) e a margem invasiva (MI) são selecionadas. As amostras, com espessura de 4 μ m, são submetidas à coloração imuno-histoquímica automatizada com

anticorpos específicos para CD3 e CD8. Em seguida, as lâminas são digitalizadas em alta resolução, e um software de patologia digital realiza a quantificação da densidade celular em ambas as regiões. Os resultados são convertidos em percentis, cuja média gera a pontuação final do imunosscore, categorizada em baixo, intermediário ou alto (Pagès *et al.*, 2018; Nassif *et al.*, 2021b; Wang *et al.*, 2023). Essa metodologia já foi incorporada à rotina diagnóstica em diversas instituições devido à sua alta precisão e reprodutibilidade (Galon, 2017).

Embora tenha sido inicialmente validado no câncer colorretal humano, onde é amplamente utilizado e recomendado por diretrizes clínicas como as da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO), o imunosscore tem demonstrado aplicabilidade como marcador prognóstico em outros tipos de câncer. Esses incluem melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de endométrio, câncer gástrico, câncer de fígado e câncer de próstata (Bouquet *et al.*, 2022; Kirilovsky *et al.*, 2022; Marliot, Lafontaine e Galon, 2019; Furgiele *et al.*, 2022). Apesar de seu uso consolidado, o imunosscore continua sendo uma ferramenta em evolução, com novas aplicações sendo exploradas no campo da oncologia, especialmente em relação ao uso combinado com imunoterapias e outras abordagens personalizadas (El Sissy *et al.*, 2020; Nassif *et al.*, 2021b; de Arruda Camargo *et al.*, 2024).

Em resumo, o imunosscore representa um avanço significativo na oncologia humana, integrando a resposta imunológica à avaliação prognóstica e terapêutica dos pacientes. Sua aplicabilidade prática, fundamentada em tecnologias modernas de imuno-histoquímica e patologia digital, reforça seu papel como uma ferramenta indispensável na oncologia de precisão, ampliando as perspectivas de tratamento e manejo de diversos tipos de câncer.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo teve um delineamento experimental observacional de caráter retrospectivo.

4.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Campus de Jaboticabal-SP, sendo conduzida de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), sob número de protocolo 004689/23.

4.2 Seleção de amostras

Foram analisados os prontuários clínicos (N=80) de pacientes que foram diagnosticados com melanoma oral entre o período de 2018 a 2023. Foram selecionados os casos (N=20) que cumpriam com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para este estudo, bem como as respectivas amostras histológicas dos tumores orais. Os casos e amostras foram, respectivamente, provenientes do serviço de oncologia veterinária (SOV) do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HVGLN) e do Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP) "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Jaboticabal – SP.

O tempo de sobrevida foi estabelecido a partir do dia do diagnóstico histopatológico até o dia do óbito do paciente, independente da causa da morte. Para o prontuário clínico que não continha a informação relacionada ao óbito, foi entrado em contato via telefonema para se obter maiores informações sobre os pacientes e sua data de óbito. Somente um paciente não foi possível o contato telefônico, estabelecendo assim a sua data final (possível óbito) na última data que o paciente foi atendido no HVGLN.

4.3 Critérios de inclusão

- Casos clínicos de cães com melanoma oral diagnosticados por histopatologia;
- Casos clínicos e prontuários que estivessem com os dados completos e de acordo com o estadiamento TNM.

4.4 Critérios de exclusão

- Casos clínicos de cães com suspeita de melanoma oral, porém sem diagnóstico histopatológico;
- Casos clínicos e prontuários com dados incompletos e/ou sem informações pertinentes ao estadiamento TNM dos pacientes.

4.5 Análise Imuno-histoquímica

Os procedimentos para realização da imuno-histoquímica foram realizados, entre dezembro de 2023 e outubro de 2024, no Laboratório de Carcinogênese Urotelial e Imunoterapia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – SP. Os cortes histológicos dos blocos de parafina com a amostra tumoral foram realizados em micrótomo semiautomático Slee CUT5062 RM 2165 (Slee Mainz, Mainz, Alemanha), com espessura de 5 µm e colocadas em lâminas silanizadas. Na sequência, permaneceram em estufa *overnight* à 37°C, sendo posteriormente reidratados em diluições crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e seguido para as reações de colorações específicas para histologia, com hematoxilina e eosina (HE).

Para imuno-histoquímica, a recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato (pH 6,0) em micro-ondas a 100°C e 800W de potência por 15 minutos. Esse procedimento foi seguido pelo bloqueio da peroxidase endógena usando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% por 15 minutos. O bloqueio da ligação de proteínas inespecíficas foi realizado com uma solução de soro de cabra 5% em tampão TBS-T à temperatura ambiente por 30 minutos. Subsequentemente, a imuno marcação de antígenos como CD3, CD8, CTLA4, CX3CR1, PD-L1, FOXP3, CD163, CD68, Ki-67 E CD4 foi realizada usando anticorpos específicos (Quadro 1) que foram

diluídos em soro de cabra a 1%, com exceção do CD3 que era *ready to use*. Posteriormente os cortes foram incubados a 4°C *overnight*. Para os controles negativos foi omitida a etapa de incubação com os anticorpos e foi realizada a incubação dos cortes com tampão TBS-T. Como controles positivos foram utilizadas amostras caninas de linfonodo (CD3, CD4, CD8, FOXP3, CTLA4 e Ki-67) e de baço (CD163, PD-L1, CD68 e CX3CR1).

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para o estudo de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Clone	Empresa	Diluição	Tipo de Marcação	Sistema de detecção
Anti-CD3	F7.2.38	Dako Denmark A/S	Pronto pra uso	Citoplasma e/ou Membrana	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-CD8	NBP2-12523	Novus Biologicals	1:50	Citoplasma e/ou Membrana	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-CTLA-4	F-8	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Citoplasma e/ou Membrana	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-CX3CR1	B-7	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Membrana	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-CD274/PD-L1	D-8	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Membrana	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-FOXP3	2A11G9	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Nuclear	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-CD163	ED2	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Membrana	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-CD68	815CU17	Novus Biologicals	1:100	Citoplasma	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-Ki-67	13523	Biorbyt	1:50	Nuclear	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)
Anti-CD4	NBP 119371-0	Novus Biologicals	1:100	Membrana	EasyLink One Polymer HRP (EP-12-20504, EasyPath)

Fonte: elaboração própria.

A detecção dos complexos antígeno-anticorpo foi realizada (de acordo com as instruções do fabricante) utilizando o kit *EasyLink One Polymer HRP*, que se liga ao anticorpo primário. As secções de tecido tumoral foram expostas a um anticorpo

secundário conjugado com peroxidase de rábano (HRP) do kit *EasyLink One Polymer HRP IHC* por 40 minutos, e após foram enxaguadas com tampão TBS-T.

Para visualização da imuno marcação foi escolhido o cromógeno 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC), 90% tech em pó, devido a sua coloração vermelho/magenta, sendo possível assim a diferenciação das células imunorreativas das células de pigmento marrom, característico dos melanócitos presentes no melanoma.

Para dissolução do AEC foi utilizado N,N-Dimethylformamide (DMF) para uma concentração de 10mg/ml, e mantida esta solução em refrigeração a 4°C, de acordo com as instruções do fabricante. Logo antes do uso, esta solução de AEC era diluída no *buffer* do cromógeno DAB, numa concentração de 1,2mg/ml, para então ser aplicado às amostras, sendo incubadas com o cromógeno por 10-20min. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris.

O cromógeno AEC é solúvel em álcool e xilol, sendo necessário o uso de um meio de montagem de lâmina aquoso, como escolhido para esse estudo o glicerol gelatinado.

Após a secagem das lâminas, foram visualizadas e avaliadas em um microscópio Olympus BX53 equipado com uma câmera Olympus DP73. Através do *software* CellSens Standard, dez (10) campos em aumento de 400x (2,37mm²) foram selecionados e fotografados para cada paciente e anticorpo, para avaliar a intensidade de imunorreatividade do antígeno no tecido tumoral.

Inicialmente, foram selecionadas 20 amostras para o estudo; entretanto, quatro lâminas apresentaram intensa pigmentação tumoral, que não pôde ser adequadamente removida, mesmo após a aplicação de diferentes técnicas de despigmentação (bleaching de melanina). Essa limitação comprometeu a visualização e a diferenciação celular, levando à exclusão dessas amostras das análises imunohistoquímicas, o que resultou em um total final de 16 amostras analisadas (N = 16).

A análise quantitativa da imunorreatividade foi realizada utilizando o *software* ImageJ (versão 1.54g). As imagens obtidas das lâminas foram submetidas ao plugin de deconvolução de cores *Color Deconvolution* (Ruifrok and Johnston, 2001), que permite separar os diferentes canais de cor presentes na coloração histológica, isolando especificamente o canal correspondente ao cromógeno AEC (vermelho).

Esse processo facilita a quantificação precisa do sinal cromogênico, eliminando a influência da contra-coloração (hematoxilina).

Após a deconvolução, o software gerou a porcentagem de contribuição de cada categoria de intensidade de marcação: *High Positive*, *Positive*, *Low Positive* e *Negative*, de acordo com a densidade do cromógeno presente na imagem. O valor de “*Percentage contribution of Negative*” representa a proporção da área analisada que não apresentou imunomarcação. Dessa forma, a imunorreatividade total foi calculada subtraindo-se este valor de 100%, representando a fração da área tecidual com imunomarcação positiva para o anticorpo avaliado. Este método quantifica a densidade de sinal cromogênico em relação à área total da imagem e não corresponde diretamente à contagem individual de células, sendo indicado para amostras tumorais com heterogeneidade histológica, como biópsias e peças cirúrgicas. As fotomicrografias estão disponíveis na sessão “Anexo”.

4.6 Desenvolvimento dos imunosscores

O desenvolvimento dos Imunosscores foi baseado na adaptação dos modelos descritos por Galon et al. (2012), Pagès et al. (2018) e Galon e Lanzi (2020), amplamente utilizados na oncologia humana para estratificação prognóstica. Diferentemente do modelo original, que realiza a quantificação da densidade de linfócitos T no centro tumoral e na margem invasiva, no presente estudo essa distinção não foi aplicada. Tal decisão metodológica deve-se ao fato de que as amostras utilizadas eram provenientes de biópsias e peças cirúrgicas com alto grau de heterogeneidade histológica, impossibilitando a padronização da delimitação anatômica entre centro tumoral e margem invasiva. Dessa forma, a análise foi realizada considerando-se a totalidade da área tumoral disponível na lâmina histológica, sem discriminação específica de sublocais dentro do tumor.

Para os modelos binário e trinário, foram utilizados os marcadores CD3 e CD8, representativos da resposta linfocitária.

Adicionalmente, foram desenvolvidos dois modelos compostos de Imunosscore, IS1 e IS2, baseados na interação entre marcadores associados à resposta citotóxica

e à imunossupressão no microambiente tumoral, conforme metodologia adaptada de de Arruda Camargo et al. (2024). As equações utilizadas foram:

$$IS1 = \frac{CD8 + CX3CR1}{CD163 + FOXP3}$$

$$IS2 = \frac{CD8 + CD3 + CX3CR1}{CD163 + FOXP3 + PD - L1}$$

A categorização dos escores foi realizada em três grupos — Baixo ($IS < 0,5$), Intermediário ($0,5 \leq IS < 1$) e Alto ($IS \geq 1$) —, conforme critérios previamente descritos na literatura (de Arruda Camargo et al., 2024) e adaptados às características da presente amostra.

4.7 Análise Estatística

Os dados coletados foram compilados em tabelas e encaminhados para aplicação dos testes estatísticos. A análise estatística descritiva foi realizada com o objetivo de caracterizar o perfil da amostra, fornecendo um panorama geral das características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo. Para isso, foram avaliadas variáveis categóricas e contínuas, empregando-se estatísticas descritivas adequadas conforme a distribuição dos dados. As variáveis contínuas foram analisadas quanto à distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis com distribuição normal ($p > 0,05$), os dados foram descritos por média $\pm$ desvio padrão (DP), enquanto para aquelas com distribuição não normal ($p < 0,05$), os valores foram expressos por mediana.

As variáveis coletadas referem-se às características do tumor, como o estadiamento TNM, localização e tamanho, diagnóstico, status linfonodal, além das médias de imunorreatividade total de 10 marcadores: CD3, CD8, CTLA4, CX3CR1, PD-L1, FOXP3, CD163, CD68, Ki-67 e CD4. Também foram obtidas informações a respeito da sobrevida dos pacientes (em dias).

As médias de imunorreatividade total foram calculadas a partir da análise de 10 campos de cada amostra, selecionados de forma aleatória. Para garantir a integridade

dos dados e evitar distorções na análise estatística, foram empregados dois métodos para a detecção de outliers: Intervalo Interquartil (IQR) e Z-score. Cada método possui características distintas e complementares para identificação de valores discrepantes.

O IQR é um método robusto que avalia a dispersão dos dados com base na mediana e nos quartis, permitindo a identificação de valores atípicos. Para isso, foram estabelecidos limites estatísticos, considerando como outliers potenciais os valores abaixo do limite inferior ou acima do limite superior. O Z-score quantifica a posição relativa de cada valor em relação à média da amostra, medindo o número de desvios-padrão de distância.

A remoção de outliers na análise de imunorreatividade foi realizada para evitar distorções na análise estatística, garantindo que os dados representassem com maior precisão o comportamento esperado das amostras. Valores discrepantes podem superestimar ou subestimar a média, comprometendo as interpretações dos resultados. Esse efeito é especialmente relevante quando o número de amostras é relativamente pequeno, tornando o impacto ainda maior. Além disso, outliers podem indicar subpopulações biológicas ou variações não representativas da tendência geral dos dados, justificando sua exclusão para uma análise mais confiável.

Para comparações entre dois grupos, foram priorizados os testes não-paramétricos devido ao pequeno tamanho amostral ($N = 16$), também resultando em mais liberdade e respeito das pressuposições de normalidade incutidas nos testes paramétricos. Foram utilizados os testes de Mann-Whitney U (para comparações entre dois grupos entre si) e Kruskal-Wallis para comparações entre grupos de variáveis com três ou mais níveis.

Para as variáveis contínuas, foram performados testes de correlação de Spearman, relacionando as variáveis numéricas com a sobrevida, bem como para todos os marcadores entre si.

A partir da divisão dos marcadores em três perfis imunológicos (perfil linfocitário, resposta imunossupressora e resposta citotóxica), foram utilizados modelos de regressão logística para verificar a relação entre os marcadores de cada perfil imunológico com o estadiamento TNM, bem como modelos de regressão linear para a relação entre os marcadores de cada perfil imunológico com a sobrevida.

No que diz respeito ao desenvolvimento do Imunoscore binário e trinário, estes foram desenvolvidos a partir dos marcadores CD3 e CD8, fazendo uso de clusters hierárquicos com os dados transformados em escala Z-score e considerando o método de agrupamento de Ward e a métrica da distância euclidiana. No caso do Imunoscore binário, o ponto de corte ideal apontado pelo método foi de 1,73. Já para o Imunoscore trinário, este utilizou os percentis 33% e 66%.

Para o desenvolvimento dos ImunoScores 1 (IS1) e 2 (IS2), baseados nos perfil imunológicos, foram utilizadas combinações de biomarcadores de modo a representar a atividade imunológica e imunossupressora no microambiente tumoral. Os valores obtidos foram posteriormente categorizados em três grupos: Alto (≥ 1), Intermediário ($0.5 \leq IS < 1$) e Baixo (< 0.5).

A avaliação dos ImunoScores foi realizada por meio de gráficos de barra e boxplot, permitindo a visualização da distribuição dos valores categorizados. Para verificar se havia associação entre os ImunoScores e variáveis clínicas, foram aplicados testes de Mann-Whitney U (para comparar os valores dos escores entre os grupos de estadiamento TNM II e III) e teste de Kruskal-Wallis, caso houvesse mais de dois grupos.

Além disso, a relação entre os ImunoScores e a sobrevida foi avaliada por meio de correlação de Spearman, analisando a associação entre os valores contínuos dos escores e o tempo de sobrevida.

Para investigar a influência dos ImunoScores sobre a sobrevida, foram submetidos à análise de Kaplan-Meier, sendo geradas curvas de sobrevivência para cada grupo. O teste de Log-Rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida entre os grupos e verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas.

Os gráficos de Kaplan-Meier apresentam as curvas de sobrevida com linhas diferenciadas por cor para cada categoria do ImunoScore, além da tabela "Number at Risk", que exhibe a quantidade de pacientes em risco ao longo do tempo. A interpretação dos resultados foi realizada considerando o formato das curvas, a separação entre os grupos e o valor de p obtido no teste de Log-Rank.

As tabelas, gráficos, testes estatísticos e modelos de regressão foram performados utilizando o software R Core Team (2023) e o nível α de significância considerado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização demográfica dos cães com melanoma oral

A Tabela 1 apresenta os dados demográficos dos 16 pacientes selecionados para o estudo, dos quais 4 (25,00%) eram machos e 12 (75,00%) eram fêmeas. Todos os pacientes pertenciam à faixa etária de adultos a idosos, com idade média de $12,38 \pm 3,26$ anos, variando entre 7 e 19 anos. Apenas dois pacientes apresentaram idade inferior a 10 anos, enquanto os demais (N = 14) apresentavam idade igual ou superior a 10 anos, com três pacientes com idade acima de 15 anos.

Tabela 1 - Dados demográficos de cães com melanoma oral.

Paciente	Idade	Raça	Sexo	Peso	Escore corporal (1-9)	Status reprodutivo
A	12	SRD	Macho	15,2	3	Inteiro
B	12	Lhasa Apso	Fêmea	4,6	3	Castrado
C	9	SRD	Fêmea	11,5	7	Castrado
D	15	York Shire	Macho	4,4	5	Castrado
E	12	Dachshound	Fêmea	4,8	4	Castrado
F	14	SRD	Fêmea	20	5	Castrado
G	19	Pinsher	Fêmea	3,5	4	Castrado
H	19	SRD	Macho	4	2	Castrado
I	12	SRD	Macho	15	8	Castrado
J	14	Fox Paulistinha	Fêmea	7,4	6	Castrado
K	7	Golden Retriever	Fêmea	45,5	8	Castrado
L	10	Pinscher	Fêmea	3,2	6	Castrado
M	12	SRD	Fêmea	7,9	4	Castrado
N	11	Labrador	Fêmea	46	8	Castrado
O	10	SRD	Fêmea	7,3	7	Castrado
P	10	SRD	Fêmea	9	6	Castrado

Fonte: Elaboração própria

Em relação à raça, verificou-se uma predominância de cães sem raça definida (SRD) (N = 8; 50,00%), seguidos por Pinscher (N = 2; 12,50%), Lhasa Apso (N = 1; 6,25%), Dachshund (N = 1; 6,25%), entre outras. O peso médio dos animais foi de $13,08 \pm 13,64$ kg, variando entre 3,2 kg e 46,0 kg.

O estado corporal, avaliado pelo escore de composição corporal (1-9), apresentou média de $5,38 \pm 1,93$. Quanto ao status reprodutivo, a maioria dos pacientes era castrado (N = 15; 93,75%), enquanto apenas um era inteiro (N = 1; 6,25%).

5.2 Análise das variáveis categóricas de cães com melanoma oral

A Tabela 2 apresenta a distribuição das variáveis categóricas, analisadas por meio de frequências absolutas e relativas (%).

Tabela 2 - Frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas de cães com melanoma oral.

Variável	Níveis	N	%
Estadiamento TNM	II	3	18.75%
Estadiamento TNM	III	13	81.25%
Localização	Mandíbula Caudal (esquerda)	4	25.00%
Localização	Mandíbula Caudal (direita)	3	18.75%
Localização	Maxila Medial (direita)	2	12.50%
Localização	Maxila Rostral (esquerda)	1	6.25%
Localização	Lábio Superior (esquerdo)	1	6.25%
Localização	Mandíbula Rostral (bilateral)	1	6.25%
Localização	Mandíbula Medial (direita)	1	6.25%
Localização	Maxila Medial (direita)	1	6.25%
Localização	Mandíbula Rostral (direita)	1	6.25%
Localização	Maxila caudal (direita)	1	6.25%
Tamanho	T3 (> 4 cm)	10	62.50%
Tamanho	T2 (2 – 4 cm)	5	31.25%
Tamanho	T1 (< 2 cm)	1	6.25%
Diagnóstico	Melanoma Amelânico oral	3	18.75%
Diagnóstico	Melanoma oral	6	37.50%
Diagnóstico	Melanoma oral (padrão misto)	4	25.00%
Diagnóstico	Melanoma oral (padrão epitelióide)	2	12.50%
Diagnóstico	Melanoma oral (padrão fusiforme)	1	6.25%
Margens	Comprometidas	7	43.75%
Margens	Não avaliado	6	37.50%
Margens	Livres	3	18.75%

Variável	Níveis	N	%
Status linfonodal	Não avaliados	6	37.50%
Status linfonodal	Com metástases (micro)	4	25.00%
Status linfonodal	Com metástases (macro)	3	18.75%
Status linfonodal	Livres	2	12.50%
Status linfonodal	Tonsila com metástase	1	6.25%

Fonte: Elaboração própria

O estadiamento TNM foi classificado nos estágio II e III, conforme critérios clínico-patológicos, sendo a maioria dos pacientes enquadrada no estágio III (N = 13; 81,25%), enquanto o estágio II foi identificado em N = 3 (18,75%).

O tamanho dos tumores foi classificado em três categorias. Tumores maiores que 4 cm (T3) foram mais prevalentes, representando 62,5% dos casos (N = 10), tumores entre 2 e 4 cm (T2) corresponderam a 31,25% (N = 5), e tumores menores que 2 cm (T1) foram os menos frequentes, somando 6,25% dos casos (N = 1).

Foram identificados dois subtipos histológicos principais de melanoma: melanoma oral (pigmentado) e melanoma amelanico oral. O subtipo melanoma oral foi o mais prevalente (N = 13; 81,25%), incluindo casos sem padrão morfológico específico (N = 6; 37,50%) e aqueles classificados em padrões morfológicos distintos, como: padrão epitelióide (N = 2; 12,50%); padrão misto (N = 4; 25,00%); padrão fusiforme (N = 1; 6,25%). Enquanto isso, o melanoma amelanico oral representou N = 3 (18,75%) dos casos.

A distribuição anatômica dos tumores foi analisada considerando três classificações:

- Região anatômica primária (maxila ou mandíbula): A maxila foi acometida em N = 5 (31,25%) dos casos, enquanto a mandíbula foi afetada em N = 9 (56,25%).
- Subdivisão da localização anatômica (rostral, medial ou caudal): A maior parte dos tumores foi identificada em regiões caudais (N = 8; 50,00%), seguidos por tumores em regiões mediais (N = 4; 25,00%) e rostrais (N = 3; 18,75%).
- Lateralidade (direita ou esquerda): A distribuição entre os lados direito e esquerdo foi relativamente equilibrada, com N = 8 (50,00%) dos tumores situados no lado direito e N = 7 (43,75%) no lado esquerdo.

A avaliação das margens cirúrgicas revelou que N = 7 (43,75%) dos pacientes apresentavam margens comprometidas, enquanto N = 3 (18,75%) tiveram margens livres. A análise dos linfonodos revelou que N = 6 (37,50%) dos pacientes apresentavam linfonodos não avaliados, enquanto N = 2 (12,50%) foram considerados livres de metástases. A presença de micrometástases foi identificada em N = 4 (25,00%) dos pacientes, e macrometástases foram encontradas em N = 3 (18,75%), demonstrando um alto índice de disseminação linfonodal na população avaliada.

5.3 Análise das variáveis contínuas (numéricas) de cães com melanoma oral

A Tabela 3 apresenta as medidas-resumo das variáveis numéricas, onde é possível observar que a média da sobrevida observada na amostra foi de $176,56 \pm 189,28$ dias, indicando uma grande variação entre os pacientes. A mediana da sobrevida, que representa o tempo no qual 50% dos pacientes ainda estavam vivos, foi de 111,5 dias.

Tabela 3 - Medidas-resumos das variáveis numéricas de cães com melanoma oral.

Variável	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Shapiro-Wilk	Valor-p	Distribuição
Volume tumoral (cm ³)	39.79	60.86	14.22	0.66	<0.001	Não-Normal
Figuras de mitose (10 CGA)	17.12	11.79	15.50	0.96	0.742	Normal
Sobrevida (dias)	176.56	189.28	111.50	0.77	0.0011	Não-Normal
CD3	31.70	21.85	23.66	0.93	0.2284	Normal
CD8	40.53	20.99	39.41	0.98	0.9553	Normal
CTLA4	12.21	11.81	10.85	0.88	0.0362	Não-Normal
CX3CR1	1.20	1.46	0.56	0.71	<0.001	Não-Normal
PD-L1	58.35	24.33	63.30	0.92	0.1468	Normal
FOXP3	22.08	16.70	20.59	0.93	0.225	Normal
CD163	17.05	11.56	17.74	0.95	0.5179	Normal
CD68	12.11	10.11	9.62	0.87	0.0241	Não-Normal
Ki-67	30.45	13.41	29.51	0.97	0.8668	Normal
CD4	11.99	9.29	11.68	0.93	0.2485	Normal

Fonte: Elaboração própria

O volume tumoral apresentou mediana de 14,22 cm³, já a contagem de figuras de mitose apresentou média de $17,12 \pm 11,78$ mitoses por 10 CGA. Entre as variáveis

já citadas, apenas a idade, escore corporal e figuras de mitose apresentaram distribuição normal, como apontado pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os níveis de expressão dos marcadores imuno-histoquímicos foram avaliados individualmente, alguns apresentando uma distribuição normal e outros não normal.

5.4 Comparação da sobrevida entre grupos clínicos e histopatológicos.

A análise comparativa da sobrevida (dias) entre diferentes grupos clínicos e histopatológicos foi conduzida com o objetivo de identificar possíveis associações entre fatores prognósticos e o tempo de sobrevida dos pacientes. Foram comparados os grupos de acordo com o estadiamento TNM (II ou III), diagnóstico histopatológico (melanoma oral ou melanoma amelanótico oral), status das margens cirúrgicas (livres ou comprometidas), status linfonodal (livre ou metastático), além das correlações com volume tumoral (cm³) e contagem de figuras de mitose por 10 CGA.

As comparações da sobrevida dos cães entre os subtipos histopatológicos melanoma oral pigmentado e melanoma amelanótico oral, margens livres e margens comprometidas, linfonodos livres e linfonodos metastáticos, bem como entre os níveis de estadiamento TNM, foram realizadas por meio do teste Kruskal-Wallis, devido ao tamanho amostral pequeno e à liberdade quanto aos pressupostos impostos pelo método paramétrico.

A análise entre estadiamento TNM e sobrevida não identificou uma associação significativa entre essas variáveis (Kruskal-Wallis = 0,004; $p = 0,9464$), sugerindo que, na amostra avaliada, a classificação TNM isoladamente não apresentou impacto estatisticamente significativo sobre o tempo de sobrevida dos pacientes.

Com relação aos subtipos histopatológicos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Kruskal-Wallis = 0,004; $p = 0,9464$), indicando que o tempo de sobrevida dos pacientes não diferiu significativamente entre os subtipos de melanoma analisados.

Na análise de sobrevida entre os grupos com margens livres e margens comprometidas não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis = 2,92; $p = 0,08$), sugerindo que a presença de margens cirúrgicas

comprometidas não influenciou diretamente o tempo de sobrevida dos pacientes na amostra avaliada.

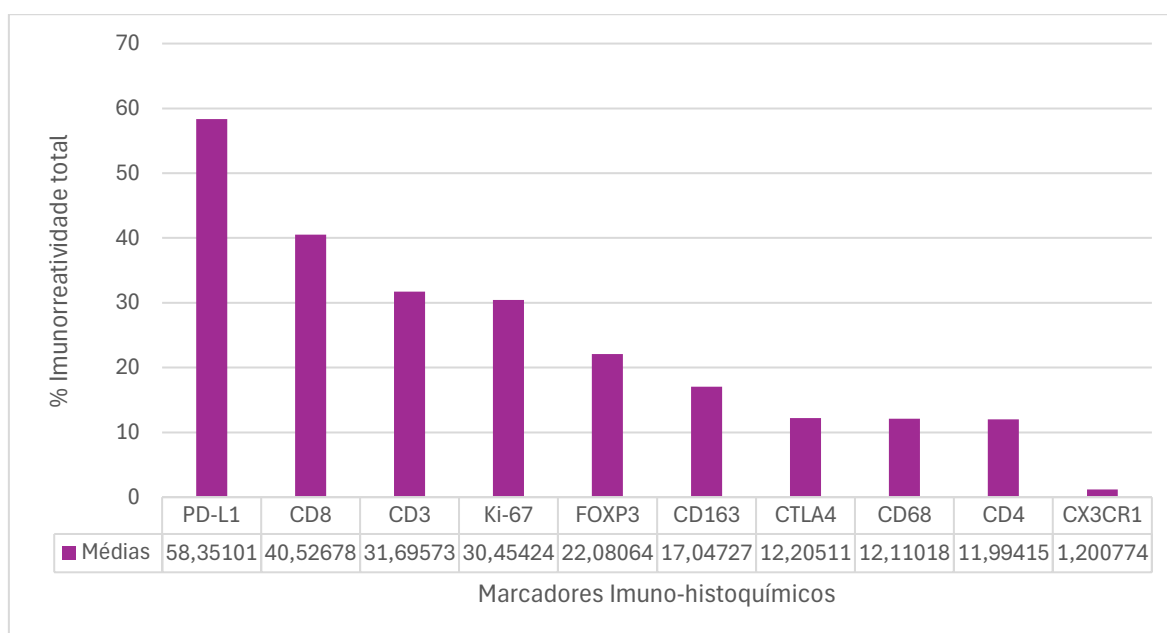
A comparação entre os grupos com linfonodos livres e linfonodos metastáticos não foi estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis = 1,09; $p = 0,2963$), indicando que, dentro da amostra estudada, o status linfonodal não se associou significativamente ao tempo de sobrevida dos pacientes.

A análise de correlação entre volume tumoral e tempo de sobrevida observou-se uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o volume tumoral e a sobrevida (Spearman = -0,54; $p = 0,0316$), indicando que tumores de maior volume estiveram associados a uma menor sobrevida dos pacientes.

5.5 Análise da imunorreatividade do melanoma oral canino.

A avaliação da imunorreatividade total dos marcadores imuno-histoquímicos nos casos de melanoma oral canino revelou um perfil imunológico específico do microambiente tumoral. A média de expressão de cada marcador foi representada graficamente na Figura 2, permitindo uma visibilização clara das diferenças na imunorreatividade entre os marcadores avaliados.

Figura 2 - Médias de imunorreatividade total em melanoma oral canino.



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados evidenciaram que PD-L1, CD8 e CD3 apresentaram as maiores médias de imunorreatividade, com valores de 58,35%, 40,52% e 31,69%, respectivamente. O PD-L1 demonstrou a expressão mais elevada entre todos os marcadores, o que reforça seu papel crítico no mecanismo de evasão imunológica tumoral. A expressão do Ki-67 foi a quarta mais elevada (30,45%), indicando um potencial proliferativo significativo do tumor.

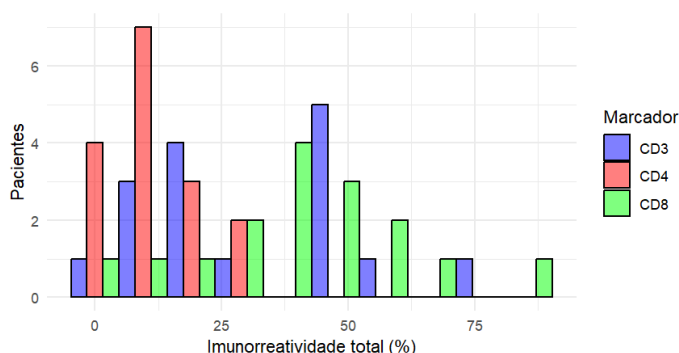
Os marcadores relacionados à imunossupressão mediada por células T reguladoras e macrófagos apresentaram níveis moderados de imunorreatividade. FOXP3, CTLA-4 e CD163 mostraram médias de 22,08%, 12,20% e 17,04%, respectivamente.

Os marcadores CD4, CD68 e CX3CR1 apresentaram as menores médias de imunorreatividade, com valores de 11,99%, 12,11% e 1,20%, respectivamente. Por fim, a expressão extremamente baixa de CX3CR1 (1,20%) indica uma reduzida capacidade de recrutamento de células imunes.

5.5.1 Análise do perfil linfocitário do melanoma oral canino.

A análise da imunorreatividade das células-T no MOC foi realizada por meio da expressão dos marcadores CD3, CD4 e CD8. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicou que as distribuições de CD3 ($p = 0,2284$), CD4 ($p = 0,2485$) e CD8 ($p = 0,9553$) não diferiram significativamente de uma distribuição normal ($p > 0,05$ para todos), permitindo a aplicação da correlação de Pearson para avaliar a relação entre os marcadores (Figura 3).

Figura 3 – Gráfico de barra da distribuição dos marcadores CD3, CD4 e CD8.

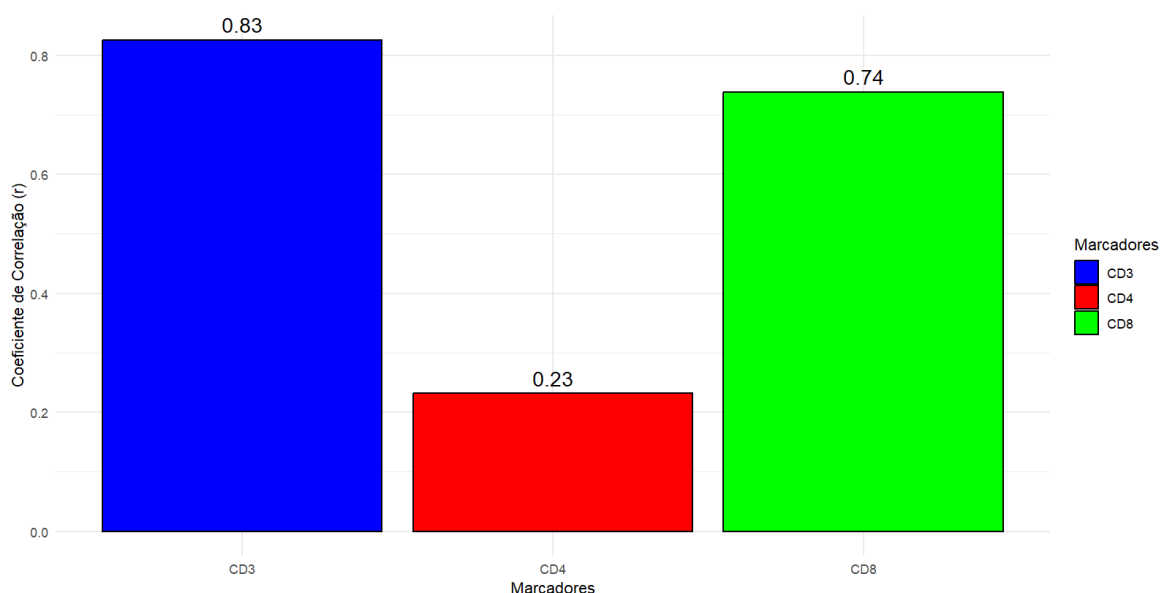


Fonte: Elaboração própria.

A análise de correlação demonstrou que não houve associação estatisticamente significativa entre os marcadores CD3, CD4 e CD8. A correlação entre CD3 e CD4 foi fraca e positiva ($r = 0,1096$, $p = 0,686$), entre CD3 e CD8 foi moderada e positiva ($r = 0,3132$, $p = 0,2375$), e entre CD4 e CD8 foi fraca e negativa ($r = -0,1623$, $p = 0,548$). Apesar dessas tendências, todas as correlações apresentaram p-valores superiores a 0,05, indicando que não há uma relação significativa entre os níveis de expressão desses linfócitos T nas amostras avaliadas.

Além da análise da correlação entre os marcadores individualmente, foi avaliada a relação entre a média geral da imunorreatividade (CD3, CD4 e CD8 combinados) e cada um desses marcadores. Como apresentado na Figura 4, observou-se que CD3 apresentou a maior correlação com a média ($r = 0.83$, $p < 0.001$), seguido por CD8 ($r = 0.74$, $p = 0.0011$), enquanto CD4 apresentou uma correlação fraca e não significativa com a média ($r = 0.23$, $p = 0.3874$). Esses achados reforçam que a imunorreatividade geral no MOC é fortemente influenciada pelos linfócitos T totais (CD3+) e citotóxicos (CD8+), enquanto CD4 tem pouca influência na resposta imune predominante.

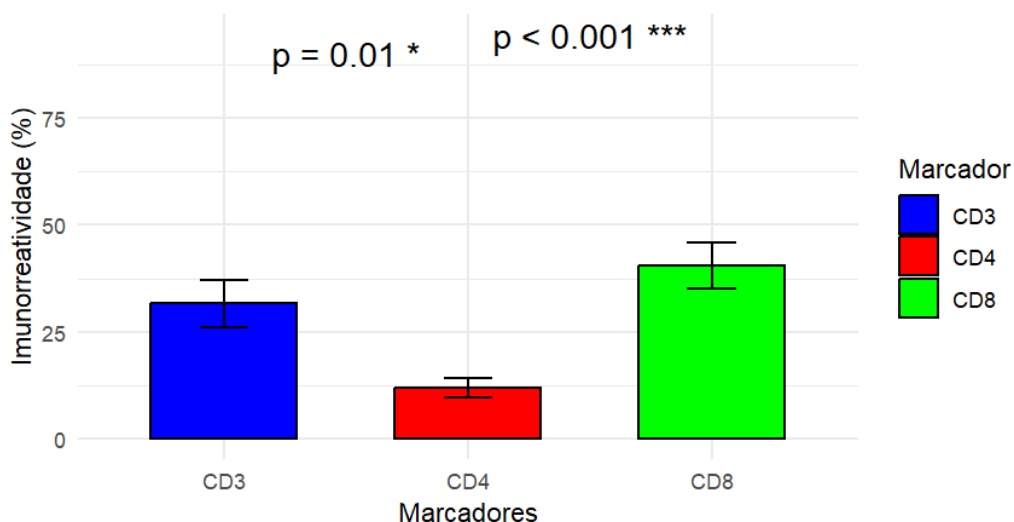
Figura 4 – Correlação entre a média de imunorreatividade e os marcadores.



Fonte: Elaboração própria.

Para investigar possíveis diferenças entre os marcadores, foi aplicada a ANOVA one-way, que revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0002$). O teste pós-hoc de Tukey (Figura 5) demonstrou que: CD8 apresentou uma expressão significativamente maior do que CD4 ($p < 0,001$); CD3 também foi mais expresso que CD4 ($p = 0,0106$); não houve diferença estatisticamente significativa entre CD3 e CD8 ($p = 0,3674$).

Figura 5 – Comparação das imunorreatividades de CD3, CD4 e CD8.



Fonte: Elaboração própria.

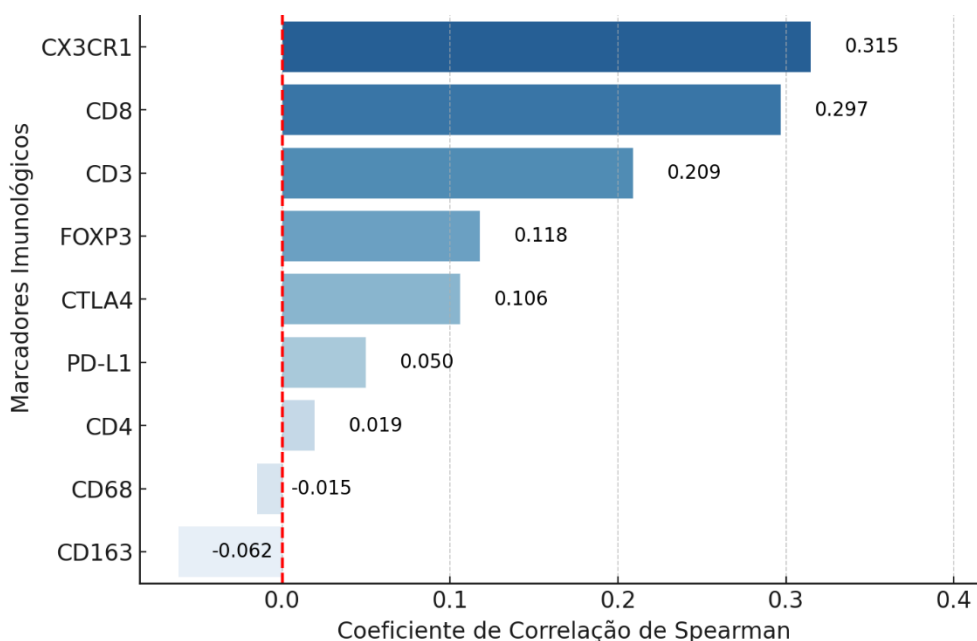
Os resultados sugerem que os linfócitos T CD8+ foram os mais expressos nas amostras de MOC, seguidos pelos linfócitos T totais (CD3+), enquanto os CD4+ apresentaram menor expressão. A ausência de correlação significativa entre os marcadores pode indicar que a resposta imune mediada por células T não segue um padrão uniforme no MOC, sugerindo um perfil heterogêneo da infiltração linfocitária no microambiente tumoral. No entanto, a diferença estatística identificada pela ANOVA confirma que a infiltração de CD4+ é significativamente menor do que a de CD3+ e CD8+, reforçando a predominância de linfócitos citotóxicos e totais no microambiente tumoral do melanoma oral canino.

5.6 Correlação entre a sobrevida e os marcadores imuno-histoquímicos.

A análise de correlação de Spearman foi realizada para avaliar possíveis associações entre a sobrevida dos pacientes e os marcadores imuno-histoquímicos CD3, CD8, CD4, PD-L1, Ki-67, FOXP3, CD163, CD68, CTLA4 e CX3CR1. Essa abordagem foi escolhida devido à ausência de normalidade na distribuição da sobrevida e à possibilidade de relações não lineares entre as variáveis.

Os resultados apresentados na Figura 6 indicaram que nenhum dos marcadores avaliados demonstrou correlação estatisticamente significativa com o tempo de sobrevida dos pacientes ($p > 0,05$), de acordo com os coeficientes de correlação de Spearman. Dessa forma, não foi possível estabelecer associação entre a expressão isolada dos marcadores imuno-histoquímicos e o desfecho clínico na amostra analisada.

Figura 6 - Correlação de Spearman entre marcadores imuno-histoquímicos e sobrevida de cães com melanoma oral.



Fonte: Elaboração própria.

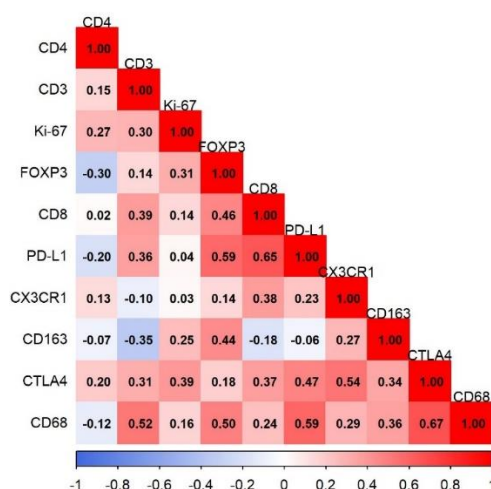
O marcador CX3CR1 apresentou o maior coeficiente de correlação positiva com a sobrevida ($r = 0,318$), seguido por CD8 ($r = 0,297$) e CD3 ($r = 0,208$). No entanto, nenhuma dessas correlações foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), não sendo

possível estabelecer qualquer associação entre esses marcadores e o tempo de sobrevida na amostra avaliada. Os marcadores PD-L1 ($r = 0,050$) e CD4 ($r = 0,019$) apresentaram coeficientes muito baixos, indicando ausência de correlação relevante com o desfecho clínico. Da mesma forma, os marcadores CD163 e CD68 mostraram coeficientes próximos de zero, reforçando a falta de associação com a sobrevida na população estudada. A Figura 6 ilustra a distribuição dos coeficientes de correlação de Spearman obtidos, evidenciando a ausência de correlações estatisticamente significativas entre a expressão isolada dos marcadores imuno-histoquímicos e o tempo de sobrevida.

5.7 Inter correlação entre os marcadores imuno-histoquímicos.

A análise de Correlação de Spearman entre os marcadores imunológicos foi realizada para identificar possíveis interações entre os componentes do microambiente tumoral. O uso do coeficiente de Spearman permite avaliar relações monotônicas, capturando interações biológicas que não seguem necessariamente um padrão linear. O mapa de calor da Figura 7 ilustra essas correlações, onde tons mais quentes (vermelho) indicam correlações positivas e tons mais frios (azul) indicam correlações negativas.

Figura 7 - Correlação de Spearman entre marcadores imuno-histoquímicos de cães com melanoma oral.



Fonte: Elaboração própria.

Os principais achados foram:

- Correlação moderada a forte
 - CD8 e PD-L1 ($r = 0,650$): Esta correlação moderada sugere que uma maior infiltração de células T citotóxicas (CD8+) pode estar associada a um aumento na expressão de PD-L1.
 - PD-L1 e FOXP3 ($r = 0,588$): A correlação positiva entre esses marcadores sugere que a imunossupressão mediada por células T reguladoras (Tregs) pode estar associada à expressão de PD-L1, criando um microambiente favorável à evasão tumoral.
 - PD-L1 e CD68 ($r = 0,591$): Indica que a presença de macrófagos (CD68+) pode estar relacionada à expressão de PD-L1, o que pode representar um mecanismo adicional de regulação imunossupressora no microambiente tumoral.
 - CTLA4 e CD68 ($r = 0,670$): A relação entre a sinalização imunossupressora via CTLA4 e a infiltração de macrófagos sugere uma interação entre células T reguladoras e macrófagos, possivelmente atuando para reduzir a resposta imunológica efetora.
 - CD3 e CD68 ($r = 0,520$): A interação entre linfócitos T e macrófagos pode indicar uma comunicação cruzada entre células efetoras e imunossupressoras no microambiente tumoral.
- Correlação fraca a moderada
 - CD3 e PD-L1 ($r = 0,364$): A associação entre a infiltração linfocitária geral e a expressão de PD-L1 sugere que, apesar da ativação da resposta imune, há mecanismos ativos de imunossupressão regulando esse processo. No entanto, a relação não foi significativa.
 - CTLA4 e Ki-67 ($r = 0,391$): A correlação entre proliferação celular (Ki-67) e imunorregulação via CTLA4 pode sugerir que tumores com maior atividade proliferativa apresentam um microambiente com maior atividade imunossupressora.
 - CD3 e CD8 ($r = 0,388$): Essa correlação confirma a interdependência entre a infiltração de linfócitos T gerais (CD3+) e a subpopulação de

células T citotóxicas (CD8+), o que reflete um microambiente tumoral imunogênico.

- Correlação muito fraca ou ausente
 - CD4 apresentou correlações fracas com os demais marcadores, sugerindo que as células T auxiliares podem ter um papel menos expressivo na modulação imune do melanoma oral canino.
 - CX3CR1 apresentou ausência de correlação com a maioria dos marcadores, indicando que sua expressão pode não estar diretamente relacionada aos principais mecanismos imunológicos avaliados.

5.8 Comparação de perfis imunológicos e desfechos clínicos.

A fim de investigar a associação entre os perfis imunológicos e os desfechos clínicos, foram conduzidas análises comparativas considerando os níveis de imunorreatividade dos marcadores CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD163, PD-L1, CTLA4, CD68 e CX3CR1 em relação ao estadiamento TNM (II e III) e à sobrevida dos pacientes.

Os marcadores imuno-histoquímicos foram organizados em três categorias principais, de acordo com suas funções biológicas:

- **Perfil Linfocitário:** CD3, CD4 e CD8, associados à resposta imune adaptativa e infiltração de células T no microambiente tumoral.
- **Resposta Imunossupressora:** FOXP3 e CD163, relacionados a mecanismos de evasão imuno mediados por células T regulatórias (Tregs) e macrófagos associados ao tumor (TAMs).
- **Resposta Citotóxica:** PD-L1, CTLA4, CD68 e CX3CR1, que participam da regulação da resposta imune e da interação entre células tumorais e sistema imune.

Para avaliar a relação do estadiamento TNM com os perfis imunológicos, foram considerados modelos de regressão logística, uma vez que a variável resposta é dicotômica (TNM II e TNM III) nesta amostra. Os coeficientes estimados, erros-padrão, estatísticas-z e valores de p encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Modelos de regressão logística entre a variável resposta “Estadiamento TNM” e os perfis imunológicos.

Perfil Imunológico	Coeficientes	Estimativas	Erro-Padrão	Estatística z	Pr(> z)
Linfocitário	(Intercept)	1.44	1.89	0.76	0.4481
	CD3	0.04	0.04	1.03	0.3029
	CD4	-0.03	0.08	-0.42	0.6734
	CD8	-0.02	0.03	-0.53	0.5935
Resposta Imunossupressora	(Intercept)	3.98	2.44	1.63	0.1027
	FOXP3	0.03	0.05	0.52	0.6009
	CD163	-0.15	0.09	-1.64	0.1013
Resposta Citotóxica	(Intercept)	-0.95	3.85	-0.25	0.8061
	PDL1	0.19	0.22	0.87	0.3832
	CTLA4	0.08	0.16	0.52	0.5999
	CD68	-0.22	0.29	-0.74	0.4570
	CX3CR1	-3.17	2.94	-1.08	0.2810

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados da regressão logística indicaram que nenhum dos perfis imunológicos avaliados apresentou associação estatisticamente significativa com o estadiamento TNM. Os valores de p obtidos para todos os marcadores foram superiores ao limiar de significância adotado ($p > 0,05$), sugerindo que a infiltração imune no microambiente tumoral, avaliada pelos níveis de imunorreatividade dos marcadores analisados, não apresenta uma relação direta com a progressão clínica representada pelo estadiamento TNM.

Adicionalmente, foi investigada a relação entre os perfis imunológicos e a sobrevida dos pacientes, por meio de modelos de regressão linear múltipla. Os coeficientes estimados, erros-padrão, estatísticas-t e valores de p são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Modelos de regressão linear múltiplos entre a variável resposta “Sobrevida” e os perfis imunológicos

Perfil Imunológico	Coeficientes	Estimativas	Erro-Padrão	Estatística t	Pr(> t)
Linfocitário	(Intercept)	82.59	144.86	0.57	0.5791
	CD3	2.44	2.55	0.96	0.3575
	CD4	0.83	5.78	0.14	0.8880
	CD8	0.16	2.68	0.06	0.9530
Resposta Imunossupressora	(Intercept)	234.61	99.83	2.35	0.0352
	FOXP3	0.53	3.27	0.16	0.8750
	CD163	-4.09	4.73	-0.86	0.4031

Perfil Imunológico	Coeficientes	Estimativas	Erro-Padrão	Estatística t	Pr(> t)
Resposta Citotóxica	(Intercept)	193.95	141.91	1.37	0.1990
	PDL1	0.64	2.86	0.22	0.8270
	CTLA4	-5.28	7.23	-0.73	0.4806
	CD68	-1.41	8.81	-0.16	0.8756
	CX3CR1	22.39	43.41	0.52	0.6163

Fonte: Elaboração própria.

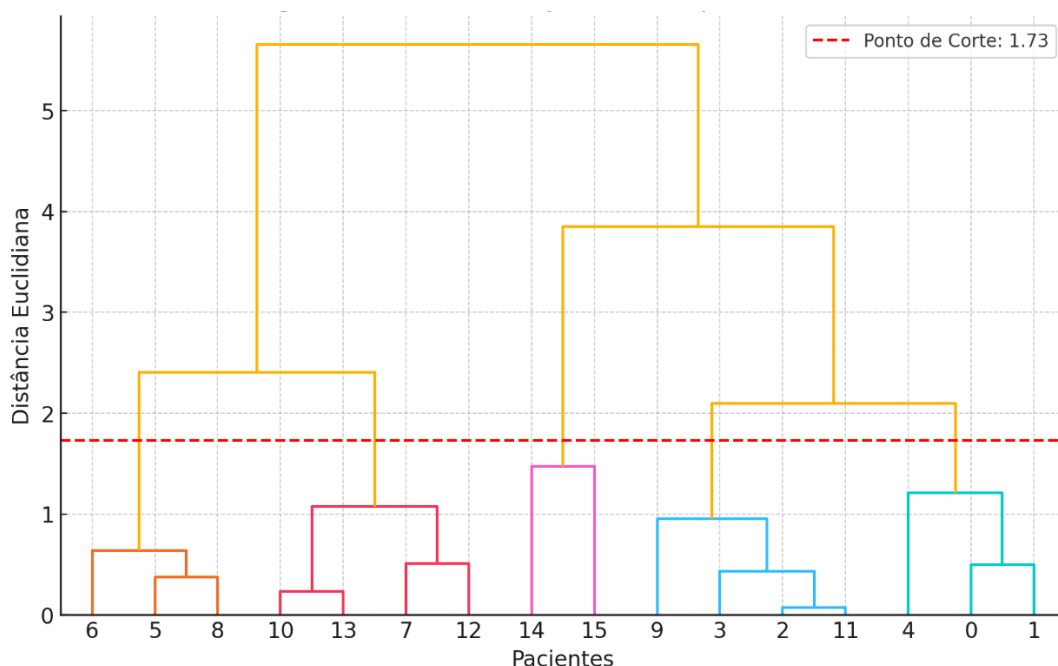
Os resultados indicaram que nenhum dos perfis imunológicos apresentou associação significativa com a sobrevida global dos pacientes ($p > 0,05$). Embora a interceptação do modelo de resposta imunossupressora tenha sido estatisticamente significativa ($p = 0,0352$), os coeficientes individuais de FOXP3 e CD163 não foram estatisticamente relevantes para prever a sobrevida. Os marcadores da resposta citotóxica e do perfil linfocitário também não demonstraram associação significativa com a sobrevida, reforçando a ausência de um padrão claro entre a expressão imunológica tumoral e o tempo de sobrevida dos pacientes.

5.9 Análise dos imunocores para melanoma oral canino.

5.9.1 Imunoscore para melanoma oral canino com classificação binária e trinária.

O imunoscore foi desenvolvido para avaliar o impacto da resposta imune mediada por linfócitos T sobre os desfechos clínicos, permitindo uma classificação objetiva dos pacientes baseada na infiltração linfocitária tumoral. Nesta análise, foram selecionados os marcadores CD3 e CD8, representativos da resposta linfocitária, para a construção dos imunocores.

A abordagem binária tem como vantagem a não dependência de pontos de corte arbitrários, pois os agrupamentos refletem a distribuição natural dos dados. A estrutura hierárquica dos agrupamentos demonstra, no gráfico da Figura 8, a separação clara entre os grupos “*High*” e “*Low*”, indicando que há uma variação biológica relevante na infiltração linfocitária entre os pacientes. Esse método é robusto e reduz a influência de variações amostrais, garantindo maior confiabilidade na categorização binária do Imunoscore.

Figura 8 - Dendrograma de clusterização hierárquica para os marcadores CD3 e CD8.

Fonte: Elaboração própria.

A segunda abordagem utilizou os percentis 33% e 66% da distribuição dos dados para estabelecer os limites entre “*Low*”, “*Intermediate*” e “*High*” Imunoscore. Os pacientes com níveis de CD3 e CD8 abaixo do percentil 33% foram classificados como “*Low*”, aqueles entre os percentis 33% e 66% como “*Intermediate*”, e aqueles acima do 66% como “*High*”. Embora essa abordagem permita uma categorização mais detalhada, ela é mais suscetível a variações amostrais e não necessariamente reflete diferenças biológicas reais entre os grupos. O Quadro 2 apresenta os resultados das classificações dos imunoscores.

Quadro 2 – Resultado da classificação dos Imunoscores binário e trinário.

Paciente	Imunoscore binário	Imunoscore trinário
A	High	High
B	High	High
C	High	High
D	High	Intermediate
E	High	High
F	Low	Low
G	Low	Low
H	Low	Low

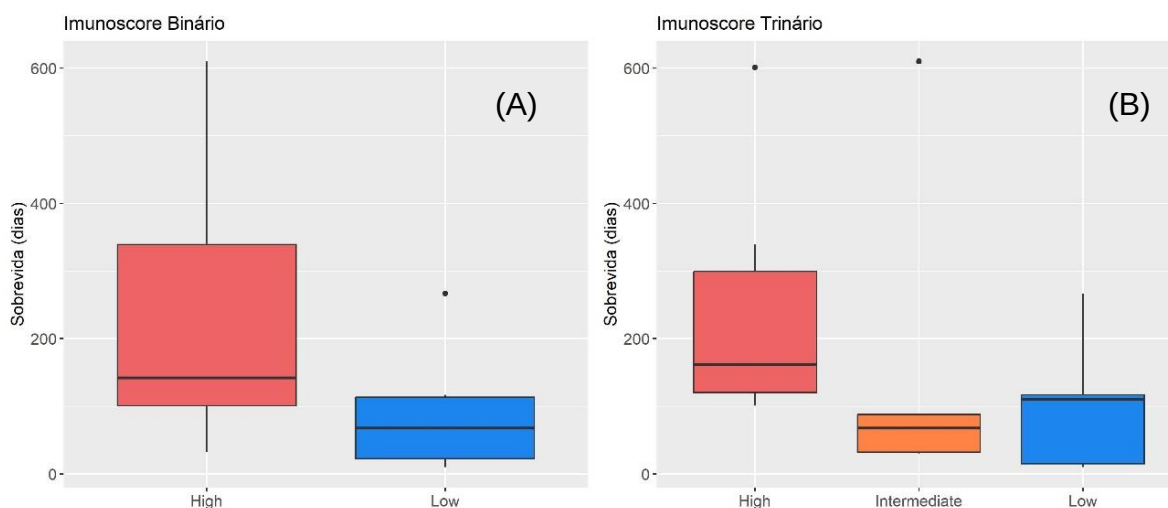
I	Low	Low
J	High	Intermediate
K	Low	Intermediate
L	High	High
M	Low	Low
N	Low	Intermediate
O	High	High
P	High	Intermediate

Fonte: Elaboração própria.

Na análise da associação com o estadiamento TNM, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos classificados pelos Imunoscoring e os estágios II e III ($p = 0,55$ para binário; $p = 0,46$ para trinário).

A relação entre os grupos de Imunoscoring e o tempo de sobrevida é ilustrada nos boxplots da Figura 9. Observou-se que pacientes classificados no grupo High apresentaram uma mediana de sobrevida superior em comparação ao grupo Low, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística ($p = 0,071$). Para o Imunoscoring trinário, a análise não revelou diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,1827$).

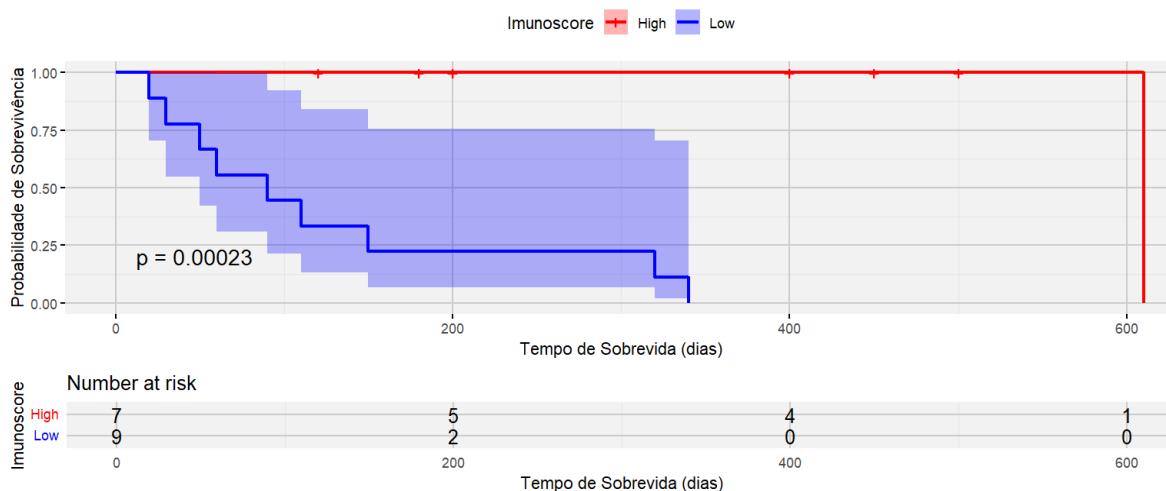
Figura 9 - Gráficos boxplot para a relação dos Imunoscoring binário e trinário com a sobrevida.



Fonte: Elaboração própria.

A curva de Kaplan-Meier (Figura 10) demonstra que o grupo High Imunosscore apresentou sobrevida significativamente maior do que o grupo Low ($p = 0,00023$, teste de Log-Rank), sugerindo que a maior infiltração linfocitária se associa a melhor prognóstico.

Figura 10 – Curva de Kaplan-Meier de Sobrevida X Imunosscore Binário.



Fonte: Elaboração própria.

Abaixo da curva, a tabela "Number at Risk" apresenta a quantidade de pacientes ainda em risco em diferentes pontos do tempo. No início do estudo (tempo = 0), 7 pacientes pertenciam ao grupo *High* Imunosscore, enquanto 9 pacientes estavam no grupo *Low* Imunosscore. Com o avanço do tempo, observa-se uma redução progressiva no número de pacientes em risco devido a eventos de óbito ou censura dos dados. Ao final do período de acompanhamento, apenas 1 paciente do grupo *High* e nenhum do grupo *Low* ainda estavam em análise.

5.9.2 Imunosscore para melanoma oral canino de acordo com os perfil imunológicos.

Os resultados dos Imunosscores IS1 e IS2, calculados para os 16 pacientes da amostra, estão apresentados no Quadro 3, com a respectiva classificação em três categorias: Alto, Intermediário e Baixo. Observa-se que, para o IS1, cinco pacientes foram classificados como Alto, oito como Intermediário e três como Baixo. Já no IS2,

seis pacientes foram classificados como Alto, sete como Intermediário e três como Baixo. A distribuição dos pacientes entre as categorias variou ligeiramente entre os dois modelos, refletindo as diferenças na composição dos marcadores utilizados em cada escore.

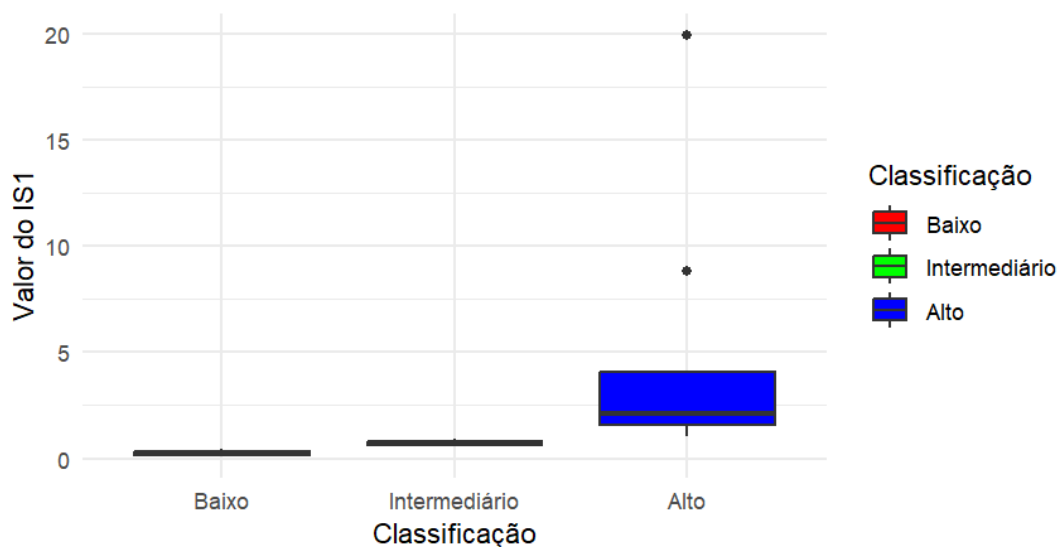
Quadro 3 – Resultados e classificações dos imunosscores S1 e S2.

Paciente	IS1	IS1 Classificação	IS2	IS2 Classificação
A	1.326	Alto	0.861	Intermediário
B	0.914	Intermediário	0.827	Intermediário
C	0.821	Intermediário	0.719	Intermediário
D	19.924	Alto	1.143	Alto
E	1.661	Alto	1.394	Alto
F	0.67	Intermediário	0.903	Intermediário
G	0.543	Baixo	0.654	Baixo
H	0.321	Baixo	0.432	Baixo
I	0.789	Intermediário	0.89	Intermediário
J	0.456	Baixo	0.567	Baixo
K	0.987	Intermediário	1.002	Intermediário
L	1.245	Alto	1.123	Alto
M	0.365	Baixo	0.478	Baixo
N	0.782	Intermediário	0.899	Intermediário
O	1.567	Alto	1.456	Alto
P	0.234	Baixo	0.312	Baixo

Fonte: Elaboração própria.

A distribuição dos valores dos Imunosscores pode ser visualizada nos gráficos de boxplot das Figuras 11 e 12. Na Figura 11, referente ao IS1, observa-se que os valores do grupo Alto apresentam maior dispersão, evidenciando maior variabilidade dentro desta categoria, especialmente devido à presença de um paciente com valor extremamente elevado (19,924). As categorias Intermediário e Baixo mostraram valores mais concentrados e próximos entre si.

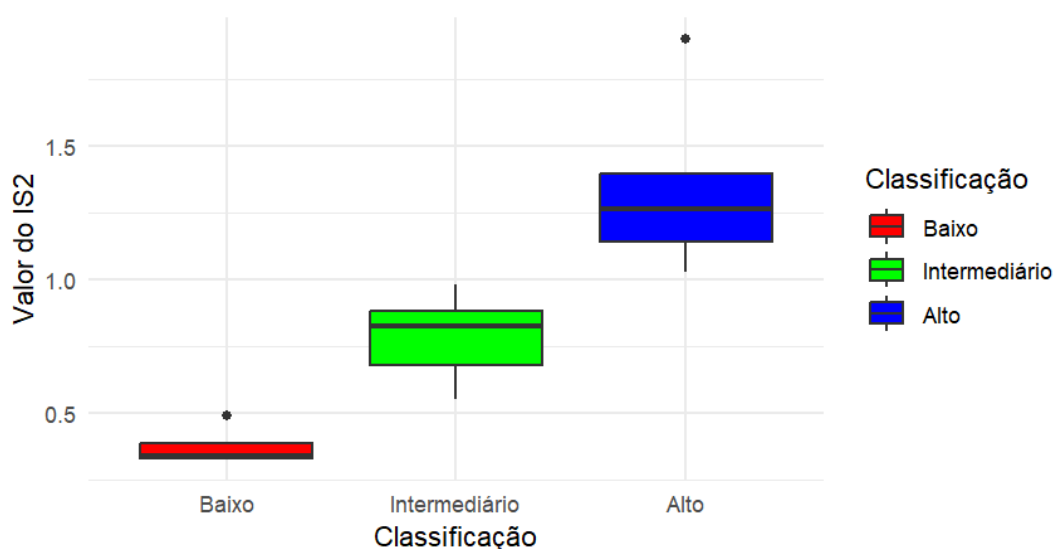
Figura 11 – Distribuição do imunoscoring 1 (IS1) por categoria.



Fonte: Elaboração própria.

Por outro lado, a Figura 12, que representa o IS2, demonstra uma distribuição mais homogênea entre as categorias, com menor dispersão dos dados, indicando que este escore proporcionou uma estratificação mais equilibrada dos pacientes, com menos presença de outliers.

Figura 12 – Distribuição do imunoscoring 2 (IS2) por categoria.



Fonte: Elaboração própria.

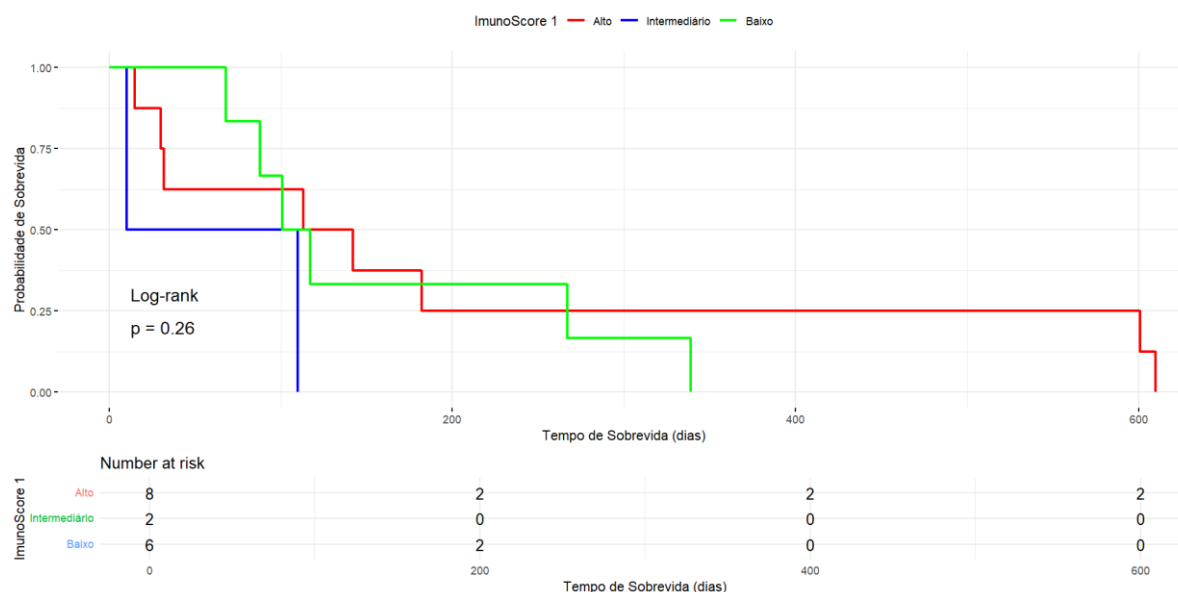
Analisando a relação entre os Imunoscores e o estadiamento TNM, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos TNM II e III, tanto para o IS1 quanto para o IS2. O teste de Mann-Whitney resultou em valores de $p = 0,4195$ para o IS2 e valores semelhantes para o IS1, indicando que, na amostra estudada, os níveis de infiltração imunológica representados pelos Imunoscores não estão diretamente relacionados à extensão anatômica do tumor.

A análise de correlação de Spearman entre os Imunoscores e o tempo de sobrevida também não demonstrou significância estatística. O IS1 apresentou um coeficiente $\rho = 0,1735$ ($p = 0,5194$), enquanto o IS2 apresentou um $\rho = 0,3117$ ($p = 0,2393$). Embora esses valores indiquem correlações positivas fracas, especialmente para o IS2, os resultados não permitem afirmar uma associação consistente entre os Imunoscores e o tempo de sobrevida dos pacientes na amostra avaliada.

As curvas de Kaplan-Meier, apresentadas nas Figuras 13 e 14, ilustram a relação entre os Imunoscores e a sobrevida dos pacientes. Na Figura 13, referente ao IS1, observa-se que o grupo Alto manteve uma probabilidade de sobrevida mais elevada ao longo do tempo, com uma queda mais lenta da curva, enquanto o grupo Baixo apresentou uma queda mais acentuada nos primeiros 200 dias. O grupo Intermediário mostrou um padrão de queda inicial mais abrupto, seguido de uma estabilização. Apesar dessa aparente diferença no comportamento das curvas, o teste de Log-Rank não indicou significância estatística ($p = 0,26$).

A tabela "Number at Risk", presente na Figura 13, demonstra que, no início do acompanhamento, havia 8 pacientes no grupo Alto, 2 no grupo Intermediário e 6 no grupo Baixo. Esse número foi progressivamente reduzido ao longo do tempo, refletindo os eventos de óbito e censura dos dados.

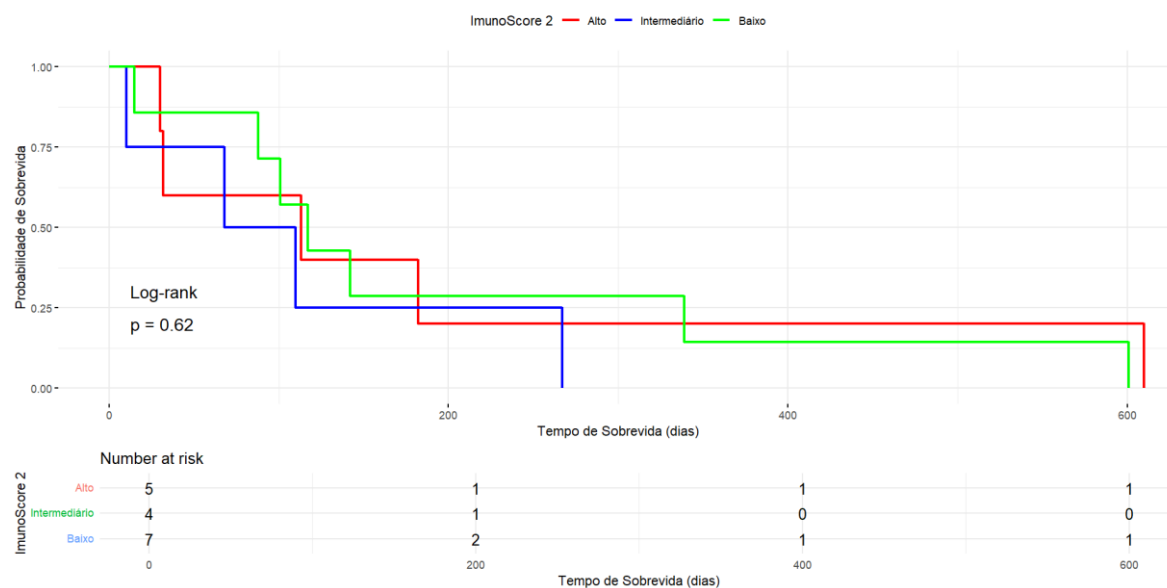
Figura 13 - Curva de Kaplan-Meier de Sobrevida para imunoscóreo 1 (IS1).



Fonte: Elaboração própria.

A Figura 14, correspondente ao IS2, também mostra que o grupo Alto manteve uma maior probabilidade de sobrevida ao longo do tempo, enquanto os grupos Intermediário e Baixo apresentaram quedas mais abruptas nos primeiros 150 a 200 dias. No entanto, as curvas de sobrevida para o IS2 apresentaram maior sobreposição entre os grupos em comparação ao IS1, indicando menor capacidade discriminatória deste modelo. O teste de Log-Rank para o IS2 também não foi estatisticamente significativo ($p = 0,62$).

A tabela "Number at Risk" da Figura 14 indica que, no tempo inicial, havia 5 pacientes no grupo Alto, 4 no grupo Intermediário e 7 no grupo Baixo. Assim como no IS1, o número de pacientes em risco foi reduzido ao longo do tempo.

Figura 14 - Curva de Kaplan-Meier de Sobrevida para imunoscóreo 2 (IS2).

De modo geral, embora as análises não tenham revelado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, as curvas de Kaplan-Meier sugerem que os pacientes classificados no grupo Alto, especialmente no modelo IS1, tendem a apresentar maior probabilidade de sobrevida ao longo do tempo. Contudo, as limitações amostrais e a sobreposição observada nas curvas do IS2 indicam a necessidade de validação desses achados em populações maiores e mais homogêneas.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo oferecem um panorama abrangente sobre as características clínicas, histopatológicas e imunológicas do melanoma oral canino (MOC), destacando aspectos do microambiente tumoral e da expressão de marcadores imunológicos. A análise conjunta dos dados obtidos e da literatura permite compreender melhor os mecanismos biológicos associados ao comportamento do MOC e suas implicações clínicas.

Os dados demográficos demonstraram que o MOC afetou predominantemente cães idosos, com idade média superior a 10 anos, corroborando estudos anteriores

que apontam maior incidência em cães de meia-idade a idosos (de Carvalho et al., 2022; Prouteau e André, 2019). A maior frequência de fêmeas castradas observada na amostra difere de parte da literatura, que não descreve predisposição por sexo (de Carvalho et al., 2022; Scattone et al., 2021). Esse achado pode refletir características específicas da população atendida ou o tamanho amostral reduzido. Da mesma forma, a alta proporção de cães sem raça definida (50%) provavelmente está associada ao perfil populacional atendido no hospital veterinário, embora estudos apontem maior acometimento em raças como poodle e dachshund (Prouteau e André, 2019).

A maioria dos casos foi diagnosticada em estágio TNM III (81,25%), alinhando-se com relatos que descrevem o MOC como uma neoplasia frequentemente identificada em estágios avançados (Prouteau e André, 2019; Kim, Vinayak e Powers, 2021). Esse padrão reforça a dificuldade no diagnóstico precoce, uma vez que sinais clínicos relevantes geralmente se tornam evidentes apenas em fases tardias (Prouteau e André, 2019).

Quanto à localização anatômica, a mandíbula caudal foi a região mais acometida na amostra, seguida pela maxila medial, achado compatível com relatos que descrevem predomínio de acometimento gengival (Mikiewicz et al., 2019). A possível influência de fatores anatômicos, como vascularização e estrutura óssea, na progressão tumoral já foi sugerida na literatura (Kim, Vinayak e Powers, 2021), embora o presente estudo não tenha sido desenhado para avaliar essa associação.

A análise imuno-histoquímica revelou expressão elevada de PD-L1, CD8 e CD3, indicando um microambiente tumoral com presença de células T infiltrantes, acompanhado da expressão de mecanismos imunossupressores, especialmente através do eixo PD-1/PD-L1. A alta expressão de PD-L1 está de acordo com estudos prévios que destacam seu papel na modulação da resposta imune e na evasão imunológica (Fonseca-Alves et al., 2021; Prouteau e André, 2019). A correlação entre PD-L1 e FOXP3 ($r = 0,588$) sugere a presença de um microambiente associado à atividade de células T reguladoras (Tregs), corroborando dados da literatura (Guillén et al., 2021).

Estudos transcriptômicos e imuno-histoquímicos já demonstraram que tumores com maior infiltração de células T também apresentam expressão aumentada de moléculas de checkpoint, como PD-1, CTLA-4 e TIM-3 (Cronise et al., 2024),

reforçando a hipótese de que a resposta imune está funcional, mas inibida localmente. A elevada expressão de PD-L1 observada neste estudo reforça essa interpretação, alinhando-se com achados anteriores que descrevem o eixo PD-1/PD-L1 como central na imunossupressão do MOC (Maekawa et al., 2017).

Em relação aos linfócitos infiltrantes (TILs), a elevada expressão de CD8 e CD3, associada à expressão moderada de FOXP3, indica que o microambiente tumoral do MOC apresenta uma infiltração linfocitária relevante, embora modulada por mecanismos de evasão imunológica. A literatura descreve que padrões de TILs com predomínio de células CD8+ e menor presença de Tregs estão associados a melhor prognóstico em tumores humanos e animais (Yasumaru et al., 2021), mas no presente estudo não foi possível confirmar essa associação, uma vez que não foram observadas correlações estatisticamente significativas com tempo de sobrevida.

O marcador Ki-67 apresentou imunorreatividade moderada, consistente com a alta taxa proliferativa característica do MOC (Scattone et al., 2021; Porcellato et al., 2021). Da mesma forma, FOXP3 e CTLA-4 mostraram expressão moderada, indicando a participação de vias imunossupressoras no microambiente tumoral.

Os marcadores CX3CR1, CD4, CD68 e CD163 apresentaram baixa expressão na maioria das amostras, sugerindo menor participação de células auxiliares (CD4+) e de macrófagos no microambiente tumoral deste grupo de pacientes. Este perfil pode indicar um microambiente menos inflamatório e mais orientado para a evasão imunológica, conforme já relatado em outros estudos (Guillén et al., 2021).

A correlação observada entre CD68 e CTLA-4 sugere possível interação funcional entre macrófagos e vias de regulação imune, alinhando-se a dados da literatura que discutem o papel dessas células na imunossupressão tumoral (Fonseca-Alves et al., 2021; Galon e Lanzi, 2020). No entanto, o presente estudo não foi desenhado para avaliar essa interação de forma mecanística.

A análise dos imunosscores desenvolvidos revelou que o Imunosscore Binário, baseado na infiltração de CD3 e CD8, não apresentou associação estatisticamente significativa com o tempo de sobrevida ($p = 0,071$). Embora a curva de Kaplan-Meier tenha indicado maior sobrevida no grupo High, este resultado deve ser interpretado com cautela, dado que não alcançou significância nos testes não paramétricos. A literatura aponta que altos níveis de infiltração linfocitária estão relacionados a melhor

prognóstico em diversos tipos de câncer, incluindo melanoma humano (Galon et al., 2012; Pagès et al., 2018), mas no presente estudo, essa relação não pôde ser confirmada.

O Imunoscore Trinário também não apresentou associação significativa com sobrevida ($p = 0,1827$), o que pode ser atribuído, em parte, ao pequeno tamanho amostral e à sobreposição dos grupos, reduzindo o poder estatístico da análise.

Em relação aos modelos compostos (IS1 e IS2), IS1 apresentou melhor distribuição dos grupos em relação à sobrevida, embora sem alcançar significância estatística, enquanto IS2 mostrou maior dispersão nos valores, refletindo menor capacidade discriminatória na presente amostra. A ausência de correlação entre os Imunoscores e o estadiamento TNM reforça a noção, já discutida na literatura (Mlecnik et al., 2023), de que o perfil imunológico pode representar uma variável prognóstica independente dos parâmetros anatômicos tradicionais.

6.1 Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações relevantes que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A primeira delas é o tamanho amostral reduzido, que limita o poder estatístico das análises e a generalização dos achados para a população canina em geral. Além disso, a heterogeneidade das amostras, provenientes de biópsias e peças cirúrgicas de diferentes tamanhos e localizações, pode ter introduzido variabilidade na avaliação do microambiente tumoral e na quantificação da expressão dos marcadores.

Outra limitação refere-se à metodologia de quantificação da imunorreatividade, baseada na análise de densidade cromogênica por meio do software ImageJ. Este método avalia a proporção de área corada na imagem, sem realizar a distinção morfológica dos tipos celulares presentes, o que impede a diferenciação precisa entre células tumorais, linfócitos, macrófagos ou outras células estromais. Assim, embora ofereça uma estimativa da densidade de sinal, não permite uma análise detalhada da distribuição celular no microambiente tumoral.

Por fim, o estudo não avaliou outros fatores moleculares, genéticos ou epigenéticos que podem exercer papel significativo na biologia do MOC, o que limita

uma compreensão mais abrangente dos mecanismos associados ao prognóstico e à resposta imune.

A ausência de associações estatísticas robustas entre os marcadores imunológicos, os imunosscores e os desfechos clínicos ressalta a necessidade de cautela na interpretação dos resultados. É provável que outros fatores, como alterações genéticas, epigenéticas, características do microambiente tumoral não avaliadas neste estudo, ou até limitações metodológicas, como o tamanho reduzido da amostra e a heterogeneidade das amostras de biópsia, tenham impactado a capacidade de detecção de associações significativas (Silveira et al., 2021).

7. CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar diferentes modelos de imunosscore para o melanoma oral canino (MOC), buscando compreender sua correlação com o estadiamento TNM e seu valor prognóstico. Embora os modelos desenvolvidos tenham demonstrado potencial na estratificação imunológica dos pacientes, especialmente o Imunosscore Binário e o S1, os resultados não foram estatisticamente significativos nas análises de correlação com sobrevida ou estadiamento, impedindo a confirmação da hipótese inicial de que o imunosscore seria um preditor independente de prognóstico para MOC.

Os achados reforçam a complexidade do microambiente tumoral do MOC, caracterizado pela presença simultânea de infiltração linfocitária citotóxica (CD8+, CD3+) e expressão de marcadores imunossupressores, como PD-L1 e FOXP3, refletindo o equilíbrio entre ativação imune e evasão tumoral. A ausência de associação entre os imunosscores e o estadiamento TNM sugere que a resposta imunológica tumoral não necessariamente acompanha a progressão clínica da doença.

As limitações metodológicas, incluindo o baixo tamanho amostral, a heterogeneidade das amostras e a abordagem de quantificação baseada em densidade cromogênica, impactaram diretamente a robustez dos resultados e devem ser consideradas na interpretação dos dados.

Apesar dessas limitações, este estudo contribui ao introduzir o conceito de imunoscore na oncologia veterinária, apontando caminhos para futuras pesquisas que incorporem amostras maiores e abordagens mais refinadas. Se validados, os imunoscores poderão se tornar ferramentas complementares ao estadiamento TNM, auxiliando na estratificação prognóstica e no manejo terapêutico de cães com MOC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angell HK, Bruni D, Barrett JC, Herbst R, Galon J (2020). The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. **Clinical Cancer Research**. 26: 332-339.

Bergman PJ, Selmic LE, Kent MS (2020). Melanoma. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 6th ed. St. Louis: Elsevier. Capítulo 20, p. 367-381.

Bongiovanni L, Andriessen A, Silvestri S, Porcellato I, Brachelente C, de Bruin A (2021). H2AFZ: A Novel Prognostic Marker in Canine Melanoma and a Predictive Marker for Resistance to CDK4/6 Inhibitor Treatment. **Frontiers in Veterinary Science**. 8: 705359.

Boquet I et al. (2022). Comparison of Immune Response Assessment in Colon Cancer by Immunoscore (Automated Digital Pathology) and Pathologist Visual Scoring. **Cancers**. 14: 1170.

Brocca G et al. (2019). Array Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals Significantly Enriched Pathways in Canine Oral Melanoma. **Frontiers in Oncology**. 9: 1397.

Cronise KE, Coy J, Dow S, Hauck ML, Regan DP (2024). Immunohistochemical and transcriptomic characterization of T and myeloid cell infiltrates in canine malignant melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. 22: 377-387.

Dagli MLZ et al. (2024). Identification of Mutations in Canine Oral Mucosal Melanomas by Exome Sequencing and Comparison With Human Melanomas. **Scientific Reports**. 14: 24174.

de Arruda Camargo GC et al. (2024). Modulation of the tumor microenvironment in non-muscle-invasive bladder cancer by OncoTherad® nanoimmunotherapy: effects on tumor-associated macrophages, tumor-infiltrating lymphocytes, and monoamine oxidases. **Medical Oncology**. 41: 287.

de Carvalho JP et al. (2022). Unraveling the Risk Factors and Etiology of the Canine Oral Mucosal Melanoma: Results of an Epidemiological Questionnaire, Oral Microbiome Analysis and Investigation of Papillomavirus Infection. **Cancers**. 14: 3397.

de Nardi AB, Ferreira TMMR, da Assunção KA (2016). Neoplasias mamárias. In: Daleck CR, de Nardi AB (Eds.). *Oncologia em Cães e Gatos*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Roca. p. 499-516.

El Sissy C et al. (2020). A Diagnostic Biopsy-Adapted Immunoscore Predicts Response to Neoadjuvant Treatment and Selects Patients with Rectal Cancer Eligible for a Watch-and-Wait Strategy. **Clinical Cancer Research**. 26: 5198-5207.

Fonseca-Alves CE et al. (2021). Current Status of Canine Melanoma Diagnosis and Therapy: Report From a Colloquium on Canine Melanoma Organized by ABROVET (Brazilian Association of Veterinary Oncology). **Frontiers in Veterinary Science**. 8: 707025.

Furguele S et al. (2022). Immunoscore Combining CD8, FoxP3, and CD68-Positive Cells Density and Distribution Predicts the Prognosis of Head and Neck Cancer Patients. **Cells**. 11: 2050.

Galon J, Lanzi A (2020). Immunoscore and its introduction in clinical practice. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. 64: 152-161.

Galon J et al. (2014). Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. **The Journal of Pathology**. 232: 199-209.

Galon J et al. (2016). Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. **Journal of Translational Medicine**. 14: 273.

Galon J et al. (2017). World-Wide Immunoscore Task Force: meeting report from the "Melanoma Bridge", Napoli, November 30th–December 3rd, 2016. **Journal of Translational Medicine**. 15: 212.

Galon J et al. (2012a). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. **Journal of Translational Medicine**. 10: 205.

Galon J et al. (2012b). The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. **Journal of Translational Medicine**. 10: 205.

Garcia JS et al. (2022). Association of Systemic Inflammatory and Immune Indices With Survival in Canine Patients With Oral Melanoma, Treated With Experimental Immunotherapy Alone or Experimental Immunotherapy Plus Metronomic Chemotherapy. **Frontiers in Veterinary Science**. 9: 888411.

Ghiringhelli F et al. (2023). Immunoscore immune checkpoint using spatial quantitative analysis of CD8 and PD-L1 markers is predictive of the efficacy of anti-PD1/PD-L1 immunotherapy in non-small cell lung cancer. **EBioMedicine**. 92: 104633.

Gregório H et al. (2021). The role of COX expression in the prognostication of overall survival of canine and feline cancer: A systematic review. **Veterinary Medicine and Science**. 7: 1107-1119.

Guillén A et al. (2021). Immunohistochemical Expression and Prognostic Significance of MAGE-A in Canine Oral Malignant Melanoma. **Research in Veterinary Science**. 137: 226-234.

Hijazi A et al. (2023). Light on life: immunoscore immune-checkpoint, a predictor of immunotherapy response. **Oncoimmunology**. 12: 2243169.

Iussich S et al. (2017). PDGFRs Expression in Dogs Affected by Malignant Oral Melanomas: Correlation With Prognosis. **Veterinary and Comparative Oncology**. 15: 462-469.

Kim WS, Vinayak A, Powers B (2021). Comparative Review of Malignant Melanoma and Histologically Well-Differentiated Melanocytic Neoplasm in the Oral Cavity of Dogs. **Veterinary Sciences**. 8: 261.

Kirilovsky A et al. (2016). Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. **International Immunology**. 28: 373-382.

Lanzi A et al. (2020). The consensus immunoscore: toward a new classification of colorectal cancer. **Oncoimmunology**. 9: 1789032.

Liptak JM (2020). Section A: Oral Tumors – Cancer of the Gastrointestinal Tract. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (Eds.). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 6th ed. St. Louis: Elsevier. Capítulo 23, p. 432-448.

Maekawa N et al. (2021). PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma. **NPJ Precision Oncology**. 5: 10.

Maekawa N et al. (2017). Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. **PLoS One**. 11: e0157176.

Marliot F et al. (2020). Analytical validation of the Immunoscore and its associated prognostic value in patients with colon cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**. 8: e000272.

Mikiewicz M et al. (2019). Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015–2017). **Journal of Comparative Pathology**. 172: 80-87.

Mlecnik B et al. (2023). Multicenter International Study of the Consensus Immunoscore for the Prediction of Relapse and Survival in Early-Stage Colon Cancer. **Cancers**. 15: 418.

Nassif EF et al. (2021). Precision immunity: Immunoscore and neoadjuvant treatment in bladder cancer. **Oncoimmunology**. 10: 1888488.

Nordio L et al. (2021). Molecular and Immunohistochemical Expression of LTA4H and FXR1 in Canine Oral Melanoma. **Frontiers in Veterinary Science**. 8: 767887.

Pagès F et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. **The Lancet**. 391: 2128-2139.

Pagès F et al. (2020). The consensus Immunoscore in phase 3 clinical trials; potential impact on patient management decisions. **Oncoimmunology**. 9: 1812221.

Palma SD et al. (2021). Review on Canine Oral Melanoma: An Undervalued Authentic Genetic Model of Human Oral Melanoma? **Veterinary Pathology**. 58: 881-889.

Pazzi P, Steenkamp G, Rixon AJ (2022). Treatment of Canine Oral Melanomas: A Critical Review of the Literature. **Veterinary Sciences**. 9: 196.

Porcellato I et al. (2021). FoxP3, CTLA-4, and IDO in Canine Melanocytic Tumors. **Veterinary Pathology**. 58: 42-52.

Porcellato I et al. (2022). Tumor-Associated Macrophages in Canine Oral and Cutaneous Melanomas and Melanocytomas: Phenotypic and Prognostic Assessment. **Frontiers in Veterinary Science**. 9: 878949.

Prouteau A, André C (2019). Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. **Genes**. 10: 501.

Ruifrok AC, Johnston DA (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**. 23: 291-299.

Scattone NV et al. (2021). Quantification of Global DNA Methylation in Canine Melanotic and Amelanotic Oral Mucosal Melanomas. **Frontiers in Veterinary Science**. 8: 680181.

Silveira TL et al. (2021). COX-2 Silencing in Canine Malignant Melanoma Inhibits Malignant Behaviour. **Frontiers in Veterinary Science**. 8: 633170.

Silveira TL et al. (2020). Cyclooxygenase-2 Expression is Associated With Infiltration of Inflammatory Cells in Oral and Skin Canine Melanomas. **Veterinary and Comparative Oncology**. 18: 727-738.

Smedley RC et al. (2022). Diagnosis and Histopathologic Prognostication of Canine Melanocytic Neoplasms: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary and Comparative Oncology**. 20: 739-751.

Smedley RC, Sebastian K, Kiupel M (2022). Diagnosis and Prognosis of Canine Melanocytic Neoplasms. **Veterinary Sciences**. 9: 175.

Wang F et al. (2023). Prognostic and predictive value of Immunoscore and its correlation with ctDNA in stage II colorectal cancer. **Oncoimmunology**. 12: 2161167.

Willis J et al. (2023). Multi-Institutional Evaluation of Pathologists' Assessment Compared to Immunoscore. **Cancers**. 15: 4045.

Yasumaru CC et al. (2021). Intratumoral T-Lymphocyte Subsets in Canine Oral Melanoma and Their Association With Clinical and Histopathological Parameters. **Veterinary Pathology**. 58: 491-502.

ANEXO

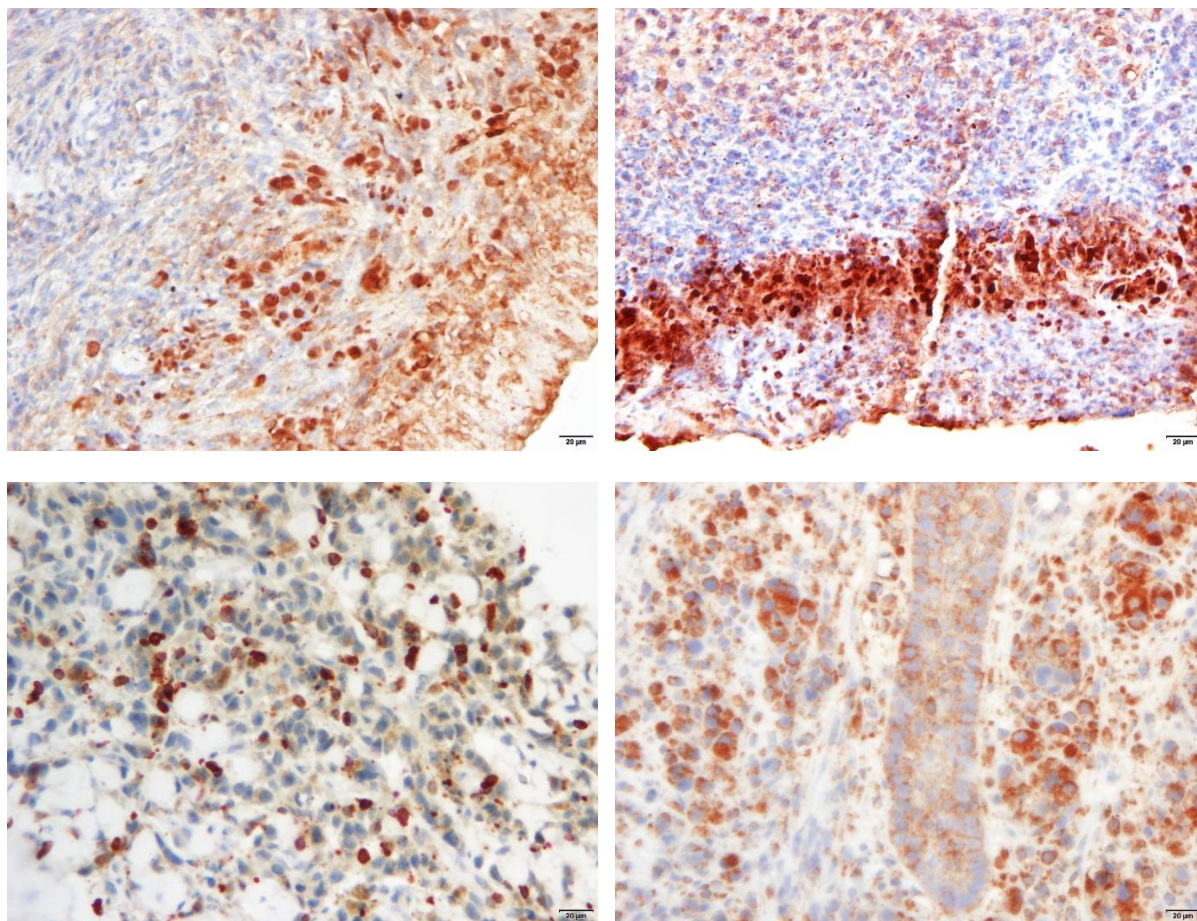
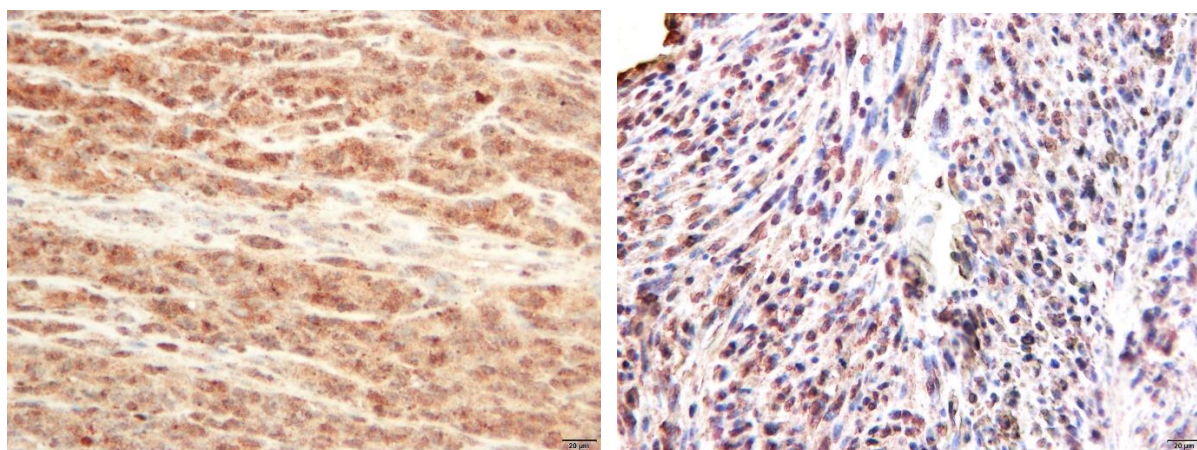


Figura 1: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador CD3 em melanoma oral canino.



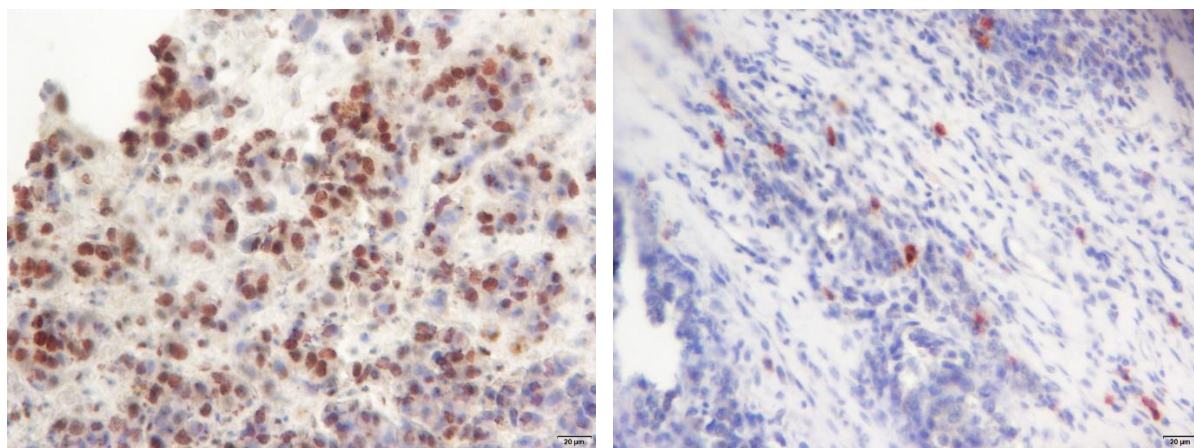


Figura 2: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador CD8 em melanoma oral canino.

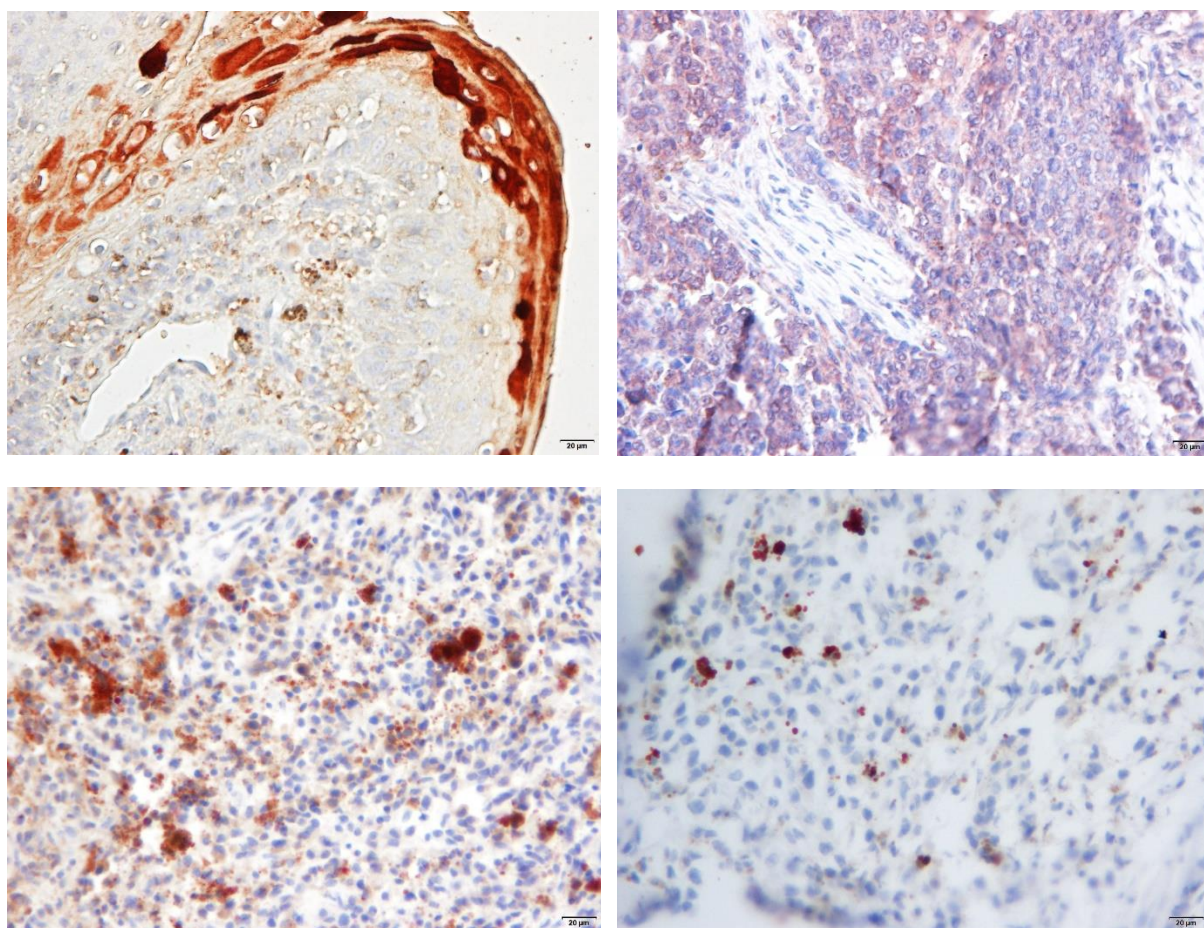


Figura 3: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador CTLA4 em melanoma oral canino.

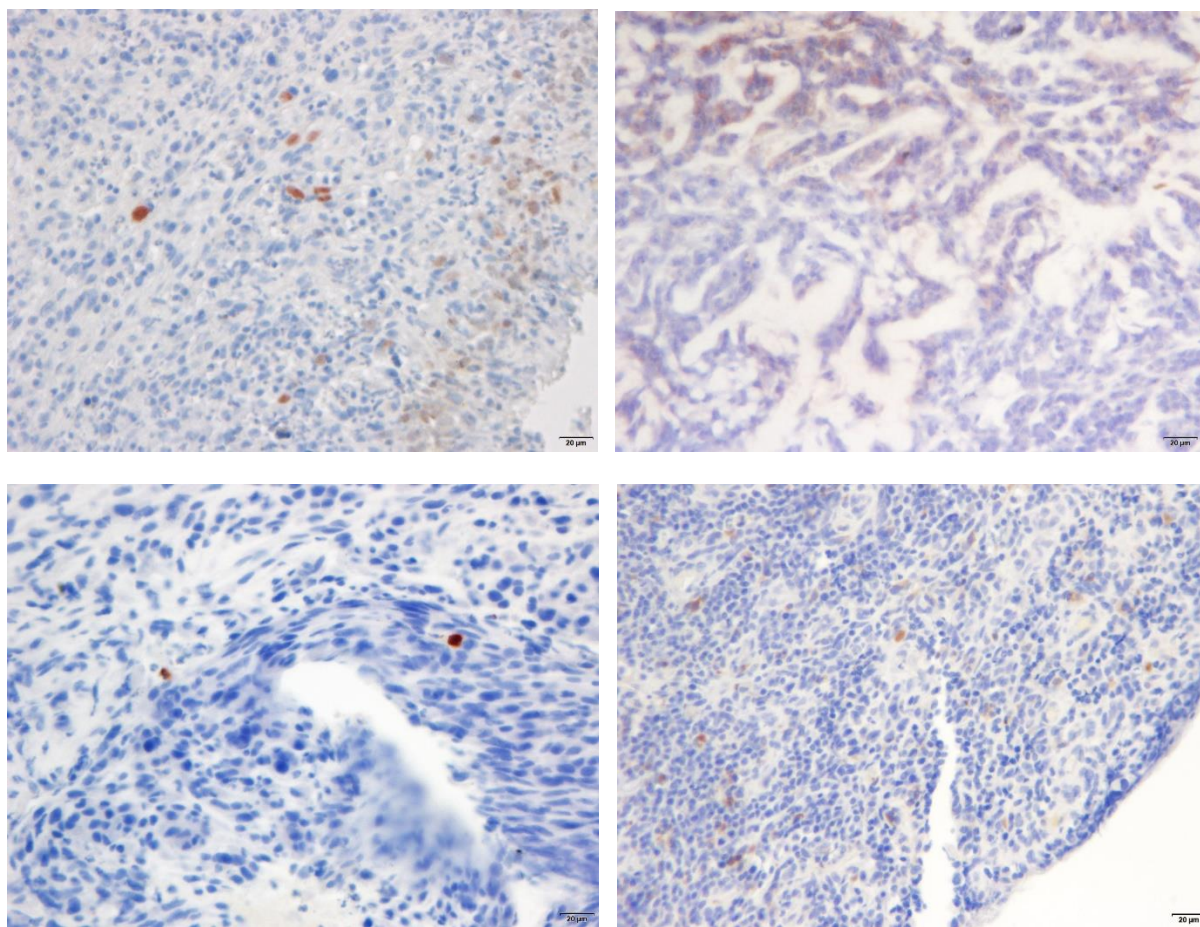
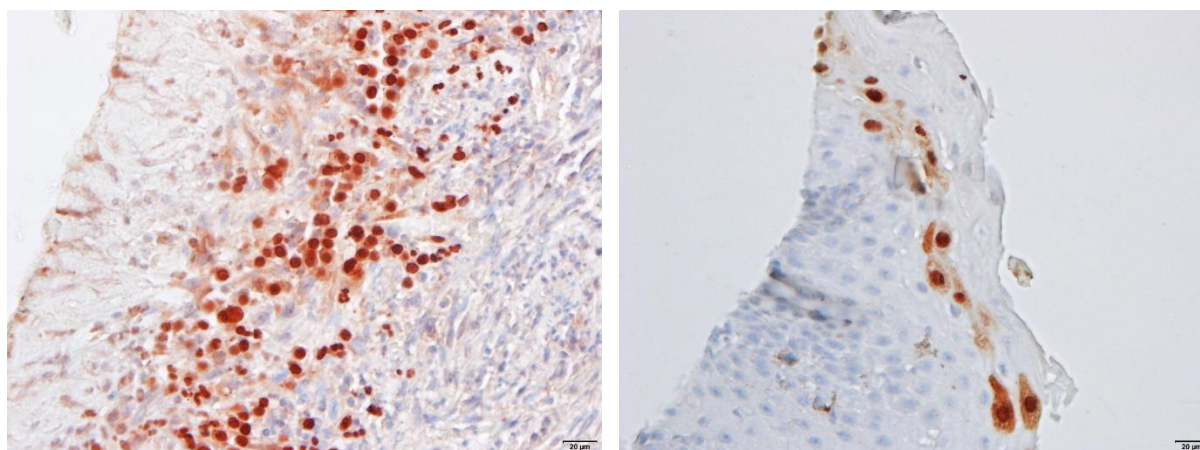


Figura 4: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador CX3CR1 em melanoma oral canino.



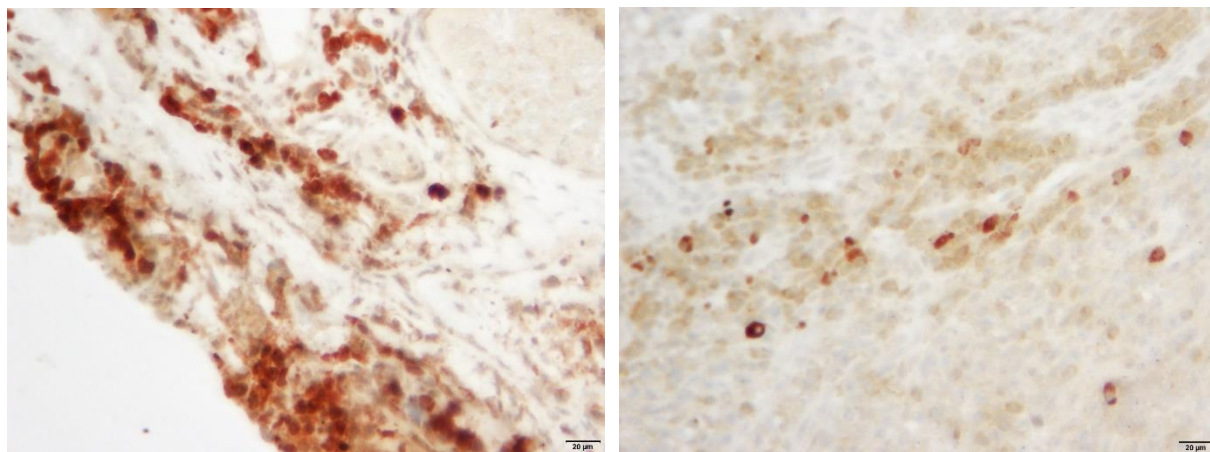


Figura 5: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador FOXP3 em melanoma oral canino.

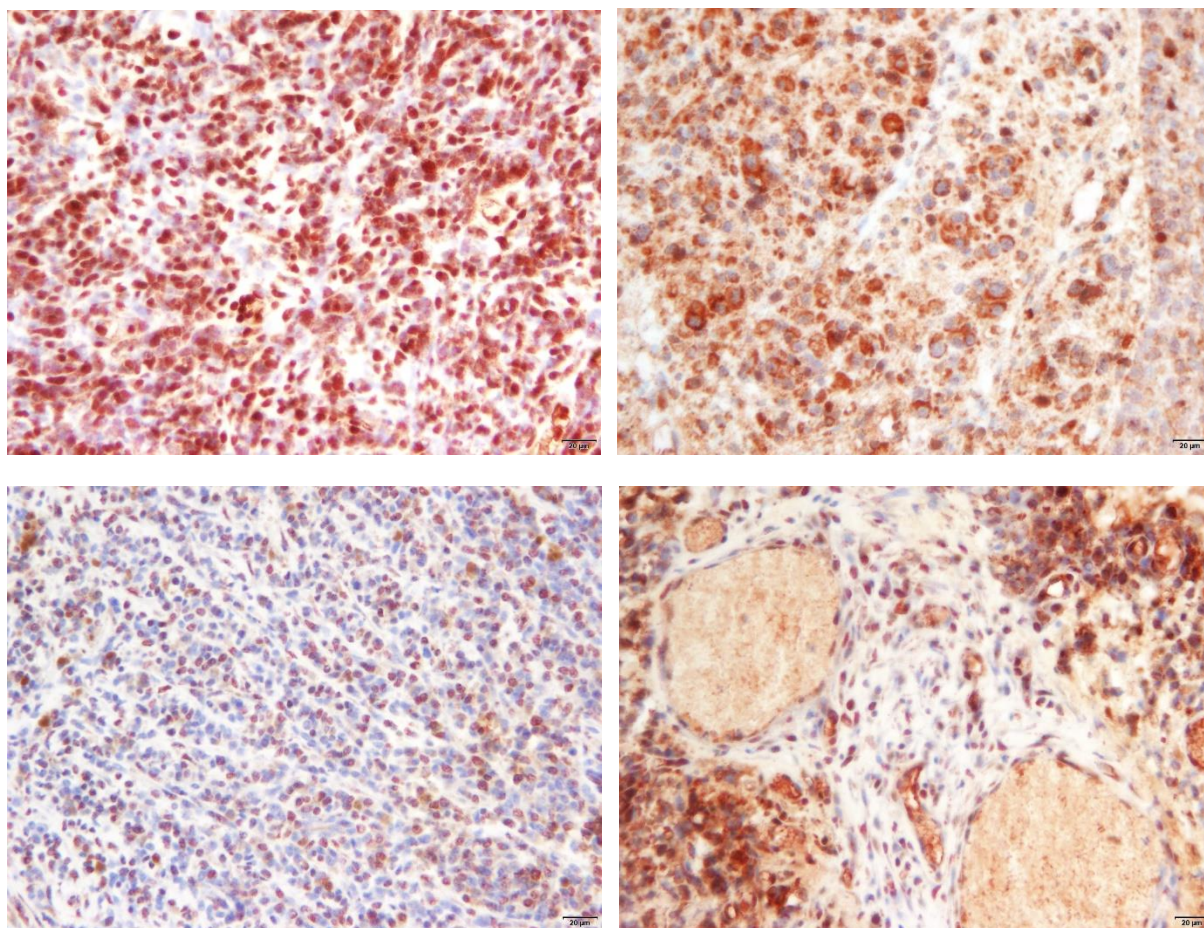


Figura 6: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador PD-L1 em melanoma oral canino.

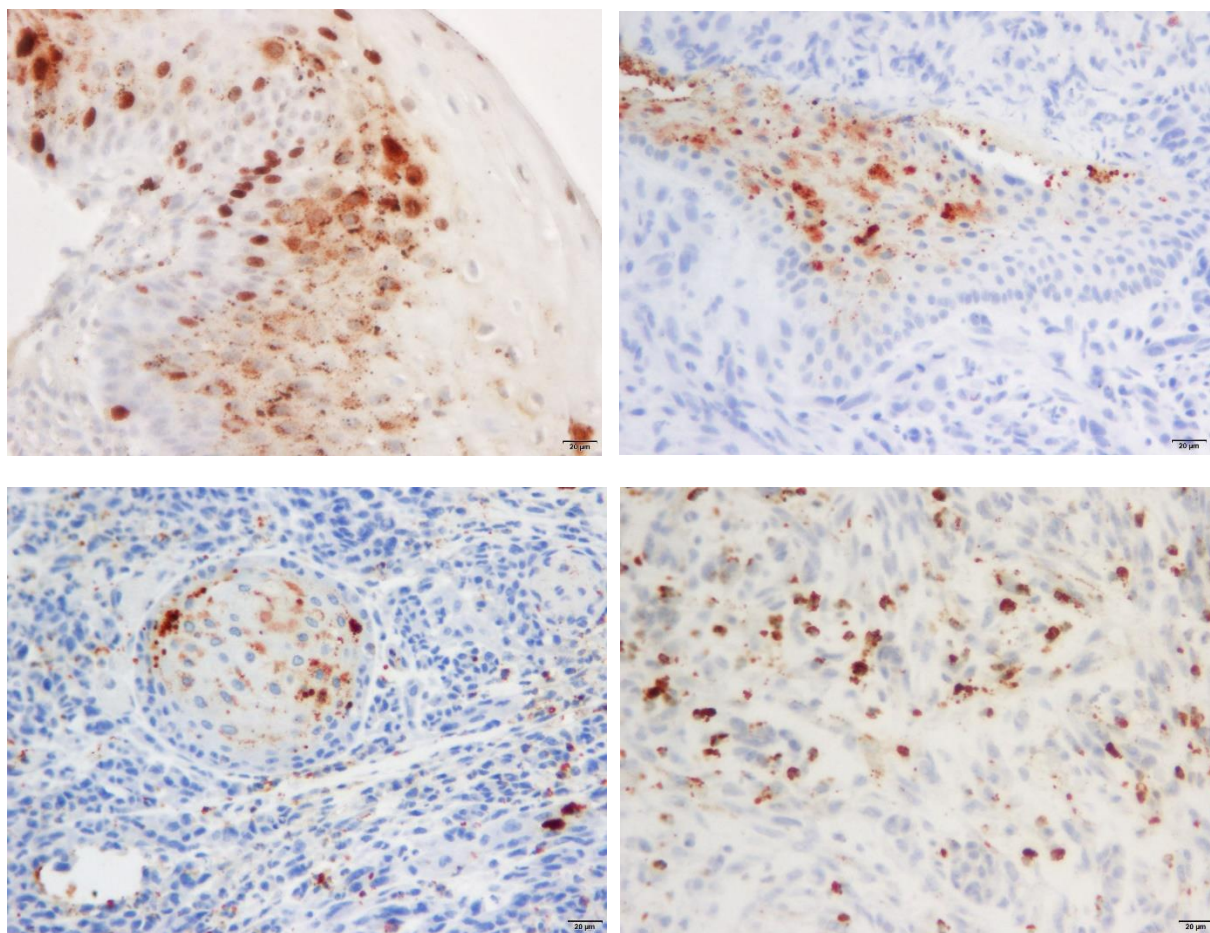
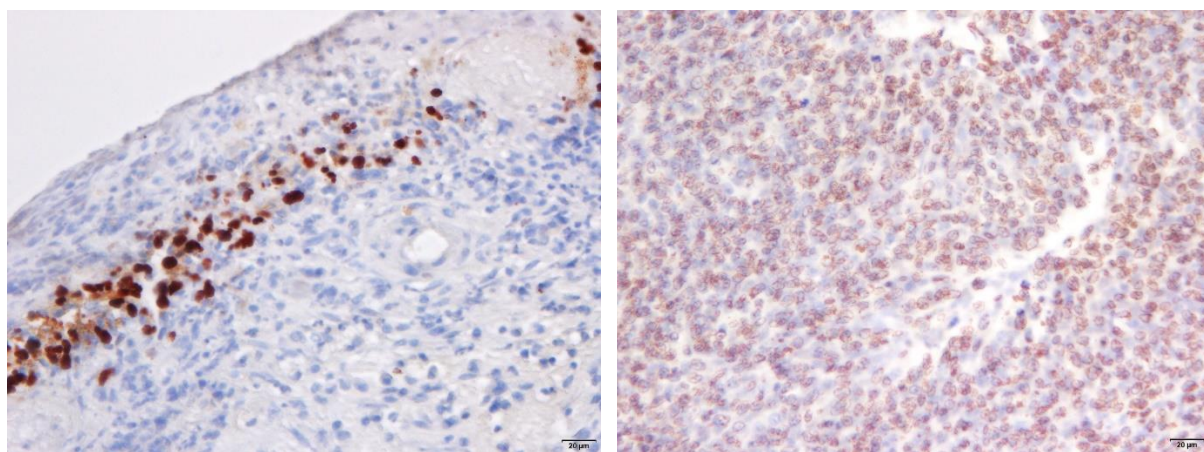


Figura 7: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador CD68 em melanoma oral canino.



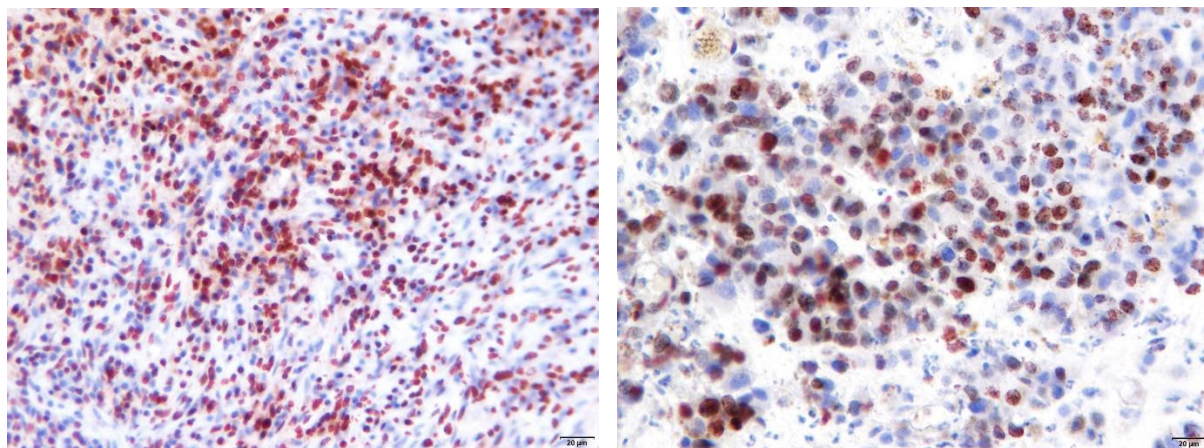


Figura 8: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador CD163 em melanoma oral canino.

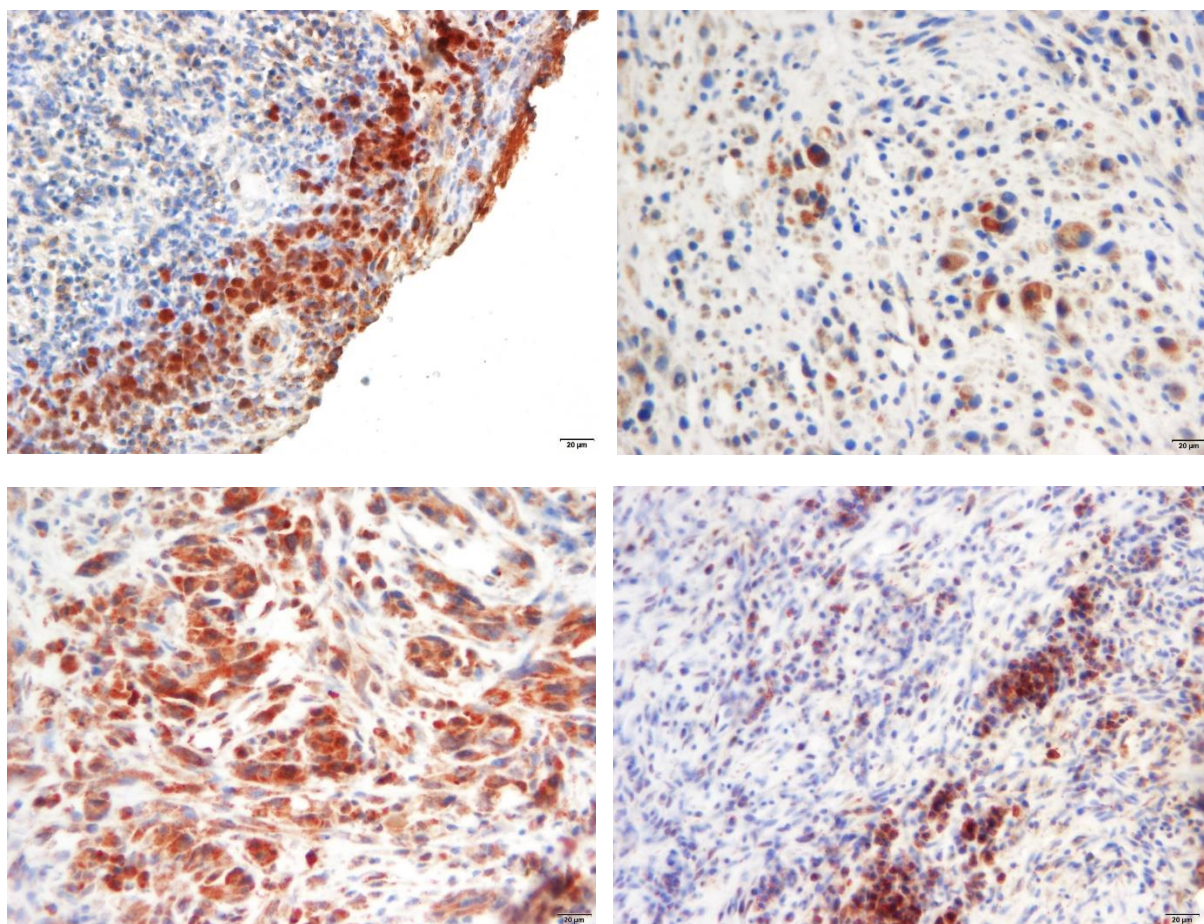


Figura 9: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador Ki-67 em melanoma oral canino.

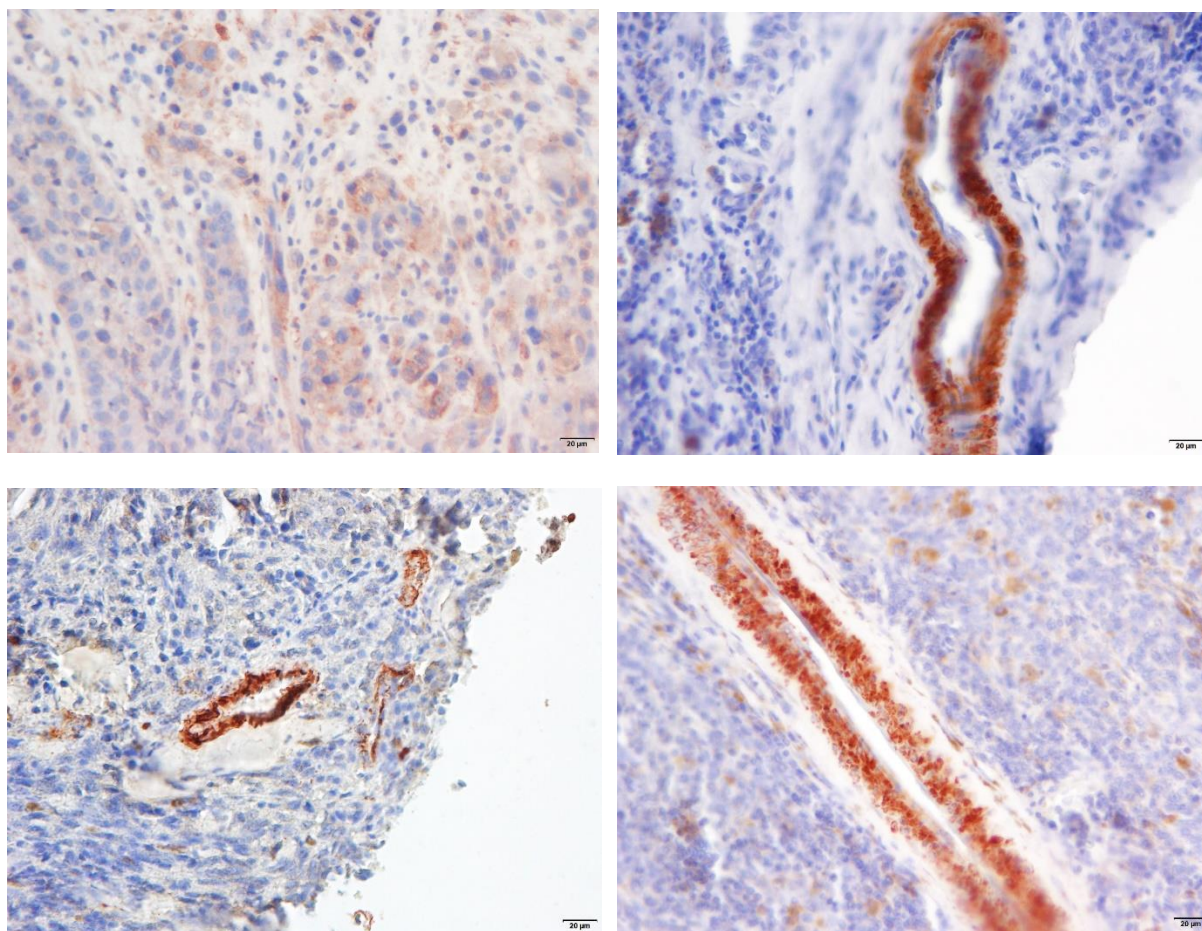


Figura 10: Micrografias (400x) de imuno-histoquímica com marcador CD4 em melanoma oral canino.