CÁSSIA CORRÊA YASUMARU

Avaliação do *crosstalk* entre os Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs) e o Fator Regulador de Interferon 8 (IRF-8) no Microambiente Tumoral: Estudo em melanoma oral canino

São Paulo

2019

CÁSSIA CORRÊA YASUMARU

Avaliação do *crosstalk* entre os Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs) e o Fator Regulador de Interferon 8 (IRF-8) no Microambiente Tumoral: Estudo em melanoma oral canino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de patologia

Área de concentração:

Patologia experimental e comparada

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Cristina de O. Massoco S. Gomes

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3743
FMVZ

Yasumaru, Cássia Corrêa
Avaliação do *crosstalk* entre os Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs) e o Fator Regulador de Interferon 8 (IRF-8) no Microambiente Tumoral: estudo em melanoma oral canino / Cássia Corrêa Yasumaru. – 2019.
102 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina de O. Massoco S. Gomes.

1. Melanoma oral. 2. Canino. 3. TILs. 4. Linfócitos. 5. IRF-8. I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Evaluation of cross-talk between tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and the Interferon γ Regulatory Factor (IRF- γ) in the tumor microenvironment: Study on oral canine melanoma", protocol number CEUAX 3123210217 (ID 000899), under the responsibility Cristina De Oliveira Massoco Salles Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day May 09, 2018.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do "cross -talk" entre os linfócitos infiltrantes de tumor(TILs) e o Fator Regulador de Interferon γ (IRF- γ) no microambiente tumoral: Estudo em melanoma oral canino", protocolado sob o CEUAX nº 3123210217, sob a responsabilidade de Cristina De Oliveira Massoco Salles Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 09 de maio de 2018.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: YASUMARU, Corrêa Cássia

Título: **Avaliação do *crosstalk* entre os Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs) e o Fator Regulador de Interferon 8 (IRF-8) no Microambiente Tumoral: Estudo em melanoma oral canino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes caninos que contribuíram para este estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a minha orientadora, Dr^a Cristina de O. Massoco S. Gomes, que apesar da minha falta de experiência científica, me deu a oportunidade de aprender e me apaixonar pela pesquisa. Sou grata por sua amizade, apoio técnico e humano;

Agradeço ao meu marido, Vital, pelo carinho, por me ouvir, pela paciência nos dias difíceis. Também pela ajuda com as formatações;

À Adele Valentina e Filomena, pelos momentos de ternura e alegria em meio ao caos;

Aos meus pais, Fátima e José Luiz, que sempre me apoiaram em cada nova jornada de aprimoramento pessoal;

À minha sogra, Irene, pela amizade e por cuidar com carinho das minhas filhas de 4 patas quando não consegui lhes dar atenção;

A todos os veterinários cirurgiões que doaram amostras de melanoma e os dados dos seus pacientes para este projeto se tornar realidade, aos tutores destes pacientes e seus cães que contribuíram de forma inestimável para o projeto;

À Juliana Fonseca, pela enorme contribuição aceitando ser a segunda avaliadora das reações de IHQ;

À Jéssica Soares Garcia, pelos ensinamentos, materiais e experiências cedidas;

Às patologistas, Vivian Rísoli e Luciana Neves Torres, por sanarem milhares de dúvidas histopatológicas e me ajudarem a avaliar os melanomas;

Aos amigos do Laboratório de Imuno-oncologia Comparada, Nicolle, Herculano, Vagner, Juliana e Victor, pelas dúvidas tiradas, materiais compartilhados e principalmente, pela amizade;

À Milena de Oliveira, por sempre estar disponível e de boa vontade quando precisei;

Aos professores José Luiz Guerra e Márcio Moreira, pelo incentivo e carta de recomendação;

À minha banca avaliadora, pela disponibilidade, contribuição e atenção;

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

“Sempre me ensinaram que o caminho do progresso não era rápido nem fácil”
(Marie Curie)

RESUMO

YASUMARU, C.C. **Avaliação do “Crosstalk” entre os Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs) e o Fator Regulador de Interferon 8 (IRF-8) no Microambiente Tumoral**: Estudo em melanoma oral canino [Evaluation of Crosstalk between Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) and Interferon 8 Regulatory Factor (IRF-8) in the Tumor Microenvironment: A Study of Canine Oral Melanoma].2019.102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As células imunes interagem com os tumores sólidos infiltrando ativamente estas neoplasias e liberando fatores solúveis que irão influenciar na progressão tumoral. Dentre as células imunes que participam e interferem neste imunoambiente estão os TILs, Linfócitos Infiltrantes de Tumor, cuja presença pode ser benéfica ou prejudicial ao paciente, dependendo do seu subtipo e citocinas produzidas. O interferon gama, uma citocina produzida por linfócitos T, induz a expressão de IRF-8 (Fator Regulatório de Interferon 8) nas células tumorais. Estudos baseados em células humanas e murinas revelaram que este fator de transcrição, entre outras ações biológicas, está envolvido na sensibilização das células tumorais à apoptose. O objetivo deste estudo foi avaliar qualitativamente e quantitativamente o infiltrado linfocitário e a expressão do IRF8 no melanoma oral canino. Para tal, foi realizado um estudo prospectivo com 50 amostras de melanoma canino, nas quais foram avaliados o infiltrado linfocitário por meio da análise histopatológica e a imunofenotipagem por citometria de fluxo. A expressão de IRF-8 nas células tumorais foi avaliada pelo método de imuno-histoquímica. De modo geral, este estudo indicou que nos melanomas orais caninos o infiltrado linfocitário intratumoral abundante e de padrão de distribuição difuso, composto principalmente por células T CD8⁺, foi associado aos tumores de fenótipos menos agressivos e a uma sobrevida maior. A imunomarcagem do IRF-8 foi mais pronunciada nas células tumorais dos melanomas que possuíam uma quantidade alta de TILs, mas a expressão deste fator não alterou a sobrevida dos pacientes. Portanto, os resultados deste trabalho sugerem que a análise do infiltrado linfocitário no melanoma canino pode auxiliar na caracterização do comportamento tumoral.

Palavras-chave: Melanoma oral. Canino. TILs. Linfócitos. IRF-8.

ABSTRACT

YASUMARU, C.C. Evaluation of Crosstalk between Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) and Interferon 8 Regulatory Factor (IRF-8) in the Tumor Microenvironment: A Study of Canine Oral Melanoma.2019. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Immune cells interact with solid tumors by actively infiltrating these neoplasms and releasing soluble factors that will influence tumor progression. Among the immune cells that participate and interfere in this immunoenvironment are TILs, Tumor Infiltrating Lymphocytes, whose presence may be beneficial or harmful to the patient, depending on their subtype and produced cytokines. Interferon gamma, a cytokine produced by T lymphocytes, induces the expression of IRF-8 (Regulatory Factor of Interferon 8) in tumor cells. Studies based on human and murine cells have revealed that this transcription factor is involved in the sensitization of tumor cells to apoptosis, among other biological actions. The objective of this study was to evaluate qualitatively and quantitatively the lymphocytic infiltrate and the expression of IRF8 in oral canine melanoma. A prospective study was carried out with 50 samples of canine melanoma, in which the lymphocytic infiltrate was evaluated by histopathological analysis and immunophenotyping by flow cytometry. Expression of IRF-8 in tumor cells was assessed by the immunohistochemistry method. In general, this study indicated that an abundant intratumoral lymphocytic infiltrate and diffuse distribution pattern, composed mainly of CD8⁺ T cells, was associated with less aggressive tumor phenotypes and with a longer survival in the canine oral melanomas. Immunoblotting of IRF-8 was more pronounced in melanoma tumors that had a high amount of TILs, but expression of this factor did not alter patient survival. Therefore, the results of this work suggest that the analysis of the lymphocytic infiltrate in canine melanoma can help in the characterization of the tumor behavior.

Keywords: Oral Melanoma. Canine. TILs. Lymphocytes. IRF-8.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1	Tipos de infiltrado linfocitário na massa tumoral	29
Figura 2	Seccionamento radial. O tecido é cortado perpendicularmente ao plano do cirurgião.	41
Figura 3	Característica racial dos 45 pacientes incluídos no estudo.	47
Figura 4	Distribuição das amostras como primeira ocorrência ou recidiva do paciente.	47
Figura 5	Estadiamento dos pacientes no momento da entrada no estudo	48
Figura 6	Formações tumorais no momento pré-cirúrgico, demonstrando os diferentes aspectos que o melanoma pode assumir.	48
Figura 7	Presença de úlcera nas amostras de estadiamento baixo (1 e 2) e alto (3 e 4) (n=48).	49
Figura 8	Fotomicrografias representando o infiltrado linfocitário peritumoral. Coloração HE.	52
Figura 9	Fotomicrografia demonstrando o infiltrado linfocitário intratumoral. Coloração HE.	53
Figura 10	Frequência das amostras quanto ao infiltrado linfocitário (Infiltrado intratumoral n=48; infiltrado peritumoral n=46).	54
Figura 11	Escore do infiltrado intratumoral de TILs em pacientes de estadiamentos menos agressivos (1-2) e mais agressivos (3-4) do melanoma oral canino.	54
Figura 12	Escore de linfócitos intratumorais (TILs) em amostras de primeira ocorrência e de recidivas (primeira ocorrência n=33; recidiva n=15).	55
Figura 13	Fotomicrografia representativa de melanoma oral canino com infiltrado de TILs de padrão difuso. Coloração HE.	57
Figura 14	Fotomicrografia representativa de melanoma oral canino com infiltrado focal de TILs (setas). Coloração HE.	58

Figura 15	Fotomicrografia representativa de melanoma oral com ausência de infiltrado linfocitário (ausente). Coloração HE.	59
Figura 16	Frequência dos padrões de infiltrado linfocitário nas amostras de melanoma oral canino (difuso n= 28; focal n=10, ausente n=10).	60
Figura 17	Escore do infiltrado linfocitário intratumoral (TILs) nas amostras de diferentes padrões de infiltrado intratumoral (n=48).	60
Figura 18	Escore do infiltrado linfocitário peritumoral nas amostras de diferentes padrões de infiltrado intratumoral (n=46).	61
Figura 19	Frequência de linfócitos CD8 ⁺ nos melanomas orais caninos com infiltrado linfocitário de diferentes padrões.	61
Figura 20	Frequência de Linfócitos Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ em amostras de diferentes padrões de infiltrado linfocitário.	62
Figura 21	Porcentagem de linfócitos TCD8 ⁺ encontrada nos melanomas orais oriundos de primeiras ocorrências tumorais e de recidivas (primeira ocorrência n=32; recidiva n=14).	65
Figura 22	Porcentagem de linfócitos TCD4 ⁺ encontrada em amostras de primeira ocorrência e de recidivas.	65
Figura 23	Presença dos linfócitos T CD8 ⁺ nas amostras de estadiamentos menos agressivos (1 e 2) e mais agressivos (3 e 4).	66
Figura 24	Porcentagem de linfócitos TCD4 ⁺ observadas nas amostras de estadiamentos baixos (1 e 2) e altos (3 e 4).	66
Figura 25	Porcentagem de linfócitos TCD8 ⁺ nas amostras de diferentes escores de TILs.	67
Figura 26	Porcentagem de Linfócitos Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ em amostras de diferentes escores de TILs.	67
Figura 27	Fotomicrografias representativas da imunomarcação para o IRF-8. Aumento de 200 vezes.	70
Figura 28	Localização intracelular do IRF-8 nas células tumorais (Citoplasma n=33; Citoplasma + Núcleo n=13).	71

Figura 29	Expressão de IRF-8 nos linfócitos (seta branca) e plasmócitos (seta preta). Aumento de 400 vezes.	71
Figura 30	Porcentagem de linfócitos TCD8 ⁺ nas amostras de melanoma oral de diferentes classificações de expressão de IRF-8.	72
Figura 31	Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes de diferentes estadiamentos (1, 2, 3 e 4) (n=50).	75
Figura 32	Sobrevida dos pacientes com estadiamentos menos agressivos (1 e 2) e mais agressivos (3 e 4).	75
Figura 33	Curva da sobrevida dos pacientes que possuíam no melanoma um escore baixo de TILs (0 a 2) versus os pacientes com escore alto de TILs (3 a 6).	76
Figura 34	Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função do padrão de distribuição dos TILs.	76
Figura 35	Curva Kaplan-Meier dos pacientes com diferentes quantidades de linfócitos TCD8 ⁺ intratumorais.	77
Quadro 1	Avaliação semi-quantitativa do infiltrado linfocitário no Melanoma Oral Canino	42
Quadro 2	Escore de imunorreatividade (IRS) para o IRF-8 nas amostras de melanoma oral canino.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação TNM para tumores orais caninos de acordo com a organização mundial da saúde (WHO).	27
Tabela 2	Estadiamento para tumores orais caninos baseado no TNM	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 IMUNIDADE ANTITUMORAL.....	19
2.1.1 INTERAÇÃO DAS CÉLULAS IMUNES NO AMBIENTE TUMORAL.....	19
2.2 O MELANOMA ORAL CANINO	22
2.2.1 EPIDEMIOLOGIA E DADOS GERAIS	22
2.2.2 ETIOLOGIA.....	23
2.2.3 CLASSIFICAÇÃO	24
2.2.4 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS	25
2.2.5 ESTADIAMENTO- SISTEMA TNM.....	26
2.3 LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR	27
2.3.1 DADOS GERAIS	27
2.3.2 DISTRIBUIÇÃO E DENSIDADE DOS TILS NO MELANOMA	28
2.3.3 SUBTIPOS CELULAR DOS TILS.....	30
2.3.4 TILS NOS TUMORES HUMANOS	31
2.3.5 TILS NOS TUMORES CANINOS	32
2.4 FATOR REGULADOR DE INTERFERON-8 (IRF-8).....	33
2.4.1 DADOS GERAIS	33
2.4.2 EXPRESSÃO GÊNICA	34
2.4.3 INFLUÊNCIA DO IRF-8 NAS CÉLULAS IMUNES E NO MICROAMBIENTE TUMORAL	35
2.4.4 INFLUÊNCIA DO IRF-8 NO MELANOMA	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 AMOSTRAS TUMORAIS.....	40
4.2 ANÁLISE DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO	40
4.3 DISSOCIAÇÃO TECIDUAL E IMUNOFENOTIPAGEM	43
4.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	44
4.5 ANÁLISE DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	45
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS	47
5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS.....	47

5.2 DADOS HISTOPATOLÓGICOS	50
5.2.1 ANÁLISE DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO NAS AMOSTRAS.....	51
5.3 IMUNOFENOTIPAGEM DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO DAS AMOSTRAS DE MELANOMA ORAL CANINO	64
5.4 EXPRESSÃO DO IRF-8 NAS AMOSTRAS TUMORAIS	69
5.5 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES	74
6 DISCUSSÃO.....	79
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de uma neoplasia é um evento que ocorre após alterações epigenéticas ou mutações celulares. Existe um sistema biológico multifatorial que vai se organizando durante o desenvolvimento dos tumores e nesse sistema as células imunes tem participação.

Uma prova natural da importância do sistema imune no desenvolvimento tumoral é a possibilidade de ocorrer regressão espontânea de alguns tumores, como o melanoma.

O sistema imune interage com as células tumorais e libera fatores como citocinas, que irão ajudar a ditar a progressão do tumor. Esse ambiente de influência recíproca entre as células tumorais e imunes é chamado de microambiente tumoral.

No entanto, os mecanismos que modulam essa interação ainda não são bem entendidos. Isto é compreensível, dado que o papel do sistema imune na vigilância tumoral começou a ser estudado apenas nos anos 70, com a Teoria da imunovigilância (BURNET, 1970). Ainda mais recentemente, a capacidade tumoral de se evadir do sistema imune ganhou destaque na publicação de Hanahan e Weinberg (2011). Desde então, os avanços e as incertezas em relação à participação imune na progressão e na regressão tumoral permanecem.

Outra evidência que o sistema imune não ignora os tumores é a presença de infiltrado inflamatório em biópsias tumorais, esse infiltrado recebe o nome de Linfócitos Infiltrantes de Tumores (TILs). Os TILs são linfócitos que se infiltram dentro da massa tumoral e se desenvolvem junto com o tumor. Porém essas células eram injustamente associadas à malignidade e, apenas há 50 anos tiveram seu papel antitumoral reconhecido (LEE E MARGOLIN; 2012).

De fato, dentre as células imunes que participam do ambiente tumoral os linfócitos ganharam destaque. A importância prognóstica e terapêutica dos TILs em alguns tumores humanos é bem determinada, é o caso do carcinoma renal, dos tumores mamários, tumores colorretais e melanomas cutâneos (CLEMENTE, 1996); (PIRAS et al, 2005); (GALON et al, 2006), (PAGES et al, 2010), (MIHM E MULÉ, 2015); (GARNELO et al., 2017).

Em 1988 foi realizado o primeiro estudo em humanos, que demonstrou que a infusão de TILs autólogos poderia induzir a regressão de melanomas metastáticos (ROSENBERG et. al., 1988).

Hoje, por conta da correlação positiva da presença dos TILs com a sobrevida do paciente com câncer, a utilização dos TILs na terapia antitumoral já ocorre na medicina humana, por meio da transferência adotiva de células, aonde são selecionados os linfócitos citotóxicos, para aumentar a resposta imune. E mais recentemente, um novo tratamento no qual é realizado o bloqueio de antígenos que regulam negativamente a ativação de linfócitos T citotóxicos se mostrou promissor, o que conferiu o prêmio Nobel de Medicina do ano de 2018 aos pesquisadores envolvidos (PHAN et al., 2003).

Em tumores caninos, por sua vez, pouco se sabe sobre a influência dos linfócitos Infiltrantes de tumor. Os mesmos já foram estudados em carcinomas mamários em cadelas, porém com resultados divergentes, ora sendo associados a malignidade, ora obtendo papel na imunovigilância, assim como ocorreu no início dos estudos destas células em humanos (ESTRELA-LIMA et al., 2010).

A presença intratumoral de linfócitos também foi observada no Tumor Venéreo Canino (TVT), onde sua presença é associada à regressão tumoral espontânea (PÉREZ et al., 1998).

No melanoma oral canino, neoplasia a ser abordada neste trabalho, ainda não existem estudos detalhados a respeito do imunoambiente. A incidência crescente desta neoplasia em cães, que hoje já corresponde a 7% dos tumores malignos caninos e não possui tratamento eficaz, torna necessária uma maior compreensão do seu microambiente (SMITH et al., 2002).

A presença de linfócitos T regulatórios foi encontrada em maior quantidade no sangue periférico de pacientes caninos que estavam acometidos pelo melanoma oral, em relação aos pacientes caninos hígidos. Essa informação confirma que nem todos os subtipos de linfócitos são benéficos para o paciente (TOMINAGA et al., 2010).

O subtipo do linfócito, as citocinas liberadas por eles e os genes expressos também apresentam participação na progressão ou regressão tumoral.

Um gene relevante expressado por diversas células imunes, inclusive por linfócitos B e linfócitos T ativados, é o Fator Regulador de Interferon-8 (IRF-8). Este gene, quando expresso, tem um papel duplo no ambiente tumoral, seja por modular o desenvolvimento de diversas células imunes que compõem o ambiente tumoral, assim como sua produção de citocinas, seja por participar da regulação da morte celular via apoptose nas células tumorais (SCHIAVONI et al., 2013).

Tamanha é a importância desse gene, até então pouco estudado, que ocorre o aumento da progressão tumoral e do número de metástases em tumores de camundongos na qual a expressão desse gene é perdida, por meio da metilação do DNA (SCHIAVONI et al., 2013; SUZUKI et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

O presente trabalho constatou que, em relação a expressão do IRF-8 nas células imunes e/ou tumorais no melanoma canino, não foram ainda conduzidos estudos científicos.

Visto que o IRF-8 induz a ativação de células TCD8⁺, que são os linfócitos associados à morte dos melanócitos no vitiligo humano, e cuja produção de IFN- γ inibe a melanogênese *in vitro*, pode-se cogitar que a expressão desse gene nos linfócitos que infiltram o melanoma canino também exerça uma influência na progressão tumoral (MIYAGAWA et al., 2012; YANG et al., 2015).

E por que seria válido investir tempo em pesquisas a respeito do melanoma oral canino?

O desenvolvimento de novos fármacos pode ser caro e ineficiente. Os modelos murinos são excelentes para o estudo da biologia do câncer, mas podem ser limitados no que diz respeito à certas características que envolvem o desenvolvimento do câncer humano, como a heterogeneidade, a influência ambiental e o crescimento por longos períodos.

Dada a alta frequência do melanoma oral na espécie, o cão doméstico é um farto modelo natural de estudo do melanoma não associado à radiação UV em humanos, como o melanoma acral e o melanoma de mucosa. Esses tumores em humanos correspondem a 5% dos casos de melanoma e são pobremente compreendidos e bastante agressivos (GILLARD et al., 2013; SIMPSON et al., 2013).

No que diz respeito à oncologia comparada, o melanoma oral em cães possui características histopatológicas similares ao “melanoma simulando nevus, com arquitetura do tipo congênito” e ao “melanoma de tipo animal”, neoplasias raras, que ocorrem com maior frequência em crianças. Além disso, é importante ressaltar que a ausência de mutação no gene BRAF nos melanomas caninos é análoga ao melanoma de “tipo animal” de mucosa em humanos (GILLARD et al., 2013; ATHERTON et al., 2016).

Por esses motivos, o cão doméstico pode ser um ótimo intermediário entre o camundongo e o homem na pesquisa oncológica. Segundo o IBGE, os cães hoje são 52 milhões nos lares brasileiros, eles convivem intimamente com os homens e

compartilham a exposição aos mesmos carcinógenos ambientais e muitas vezes, os mesmos alimentos, além de possuir um desenvolvimento espontâneo de neoplasias, assim como os seres humanos.

Estudos a respeito do microambiente do melanoma de cavidade oral na espécie canina possibilitarão prever com mais clareza o prognóstico do paciente, oferecer novas opções de tratamento para esse câncer devastador e fazer um paralelo entre o melanoma oral canino e o melanoma de mucosa humano, aproveitando da grande quantidade de casos caninos para se desenvolver terapias e pesquisas clínicas, que possam favorecer não só a medicina veterinária, mas também a medicina humana.

Portanto, o presente trabalho visa compreender melhor o papel dos TILs e da expressão do IRF-8 no microambiente do melanoma oral canino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMUNIDADE ANTITUMORAL

2.1.1 Interação das células imunes no ambiente tumoral

Em 1891 Willian Coley se deparou com o histórico de um paciente com sarcoma, que após uma grave infecção pós-operatória apresentou regressão tumoral. Com base nessa observação começou a simular uma infecção em seus pacientes, desenvolvendo assim a primeira vacina antitumoral, a chamada toxina de Coley (CANN, 2003).

Em 1970, Macfarlane Burnet propôs o conceito de imunovigilância no qual o sistema imune seria capaz de reconhecer e eliminar células tumorais (BURNET, 1970). A infiltração de células imunes é um evento natural que faz parte da imunovigilância, e ocorre via extravasamento e/ou através dos vasos sanguíneos (MATTEI, 2013).

Em 1988, foi realizado o primeiro estudo em humanos que demonstrou que a infusão de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) autólogos poderia induzir a regressão do câncer em pacientes com melanomas metastáticos (ROSENBERG et al., 1988).

Nos anos 90, uma série de estudos demonstraram que animais tratados com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ e camundongos deficientes para perforina tiveram um crescimento tumoral mais precoce do que os animais do grupo controle estabelecendo uma relação do desenvolvimento tumoral com o sistema imune (DUNN et al., 2004; SMITH et al., 2002).

Em 1996, no estudo de ROSENBERG e WHITE obteve uma evidência da resposta do sistema imune contra os antígenos associados ao tumor (AAT) exibidos pelas células do melanoma, quando 26% dos pacientes tratados com interleucina 2 (IL-2) desenvolveram vitiligo, uma doença autoimune (WEINBERG, 2006). Além disso, dados clínicos e laboratoriais demonstram incidências altas de câncer em pacientes imunossuprimidos (PAGÈS et al., 2010).

Ao longo dos anos, ficou evidente que o *crosstalk* das células imunes com as células tumorais no microambiente determina a progressão ou não do tumor (MATTEI, 2013), e já está bem estabelecido que camundongos *knockout* para componentes

essenciais do sistema imune inato ou adaptativo, como por exemplo STAT1 ou perforina, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de câncer (ZITVOGEL, 2006).

A resposta imune antitumoral se inicia após o remodelamento tecidual no local do crescimento do tumor, o que ocorre devido à angiogênese e crescimento com invasão tecidual. Esse processo gera citocinas pró-inflamatórias, que juntamente com as citocinas tumorais recrutam células do sistema imune inato, como células NK, macrófagos e linfócitos T $\gamma\delta$, estas por sua vez interagem com as células tumorais via TCR e produzem IFN- γ . A liberação de IFN- γ no imunoambiente tumoral leva ao recrutamento de mais células imunes, como os macrófagos, que se infiltram no estroma tumoral e produzem IL-12, o que leva ao recrutamento de células NK e produção de mais IFN- γ . Esse sistema de feedback positivo ativa processos dependentes do IFN- γ , sendo eles processos pró-apoptóticos, angiostáticos e antiproliferativos. Como resultado, os antígenos tumorais provenientes de células tumorais mortas ficam disponíveis para as células apresentadoras de antígeno que são essenciais para a regulação do sistema imune adaptativo. As células dendríticas que foram recrutadas para o ambiente tumoral, se tornam ativadas pela presença de citocinas, adquirem antígenos tumorais e migram aos linfonodos, induzindo a ativação de células Th1 CD4⁺ e o desenvolvimento de células T CD8⁺ CTL. Estas migram para o sítio tumoral aonde as células T CD4⁺ via produção de IL-5 mantém a viabilidade das células T CD8⁺, que então irão induzir a morte das células positivas para os antígenos tumorais, através da produção de IFN- γ e as matando diretamente (DUNN et al., 2004).

Apesar das evidências científicas de que animais imunossuprimidos são mais susceptíveis ao desenvolvimento tumoral, os animais com o sistema imune competente também podem desenvolver câncer. Isso acontece, em teoria, pela capacidade de evasão tumoral, ou seja, a capacidade das células tumorais de não só escaparem do sistema imune, como também de o subverter (ONUICHIC e CHAMMAS, 2010).

A evasão do sistema imune é tão significativa para o desenvolvimento do tumor que foi incluída como uma característica do câncer, além das já descritas no artigo "The Hallmarks of cancer" (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Outra forma de evasão das células tumorais é a ausência de expressão do MHC de classe I nas mesmas, isto acontece por meio das altas taxas de mitose

dessas células, o que pode levar a alterações ou mutações de e as torna irreconhecíveis pelos linfócitos T citotóxicos (ABBAS et al., 2015), (LANITIS et al., 2017).

Um dos mecanismos de evasão é a produção tumoral de citocinas imunossupressoras, como, por exemplo, o TGF- β que leva à geração de células imunes com atividade inibitória (ABBAS et al., 2015). Alguns subtipos celulares como os Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs), com fenótipo M2, agem “desligando” o sistema imune, favorecendo a progressão tumoral (MATTEI, 2013). A densidade elevada de macrófagos no tecido neoplásico é relacionada ao mau prognóstico, e a superexpressão de CSF-1 (colony-stimulating factor -1), um fator de crescimento de macrófagos, está correlacionada a um alto grau neoplásico e pior prognóstico em diversos tumores (CONDEELIS e POLLARD, 2006).

Existe uma correlação positiva entre a presença de linfócitos Infiltrantes de tumor e um prognóstico favorável em diversos tumores sólidos. No entanto, nem todos os tipos de linfócitos possuem atividade antitumoral, uma vez que uma fração importante dos linfócitos que infiltram o tumor são os linfócitos T regulatórios, que possuem atividade imunossupressora e auxiliam na evasão e progressão tumoral (MATTEI, 2013).

Além disso, existe uma competição nutricional entre as células tumorais e as células imunes no imunoambiente. Foi verificado *in vitro* que existe um aporte insuficiente de glicose para os TILs, o que reduz a produção de citocinas, como o IFN- γ , mesmo que o tumor em questão seja altamente antigênico. Isso acontece porque muitos tumores apresentam altas taxas de glicólise (conhecido como Efeito *Warburg*) (CHANG et al., 2016); (BURNS e MANDA, 2017).

Mesmo as células dendríticas e as células NK, que sabidamente produzem uma resposta imune ativa antitumoral, podem desenvolver deficiências funcionais devido ao ambiente imunossupressor tumoral. De fato, ao isolar-se células dendríticas de pacientes com câncer foi verificada a baixa expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 (MATTEI, 2013), (LANITIS et al., 2017).

Outro mecanismo importante de tolerância imune é a produção tumoral de GM-CSF e consequente geração de células supressoras de origem mieloide (MDSC), que são células mieloides imaturas, precursoras de granulócitos, macrófagos e células dendríticas, capazes de inibir a resposta imune inata e adaptativa (UMANSKY et al., 2016).

Algumas células tumorais expressam PD-L1 (*programmed cell death ligant 1*) que ao se ligar no PD-1 (*programmed cell death 1*), um ligante inibitório dos linfócitos, causa exaustão linfocitária, o que permite a sua evasão do sistema imune. No melanoma humano os linfócitos Infiltrantes de tumor (TILs) expressam PD-1, portanto, os pacientes com células tumorais que expressam o PD-L1 apresentam maior risco de progressão da doença (MAEKAWA, 2014).

Outro indício interessante da evasão tumoral foi o estudo conduzido *in vitro* cuja ação dos TILs no câncer de próstata foi aumentada após enzimas imunossupressoras, como a arginase-1 e o óxido nítrico sintase (iNOS) serem inibidas (BRONTE 2005).

Apesar da inabilidade do sistema imune em rejeitar o tumor em muitos casos, ainda assim há uma resposta imune detectável no sítio tumoral com potencial de controlar a doença (SALGADO et al., 2015), essa resposta imune intratumoral será abordada nesse trabalho.

2.2 O MELANOMA ORAL CANINO

2.2.1 Epidemiologia e dados gerais

Na medicina veterinária, a forma benigna dos tumores melanocíticos é denominada melanocitoma e a maligna de melanoma (GOLDSCHMIDT et al. 1998).

O melanoma nos cães representa 7% de todos os tumores malignos (SMITH et al., 2002) e pode afetar diferentes locais como lábios, cavidade oral, dígitos e pele (BERGMAN, 2007), outros locais menos comuns como os olhos representam apenas 2% dos melanomas caninos (SMITH et al., 2002). O melanoma uveal é o tumor primário intraocular mais comum em cães (STARKEY, 2016; PERLMANN, 2010).

No que diz respeito aos tumores orais, o melanoma é responsável por 30 a 40% de todos eles e 33% a 42% desses casos estão localizados na gengiva (SMITH et al., 2002; SPANGLER e KASS, 2006; BERGMAN, 2007).

A mortalidade das neoplasias melanocíticas orais é de 68% (SPANGLER e KASS, 2006), o que é esperado já que 70 a 90% delas metastatizam, independente da sua localização dentro da cavidade oral (SMITH et al., 2002). E isso acontece porque essas células neoplásicas desregulam várias moléculas de adesão como caderinas (moléculas de adesão dependentes do cálcio) e CD44 (MONTEIRO, 2013).

Os locais-alvo de metástases são os linfonodos e menos frequentemente, os pulmões (RAMOS-VARA, 2000; TEIXEIRA, 2011).

Acredita-se que o melanoma oral se desenvolva a partir de uma hiperplasia epitelial, oriunda de lesão crônica, sendo essa inflamatória ou mecânica (SMITH et al 2002).

Raças pequenas e com mucosas orais bastante pigmentadas apresentam risco elevado de desenvolver melanoma oral (RAMOS-VARA, 2000). São citadas na literatura algumas raças predispostas, são elas: *Schnauzer Miniatura* e *Standart Pinschers*, *Scottish Terriers*, *Setter Irlandês* e *Golden Retriever*, *Poodle*, *Dachshund*, *Cocker Spaniel*, *Chow Chow*, *Setter Gordon* e *Pastor da Anatólia* (MODIANO et al., 1999). A existência de raças predispostas indica um componente hereditário para a doença, no entanto, a real incidência nas raças não é bem estabelecida (BERGMAN et al., 2013).

2.2.2 Etiologia

É sabido que alterações na expressão ou na função de genes e proteínas envolvidas no ciclo celular e na apoptose podem ser de importância primordial para o desenvolvimento do melanoma (MODIANO et al., 1999).

No melanoma humano, é comum haver mutação no gene supressor tumoral p53. No entanto, o envolvimento da perda da expressão do p53 no desenvolvimento do melanoma canino ainda não está bem determinado (MODIANO et al., 1999). Já a perda da expressão do supressor tumoral Rb foi detectada em uma linhagem celular de melanoma canino (CML-6MC2) (AHERN et al, 1993), e o gene supressor tumoral waf-1 está envolvido no melanoma em famílias caninas (BELL, 2018). Ainda, segundo LEE (2017) o melanoma oral canino apresenta expressão alterada de tirosinase, p16, Pten e p53, assim como o melanoma humano.

A família das quinases dependentes de ciclinas (CDKI) possui os mais importantes genes supressores tumorais conhecidos, a perda da inibição de contato das células de melanoma canino *in vitro* foi observada após a perda da expressão do p21/waf-1, que codifica uma cinase inibidora dependente de ciclina (MODIANO et al., 1999).

O papel dos oncogenes no melanoma canino ainda não foi explorado amplamente. Um estudo apontou a superexpressão dos genes c-myc e c-erb-B em

uma linhagem celular de melanoma implantada em camundongo nude (AHERN et al., 1993).

Em linhagens celulares oriundas de melanomas de mucosa canino, foi observada a expressão do IQGAP1, uma proteína que regula a sinalização oncogênica ERK1/2 MAPK, assim como no melanoma humano. Pesquisas não encontraram mutações Braf, e observaram raras mutações na oncoproteína N-ras no melanoma oral canino (LEE, 2017). No estudo de MAYR (2003) foram analisadas 16 amostras de cães com melanoma cutâneo, apenas duas amostras foram positivas para mutações no gene N-ras.

2.2.3 Classificação

Os melanomas podem ser classificados de acordo com sua morfologia celular. No subtipo de células epitelióides, as células são arredondadas ou poligonais, com citoplasma abundante, núcleo grande e centralizado, contendo nucléolos proeminentes. No subtipo de células fusiformes, é constituído por células de formato de fuso ou alongadas, nesse tipo o núcleo é alongado e contém nucléolos pequenos. Já o subtipo misto, envolve os dois tipos celulares (TEIXEIRA, 2011; MEUTEN, 2017).

Existe ainda um tipo celular raro de melanoma amelanico cujas células neoplásicas são poligonais, grandes e com citoplasma abundante e vacuolizado, e são chamadas de células balonosas (WILKERSON, 2003; BLANCHARD, 2001). Tipos adicionais raros, como o melanoma dendrítico, melanoma com células em anel de sinete, melanoma maligno de partes moles (*clear cell sarcoma*) e melanoma adenóide/papilar também foram relatados (RAMOS-VARA et al., 2000; CANGUL et al., 2001; MEUTEN, 2017).

Os melanomas também podem ser classificados de acordo com a sua pigmentação. Os melânicos, são pigmentados, devido à sua síntese intensa de melanina, e os amelanicos sintetizam baixa ou nenhuma quantidade de melanina. A síntese de melanina ocorre nos melanossomas, organelas que convertem a tirosina em melanina (TEIXEIRA, 2011).

O diagnóstico histopatológico do melanoma pode ser dificultado já que o melanoma pode ser assemelhar aos linfomas, carcinomas, sarcomas, tumores osteogênicos, tumores de células germinativas, tumores neuroendócrinos e mesmo

tumores benignos, como por exemplo, o histiocitoma fibroso benígno (NAKHLEH et al., 1990; BANERJEE e HARRIS, 2000). Se torna ainda mais difícil o diagnóstico apenas com a histopatologia caso o melanoma não apresente melanina (amelânico), o que acontece em um terço dos casos. Para um diagnóstico mais preciso do melanoma amelânico deve-se associar a histopatologia com a imuno-histoquímica (NISHIYA et al., 2016).

2.2.4 Marcadores imuno-histoquímicos

Os principais marcadores imuno-histoquímicos para o melanoma canino são: vimentina, proteína S-100, melan-A, PNL2, HMB-45, enolase específica neuronal (NSE), tirosinase, proteína 1 relacionada a tirosinase (TRP-1) e proteína 2 relacionada a tirosinase (TRP-2) (SANDUSKY, 1985; SMITH et al., 2002; GIUDICE, 2010; RAMOS-VARA e MILLER, 2011; TEIXEIRA, 2011; SMEDLEY et al., 2011; ROLIM, 2012; GARCIA, 2017).

Os melanomas caninos são positivos para vimentina, mas esse anticorpo não é específico para melanoma, por também apresentar imunorreatividade para outros tumores caninos, como os sarcomas (SMITH et al., 2002).

No estudo de RAMOS-VARA e MILLER (2011) foi observada imunorreatividade dos melanomas caninos para os marcadores melan-A (55%), PNL2 (68%) e tirosinase (55%). Todos esses antígenos são citoplasmáticos. Melan-A é uma proteína específica de diferenciação melanocítica, mas pode ser expressada em alguns carcinomas. A tirosinase é uma enzima envolvida na melanogênese. A função do PNL2 é desconhecida, é um anticorpo monoclonal gerado recentemente, e reconhece um antígeno melanocítico, sua proteína-alvo ainda não foi identificada, o mesmo não está presente em tecidos normais ou em tumores não melanocíticos caninos (RAMOS-VARA et al, 2000; RAMOS-VARA e MILLER, 2011; GIUDICE, 2010; TEIXEIRA, 2011; GARCIA, 2017). No estudo de GIUDICE (2010) a porcentagem de neoplasias melanocíticas marcadas para PNL2 foi ligeiramente maior do que as marcadas para melan-A (62% versus 59%).

A proteína S-100, uma proteína ligante de cálcio, é moderadamente útil para o diagnóstico do melanoma, porém sua especificidade é baixa, pois também está presente em outros tumores, como os carcinomas. O HMB-45 está presente no

melanossomo, o anticorpo é sensível e específico aos melanomas (CHOI e KUSEWITT, 2003; TEIXEIRA, 2011; GARCIA, 2017). A NSE também não é específica, já que está presente também em outros tecidos, como o tecido muscular liso e tecido neuroendócrino (SMITH et al., 2002; TEIXEIRA, 2011). As enzimas TRP-1 e TRP-2 participam da melanogênese, e segundo o estudo de CHOI e KUSEWITT (2003) a TRP-2 foi mais sensível do que a melan-A na determinação de melanomas amelanicos.

2.2.5 Estadiamento- Sistema TNM

Em 1980 foi estabelecido um sistema para classificar o câncer canino, de forma que a avaliação clínica de um profissional pudesse ser cedida a outro profissional sem ambiguidades. No que diz respeito a tumores orais, essa classificação é válida para mucosa oral, os dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, palato duro e mucosa alveolar (OWEN, 1980).

TABELA 1: Classificação TNM para tumores orais caninos de acordo com a organização mundial da saúde (WHO).

T1	Tumor menor que 2 cm de diâmetro na sua maior dimensão
T1A	Sem invasão óssea
T1B	Com invasão óssea
T2	Tumor com 2 a 4 cm de diâmetro na sua maior dimensão
T2A	Sem invasão óssea
T2B	Com invasão óssea
T3	Tumor maior que 4 cm na sua maior dimensão
T3A	Sem invasão óssea
T3B	Com invasão óssea
N0	Sem metástase em linfonodos regionais
N1	Linfonodos ipsilaterais móveis
N1A	Sem evidência de metástases em linfonodos

N1B	Com evidência de metástases em linfonodos
N2	Linfonodos contralaterais ou bilaterais móveis
N2A	Sem evidência de metástases em linfonodos
N2A	Com evidência de metástases em linfonodos
N3	Linfonodos fixos
M0	Sem metástase à distância
M1	Com metástase à distância (incluindo linfonodos distantes)

Fonte: WHO (1980).

Tabela 2: Estadiamento para tumores orais caninos baseado no TNM

Estágio	Tumor primário(T)	Linfonodos(N)	Metástase(M)
I	T1	N0, N1a, N2a	M0
II	T2	N0, N1a, N2a	M0
III	T3	N0, N1a, N2a	M0
	Qualquer T	N1b	M0
IV	Qualquer T	N2b ou N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: WHO (1980).

2.3 LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR

2.3.1 Dados gerais

A presença de células do sistema imune infiltrando tumores sólidos já foi relatada em diversos estudos, e muitas vezes essa presença levando à inflamação crônica está relacionada ao desenvolvimento tumoral. No entanto, no caso dos linfócitos, sua presença nos tumores sólidos foi associada a um prognóstico favorável em diversos tipos tumorais humanos, como o carcinoma hepatocelular, melanoma cutâneo, tumores de mama, câncer de ovário e tumores colorretais (CLEMENTE et al., 1996); (PIRAS et al, 2005); (GALON et al, 2006), (PAGES et al, 2010), (MIHM e

MULÉ, 2015); (GARNELO et al., 2017). Foi demonstrado em estudos experimentais que a resposta imune celular, e não a humoral, é responsável pela rejeição de transplantes tumorais (ROSENBERG, 2001).

Rudolf Virchow identificou pela primeira vez a presença de leucócitos no tecido tumoral em 1863. No entanto, o termo “linfócitos Infiltrantes de tumor” (TILs, do inglês *tumor infiltrate lymphocytes*) somente foi utilizado pela primeira vez em 1969, em um estudo detalhado sobre melanoma maligno cutâneo (CLARK et al., 1969). Em 1972, na conferência de melanoma ocorrida em Sidnei, foi reconhecido que o infiltrado linfocitário seria relevante no curso do melanoma primário, porém ainda não estavam compreendidos o suficiente para serem incluídos na rotina do patologista (MIHM e MULÉ, 2015).

Os TILs representam uma população heterogênea de linfócitos que está crescendo com o tumor (LEE e MARGOLIN, 2012). São definidos como linfócitos presentes dentro dos ninhos tumorais, apresentando contato direto com as células do tumor, mas também abrangem os linfócitos dispersos no estroma tumoral, já que tanto os ninhos celulares quanto o estroma compreendem o tecido tumoral (SALGADO et al., 2015). Tumores que apresentam células T CD8⁺ na sua extensão são chamados de “hot tumors” enquanto que tumores com ausência completa de infiltrado imune são chamados de “cold tumors” ou desertos imunes (LANITIS et al., 2017).

Em um estudo com 12 pacientes com tumores de mama, foi determinada por meio da citometria de fluxo uma maior produção de citocinas tipo 1 (TNF- α , IFN- γ e IL-2) do que de citocinas tipo 2 (IL-4, IL-6 e IL-10) pelos TILs presentes nesses tumores (EL-HOUSEINI et al., 2008).

2.3.2 Distribuição e densidade dos TILs no melanoma

Nos seus esforços para entender a presença dos TILs no melanoma, e prever o comportamento tumoral com base no infiltrado imune neste microambiente, diversos pesquisadores desenvolveram formas de classificar histologicamente e quantificar os TILs, e os linfócitos peritumorais (MIHM E MULÉ, 2015); (SALGADO et al., 2015); (HIDA e OHI, 2015). A primeira classificação bem difundida foi a desenvolvida em 1989 por CLARK para avaliar os TILs presentes no melanoma cutâneo de estágio I

em humanos em um estudo de variáveis cujo objetivo era prever o prognóstico do paciente. Clark propôs que se os TILs estivessem infiltrando o tumor em toda sua base de crescimento vertical e dentro da massa tumoral estes seriam classificados como *brisk* (difuso). Se os TILs fossem encontrados em um ou mais focos na massa tumoral seriam classificados como *nonbrisk* (focal). E por fim, se os linfócitos estivessem ausentes ou presentes não infiltrando o melanoma, seriam designados como *absent* (ausente), conforme ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1: Tipos de infiltrado linfocitário na massa tumoral

Fonte: MIHN e MULÉ (2015).

Esta mesma classificação foi utilizada no estudo de CLEMENTE et al (1996) que avaliou 285 pacientes com melanoma cutâneo. Nesse estudo, observou-se uma maior sobrevida em pacientes nos quais havia TILs distribuídos de forma *brisk* do que as amostras *nonbrisk* e *absent*. Outra análise foi elaborada pelo THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK (2015), onde o escore linfocitário é avaliado separadamente no caso dos linfócitos intratumorais e dos linfócitos peritumorais. Foi atribuída uma escala numérica para a distribuição e para a densidade linfocitária cuja multiplicação desses valores determina o escore linfocitário.

Ambas formas de classificação, a elaborada por CLARK (1989) e a desenvolvida pelo THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK (2015) foram empregadas no atual estudo.

2.3.3 Subtipos celular dos TILs

Apesar da densidade e destruição linfocitária no tecido tumoral ser relevante, muitos estudos sugerem que é o subtipo celular e não a quantidade dos TILs é que determina o prognóstico (PIRAS et al., 2005; YU e FU; 2006).

Um subgrupo de destaque na imunidade antitumoral são os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL), estes reconhecem antígenos tumorais apresentados pelas moléculas MHC (análogo ao HLA humano) de classe I do tumor, e induzem a morte das células tumorais. Essa capacidade é muito relevante, já que as células tumorais são positivas para MHC I, mas negativas para o MHC de classe II (ROSENBERG, 2001; YU e FU, 2006; LANITIS et al., 2017).

As CTLs podem levar à morte de células tumorais através da liberação de perforina, presente em grânulos no citoplasma cuja liberação leva à formação de poros na membrana celular da célula-alvo, o que facilita a entrada de outras proteínas granulares, como as granzimas, que causam a fragmentação do DNA da célula tumoral. Além disso, foi descoberto que determinadas granzimas, como as granzimas A, B e H conseguem penetrar na célula-alvo mesmo na ausência de perforina. Outra via utilizada pelas células T citotóxicas é a via FAS, causando morte por apoptose. Essas duas vias citadas atuam de formas independentes (STREET et al., 2001; BARRY e BLEACKLEY, 2002).

Da mesma forma, estudos em câncer murino e humano demonstraram que linfócitos T CD4⁺ não somente conseguem reconhecer os antígenos tumorais apresentados pelas moléculas MHC de classe II nas células apresentadoras de antígenos (APCs), mas também ativam as APCs, e migram para o sítio tumoral. Portanto, uma resposta antitumoral bem-sucedida depende de uma ligação TCR-MHC e das células T CD8⁺ e T CD4⁺, cada qual estimulada por antígenos diferentes, restritos aos MHC de classe I e ao MHC de classe II, respectivamente (ROSENBERG, 2001; YU e FU, 2006; LANITIS et al., 2017).

No entanto, há uma ambiguidade nas T CD4⁺, já que as mesmas podem apresentar um fenótipo regulatório. Um influxo de células Treg CD25⁺CD4⁺ é mais prejudicial do que benéfica ao paciente. Os Treg expressam CD4⁺/CD25⁺/Foxp3, representam 5-10% das células T CD4⁺ humanas e são responsáveis pela imunotolerância. No entanto, em tumores, a presença dessas células é percebida em maior quantidade em lesões metastáticas e avançadas, o que faz sentido, já que os Treg suprimem a produção de IFN- γ pelas células TCD4⁺ e auxiliam a progressão tumoral (SAKAGUCHI et al., 2001; YU e FU; 2006; KOVACSOVICS-BANKOWSKI et al., 2014).

Percebe-se que os TILs ainda são assunto de debate, tanto na oncologia humana quanto na veterinária, pois podem liberar citocinas de tipo I ou II, e estimular ou inibir a regressão tumoral (EL-HOUSEINI et al., 2008; KIM et al., 2010).

2.3.4 TILs nos tumores humanos

No estudo de Piras et al. (2005) ambos fenótipos, CD4⁺ e CD8⁺, foram encontrados em tecidos de melanoma cutâneo humano através da técnica de imuno-histoquímica, e os pacientes com presença pronunciada de linfócitos T CD8⁺ no tecido tumoral apresentaram uma sobrevida maior do que os demais. GARNELO et al. (2017) observaram que a presença mútua dos TILs e dos TIBs (*Tumor infiltrating B cells*) foi associada à sobrevida de pacientes com carcinoma hepatocelular.

Em tumores colorretais, há uma maior presença de células T CD8⁺ no centro e nas margens dos tumores de pacientes que não apresentaram recorrência, e a densidade das células CD3⁺ presentes no tumor foi associada com uma maior sobrevida dos pacientes (GALON et al., 2006). Em tumores de ovário e em metástases de fígado analisados por citometria de fluxo após digestão tumoral, foi observada uma presença elevada tanto de células TCD8⁺ quanto de células T regs (KOVACSOVICS-BANKOWSKI et al., 2014).

Em tumores humanos ficou clara a importância dos TILs intratumorais e o estudo de PIRAS et al. (2005) realizado com 47 pacientes com melanoma cutâneo é um exemplo indiscutível dessa relevância: nele, apenas os tumores que apresentaram TILs, possuíam células tumorais apoptóticas.

Dada a correlação positiva da presença dos TILs intratumorais com a sobrevida do paciente em diversos tipos tumorais humanos, o uso dos TILs na terapia

antitumoral já ocorre na medicina humana através da transferência adotiva de células. O princípio desse tratamento é selecionar os linfócitos com ação antitumoral para incrementar a resposta imune, desta forma, já se obteve 35% de resposta em pacientes com melanoma (ROSENBERG, 2001; LEE e MARGOLIN, 2012). Em estudos em pacientes com melanoma que foram tratados com a administração de TILs por via intravenosa observou-se uma boa resposta geral, com regressão tumoral em alguns casos (LEE e MARGOLIN, 2012).

2.3.5 TILs nos tumores caninos

Os carcinomas mamários caninos malignos são normalmente infiltrados por linfócitos na vasculatura e no estroma, contudo o mesmo não acontece nos tecidos mamários normais e nos tumores benignos mamários nessa espécie. Nos tumores mamários caninos ainda não está bem determinado o papel dos TILs, com autores sugerindo sua participação na agressividade tumoral, enquanto outros sugerem um papel na imunovigilância (KIM et al., 2010; ESTRELA-LIMA et al.; 2010; KIM et al; 2013).

Em tumores venéreos transmissíveis caninos (TVT), foi encontrada uma maior quantidade de TILs na avaliação histológica, enquanto que na reação imuno-histoquímica foi observada uma maior quantidade de células marcadas para CD3⁺ e CD79 nos tumores com tamanho estável, em relação aos cães com esse mesmo tumor, mas com crescimento progressivo e/ou metástase. Isso sugeriu um comportamento antitumoral dos linfócitos no TVT (PÉREZ et al., 1998).

Em um estudo com o sangue periférico de 14 cães com diferentes tumores metastáticos foi realizada a imunofenotipagem por meio da citometria de fluxo. Foi encontrada uma porcentagem elevada dos linfócitos Treg em pacientes com tumores metastáticos em relação aos pacientes normais. O mesmo ocorreu quando foram avaliados os Treg de cães com melanoma oral em relação a cães saudáveis (HORIUCHI et al, 2009; TOMINAGA et al., 2010).

No estudo de O'NEILL et al (2009), foi analisado o sangue periférico de 34 cães com diferentes tipos de câncer, e observou-se que a relação celular Treg/CD8⁺ foi significativamente maior nos cães com câncer do que em cães hígidos.

HORIUCHI et al. (2010) analisaram o sangue periférico de cães saudáveis e de cães com melanoma oral por meio da citometria de fluxo. A porcentagem de células

CD4⁺ e CD8⁺ foi menor nos cães com melanoma oral do que nos cães hígidos, enquanto que a porcentagem de células FoxP3⁺ foi maior nos cães com melanoma oral.

2.4 FATOR REGULADOR DE INTERFERON-8 (IRF-8)

2.4.1 Dados gerais

No microambiente tumoral não só têm influência as células que o compõem, mas também as citocinas liberadas e os fatores de transcrição, que são expressados por essas células e/ou ativados por essas citocinas. No caso das células T CD8⁺, por exemplo, o ganho da sua função efetora é acompanhado pela produção de moléculas citotóxicas, como granzimas e perforinas, de citocinas, como o IFN- γ e o fator de necrose tumoral(TNF), e de mudanças na expressão de genes, mediadas por fatores de transcrição (TANIGUCHI et al., 2001; MIYAGAWA et al., 2012).

Um fator de transcrição envolvido na modulação das células do sistema imune é o Fator regulador de interferon-8, também conhecido como *interferon consensus sequence-binding protein* (IRF-8 ou ICSBP), que recebe esse nome porque nos promotores dos genes induzidos por interferon, a região consenso que o IRF-8 reconhece é a *interferon consensus sequence* (TANIGUCHI et al., 2001; TAKAOKA et al., 2008).

Nos cães o IRF-8 é um dos fatores de transcrição da família reguladora de interferon composta por 10 membros. Este gene está localizado no cromossomo 5 na espécie canina, e apresenta resíduos de triptofano no domínio N-terminal de ligação ao DNA. Além dessa característica, todos os membros da família IRF, exceto o IRF-1 e o IRF-2, têm um domínio de associação com IRF(IAD1), responsável por sua ligação com outros fatores de transcrição. A porção C-terminal apresenta variações entre os membros da família. O gene IRF-8 está presente no cromossomo 5 (TANIGUCHI et al., 2001; TAKAOKA et al., 2008; HUANG et al., 2010).

O IRF-8 não se liga independentemente ao DNA, por apresentar baixa afinidade à cromatina. Para se ligar forma um complexo com outros membros da família IRF ou da família ETs (PU.1) para que seja possível ativar ou reprimir a expressão de um gene. É o caso da sinergia IRF-1 e IRF-8 para ligação no promotor

da IL-12 (GIESE ET AL., 1997; LIU et al., 2004; SCHONHEIT et al., 2013; SALEM et al., 2014).

2.4.2 Expressão Gênica

Nos primeiros estudos envolvendo o IRF-8 afirmava-se que o mesmo estava expresso somente nas células imunes, porém nos estudos recentes, observou-se sua presença também em células tumorais. Hoje, em humanos sabe-se que essa molécula proteica está presente principalmente nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, mas também em linfócitos T CD8⁺ ativados, adipócitos, melanócitos, células do músculo cardíaco, músculo liso, neurônios e pode ser encontrada em células tumorais como, linfoma de grandes células B, tumores mamários e carcinoma de cólon (GIESE et al., 1997; MATTEI, 2006; YANG et al., 2007; LU, 2008; TAKAOKA et al., 2008; ABRAMS, 2010; MATTEI et al., 2012; MIYAGAWA et al., 2012; SHUKLA e LU, 2014; ZHANG et al., 2017).

O padrão de expressão do IRF-8 nas células imunes e tumorais caninas ainda permanece imprecisa. Porém, sabe-se em humanos, nos macrófagos inativos o IRF-8 é constitutivamente expresso no citoplasma e na presença de IFN- γ , o IRF-8 é translocado para o núcleo (LIU et al., 2004). Nas células T CD8⁺ murinas a expressão do IRF-8 foi detectada apenas em células T ativadas (GIESE et al., 1997; MIYAGAWA et al., 2012).

No estudo de MINDERMAN et al. (2016) observou-se a expressão tanto nuclear quanto citoplasmática do IRF-8. Este estudo realizado em células MDSCs (células supressoras derivadas mieloides) de carcinoma renal humano, demonstrou a diferença da presença celular total com a presença nuclear de IRF-8. Essa é uma informação relevante, já que é sabido que na espécie humana a atividade biológica do IRF-8 ocorre apenas no núcleo (MINDERMAN et al., 2016).

Já foi observado que a expressão de IRF-8 é inibida através da metilação do DNA, o que leva à resistência a apoptose mediada por Fas em células tumorais e a interrupção da sua expressão apesar do estímulo com IFN- γ . Esse silenciamento foi observado em 76% dos carcinomas avaliados em um estudo conduzido com 113 carcinomas humanos de diferentes localizações anatômicas (YANG et al., 2007; LEE et al., 2008; LUO et al., 2017).

A ativação da expressão gênica do IRF8 é regulada pelo IFN- γ , IFN- α e pela IL-12 (LEHTONEN et al., 2003; LIU et al., 2004).

O interferon gama, o único membro na família de interferons tipo II, é produzido por células NK, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ ativadas, e é uma citocina ativadora de macrófagos. Nos macrófagos, e em outras APCs, o IFN- γ é responsável pela ativação dos genes do IRF-8, que por sua vez, é essencial para respostas mediadas por IFN- γ (LIU et al., 2004; ZHANG et al., 2010; ABBAS et al., 2015).

A presença do interferon alfa (IFN- α) e da interleucina 12 (IL-12), ambas citocinas com efeitos antineoplásicos e produzidas pelos macrófagos, induz a expressão do IRF-8 em células NK e células T humanas. Assim como observado no caso do IFN- γ , há uma dependência mútua da IL-12 e do IRF-8, já que a IL-12 ativa a expressão do IRF-8 enquanto que, em macrófagos, o IRF-8 ativa o promotor da IL-27, uma citocina da família da IL-12, e aumenta a produção de IL-12 pelas APCs. O mesmo acontece em macrófagos murinos cujas células estimuladas por IFN- γ expressam IRF-8 e IRF-1, que ativam o promotor p40 da IL-12 (MASUMI et al., 2002); (LEHTONEN et al., 2003; ZHANG et al., 2010; ABBAS et al., 2015).

Em resumo, o IRF-8 está envolvido em um processo de retroalimentação do eixo IL-12/IFN- γ cuja a exposição das APCs ao IFN- γ ativa a expressão dos IRFs, incluindo o IRF-1 e o IRF-8, que são cruciais para a síntese de IL-12, uma citocina com atividade antitumoral, que estimula as células NK e as TCD4⁺ a produzirem mais IFN- γ (GIESE et al., 1997; MASUMI et al., 2002; LEHTONEN et al., 2003; LIU et al., 2004; SHIMIZU et al., 2006; TAKAOKA et al., 2008; ZHANG et al., 2010; ABBAS et al., 2015).

2.4.3 Influência do IRF-8 nas células imunes e no microambiente tumoral

O IRF-8 apresenta uma participação multifuncional no ambiente tumoral, porém foi originalmente descrito como um fator de transcrição responsável pelo desenvolvimento da linhagem mieloide e linfóide (LIU et al., 2004; MATTEI, 2006; LU, 2008; MINDERMAN et al., 2016).

No sistema imune sua expressão foi relatada em DCs, monócitos, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ ativados (LU, 2008; MIYAGAWA et al., 2012; SICHIEEN et al., 2016).

O IRF-8 está envolvido na diferenciação de monócitos, células dendríticas convencionais (cDCs) e plasmocitóides (pDCs).

Em camundongos IRF-8^{-/-} as células dendríticas esplênicas capturam antígenos, mas não são capazes de os apresentar aos linfócitos T *naïve* (MATTEI et al., 2006; TAKAOKA et al., 2008; SICHIEEN et al., 2016).

A importância do IRF-8 na diferenciação e função das DCs ficou bem clara em um relato único de uma paciente humana com uma mutação de perda de função no IRF-8, essa síndrome foi nomeada de Síndrome da imunodeficiência de células dendríticas IRF-8 recessivo. Essa paciente não apresentava produção de IL-12 e IFN- γ em resposta a infecções e desenvolveu monocitopenia absoluta. Além disso, suas células T se mantiveram em um estado “*naïve*” (SALEM et al., 2014).

A transição das células TCD8⁺ de células *naïve* para células efetoras é acompanhada por mudanças na expressão gênica e o IRF-8 atua nesse processo. Quando há a associação de antígenos com determinadas citocinas, como a IL-15 produzida pelas DCs, o IRF-8 é capaz de mediar a transição das células TCD8⁺ de *naïve* para efetoras. Por isso, nessas células, sua expressão está restrita ao estado ativado (MIYAGAWA et al., 2012).

Nas células T CD4⁺ o IRF-8 também está expressado, assim como nos linfócitos T reg CD4⁺CD25⁺, aonde é induzido pelo FoxP3, e regula a função Th1-like T reg através do controle do seu receptor de citocinas CXCR3 (LEE et al., 2016).

No que diz respeito aos linfócitos B, já está determinado que há uma importante influência do IRF-8 no estágio pré-B, estágio onde se encontra reduzida a expressão do PU.1, um fator de transcrição responsável pela regulação do desenvolvimento de células da linhagem mieloide e linfoide, enquanto induz a expressão de *ikaros* e *aiolos*, fatores de transcrição que são reguladores negativos da célula pré-B. Dessa forma, diversas neoplasias relacionadas às células B possuem envolvimento do IRF-8, como o linfoma folicular, linfoma de grandes células B e leucemia linfocítica crônica (WANG et al., 2008; LU, 2008; SHUKLA e LU, 2014).

Nos carcinomas humanos, no câncer pulmonar humano de não pequenas células, na leucemia mielóide humana e em melanomas murinos, a perda da expressão do IRF-8 por conta da metilação do DNA foi relatada. Nos carcinomas a

perda da expressão do IRF-8 está relacionada à resistência das células tumorais à apoptose. Ainda, evidências demonstram que a expressão do IRF-8 em células de carcinoma renal e carcinoma mamário humano está relacionada a uma redução da progressão tumoral. Estes fatos indicam que o IRF-8 seria um supressor tumoral (SCHIAVONI et al., 2013; ZHANG et al., 2014; SUZUKI et al., 2014; LUO et al., 2017).

A perda da expressão do IRF-8 através da metilação do DNA em células SW620 de carcinoma de cólon, levou estas células a adquirirem resistência à apoptose mediada por Fas, apesar da estimulação com IFN- γ , o mesmo foi observado no carcinoma mamário murino *in vivo*.

O sistema Fas/FasL é uma importante via de morte celular, que juntamente com a perforina é utilizada pelas células T citotóxicas para mediar a apoptose de células tumorais. Portanto, foi sugerido que o IRF-8 é um dos genes responsáveis pela regulação desse sistema de morte celular, e que a perda da sua expressão estaria relacionada à resistência a apoptose observada em neoplasias malignas (YANG et al., 2007; LEE et al., 2008; ABRAMS, 2010).

2.4.4 Influência do IRF-8 no melanoma

No que diz respeito ao melanoma canino, não foram conduzidos estudos para a verificação da relevância da expressão do IRF-8 nessas células e no seu microambiente. No entanto, alguns estudos com linhagens de células de melanoma murino foram realizados, trazendo informações relevantes sobre o papel do IRF-8 nesses tumores. É o caso do estudo de MATTEI (2012), em que foram transplantadas células de melanoma B16-F10 em camundongos *wild type* (WT) e IRF-8^{-/-}. Em relação aos WT, as células cresceram de forma mais rápida, e desenvolveram focos de metástase pulmonar nos IRF-8^{-/-} após 5 dias da implantação. Ao analisar o infiltrado imune nesses tumores com a coloração de HE, perceberam-se poucos focos de infiltrado leucocitário nos melanomas dos camundongos IRF-8^{-/-} e por meio da citometria de fluxo foi observado uma queda nas porcentagens das células CD4⁺ e CD8⁺ nos melanomas IRF-8^{-/-} em relação ao WT.

Foi observada ainda, uma maior expressão de IL-27 nas células CD45⁺ pertencentes ao ambiente tumoral de camundongos WT, em relação aos camundongos IRF-8^{-/-}. A importância da IL-27 como um agente antiangiogênico em

células B16-F10 foi demonstrada, e sendo ela uma interleucina da família das IL-12, sua relação com o IRF-8 já foi citada anteriormente (LEHTONEN et al., 2003; SHIMIZU et al., 2006; MATTEI et al., 2012).

Por fim, é válido ressaltar que o IRF-8 induz a ativação de células TCD8⁺, células que foram associadas à morte dos melanócitos via apoptose no vitiligo, e cuja produção de IFN- γ inibiu a melanogênese *in vitro*. Mesmo que incipientes, estes dados em conjunto, apontam para uma associação clara da interação do IRF-8 com o sistema imune e os melanócitos, e possivelmente, em uma condição anormal, como no melanoma (MIYAGAWA et al., 2012; YANG et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar qualitativamente e quantitativamente os TILs e a expressão do IRF8 no melanoma oral canino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nas amostras de melanoma oral canino de diferentes graus de agressividade:

- Análise quantitativa do infiltrado linfocítico tumoral (escore linfocitário);
- Análise qualitativa do infiltrado linfocítico tumoral (padrão linfocitário);
- Avaliar o escore de imunorreatividade e o padrão de imunomarcção do IRF-8;
- Determinar o fenótipo da população celular linfóide infiltrante tumoral;
- Avaliar a relação entre o padrão dos TILs e da expressão do IRF-8;
- Avaliar a influência do infiltrado linfocitário e do IRF8 na sobrevida dos cães com neoplasia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS TUMORAIS

Após aprovação do CEUA da FMVZ-USP, foram recebidas e estudadas amostras de 50 cães com diagnóstico de melanoma oral, após consentimento dos tutores. As amostras tumorais recebidas foram oriundas de pacientes submetidos à procedimento cirúrgico em diferentes clínicas e/ou hospitais veterinários particulares e/ou universitários de São Paulo. Os critérios de inclusão foram: cães com diagnóstico histopatológico ou imuno-histoquímico confirmado de melanoma maligno oral e com estadiamento clínico completo segundo critérios da World Health Organization (WHO) e adaptado por Owen (Owen, 1980). Amostras amelanicas com diagnóstico inconclusivo no exame histopatológico foram submetidas à marcação com PNL2 e Melan-A por técnica de imuno-histoquímica para confirmação do diagnóstico (RAMOS-VARA e MILLER, 2011). Os critérios de exclusão para o recebimento de amostras foram: amostras não confirmadas como melanoma no histopatológico ou na análise imuno-histoquímica, assim como amostras de pacientes que receberam tratamento imunossupressor prévio à cirurgia.

4.2 ANÁLISE DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO

Imediatamente após a ressecção cirúrgica, a formação tumoral foi mantida refrigerada em meio RPMI-1640 até a chegada ao laboratório o que aconteceu dentro do intervalo máximo de 24 horas. No laboratório, uma parte da amostra tumoral foi fixada em uma solução de formol tamponado a 10% por 48 horas e a outra parte foi preparada para a imunofenotipagem como descrito no item 4.2.2. Devido a análise peritumoral e intratumoral do infiltrado linfocitário, optou-se por fazer o seccionamento radial das amostras recebidas, o que permite visualizar a relação entre o tumor e a sua margem (**Figura 2**). A desvantagem dessa orientação é que apenas uma pequena parte da circunferência da margem é preservada.

Figura 2: Seccionamento radial. O tecido é cortado perpendicularmente ao plano do cirurgião.

Fonte: MEUTEN (2016).

Em seguida o material tumoral foi incluído em bloco de parafina, seccionado e corado pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), para posteriormente o infiltrado linfocitário ser analisado pela técnica histológica utilizando-se microscopia óptica. Também foi avaliada a presença de ulceração, índice mitótico, necrose, presença de bactérias, tipo celular, presença de atividade juncional e pigmentação das amostras. Para ser avaliado o índice mitótico foram contados aleatoriamente 10 campos no grande aumento, iniciando-se pelos locais com maior atividade mitótica, conforme descrito por SMEDLEY (2011). Áreas muito pigmentadas foram evitadas ao se avaliar o índice mitótico. Em 2 amostras em que não foi possível realizar a contagem mesmo após o *bleaching* das lâminas, o índice mitótico não foi avaliado. Foram consideradas para análise semi-quantitativa dos linfócitos peritumorais as amostras que foram recebidas com ao menos 25% de sua margem.

A análise do infiltrado linfocitário compreendeu dois métodos analíticos conforme proposto pelo THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK (2015) e CLARK (1989), respectivamente, uma avaliação semi-quantitativa e uma avaliação qualitativa, ambos propostos para o melanoma cutâneo em humano. A avaliação semi-quantitativa foi baseada em um sistema de escore linfocítico (EL) da amostra tumoral no qual foram analisadas tanto a região intratumoral como peritumoral, que foi calculado por meio da soma do escore de distribuição de linfócitos (EDL) e o escore de densidade (ED) (**Quadro 1**). Foi classificado como escore baixo o resultado compreendido entre 0 a 2 e o escore alto de 3 a 6.

A avaliação qualitativa se baseou no tipo da distribuição do infiltrado linfocitário no interior das massas tumorais, ou seja, se o infiltrado na área intratumoral ou na periferia intratumoral era difuso (*Brisk*), em focos (*Nonbrisk*) ou ausente (*Absent*) (Figura 1).

Quadro 1- Avaliação semi-quantitativa do infiltrado linfocitário no Melanoma Oral Canino.

Sistema de Escore	
DISTRIBUIÇÃO DE LINFÓCITOS PERITUMORAIS (EDL)	DENSIDADE DE LINFÓCITOS(ED)
0 = Ausência de linfócitos com o tecido	0= Ausente
1 = Presença de linfócitos ocupando menos que 25% do tecido	1= leve (1-19)
2 = Presença de linfócitos ocupando de 25% a 50% do tecido	2 = Moderado (20-49)
3 = Presença de linfócitos ocupando mais de 50% do tecido	3= Severo (> 50)
Escore Peritumoral (EL) (Distribuição + Densidade) =	
DISTRIBUIÇÃO DE LINFÓCITOS INTRATUMORAIS	DENSIDADE DE LINFÓCITOS
0 = Ausência de linfócitos com o tecido	0= Ausente
1 = Presença de linfócitos ocupando menos que 25% do tecido	1= leve (1-19)
2 = Presença de linfócitos ocupando de 25% a 50% do tecido	2 = Moderado (20-49)
3 = Presença de linfócitos ocupando mais de 50% do tecido	3= Severo (> 50)
Escore intratumoral (EL) (Distribuição + Densidade) =	

*** O escore de 0 a 2 é considerado baixo, e de 3 a 6 é considerado alto.**

Fonte: YASUMARU (2018).

4.3 DISSOCIAÇÃO TECIDUAL E IMUNOFENOTIPAGEM

Uma segunda parte dos fragmentos tumorais foi submetido à digestão enzimática tecidual realizada com Colagenase tipo II (ThermoFisher®) e RPMI 1640 (Vitrocell®) durante 1 hora, filtrada em filtro de 70 micras (Biofil®), centrifugada, e em seguida, o pellet celular foi ressuspendido em PBS e o número de células foi obtido pela contagem e viabilidade utilizando Azul de Tripán (Sigma-Aldrich®). O número total de células foi mantido em uma solução criopreservante de soro fetal bovino 90% com DMSO 10% (Merck®) no criotubo. Os criotubos foram congelados em álcool isopropílico a -80o C por 24 horas e em seguida mantidos no nitrogênio líquido até o momento de uso. Para determinar a frequência de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e macrófagos, as células foram posteriormente descongeladas em banho-maria a 37°C e marcadas com anticorpos comerciais conjugados com fluoróforos na diluição de 1:20 em um volume final de 100 µL: anti-CD3FITC/CD4RPE/CD8 Alexa Fluo 647 (Bio-Rad®, CA17.2A12; YKIX 302.9 e YCATE 55.9), anti-CD45 RPE (Biolegend®, MEM-55), anti-CD14 FITC (Novus Biologicals®, TÜK4). Para avaliação dos linfócitos Treg, as células foram marcadas com anti-CD4 APC (Bio-Rad®, YKIX 302.9), anti-CD25 FITC (Bio-Rad®, BC96), permeabilizadas com buffer de fixação e permeabilização (ThermoFisher®) e, posteriormente marcadas com anti-FOXP3 RPE (eBioscience®), conforme instruções do fabricante.

Foi utilizado o reagente *Fc receptor blocking solution-Human trustain Fcx* (BIOLEGEND®) na proporção 5µL para cada 100µL de suspensão celular antes da incubação com os anticorpos citados anteriormente e a incubação das amostras ocorreu a temperatura ambiente por 5 a 10 minuto.

Após este período aproximadamente 1×10^5 a 1×10^6 células/100µL de suspensão celular foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos a 4°C e protegidos da luz. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, ressuspendidas em 300µL de PBS, colocadas em tubos de ensaio próprios para citometria de fluxo e submetidas à leitura em um citômetro de fluxo modelo *FACSCalibur* (Becton & Dickinson) com auxílio do programa *CellQuestPro*. Após aquisição das amostras, os resultados foram analisados utilizando o programa *FlowJo* v10. (Tree Stars Inc). Para a análise dos resultados a população de interesse foi separada com o auxílio do gráfico a partir da complexidade celular (SSC) e da

população celular CD45⁺ obtendo-se deste modo a população de interesse discriminada das demais (tumorais).

A partir do *gate* de linfócitos, pode-se observar os grupos celulares de interesse: CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ para a realização da quantificação que foi expressa em porcentagem.

4.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foi realizada a técnica de imuno-histoquímica para a análise da expressão de IRF-8, e para isso, um terceiro fragmento das amostras tumorais foi destinado a cortes histológicos, que foram aderidos em lâminas silanizadas (*Knittel-Glass*[®]). O tecido foi desparafinado, hidratado e a recuperação antigênica foi obtida com o uso da panela Pascal durante 19 minutos, em solução tampão Citrato de Sódio de pH 6,0. Posteriormente, foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas em solução de H₂O₂ 30% e metanol puro, durante 15 minutos. Após esse processo, a cada lâmina foi adicionado o anticorpo primário policlonal coelho anti-dog IRF-8 (Cat # AV100841, Sigma, Alemanha) na diluição de 1:250. As lâminas foram incubadas durante 60 minutos em estufa a 37°C e, posteriormente em câmara úmida por 14 horas, em temperatura de 4° C. Após a incubação e lavagem das lâminas, estas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C com o anticorpo secundário do Kit Super Picture (ThermoFisher[®]). A reação foi revelada com o uso do cromógeno tetracloro 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich[®]) e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. Para montagem foram utilizadas lamínulas (Glass Técnica[®]) coladas com Permount (ThermoFisher[®]). Os tecidos de melanoma que apresentaram muito pigmento, antes da reação imuno-histoquímica foram submetidos a um processo de clareamento da melanina, sem alterar a afinidade antígeno-anticorpo, com a imersão das lâminas em uma solução de Tris-HCl com peróxido de hidrogênio a 10% durante 24 horas (SILVA et al, 2011). Como controle positivo, foram utilizados linfonodos e baço de 2 pacientes caninos que vieram a óbito de causas não relacionadas. Para controle negativo, foi omitido o anticorpo primário em algumas amostras. Para verificação da presença do IRF-8 em tecido hígido foi realizada a reação imuno-histoquímica em tecido de mucosa oral sadia de 6 cães, que vieram a óbito devido a causas não relacionadas ao melanoma.

4.5 ANÁLISE DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise da reação imuno-histoquímica foi realizada com a utilização do Escore de imunorreatividade (*Immunoreactive score - IRS*), que é determinado pela multiplicação da intensidade de marcação (4 gradações) com a porcentagem de células marcadas (5 gradações). Um escore de 0-12 é obtido. Os intervalos de escore geram uma classificação mais simples, representada pelos números 0, 1, 2 e 3, sendo 0 expressão nula, 1 expressão baixa, 2 expressão média e 3 expressão alta. Amostras com valor maior que 3 são consideradas positivas (SPECHT et al., 2015). Para determinação do escore foi observada apenas a marcação nas células tumorais. Um segundo avaliador foi solicitado para avaliar o escore das amostras, no mesmo microscópio utilizado pelo primeiro avaliador. O *Kappa* ponderado para a concordância dos valores de escore interobservador foi de 0,79, o que determinou uma concordância substancial.

Quadro 2: Escore de imunorreatividade (IRS) para o IRF-8 nas amostras de melanoma oral canino.

Intensidade de marcação	Porcentagem de células positivas	Escore	Classificação
0	0 = Negativo	0-1	0
1	1 = < 10%	2-3	1
2	2 = 10 a 50%	4-8	2
3	3 = 51 a 80%	9-12	3
	4 = > 80%		

Fonte: SPECHT et al., 2015.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da imunofenotipagem foram representados pela média $\pm$ SD. Antes de aplicar-se a análise estatística foi verificado por meio do teste de Bartlett qual tipo de teste-paramétrico ou não-paramétrico, foi o mais adequado para cada dado. A diferença estatística das análises do infiltrado de linfócitos, análises histopatológicas, expressão de IRF-8 e estadiamentos foi determinada pelo teste “t” de *Student* e por

ANOVA *one-way*. As curvas de sobrevida foram geradas pelo método Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de *Log-rank*. Em todos os testes aplicados, a probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes. Para as análises estatísticas foram utilizados os programas *GraphPad Prism 6*.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

Foram recebidas 50 amostras de melanoma oral canino sendo que destas, 5 amostras eram recidivas de pacientes que já estavam no estudo e apenas na análise dos dados demográficos não foram levadas em conta. Os dados demográficos foram obtidos por meio de fichas clínicas cedidas pelos veterinários responsáveis e informações cedidas pelos tutores dos pacientes.

A média de idade foi de 12,55 anos e a mediana foi de 12 anos (valor mínimo, 7 e valor máximo, 19). Destes pacientes, 51% eram fêmeas (23) e 49% eram machos (22). As raças mais representadas foram o SRD (18), *Teckel* (5) e *Cocker Spaniel* Inglês (4) (**Figura 3**). Das 50 amostras recebidas, 68% (n=34) eram a primeira ocorrência do paciente e 32% (n=16) eram uma recidiva (**Figura 4**). Os pacientes em sua maioria possuíam estadio 3 (52%) no momento da entrada no estudo, sendo que 10% estavam em estadio 1, 22% em estadio 2 e 16% em estadio 3 (**Figura 5**). Em 20 (44%) pacientes a avaliação da presença de metástase em linfonodos foi realizada apenas pela palpação no exame clínico.

Em relação a localização anatômica das amostras 3% (n=3) se localizavam na mucosa jugal, 10% (n=5) se localizavam no lábio, 13% (n=6) se localizavam no palato, 25% (n=12) estavam presentes em mais de uma localização na cavidade oral e 46% (n=22) se localizavam na gengiva. A **Figura 6** ilustra dois pacientes com melanoma oral, demonstrando a heterogeneidade do aspecto macroscópico dessa neoplasia em cães.

O tratamento realizado divergiu dentre os 45 pacientes do estudo, sendo que 16 (35,5%) realizaram cirurgia associada a quimioterapia e imunoterapia, 15 (33,4%) realizaram cirurgia associada a imunoterapia, 12 (26,7%) realizaram cirurgia associada a quimioterapia e 2 (4,4%) realizaram apenas a cirurgia. Dos 45 pacientes do estudo, a sobrevida foi acompanhada em 42, os dados da sobrevida foram perdidos em 3 pacientes que mudaram de oncologista veterinário.

Figura 3: Característica racial dos 45 pacientes incluídos no estudo.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Figura 4: Distribuição das amostras como primeira ocorrência ou recidiva do paciente.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Figura 5: Estadiamento dos pacientes no momento da entrada no estudo

Fonte: YASUMARU, 2018.

Figura 6: Formações tumorais no momento pré-cirúrgico, demonstrando os diferentes aspectos que o melanoma pode assumir.

Fonte: YASUMARU, 2018.

A) Formação pigmentada em gengiva de paciente de estadio 3.

B) Formação não pigmentada, em língua de paciente de estadio 4.

5.2 DADOS HISTOPATOLÓGICOS

Na análise das características histopatológicas das amostras de melanoma oral canino foi avaliada a presença de ulceração, invasão angiolinfática, necrose, bactérias, índice mitótico, atividade juncional, pigmentação e infiltrado linfocitário. Das 50 amostras tumorais recebidas foram excluídas da análise histopatológicas 2 amostras, por não apresentarem qualidade para a realização desta análise (n=48). Em relação a pigmentação das amostras, 81% eram melânicas e 19% amelânicas. Na avaliação do índice mitótico, foi utilizado o critério do trabalho de ESPLIN (2008) no qual um índice mitótico menor do que 3 em 10 campos de grande aumento é considerado baixo. Das 48 amostras 9 (19%) possuíam o índice mitótico baixo e 39 (81%) possuíam o índice mitótico alto. A presença de ulceração foi mais prevalente nas amostras de estadiamento mais alto ($p=0,04$) (**Figura 7**). As demais características histopatológicas avaliadas não apresentaram relação estatisticamente significativa com o estadiamento.

Figura 7: Presença de úlcera nas amostras de estadiamento baixo (1 e 2) e alto (3 e 4) (n=48).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de Student ($p=0,04$).

5.2.1 Análise do infiltrado linfocitário nas amostras

A presença dos TILs nas amostras tumorais foi avaliada de forma semi-quantitativa e qualitativa. Os critérios de avaliação do infiltrado linfocitário tumoral estão demonstrados nos quadros 1 e 2, do item 4.2.

5.2.1.1 Avaliação semi-quantitativa dos TILs

A avaliação semi-quantitativa das amostras tumorais quanto ao infiltrado linfocitário foi dividida quanto à localização peritumoral e intratumoral (TILs) do infiltrado. Em 2 duas amostras a região peritumoral não estava íntegra, portanto o infiltrado peritumoral foi avaliado em apenas 46 amostras, sendo que 65,21% (n=30) das amostras apresentaram um infiltrado peritumoral de escore alto (**Figura 8 A**), enquanto que em 34,78% (n=16) das amostras o escore peritumoral foi baixo (**Figura 8 B**). A avaliação do escore intratumoral foi realizada em 48 amostras e 41,66% (n=20) das amostras apresentaram um escore alto de TILs (**Figura 9 A**) enquanto que 58,33% (n=28) das amostras apresentaram um escore baixo (**Figura 9 B**).

Na **Figura 10** é possível visualizar que a maior parte das amostras apresentou escore alto de infiltrado linfocitário peritumoral e escore baixo de infiltrado intratumoral (p=0,02).

A análise estatística revelou diferenças significativas caracterizadas pela diminuição dos TILs nas amostras tumorais de estadiamento 3 e 4 em relação as amostras de estadiamento 1 e 2 (p=0,0044), conforme ilustra a **Figura 11**. O escore do infiltrado peritumoral não apresentou diferença estatística significativa nas amostras de diferentes estadiamentos clínicos. Não houve diferença estatisticamente significativa do infiltrado linfocitário dos pacientes que receberam quimioterapia e/ou imunoterapia anterior à cirurgia e dos pacientes que não receberam tratamento anterior. Não foi observada relação do escore linfocitário com a presença de úlcera, índice mitótico e idade dos pacientes.

Na comparação das diferentes classificações do escore de marcação do IRF-8 com o infiltrado linfocitário peritumoral, não se obteve uma diferença estatisticamente significativa. Porém, foi constatado que as amostras com uma maior expressão de IRF-8, possuem um escore maior de infiltrado linfocitário intratumoral (p=0,03).

Também possuem um maior escore de infiltrado linfocitário intratumoral as amostras de primeira ocorrência, com uma diferença significativa ($p=0,01$) das amostras de recidivas tumorais (**Figura 12**).

Figura 8: Fotomicrografias representando o infiltrado linfocitário peritumoral. Coloração HE.

Fonte: YASUMARU, 2018.

A) Escore linfocitário peritumoral alto (Escore 5). Aumento de 200 vezes.

B) Escore linfocitário peritumoral baixo (Escore 1). Aumento de 200 vezes.

Figura 9: Fotomicrografia demonstrando o infiltrado linfocitário intratumoral. Coloração HE.

Fonte: YASUMARU, 2018.

A) Escore linfocitário intratumoral alto (Escore 6). Aumento de 200 vezes.

B) Escore linfocitário intratumoral baixo (Escore 0). Aumento de 200 vezes.

Figura 10: Frequência das amostras quanto ao infiltrado linfocitário (Infiltrado intratumoral n=48; infiltrado peritumoral n=46).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: *Chi-square test* ($p=0,02$)

Figura 11: Escore do infiltrado intratumoral de TILs em pacientes de estadiamentos menos agressivos (1-2) e mais agressivos (3-4) do melanoma oral canino.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de *Student* ($p=0,0044$).

Figura 12: Escore de linfócitos intratumorais (TILs) em amostras de primeira ocorrência e de recidivas (primeira ocorrência n=33; recidiva n=15).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de Student ($p=0,01$).

5.2.1.2 Avaliação qualitativa dos TILs

Na análise qualitativa foi observada a distribuição dos TILs em 48 amostras de melanoma, o padrão deste infiltrado foi classificado em difuso, focal e ausente. Os linfócitos ao redor da massa tumoral que não estivessem contíguos com as células tumorais não foram considerados nessa avaliação.

A **Figura 13** mostra uma amostra representativa de melanoma oral com infiltração difusa de TILs sendo possível observar a presença de TILs por toda a área da massa tumoral. A **Figura 14** ilustra uma amostra representativa de melanoma oral canino na qual os TILs se infiltraram de forma focal, enquanto que a **Figura 15** demonstra uma amostra representativa de melanoma oral canino sem presença de TILs na sua região interna (padrão ausente).

O padrão difuso de infiltração linfocítica foi observado em 58% das amostras avaliadas, enquanto que em 21% das amostras foi observado o padrão focal e em 21% das amostras foi observado o padrão ausente (**Figura 16**).

As amostras de padrão difuso e focal apresentaram um maior escore tanto de infiltrado de linfócitos intratumorais ($p < 0,0001$) quanto de infiltrado de linfócitos peritumorais ($p = 0,0005$) quando comparadas às amostras de padrão ausente (**Figuras 17 e 18**).

As amostras com diferentes tipos de infiltrado de TILs (difuso, focal e ausente) foram comparadas quanto ao escore de IRF-8, índice mitótico e perfil fenotípico dos linfócitos. Houve um aumento estatisticamente significativo ($p = 0,04$) na frequência de linfócitos T CD8⁺ nas amostras de padrão difuso quando comparado com os outros padrões (**Figura 19**). Houve uma redução ($p = 0,04$) dos linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nas amostras de padrão difuso em relação às amostras com outros padrões de infiltrado linfocitário, conforme demonstrado na **Figura 20**.

Quando comparados os três padrões de TILs não houve diferença estatística significativa em relação ao escore do IRF-8, estadiamento dos pacientes e ao índice mitótico.

Figura 13: Fotomicrografia representativa de melanoma oral canino com infiltrado de TILs de padrão difuso. Coloração HE.

Fonte: YASUMARU, 2018.

A) Aumento de 200 vezes; B) Aumento de 400 vezes.

Figura 14: Fotomicrografia representativa de melanoma oral canino com infiltrado focal de TILs (setas). Coloração HE.

Fonte: YASUMARU, 2018.

A) Aumento de 200 vezes; B) Aumento de 400 vezes.

Figura 15: Fotomicrografia representativa de melanoma oral com ausência de infiltrado linfocitário (ausente). Coloração HE.

Fonte: YASUMARU, 2018.

A) Aumento de 200 vezes; B) Aumento de 400 vezes.

Figura 16: Frequência dos padrões de infiltrado linfocitário nas amostras de melanoma oral canino (difuso n= 28; focal n=10, ausente n=10).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Figura 17: Escore do infiltrado linfocitário intratumoral (TILs) nas amostras de diferentes padrões de infiltrado intratumoral (n=48).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: ANOVA One-Way ($p < 0,0001$).

Figura 18: Escore do infiltrado linfocitário peritumoral nas amostras de diferentes padrões de infiltrado intratumoral (n=46).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: ANOVA *One-Way* ($p=0,0005$).

Figura 19: Frequência de linfócitos CD8⁺ nos melanomas orais caninos com infiltrado linfocitário de diferentes padrões.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: ANOVA *One-Way* seguida do Teste de *Kruskal Wallis* ($p=0,04$).

Figura 20: Frequência de Linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em amostras de diferentes padrões de infiltrado linfocitário.

Fonte: YASUMARU, 2018

Legenda: ANOVA One-Way seguida do Teste de *Kruskal Wallis* ($p=0,04$).

5.3 IMUNOFENOTIPAGEM DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO DAS AMOSTRAS DE MELANOMA ORAL CANINO

Foi analisado por meio da citometria de fluxo o infiltrado linfocitário de 46 amostras, destas 32 amostras eram uma primeira ocorrência e 14 eram uma recidiva. A **Figura 21** demonstra que nos melanomas orais caninos que eram uma primeira ocorrência houve uma maior frequência dos linfócitos TCD8⁺ ($p=0,02$) quando comparados aos que eram recidivas. Na **Figura 22** observa-se que os linfócitos TCD4⁺ também apresentaram uma frequência maior nas amostras de primeira ocorrência quando comparadas às amostras de recidivas ($p=0,01$). Entre as amostras de primeira ocorrência ou de recidivas não houve diferença estatisticamente significativa em relação a porcentagem de linfócitos T regs e ao índice mitótico.

Dos 45 pacientes incluídos no projeto, 5 tiveram duas amostras enviadas, referentes a primeira ocorrência e a sua recidiva tumoral. Da mesma forma do encontrado nas amostras de todos os pacientes, quando foram analisadas isoladamente as amostras apenas destes 5 cães, foi encontrada uma porcentagem menor de linfócitos TCD8⁺ nas recidivas do que nas suas amostras de primeira ocorrência. Assim como no caso dos linfócitos TCD8⁺, a porcentagem de linfócitos TCD4⁺ e de linfócitos T regs também foi menor nas amostras de recidivas quando comparadas às amostras de primeira ocorrência dos mesmos pacientes, porém em ambos os casos não foi uma diferença estatisticamente significativa.

Na comparação dos diferentes estadiamentos observa-se uma diferença significativa ($p<0,0001$) dentre os mesmos em relação a porcentagem de linfócitos TCD8⁺ (**Figura 23**). Também foi observada ($p=0,002$) uma maior porcentagem dos linfócitos TCD4⁺ dentre os estadiamentos baixos (1 e 2) em relação aos estadios altos (3 e 4) (**Figura 24**). Tal diferença não foi observada quando se avaliou a presença dos linfócitos T regs e da taxa CD4⁺/CD8⁺ nas amostras de diferentes estadiamentos.

Conforme esperado, foi observado uma maior frequência de linfócitos TCD8⁺ em amostras de maior escore de infiltrado intratumoral em relação as amostras de baixo escore (**Figura 25**) de maneira significante ($p=0,01$). Conforme a **Figura 26** o contrário ocorreu com os linfócitos T regs, os quais estavam em maior quantidade em amostras de escore baixo do infiltrado intratumoral em relação às amostras de alto escore de infiltrado intratumoral, com uma diferença significativa dentre estes dois

grupos ($p=0,02$). Não foi observada diferença significativa na quantidade de linfócitos TCD4⁺ nos melanomas de diferentes escores de infiltrado intratumoral.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de linfócitos T CD8⁺, CD4⁺ e T regs nas amostras com diferentes escores de infiltrado peritumoral.

Figura 21: Porcentagem de linfócitos TCD8⁺ encontrada nos melanomas orais oriundos de primeiras ocorrências tumorais e de recidivas (primeira ocorrência n=32; recidiva n=14).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de Student ($p=0,02$).

Figura 22: Porcentagem de linfócitos TCD4⁺ encontrada em amostras de primeira ocorrência e de recidivas.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de Student ($p=0,01$).

Figura 23: Presença dos linfócitos T CD8⁺ nas amostras de estadiamentos menos agressivos (1 e 2) e mais agressivos (3 e 4).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de *Student* ($p < 0,0001$).

Figura 24: Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ observadas nas amostras de estadiamentos baixos (1 e 2) e altos (3 e 4).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de *Student* ($p = 0,0020$).

Figura 25: Porcentagem de linfócitos TCD8⁺ nas amostras de diferentes escores de TILs.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de Student ($p=0,01$).

Figura 26: Porcentagem de Linfócitos Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ em amostras de diferentes escores de TILs.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: Teste "t" de Student ($p=0,02$).

5.4 EXPRESSÃO DO IRF-8 NAS AMOSTRAS TUMORAIS

Para avaliação da expressão tumoral de IRF-8 foi utilizado o Escore de Imunorreatividade (IRS), conforme explicado no item 4.5. A avaliação da concordância interobservador na determinação do escore foi boa (κ ponderado= 0,79).

As amostras foram consideradas positivas quando o escore foi maior que 3, conforme o estudo de SPECHT et al. (2015). Na **Figura 27** é possível observar três diferentes escores de imunomarcção para o IRF-8 no melanoma oral canino, representando um escore alto, médio e baixo, respectivamente.

A marcação positiva para IRF-8 foi observada nas células tumorais, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células do endotélio. Porém, para a análise do escore de IRF-8 tumoral foram consideradas apenas as células tumorais positivamente marcadas. Houve marcação positiva para o IRF-8 em 91,7% das amostras e destas, 81% apresentou marcação apenas nas células tumorais, 8% nas células tumorais e em linfócitos, 6% em células tumorais e plasmócitos e 2% em células tumorais, linfócitos e plasmócitos. Não houve diferença estatisticamente significativa do escore do IRF-8 nos pacientes que receberam quimioterapia e/ou imunoterapia anterior à cirurgia e dos pacientes que não receberam tratamento anterior.

Com relação ao padrão de imunorreatividade 72% das amostras tumorais apresentaram marcação citoplasmática enquanto que a marcação tanto em núcleo quanto em citoplasma foi observada em 28% das amostras (**Figura 28**). Foram utilizadas 6 amostras de cavidade oral de pacientes sadios sem a presença de melanoma a título de comparação, e destas, 100% apresentaram marcação para IRF-8 apenas no citoplasma.

A presença somente citoplasmática ou citoplasmática e nuclear do IRF-8 não foi estatisticamente significativa para determinar diferenças nas amostras no que diz respeito aos índices mitóticos, presença de ulceração e invasão angiolinfática. Interessantemente nos linfócitos a presença de IRF-8 foi sempre nuclear e nos plasmócitos a expressão foi nuclear e/ou citoplasmática (**Figura 29**).

As amostras com escore mais baixo de expressão do IRF-8 possuíam uma porcentagem menor de linfócitos TCD8⁺ ($p=0,0078$), conforme ilustrado na **Figura 30**. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa da porcentagem de

linfócitos TCD4⁺ e T regs nas amostras de melanoma de diferentes classificações de IRF-8.

Figura 27: Fotomicrografias representativas da imunomarcação para o IRF-8. Aumento de 200 vezes.

Fonte: YASUMARU, 2018.

- A) Expressão alta (escore 9).
- B) Expressão média (escore 4).
- C) Expressão baixa (escore 1).

Figura 28: Localização intracelular do IRF-8 nas células tumorais (Citoplasma n=33; Citoplasma + Núcleo n=13).

Fonte: YASUMARU, 2018.

Figura 29: Expressão de IRF-8 nos linfócitos (seta branca) e plasmócitos (seta preta). Aumento de 400 vezes.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Figura 30: Porcentagem de linfócitos TCD8⁺ nas amostras de melanoma oral de diferentes classificações de expressão de IRF-8.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Legenda: One-way ANOVA seguida do Teste de *Kruskal Wallis* ($p=0,0078$).

5.5 ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES

Foram considerados os dados de 47 pacientes para esta análise, pois 3 pacientes foram excluídos por falta de acompanhamento clínico. No momento da conclusão do estudo 6 pacientes estavam vivos e foram considerados *censored*. A sobrevida média foi de 120 dias.

Houve uma diferença significativa na sobrevida dos pacientes de diferentes estadiamentos ($p=0,01$), sendo que os pacientes de estadiamentos 1 e 2 apresentaram uma sobrevida maior (365 e 165 dias, respectivamente) enquanto que os pacientes de estadiamento 3 e 4 tiveram uma sobrevida menor (90 e 45 dias, respectivamente) (**Figura 31**). Quando a comparação da sobrevida nos estadiamentos foi realizada agrupando o estadio 1 com o 2 e o estadio 3 com o 4, ficou ainda mais evidente a diferença ($p=0,0017$) da sobrevida nos estadiamentos menos agressivos (1 e 2) em relação aos mais agressivos (3 e 4) (**Figura 32**). A comparação da sobrevida dos pacientes em relação ao seu índice mitótico, realizada com o teste de *Log-rank*, não apresentou uma diferença estatisticamente significativa.

Não houve uma diferença significativa no tempo de sobrevida dos pacientes de diferentes classificações de IRF-8 analisados pelo teste estatístico de *Log-rank*, assim como, também não foi observada uma diferença estatisticamente significativa na sobrevida dos pacientes de diferentes localizações celulares do IRF-8. Os pacientes de diferentes escores de linfócitos peritumorais não apresentaram diferença estatística em relação a sobrevida. A sobrevida média dos pacientes com melanomas ulcerados foi de 90 dias, enquanto que a sobrevida de pacientes com melanomas não ulcerados foi de 135 dias, no entanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa na sobrevida desses dois grupos de pacientes.

Em relação ao infiltrado linfocitário intratumoral (TILs), observou-se uma maior sobrevida ($p=0,002$) dos pacientes com escore alto (180 dias) em relação aos pacientes de escore baixo de TILs (60 dias), conforme ilustrado na **Figura 33**.

Na comparação da sobrevida dos pacientes com amostras de diferentes padrões de infiltrado intratumoral, foi observado que a sobrevida média para o padrão difuso foi de 135 dias, para o padrão focal foi de 180 dias e para o padrão ausente foi de 30 dias ($p=0,0015$), conforme representado na **Figura 34**.

Na análise da curva de sobrevida dos pacientes com diferentes porcentagens no tumor de linfócitos TCD8⁺, mensurados por meio de citometria de fluxo, foi

constatada ($p=0,0036$) uma sobrevida média de 60 dias nos pacientes com até 3% de linfócitos TCD8⁺ intratumorais e de 210 dias nos pacientes com mais de 3% de linfócitos TCD8⁺ intratumorais (**Figura 35**).

Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os pacientes com quantidade baixa de linfócitos TCD4⁺ em relação aos pacientes de porcentagem alta dos mesmos. O tempo de sobrevida dos pacientes com baixa porcentagem de linfócitos T regs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ não apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo dos pacientes de alta porcentagem de linfócitos T regs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Figura 31: Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes de diferentes estadiamentos (1, 2, 3 e 4) (n=50).

Fonte: YASUMARU, 2018.
 Teste estatístico de Log-rank ($p=0,01$).

Figura 32: Sobrevida dos pacientes com estadiamentos menos agressivos (1 e 2) e mais agressivos (3 e 4).

Fonte: YASUMARU, 2018.
 Teste estatístico de Log-rank ($p=0,0017$).

Figura 33: Curva da sobrevida dos pacientes que possuíam no melanoma um escore baixo de TILs (0 a 2) versus os pacientes com escore alto de TILs (3 a 6).

Fonte: YASUMARU, 2018.
 Teste estatístico de Log-rank ($p=0,0020$).

Figura 34: Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados em função do padrão de distribuição dos TILs.

Fonte: YASUMARU, 2018.
 Teste estatístico de Log-rank ($p=0,0015$).

Figura 35: Curva Kaplan-Meier dos pacientes com diferentes quantidades de linfócitos TCD8⁺ intratumorais.

Fonte: YASUMARU, 2018.

Teste estatístico de Log-rank ($p=0,0036$).

6 DISCUSSÃO

O papel das células imunes que infiltram o melanoma e sua interação com as células tumorais já é estudado e parcialmente compreendido na medicina humana. No melanoma canino, o papel das células imunes, em especial os linfócitos, ainda é pouco elucidado. De acordo com estudos em camundongos e humanos as células imunes liberam fatores, como citocinas, que regulam a expressão do IRF-8 nas células tumorais. Portanto, a proposta deste trabalho foi compreender o papel dos TILs e da expressão do IRF-8 nas células do melanoma oral canino. Para este fim, foram analisadas 50 amostras de melanoma oral oriundas de 45 pacientes caninos que desenvolveram este tumor de forma espontânea.

Os cães doadores apresentavam diferentes estadiamentos clínicos no momento da inclusão no estudo, no entanto, sabe-se que o sistema de estadiamento clínico na oncologia veterinária é falho, devido a vários fatores, tais como, à limitada realização de exames de imagem, a má conduta cirúrgica e, principalmente, por se basear em humanos cuja média de peso/tamanho não varia como nos cães. Um exemplo é a avaliação da presença de metástases pulmonares, que em todos os pacientes do estudo foi realizada por meio da radiografia de tórax em três projeções (laterais direito e esquerdo e ventrodorsal) porém, segundo LAMB (2002), nos exames radiográficos de tórax apenas são detectados nódulos acima de 4 a 5 mm.

Outra possível causa de um sistema de estadiamento clínico impreciso é o fato de que não é comum a prática da excisão dos linfonodos regionais, portanto no presente estudo, em quase metade dos pacientes a avaliação de metástase em linfonodos foi realizada apenas pela palpação no exame clínico. Utilizar o tamanho do linfonodo como um preditor de metástase tem pobre sensibilidade (70%) e especificidade (51%) segundo o estudo de WILLIAMS e PACKER (2003). Desta forma, um estadio 2 poderia ser um estadio 3, se houvesse um acometimento de linfonodo não relatado, enquanto que um estadio 3 poderia ser um estadio 4, se houvesse uma metástase pulmonar não detectada. Por este motivo, nas análises do presente estudo foi decidido agrupar os animais como menos agressivo (1 e 2) ou mais agressivo (3 e 4) na tentativa de contornar esta falha no sistema de estadiamento.

A raça mais acometida foi a SRD (18), seguida pela *Dachshund* (5), *Cocker Spaniel* Inglês (3), Labrador (3), *Golden Retriever* (3) e *Poodles* (3). Nossos resultados

concordam com o estudo de RAMOS-VARA et al. (2000) no qual foram avaliados 338 cães com melanoma oral cujas raças mais acometidas foram *Cocker Spaniel*, *Golden Retriever* e *Poodle*. No estudo de ROLIM (2012) as principais raças acometidas foram o *Poodle*, *Dachshund* e *Cocker Spaniel*, mas o maior número de casos foi observado em cães sem raça definida (SRD), assim como no presente trabalho. O fato de se observar um maior número de casos nos cães mestiços, pode ser justificado pela maior criação de cães sem raça definida (SRD) em relação a cães com raça definida no Brasil. Outra possibilidade é que estes cães sem raça definida sejam mestiços de raças caninas predispostas ao melanoma oral.

Dos 50 melanomas avaliados 81% eram melânicos e 19% amelânicos, esta casuística está próxima ao relatado no trabalho de ROLIM (2012) cujo 74,8% dos casos eram de melanomas melânicos e 25,4% de melanomas amelânicos. O diagnóstico dos melanomas amelânicos, no presente estudo, foi confirmado por meio da técnica de imuno-histoquímica usando os marcadores PNL2 e Melan-A. No estudo de RAMOS-VARA e MILLER (2011) 75% dos melanomas amelânicos foram positivos para PNL2 enquanto que 64% foram positivos para Melan-A. Já no trabalho de CHOI (2003) apenas 47,3% dos melanomas amelânicos foram positivos para Melan-A.

Das 48 amostras em que foi realizada a análise histopatológica, 39 (81%) possuíam o índice mitótico alto, o qual foi atribuído quando havia mais do que 3 mitoses em 10 campos no aumento de 400 vezes, conforme no trabalho de ESPLIN (2008) em um estudo com neoplasias melanocíticas. O índice mitótico das amostras avaliadas não apresentou relação com o escore de IRF-8, infiltrado linfocitário ou com o estadiamento, conforme seria esperado. No entanto, o número de mitoses pode estar subestimado em amostras muito pigmentadas, nas quais as mitoses não são de fácil visualização, mesmo após o protocolo de clareamento (*bleaching*) das lâminas. O mesmo foi observado por SMEDLEY et al. (2011) que atribuiu o índice mitótico de 0 em tais amostras com excesso de pigmentação.

Um fator a ser considerado no presente estudo é a influência que a quimioterapia prévia à excisão cirúrgica poderia ter no infiltrado tumoral. Das 50 amostras recebidas 22% foram excisadas de pacientes que realizaram tratamento com quimioterápico previamente à cirurgia. Não foi encontrada na literatura a influência desse tratamento na análise posterior do imunoambiente do melanoma oral canino e, no estudo de PAGES et al. (2009) com tumores colorretais humanos, não foi encontrada modificação no contexto imunológico de pacientes que receberam

quimioterapia pré-operatória neoadjuvante. Da mesma forma, no presente estudo não foi observada influência do tratamento com quimioterápicos e/ou vacinas de células autólogas utilizados anteriormente à cirurgia na quantidade e no padrão do infiltrado linfocitário. Com relação a estes parâmetros vale a ressalva de que não é recorrente na rotina do exame anatomopatológico de neoplasias em animais quantificar e/ou descrever o padrão de infiltrado linfocítico. O infiltrado linfocitário ganhou atenção no estudo de CLARK (1969) com melanoma cutâneo humano, neste estudo os linfócitos intratumorais foram denominados Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs), assim foi proposto que a análise qualitativa dos TILs ocorra apenas aos linfócitos intratumorais e não aos linfócitos peritumorais.

No estudo de SALGADO et al. (2015) foi determinado para o tumor de mama humano uma abordagem padrão para se avaliar os TILs por meio da técnica histológica, no qual se propôs especificar qual área deve ser avaliada nas amostras. Nesta avaliação, toda a amostra é avaliada excetuando os linfócitos nas áreas peritumorais e, tampouco, as células imunes presentes em áreas necróticas. No entanto, HIDA e OHI (2015) declararam que a forma de avaliação desenvolvida por SALGADO et al. (2015) seria muito detalhada e cheia de vieses para ser utilizada na rotina, por isso foi sugerido realizar a avaliação de densidade dos TILs no tumor procurando por “hot spots” no menor aumento. No presente trabalho, optou-se pela avaliação dos linfócitos intratumorais e peritumorais realizada em toda a extensão da amostra, conforme a análise semi-quantitativa do THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK (2015) e a análise qualitativa de CLARK (1989).

As análises apontaram para resultados interessantes, e até onde sabemos para o melanoma canino, inéditos. Foi demonstrado que o escore dos TILs foi inferior nas amostras de estadiamento mais agressivo (3 e 4). Essa diferença dentre os estadiamentos não foi observada no escore do infiltrado peritumoral. O oposto foi observado no estudo do melanoma cutâneo humano realizado por PARK e KIM (2017), no qual foi observado que os pacientes com melanomas em estágios iniciais apresentavam um maior escore de infiltrado peritumoral, enquanto que não foi encontrada relação do infiltrado intratumoral com a agressividade tumoral. Neste mesmo estudo observou-se também um maior escore linfocitário intratumoral nas amostras com presença de úlcera e oriundas de pacientes mais velhos. No nosso estudo não foi observada relação do infiltrado linfocitário com a idade dos pacientes e com a presença de úlcera nas amostras. Já no trabalho de CARVALHO et al. (2011)

com neoplasias mamárias caninas foi observada que as neoplasias benignas possuíam um maior número de TILs. Da mesma forma, observamos um maior escore de infiltrado intratumoral de linfócitos nos melanomas menos agressivos. Supõe-se que isto se deva a capacidade de recrutamento imune que existe nos pacientes com neoplasias em estágio menos agressivo, enquanto que a imunidade celular decresce nas neoplasias mais agressivas devido à evasão tumoral. Esta perda da capacidade imune também justifica o fato de amostras oriundas de neoplasias primárias possuírem um maior escore de TILs em relação às amostras oriundas de recidivas no nosso estudo.

No estudo de PEREZ (1998) com tumor venéreo canino foi observado que neoplasias com maior infiltrado linfocitário possuíam um menor índice mitótico, esta relação não foi encontrada em nosso trabalho, no entanto, por se tratarem de neoplasias muito diferentes é difícil realizar comparações.

No presente trabalho foi observado um maior escore de TILs e de linfócitos peritumorais nos melanomas com infiltrado linfocitário de padrão difuso e focal em relação ao padrão ausente. A frequência de linfócitos TCD8⁺ observada em pacientes com infiltrado intratumoral de padrão difuso também foi maior, enquanto que a frequência de linfócitos T regs nestes pacientes foi menor. Isto aponta que a análise do padrão do infiltrado linfocitário com a avaliação dos subtipos de linfócitos mais envolvidos na imunidade antitumoral pode ser um bom preditor de um fenótipo tumoral menos agressivo e da sobrevida do paciente. É interessante quão útil pode ser aplicação desta classificação do padrão linfocitário para auxiliar na definição do comportamento tumoral, pois se trata de uma análise prática e pouco onerosa para ser utilizada na rotina dos patologistas.

No estudo de THOMAS et al. (2013) foi observada uma menor mortalidade devido ao melanoma em pacientes com infiltrado linfocitário de padrão difuso e focal, comparados aos pacientes com ausência de TILs. CLARK (1989) constatou no melanoma cutâneo humano que nos pacientes com infiltrado de TILs de padrão difuso maior foi a probabilidade destes pacientes apresentarem uma sobrevida de 8 anos. Isto corrobora com nossos resultados, no quais observamos uma maior sobrevida dos pacientes com infiltrado linfocitário de padrão difuso e focal em relação ao ausente.

Na imunofenotipagem dos linfócitos intratumorais realizada por meio da citometria de fluxo, foi constatado que amostras menos agressivas oriundas de primeira ocorrência ou de estadio mais baixo, apresentavam uma maior frequência de

linfócitos TCD8⁺ e linfócitos TCD4⁺. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados no estudo de CARVALHO et al.(2011) com neoplasias mamárias caninas, no qual foi observado que tumores benignos possuíam um maior infiltrado de células T intratumorais em relação às neoplasias malignas e, com o estudo de PAGES et al. (2010) com tumores colorretais humanos, que constatou por meio da citometria de fluxo a frequência maior de linfócitos T CD8⁺ em pacientes sem metástase.

Para análise da sobrevida dos pacientes com diferentes frequências de infiltrado de linfócitos T CD8⁺ dividimos as amostras em até 3% de TILs CD8⁺ e mais do que 3% de TILs CD8⁺. Este número discriminatório foi escolhido devido a observação de que metade das amostras apresentava uma frequência até 3% e metade uma frequência maior do que 3% destas células no tumor. Uma porcentagem semelhante foi encontrada no estudo de KIM et al (2010) cuja frequência de 2,4% de células T foi observada em tumores mamários caninos metastáticos. É difícil estimar se a frequência encontrada de células T CD8⁺ e T CD4⁺ em nosso estudo se encontra dentro do esperado, pois estudos semelhantes com melanoma oral canino não são usuais.

Também, foi observado em nosso estudo uma maior sobrevida dos pacientes com escore alto de TILs em relação aos pacientes de escore baixo, isto corrobora com o estudo de GALON et al. (2006) com tumores colorretais humanos, no qual os pacientes com maior infiltrado de linfócitos CD3⁺, tanto intratumoral quanto peritumoral, apresentaram uma maior sobrevida, o que foi observado inclusive nos pacientes de estadio baixo. Um resultado semelhante foi encontrado no estudo de ESTRELA-LIMA et al. (2010) com carcinomas mamários caninos, no qual uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ apresentou correlação com uma maior sobrevida dos pacientes.

No nosso estudo foi observada uma relação dos TILs, principalmente de subtipo CD8⁺, com os estadios menos agressivos, tumores de primeira ocorrência e com uma maior sobrevida. Esta relação foi descrita em trabalhos prévios com neoplasias humanas, como o melanoma cutâneo, tumor de mama, carcinoma hepático, tumores colorretais, tumor de ovário e câncer de pulmão de células não pequenas (CLEMENTE, 1996; PIRAS et al., 2005; GALON et al., 2006; PAGES et al., 2010; ZHANG et al., 2010; MIHM e MULÉ, 2015; GARNELO et al., 2017). Acredita-

se que esta relação ocorra devido ao papel antitumoral dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺.

Por esta razão, na medicina humana os tumores que apresentam células T CD8⁺ no seu interior são denominados “*hot tumours*”, estes tumores provavelmente apresentam uma alta taxa mutacional que levou a presença de neoantígenos na sua superfície, o que os deixou mais expostos ao reconhecimento imune. Ao contrário, os “*cold tumors*” não provocam reação imunológica e devido à ausência de células imunes no seu interior, algumas medicações, como os inibidores de *checkpoint*, não são eficazes nestes tumores. Por isso, existe atualmente um arsenal crescente de tratamentos destinados a transformar os “*cold tumors*” em “*hot tumors*” (LANITIS et al., 2017; SALTUS, 2018).

De fato, a presença aumentada dos linfócitos T CD8⁺, indica uma resposta antitumoral que se inicia com o remodelamento tecidual causado pelo tumor, o que gera citocinas pró-inflamatórias, as quais juntamente com as citocinas tumorais recrutam células do sistema imune inato, como os macrófagos, linfócitos T $\gamma\delta$ e NK, que interagem com as células tumorais via TCR e produzem IFN- γ , o que leva ao recrutamento de mais células imunes. Os antígenos tumorais provenientes das células tumorais mortas ficam disponíveis para as APCs, que induzem a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺, estas migram para o sítio tumoral e secretam TNF e IFN- γ levando ao aumento da expressão de MHC de classe I pelas células tumorais e a sensibilidade à lise pelas CTLs CD8⁺ (DUNN et al., 2004; ABBAS et al., 2015).

Nos melanomas oriundos de recidivas e de pacientes de estadio mais agressivos foi encontrada uma menor frequência de linfócitos T CD4⁺. Esta relação é esperada, já que nestas amostras, consideradas “*cold tumors*” também foi encontrada uma menor frequência de linfócitos TCD8⁺, que são mantidos no ambiente tumoral por meio da ação dos linfócitos T CD4⁺.

Um dado interessante é que foi observada uma menor frequência de linfócitos T regs em melanomas de pacientes com padrão difuso de infiltrado linfocitário e alto escore de TILs. Supõe-se que isto aconteça pelo fato de que estes melanomas orais com fenótipo menos agressivo, com infiltrado linfocitário composto principalmente de linfócitos TCD8⁺, não induzam a migração de linfócitos T regs para o sítio tumoral. No estudo conduzido por TOMINAGA et al. (2010) que avaliou a população de linfócitos T regs CD4⁺ FOXP3⁺ no sangue periférico e no tecido tumoral de cães com melanoma oral observou-se uma maior frequência de T regs no tecido tumoral, uma possibilidade

é de que neste caso as células tumorais estariam induzindo a migração intratumoral de linfócitos T regs. Não foram encontradas diferenças na sobrevida dos pacientes com maior frequência de T regs no infiltrado intratumoral em relação aos pacientes com menor frequência. Já no estudo de SAKAI et al. (2018), que avaliou a presença de T regs no melanoma oral canino por meio da técnica de imunomarcagem, a sobrevida dos pacientes com maior infiltrado de T regs foi menor.

Para verificar outros fatores que influenciariam a presença e ação do infiltrado linfocitário no melanoma oral canino, foi selecionado o fator de transcrição conhecido como Fator regulatório de interferon 8 (IRF-8), ainda não estudado em cães, cuja ativação ocorre principalmente via IFN- γ e, segundo estudos em humanos e murinos, age tanto na imunomodulação quanto como um supressor tumoral em diversas neoplasias.

A avaliação da expressão do IRF-8 nas células tumorais no presente estudo foi realizada por meio da técnica de imuno-histoquímica. Foi utilizado um anticorpo policlonal e tal escolha se deu pela utilização deste anticorpo em trabalhos prévios (LU, 2008) e pela disponibilidade, já que não foi encontrado anticorpo monoclonal anti-IRF-8 com reatividade para a espécie canina. O escore de imunorreatividade (IRS) utilizado para avaliação da expressão do IRF-8 foi escolhido com base no trabalho de SPECHT et al. (2015), que comparou escores para análise da expressão do receptor de somatostatina pela reação de imuno-histoquímica e observou que o IRS foi o escore que mais se assemelhou com os dados obtidos pela técnica de RT-PCR.

Foi observada em nossa análise a expressão do IRF-8 em uma pequena quantidade de linfócitos, plasmócitos e nas células dos melanomas em diversas amostras. Até recentemente, diversos estudos a respeito do IRF-8 o consideravam um membro da família IRF expressado exclusivamente nas células imunes (LIU et al 2004; MATTEI, 2006; LU, 2008; ZHANG et al., 2010; MIYAGAWA et al., 2012; MINDERMAN et al., 2017). No entanto, estudos recentes, alguns inclusive dos mesmos autores, assim como nós, relatam a presença do IRF-8 em células não imunes, como células do músculo cardíaco, células do músculo liso, adipócitos, neurônios e em células de tumores como linfoma de grandes células B, carcinomas mamários humanos, carcinomas de cólon humanos (YANG et al., 2007; TAKAOKA et al., 2008; ABRAMS, 2010; MATTEI et al., 2012; MATTEI et al., 2013; SHUKLA e LU, 2014; ZHONG et al.; 2017). No que diz respeito aos linfócitos que encontramos com

expressão de IRF-8, suspeitamos que sejam linfócitos do tipo B, conforme constatado em estudos prévios (LU, 2008; MINDERMAN et al., 2017).

Nas células tumorais a expressão do IRF-8 foi majoritariamente citoplasmática, e houve amostras com expressão tanto citoplasmática quanto nuclear, contudo não houve amostras com expressão deste fator apenas no núcleo. Esta heterogeneidade no padrão de expressão do IRF-8 nas células tumorais reflete o dinamismo do microambiente tumoral, além de já ter sido descrito que o IRF-8 apresenta uma baixa afinidade pela cromatina. Assim, uma vez que não foi observada nenhuma diferença de infiltrado de TILs nas amostras de diferentes localizações celulares de expressão do IRF-8, pode-se sugerir que no futuro também sejam consideradas além do IRF-8, a análise da expressão das moléculas acessórias que facilitam a ligação deste fator no núcleo, tais com IRF-1 e PU.1.

Outros estudos também observaram a presença citoplasmática do IRF-8 (ROBBIO et al., 2005; MINDERMAN et al., 2017). Além disso, segundo o estudo de SCHONHEIT et al. (2013) foi observado que 80% do IRF-8 celular seria móvel e somente ficaria estável ao interagir com outros fatores de transcrição como o PU.1 e o IRF-1. Se de fato o IRF-8 tem uma baixa afinidade à cromatina e transita entre núcleo e citoplasma, conforme sugere o estudo de MINDERMAN et al. (2017), pode ser que esta migração citoplasma/núcleo do IRF-8 seja variável e que esta seja determinada por fatores os quais devem ser revelados por estudos futuros.

Observamos ainda um maior escore de infiltrado de TILs e uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ em amostras com maior expressão de IRF-8 nas células tumorais. Um resultado semelhante foi obtido no estudo de MATTEI et al. (2012) que observou redução do infiltrado linfocitário, das células T CD8⁺ e das células T CD4⁺ em camundongos *knockout* para IRF-8, nos quais foram implantadas células de melanoma B16-F10, neste estudo foi concluído que a deficiência de IRF-8 determina um defeito no infiltrado tumoral de linfócitos T.

A relação da expressão do IRF-8 nas células tumorais com a presença de TILs ainda não está bem elucidada, mas é sabido que a apoptose das células tumorais responsivas ao Fas é um mecanismo de morte celular utilizado pelas células CTL CD8⁺ e um dos genes envolvidos na resposta de morte celular tumoral mediada por Fas é o IRF-8. Já foi demonstrado uma relação inversa da expressão de Fas pelas células tumorais e sua malignidade (LIU et al., 2005; ABRAMS, 2010; ABBAS et al., 2015).

De acordo com os resultados obtidos, o escore de TILs foi maior nas amostras de padrão difuso e a expressão de IRF-8 foi maior nas amostras de maior escore de TILs, portanto seria esperado que as amostras de padrão difuso também apresentassem uma maior expressão de IRF-8, mas esta relação não foi observada.

Ainda, KOVACSOVICS-BANKOWSKI et al. (2014) observou no seu trabalho com neoplasias de ovário e de fígado, que os T regs suprimem o IFN- γ produzido pelos linfócitos T CD4⁺. É deduzível que nas amostras com uma maior frequência de infiltrado de T regs o IRF-8, induzido pelo IFN- γ , estaria menos expresso, no entanto esta relação não foi observada em nosso estudo.

De forma simplificada, o IRF-8 atuaria de duas formas no ambiente tumoral: uma delas seria sensibilizando as células tumorais à apoptose mediada por Fas/FasL, após sua expressão ser induzida nestas células pela presença do IFN- γ . Sua segunda participação seria na ativação e desenvolvimento das células imunes deste microambiente, levando à produção de IL-12 que estimula as células imunes a produzirem mais IFN- γ , gerando um processo de retroalimentação que impediria a progressão tumoral (GIESE et al., 1997; LEHTONEN et al., 2003 ; LIU et al., 2004; ZHANG et al., 2010; ABRAMS, 2010; ABBAS et al., 2015).

Não foi observada diferença na sobrevida dos pacientes com baixa e com alta expressão de IRF-8 nas células tumorais, pode ser que de fato sua expressão citoplasmática, observada na maior parte das amostras, não coincida com sua ação celular, conforme já discutido. Porém, pelo fato do IRF-8 modular o ataque imune Fas-dependente, pode ser um parâmetro importante na escolha dos pacientes que futuramente irão ser tratados com imunoterapia, principalmente se tratando de terapias envolvendo os CTLs CD8⁺.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As amostras de estadio menos agressivo e oriundas de uma primeira ocorrência apresentaram maior escore de TILs, padrão difuso de infiltrado linfocitário e maior frequência de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺;
- As amostras de padrão de infiltrado linfocitário difuso apresentaram uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ e menor frequência de T regs;
- O escore escolhido para avaliar a expressão de IRF-8 nas células tumorais foi adequado e a maior parte das células tumorais apresentou marcação citoplasmática;
- As amostras com maior escore de TILs foram as que apresentaram maior expressão de IRF-8;
- Os pacientes com maior escore de TILs, maior frequência de células T CD8⁺ e padrão difuso ou focal de infiltrado linfocitário tumoral foram os que apresentaram maior sobrevida;
- A expressão de IRF-8 nas células tumorais não influenciou na sobrevida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2015. 536 p.

ABRAMS, S. I. A multi-functional role of interferon regulatory factor-8 in solid tumor and myeloid cell biology. **Immunologic Research**, v. 46, n. 1–3, p. 59–71, 2010.

AHERN et al. Overexpression of c-erbB-2 and c-myc but not c-ras, in canine melanoma cell lines, is associated with metastatic potential in nude mice. **Anticancer Res.** Sep-Oct;13(5A):1365-71.1993.

ATHERTON, M. J. et al. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 169, p. 15–26, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.003>>.

BANERJEE, S. S; HARRIS, M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. **Histopathology**. v36, p387±402.2000. Disponível em: <http://www.ipathnetwork.com/raft/file/src/189921/variations%20in%20malignant%20melanoma.pdf>

BARRY, M.; BLEACKLEY, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 401, 1 jun. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri819>>.

BARRY, M.; BLEACKLEY, R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. **Nature Reviews Immunology** v.2, p.401–409.2002.

BELL, J.S. The Genetics of Canine Cancer. **Tufts' canine and feline breeding and genetics conference**, 2003. Disponível em: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3848656&pid=11165&print=1> .

BERGMAN, P. J. Canine Oral Melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 55–60, 2007.

BLANCHARD, T. W.; BRYANT, N. J.; MENSE, M. G. Balloon cell melanoma in three dogs: A histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, n. 4, p. 254–261, 2001.

BRONTE, V. et al. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 8, p. 1257–1268, 2005. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20042028>>.

BURNET, F.M. The Concept of Immunological Surveillance. **Prog Exp Tumor Res.** v. 27, 1970.

BURNS, J.; MANDA, G. Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2755, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/12/2755>>.

CANGUL, I. T. et al. Canine balloon and signet-ring cell melanomas: A histological and immunohistochemical characterization. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, n. 2–3, p. 166–173, 2001.

CANN, H. et al., 2003. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. **Postgraduate medical journal**, v. 79, n. 938, p. 672–80, 2003.

CARVALHO, M. I. et al. T-lymphocytic infiltrate in canine mammary tumours: Clinic and prognostic implications. **In Vivo**, v. 25, n. 6, p. 963–969, 2011.

CHANG, C. et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. **Cell**. v. 162, n. 6, p. 1229–1241, 2016.

CHOI, C.; KUSEWITT, D. F. Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, and melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 713–718, 2003.

CLARK, W. H. et al. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. **Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 705–727, 1969.

CLEMENTE, C. G. et al. Prognostic Value of TILs in vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 77, n. 7, p. 1303–1310, 1996.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 2006.

DUNN, G.P. et al. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. **Immunity**, v. 21, p137–148, Aug, 2004.

EL-HOUSEINI, M. E. et al. Isolation and Immuno-Phenotypic Characterization of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) Obtained from Breast Malignant Tumor Tissues of Egyptian Patients. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 20, n. 4, p. 379–86, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571596>>.

ESPLIN, D.G. Survival of Dogs Following Surgical Excision of Histologically Well-differentiated Melanocytic Neoplasms of the Mucous Membranes of the Lips and Oral Cavity. **Vet Pathol**. v. 896, p. 889–896, 2008.

ESTRELA-LIMA, A. et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

GALON, J. et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. **Science** .v313.p1960-1963.2006.

GARCIA, J. S.; GOMES, C. de O. M. S. **Avaliação da expressão das galectinas no melanoma canino**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2017.

GARNELO, M. et al. Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma. **Gut**, v. 66, n. 2, p. 342–351, 2017.

GIESE, B. N. A. et al. Transcription Factor of the IFN Regulatory Factor Family , Regulates Immune Responses In Vivo through Control of Interleukin 12 Expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 9, 1997.

GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 90–102, 2014.

GIUDICE, C. et al. Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. **J Vet Diagn Invest**. v. 394, p. 1–6, 2010. Disponível em: <papers3://publication/uuid/33BA01C4-A585-4773-947A-B1A7E2EADF6C>.

GOLDSCHMIDT M.H.,et al. Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals. 2nd ed. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, DC. 106p.1998.

HANAHAN, D. E WEINBERG, R.A.Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**.v144, March 4, 2011.

HIDA, A. I.; OHI, Y. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer; proposal of a simpler method. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 11, p. 2351, 2015.

HORIUCHI, Y. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 8, p. 468–474, 2009.

HORIUCHI, Y. et al. Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Microbiol Immunol**, v.54: p152–159, 2010.

HUANG, B. et al. Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: Glimpse of the diversification in evolution. **BMC Immunology**, v. 11, p. 1–28, 2010.

KIM, J. H. et al. Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes to histopathological features and molecular phenotypes in canine mammary carcinoma: A morphologic

and immunohistochemical morphometric study. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 2, p. 142–149, 2013.

KIM, J. H. et al. Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 2–3, p. 177–186, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.10.023>>.

LAMB, C. R. The canine and feline lung. In: THRALL, D.E. **Text book of veterinary diagnostic radiology**. 4.ed. Philadelphia: Saunders, p. 431-447.2002.

LANITIS, E et al. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors. **Annals of Oncology** 28 (Supplement 12): xii18–xii32, 2017
doi:10.1093/annonc/mdx238 Published online 21 September 2017

LARICCHIA-ROBBIO, L. et al. Partner-regulated interaction of IFN regulatory factor 8 with chromatin visualized in live macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 40, p. 14368–14373, 2005. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16183743>.

LEE, B. H. et al. IQGAP1 is an oncogenic target in canine melanoma. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–13, 2017.

LEE, K. Y. et al. Epigenetic disruption of interferon- γ response through silencing the tumor suppressor interferon regulatory factor 8 in nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas. **Oncogene**, v. 27, n. 39, p. 5267–5276, 2008.

LEE, S.; MARGOLIN, K. Tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma. **Current Oncology Reports**, v. 14, n. 5, p. 468–474, 2012.

LEE, W. et al. Transcription factor IRF8 controls Th1-like regulatory T-cell function. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 6, p. 785–794, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2015.72>>.

LEHTONEN, A. et al. IFN- α and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells. **Cytokine**, v. 24, n. 3, p. 81–90, 2003.

LIU, J. et al. Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55609–55617, 2004.

LIU, K.; CALDWELL, S. A.; ABRAMS, S. I. Immune selection and emergence of aggressive tumor variants as negative consequences of Fas-mediated cytotoxicity and altered IFN- γ -regulated gene expression. **Cancer Research**, v. 65, n. 10, p. 4376–4388, 2005.

LU, R. Interferon regulatory factor 4 and 8 in B-cell development. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 10, p. 487–492, 2008.

LUO, X. et al. The tumor suppressor interferon regulatory factor 8 inhibits β -catenin signaling in breast cancers, but is frequently silenced by promoter methylation. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 48875–48888, 2017.

MAEKAWA, N. et al. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

MASUMI, A. et al. IRF-8/ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages. **FEBS Letters**, v. 531, n. 2, p. 348–353, 2002.

MATTEI, F. et al. ICSBP/IRF-8 differentially regulates antigen uptake during dendritic-cell development and affects antigen presentation to CD4⁺T cells. **Blood**, v. 108, n. 2, p. 609–617, 2006.

MATTEI, F. et al. IRF-8 Controls Melanoma Progression by Regulating the Cross Talk between Cancer and Immune Cells within the Tumor Microenvironment. **Neoplasia**, v. 14, n. 12, p. 1223–1234, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558612800583>>.

MAYR, B. et al. N-ras mutations in canine malignant melanomas. **Veterinary Journal**, v. 165, n. 2, p. 169–171, 2003.

MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals** 5ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017.997 p.

MIHM, M. C.; MULE, J. J. Reflections on the Histopathology of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Melanoma and the Host Immune Response. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 8, p. 827–835, 2015. Disponível em: <<http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-15-0143>>.

MINDERMAN, H. et al. Total cellular protein presence of the transcription factor IRF8 does not necessarily correlate with its nuclear presence. **Methods**, v. 112, p. 84–90, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.08.011>>.

MIYAGAWA, F. et al. Interferon regulatory factor 8 integrates T-cell receptor and cytokine-signaling pathways and drives effector differentiation of CD8 T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 30, p. 12123–12128, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1201453109>>.

MODIANO, J. F.; RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 163–174, 1999.

MONTEIRO, P. M. P. **Pesquisa de biomarcadores tumorais com potencial terapêutico em tumores melanocíticos do cão: Expressão de Linfócitos T e Cicloxigenase-2**. 2013.

NAKHLEH et al. Morphologic diversity in malignant melanomas. **Am J Clin Pathol.** jun;93(6):731-40.1990.

NEILL, K. O. et al. Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, p. 875–881, 2009.

NISHIYA, A. et al. Comparative Aspects of Canine Melanoma. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2306-7381/3/1/7>>.

ONUCHIC, A.C E CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Cancer. Rev Med** (São Paulo).v.89, n. 1, p. 21–31, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i1p21-31%5Cnhttp://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/46269>>.

OWEN, L. N, World Health Organization. Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology. (1980). **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals**/ edited by L.N. Owen. Geneva : World Health Organization.

PAGÈS, F. et al. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, n. 8, p. 1093–1102, 2010.

PARK, C. K.; KIM, S. K. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 14759–14769, 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/14736>>.

PÉREZ, J. et al. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 2, p. 133–147, 1998.

PERLMANN, E. **Estudo morfológico das neoplasias melanocíticas uveais em cães**. Dissertação.2010.

PHAN, G. Q. et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8372–8377, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1533209100>>.

PIRAS, F. et al. The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. **Cancer**, v. 104, n. 6, p. 1246–1254, 2005.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, 37(6), 597–608.2000. Disponível em: <http://doi.org/10.1354/vp.37-6-597>.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: Comparison with melan A. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 2, p. 443–450, 2011.

ROLIM, V. M. et al. Melanoma amelanótico em cães: Estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 340–346, 2012.

ROSENBERG, S. A. et al. Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 25, p. 1676–1680, 22 dez. 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192527>.

ROSENBERG, S. A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. **Nature Review**. v. 2, 2001.

SAKAGUCHI et al. Immunologic tolerance maintained by cd25+ cd4+ regulatory t cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol Rev.** aug;182: p18-32.2001.

SAKAI, K. et al. Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 3, p. 330–336, 2017.

SALEM, S. et al. Functional characterization of the human dendritic cell immunodeficiency associated with the IRF8K108Emutation. **Blood**, v. 124, n. 12, p. 1894–1904,2014.Disponível em:
<<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L600045718%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-04-570879%5Cnhttp://sfx.aub.aau.dk/sfxaub?sid=EMBASE&issn=15280020&id=doi:10.1182%2Fblood-2014-04-570879&atitle=Functional+characte>>.

SALGADO, R. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 2, p. 259–271, 2015.

SALTUS, R. 2018 Enhancing Immunotherapy: The Race to Make Cold Tumors Hot em <https://www.dana-farber.org/newsroom/publications/paths-of-progress-2018/enhancing-immunotherapy/> acesso em 11/01/19 16h.

SANDUSKY, G. E.; CARLTON, W. W.; WIGHTMAN, K. A. Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. **Veterinary pathology**, v. 22, n. 6, p. 577–581, 1985.

SCHIAVONI, G.; GABRIELE, L.; MATTEI, F. The Tumor Microenvironment: A Pitch for Multiple Players. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. April, p. 1–15, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2013.00090/abstract>>.

SCHÖNHEIT, J. et al. PU.1 Level-Directed Chromatin Structure Remodeling at the IRF8 Gene Drives Dendritic Cell Commitment. **Cell Reports**, v. 3, n. 5, p. 1617–1628, 2013.

SHIMIZU, M. et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of IL-27. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 12, p. 7317–7324, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.176.12.7317>>.

SHUKLA, V.; LU, R. IRF4 and IRF8: Governing the virtues of B lymphocytes. **Frontiers in Biology**, v. 9, n. 4, p. 269–282, 2014.

SICHIEN, D. et al. IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 626–640, 2016.

SILVA, A. P. et al. Bleaching of melanin in the epidermis of South American fur seal and its application on enzyme immunohistochemistry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 267–270, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000300014&lng=en&tling=en>.

SIMPSON, R. M. et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 37–47, 2014.

SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 54–72, 2011.

SMITH, et al. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. **Vet Pathol.** v. 678, n. 2002, p. 651–678, 2002.

SPANGLER, W. L., & Kass, P. H. (2006). The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, 43(2), 136–149. Disponível em: <http://doi.org/10.1354/vp.43-2-136>.

SPECHT, E. et al. Comparison of immunoreactive score, HER2/neu score and H score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. **Histopathology**, v. 67, n. 3, p. 368–377, 2015.

STARKEY, M. P. et al. Metastasis-associated microRNA expression in canine uveal melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 1, p. 81–89, 2018.

STREET, S. E. et al.; Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 192–197, 2001.

SUZUKI, M. et al. Aberrant methylation and silencing of IRF8 expression in non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, v. 8, n. 3, p. 1025–1030, 2014.

TAKAOKA, A. et al. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. **Cancer Science**, v. 29, n. 3, p. 467–478, 2008.

TANIGUCHI, T. et al. IRF Family of Transcription Factors as Regulators of Host Defense. **Annu. Rev. Immunol.** 19:623–55. 2001.

TEIXEIRA, T. F. **Melanomas melânicos e amelanicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares.** p. 1–140, 2011.

Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-19102012-082041/publico/TARSO_FELIPE_TEIXEIRA.pdf>.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, Local, v. 161, n. 7, p. 1681-1696, 2015. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(15\)00634-0.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(15)00634-0.pdf)> . Acesso em: 19 dez. 2018.

THOMAS, N.E. et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. **J Clin Oncol** 31:4252–9.2013.

TOMINAGA, M. et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 3, p. 438–441, 2010.

UMANSKY, V. et al. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. **Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 36, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-393X/4/4/36>>.

WANG, H. et al. IRF8 regulates B-cell lineage specification, commitment, and differentiation. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 4028–38, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18799728>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2581985>.

WILKERSON, M. J. et al. Metastatic balloon cell melanoma in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 32, n. 1, p. 31–36, 2003.

WILLIAMS, L.E.; PACKER, L.A..Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). **J Am Vet Med Assoc.** may 1;222(9):1234-6.2003.

YANG, D. et al. Repression of IFN regulatory factor 8 by DNA methylation is a molecular determinant of apoptotic resistance and metastatic phenotype in metastatic tumor cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3301–3309, 2007.

YANG, L. et al. Interferon-gamma inhibits melanogenesis and induces apoptosis in melanocytes: A pivotal role of CD8+cytotoxic T lymphocytes in vitiligo. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 6, p. 664–670, 2015.

YU, P.; FU, Y. X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes? **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 3, p. 231–245, 2006.

ZHANG, J. et al. Activation of IL-27 p28 gene transcription by interferon regulatory factor 8 in cooperation with interferon regulatory factor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21269–21281, 2010.

ZHANG, Q. et al. Interferon regulatory factor 8 functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma and its promoter methylation is associated with patient poor prognosis. **Cancer Letters**, v. 354, n. 2, p. 227–234, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.040>>.

ZHONG, W. et al. Increased expression of IRF8 in tumor cells inhibits the generation of Th17 cells and predicts unfavorable survival of diffuse large B cell lymphoma patients. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 49757–49772, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28537908>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5564805>.

ZITVOGEL, L. et al. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 715, 15 set. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri1936>>.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados do exame histopatológico de 48 amostras de melanoma oral canino

Variável histopatológica	Total (n= 48)
Tipo celular	
Epitelióide	20 (42%)
Fusiforme	13 (27%)
Misto	14 (29%)
Balonoso	1 (2%)
Índice Mitótico	
Alto (>3)	7 (15%)
Baixo (<3)	41(85%)
Pigmentação	
Amelânico	9 (19%)
Melânico	39 (81%)
Úlcera	
Presente	26 (54%)
Ausente	22 (46%)
Atividade Juncional	
Sem epitélio	3 (6%)
Presente	21 (44%)
Ausente	24 (50%)
Bactérias	
Presentes	22 (46%)
Ausentes	26 (54%)
Necrose	
Presente	29 (60%)
Ausente	19 (40%)
Invasão Angiolinfática	
Presente	16 (33%)
Ausente	32 (67%)

Fonte: YASUMARU, 2018.