

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INGRID KESTER LIMA SILVA

**Avaliação da expressão do Ligante Celular de Morte Programada (PD-L1) e do infiltrado de células T citotóxicas e regulatórias como fatores prognósticos em tumores de mama de cadelas**

Pirassununga

2023

INGRID KESTER LIMA SILVA

**Avaliação da expressão do Ligante Celular de Morte Programada (PD-L1) e do infiltrado de células T citotóxicas e regulatórias como fatores prognósticos em tumores de mama de cadelas**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi

---

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Ingrid Kester Lima  
Avaliação da expressão do PD-L1 e do infiltrado de células T citotóxicas e regulatórias como fatores prognósticos em tumores de mama de cadelas / Ingrid Kester Lima Silva ; orientador Ricardo de Francisco Strefezzi. -- Pirassununga, 2023.  
77 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. CD8. 2. FOXP3. 3. PD-L1. 4. Prognóstico. 5. Tumor de mama em cadelas. I. Strefezzi, Ricardo de Francisco, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
SCARACADINICUBA

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de  
São Paulo - FZEA/USP

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "COMPONENTES DO MICROAMBIENTE TUMORAL E SEU VALOR COMO MARCADORES PROGNÓSTICOS EM NEOPLASIAS CANINAS", CEUA nº 7498190221 (ID 069966), sob a responsabilidade de Ricardo de Francisco Strefezzi e equipe; Bruna dos Santos; Paulo Edson Baptista Martinelli; Giovanna Pedroso Vicente; Bethânia Almeida Gouveia; Jessika Daniel Urel; Ingrid Kester Lima Silva; Fernanda Ramalho Ramos; Karina Cavalhieri Bittencourt - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) em 05/07/2021.

Certificamos que a seguinte proposta foi aprovada como SUBPROJETO à proposta principal citada acima:

- AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO LIGANTE CELULAR DE MORTE PROGRAMADA (PD-L1) E DO INFILTRADO DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS E REGULATÓRIAS COMO FATORES PROGNÓSTICOS EM TUMORES DE MAMA DE CADELAS, executada por Ingrid Kester Lima Silva.

Término previsto: 01/2025

Origem: Hospital Veterinário UDCH

Espécie: Cães

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 0 a 25 anos

Quantidade  
mandada: 0

Linhagem: qualquer

Peso: 0 a 100 kg

### ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Cães	Machos e Fêmeas	1000	0

Pirassununga, 12 de maio de 2023

Profª Drª Luciane Silva Martello  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Profª Drª Fabiana Fernandes Bressan  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo FZEA/USP

## **DEDICATÓRIA**

À minha família e a todas as pacientes caninas que contribuíram com este estudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Joelma, por todo o apoio e incentivo. Sem ela eu não seria metade do que sou hoje. Ao meu pai, Luiz, por seu carinho e atenção de sempre.

À minha irmã, Isabely, por ser minha melhor amiga, me ouvir, incentivar e sempre me apoiar em todas as fases da minha vida.

Ao meu noivo Augusto, pelo carinho, amor e por sempre me apoiar e me incentivar a realizar os meus sonhos.

A toda a minha família e amigos que estiveram presentes em cada momento desta importante etapa.

Ao meu orientador, Ricardo Strefezzi, pela oportunidade, por incentivar meu crescimento profissional, por todo conhecimento e por estar sempre à disposição quando necessário.

Às minhas companheiras de laboratório e de vida, Jéssika, Karina, Bethânia, Bruna, Giovanna, Fernanda e Johanna, pelos conselhos, pela troca de experiências, aprendizados e pelos momentos compartilhados.

À Lindsay, por todo apoio técnico e ensinamentos.

À Adelina Gama, por ter me recebido na UTAD, por todo o conhecimento passado, pela contribuição a este trabalho, pelo acolhimento e cuidado durante o período de estágio em Portugal.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), campus Jaboticabal, em especial a professora Rosemeri pela parceria no fornecimento de amostras.

Ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), campus Jaboticabal, em especial ao professor Andriago De Nardi e ao Adilson pelo fornecimento de amostras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar este trabalho, processos 2020/14891-8 e 2020/10582-0, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza”  
(Marie Curie)*

## RESUMO

SILVA, I. K. L. **Avaliação da expressão do ligante celular de morte programada (PD-L1) e do infiltrado de células T citotóxicas e regulatórias como fatores prognósticos em tumores de mama em cadelas.** 2023. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O câncer tem sido relatado como a principal causa de morte em cães e, nas cadelas, os tumores de mama são os mais frequentes. Desta forma, estudos que elucidem melhor a patogênese tumoral e que tenham como objetivo melhorias no tratamento e na prevenção do câncer são necessários. A proteína celular de morte programada 1 (PD-1) é uma molécula de ponto de verificação imune expressa na superfície das membranas de células T. Quando se une ao ligante celular de morte programada 1 (PD-L1), sinais negativos são propagados para as células T, iniciando mecanismo supressivo de suma importância para o controle da resposta imune. Esse mecanismo também pode ser utilizado pelas células tumorais, que podem expressar a proteína PD-L1 em suas superfícies e utilizá-la como mecanismo de evasão da resposta imune. A expressão de PD-L1 em medicina veterinária já foi analisada em várias espécies animais, porém, são escassas as informações acerca do seu valor prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a expressão do PD-L1 e do infiltrado de células T citotóxicas e regulatórias em tumores mamários de cadelas e verificar seus valores prognósticos quando comparados à sobrevida pós-cirúrgica. Oitenta e sete amostras foram analisadas histologicamente e por imuno-histoquímica. A maioria dos tumores foi positiva para PD-L1 e os animais com tumores negativos para esta proteína apresentaram menor sobrevida pós-cirúrgica. A avaliação dos infiltrados de células T citotóxicas e regulatórias nos tumores mamários, realizada em número reduzido de amostras, não apresentou valor prognóstico. Nossos resultados sugerem que a menor expressão de PD-L1 é um indicador de menor sobrevida pós-cirúrgica em cadelas com carcinomas mamários e que a positividade para essa ligante pode ser um indicador de melhor prognóstico.

Palavras-chave: Câncer. CD8. FOXP3. Imuno-histoquímica. PD-L1. Prognóstico. Tumor de mama em cadelas.



## ABSTRACT

SILVA, I. K. L. **Evaluation of expression of death programmed cell ligand (PD-L1) and cytotoxic and regulatory t-cell infiltrate as prognostic factors in mammary tumor of canine female.** 2023. 77 f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

Cancer has been reported as the main cause of death in dogs and, in bitches, mammary tumours are the most common. Therefore, studies to elucidate tumour pathogenesis and aiming to improve the treatment and prevention of cancer are needed. Programmed cell death protein 1 (PD-1) is an immune checkpoint molecule expressed on the surface of T cell membrane. When it binds to programmed cell death ligand 1 (PD-L1), negative signals are propagated to T cells, initiating a suppressive mechanism of utmost importance for controlling the immune response. This mechanism can also be used by tumour cells, which can express the PD-L1 protein on their surfaces and use it as a mechanism to evade the immune response. The expression of PD-L1 in veterinary medicine has already been analysed in several animal species, however, there is little information about its prognostic value in dogs with mammary neoplasms. The objective of the present study was to characterize the expression of PD-L1 and the cytotoxic and regulatory T cell infiltrates in canine mammary tumours and to verify their prognostic values when compared to post-surgical survival. Eighty-seven samples were analysed histologically and by immunohistochemistry. The majority of the tumours were positive for PD-L1 and dogs with negative tumours for this protein had shorter post-surgical survival. The evaluation of cytotoxic and regulatory T cell infiltrates in mammary tumours, carried out on a small number of samples, did not show prognostic value. Our results suggest that lower PD-L1 expression is an indicator of shorter post-surgical survival in dogs with mammary carcinomas and the positivity for this ligand may be an indicator of a better prognosis.

Keywords: Cancer. CD8. FOXP3. Immunohistochemistry. PD-L1. Prognosis. Mammary tumor of canine female.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Relação entre LTC CD8+ e outras células no microambiente tumoral .....	28
<b>Figura 2</b> - Regulação positiva de PD-L1: resistência imune inata e adaptativa.....	31
<b>Figura 3</b> - Eixo PD-1/PD-L1.....	32
<b>Figura 4</b> - Estratificação do microambiente tumoral com base na expressão de PD-L1 e ausência ou presença de TILs .....	35
<b>Figura 5</b> - Curvas de sobrevida pós-cirúrgica em função dos grupos histológicos de baixa e alta agressividade, comparados aos tumores benignos .....	45
<b>Figura 6</b> - Curvas de sobrevida em função dos grupos histológicos de baixa, intermediária e alta malignidade comparados aos tumores benignos .....	46
<b>Figura 7</b> - Padrões de imunomarcção para PD-L .....	47
<b>Figura 8</b> - Padrões de imunomarcção para PD-L1 em tumores mamários caninos.....	48
<b>Figura 9</b> - Curvas de sobrevida em função da expressão de PD-L1.....	49
<b>Figura 10</b> - Imunomarcção de LTR FOXP3+ .....	50
<b>Figura 11</b> - Padrões de imunomarcção de LTR FOXP3+ .....	51
<b>Figura 12</b> - Padrões de imunomarcção de LTC CD8+ .....	52
<b>Figura 13</b> - Padrões de imunomarcção para RE e RP .....	53
<b>Figura 14</b> - Padrões de imunomarcção para Ki67 e Calponina .....	54
<b>Figura 15</b> - Imunomarcção para HER2 e Calponina em tecido controle e carcinoma mamário canino .....	55
<b>Figura 16</b> - Curvas de sobrevida em função da expressão de HER2 .....	57

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Classificação histológica de tumores mamários caninos proposta por Goldschmidt et al. (2011).....	18
<b>Quadro 2</b> - Critérios para grau histológico maligno.....	20
<b>Quadro 3</b> - Grau de malignidade histológica das neoplasias mamárias.....	20
<b>Quadro 4</b> - Estadiamento clínico adaptado de Owen (1980).....	21
<b>Quadro 5</b> - Classificação molecular dos carcinomas mamários caninos .....	24
<b>Quadro 6</b> - Diretrizes para determinar a técnica cirúrgica e extensão para tumores mamários únicos.....	25
<b>Quadro 7</b> - Protocolos de IHQ utilizados.....	39
<b>Quadro 8</b> - Método de análise dos dados de IHQ para RE e RP.....	41
<b>Quadro 9</b> - Critérios para análise da expressão de HER2.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Taxas de expressão de PD-L1 em tumores caninos .....	32
<b>Tabela 2</b> - Raças representadas no estudo .....	43
<b>Tabela 3</b> - Subtipos tumorais representados no estudo conforme Rasotto et al. (2017) .....	44
<b>Tabela 4</b> - Subtipos tumorais representados no estudo conforme Brunetti et al. (2021a).....	45
<b>Tabela 5</b> - Expressão imuno-histoquímica de cada marcador estudado .....	56

## LISTA DE SIGLAS

CAFs	Fibroblastos Associados ao Câncer
CK5	Citoqueratina 5
FOXP3	Forkhead box P3
HER2	Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HPF	Campos de alta marcação
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IHQ	Imuno-histoquímica
Ki67	Índice de proliferação celular
LTC	Linfócitos T citotóxicos CD8+
LTR	Linfócitos T regulatórios FOXP3+
mAbs	Anticorpos monoclonais recombinantes
MDSC	Células supressoras de origem mieloide
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
PBS	Solução Salina Tamponada
PD-1	Proteína Celular de Morte Programada 1
PD-L1	Ligante Celular de Morte Programada 1
PD-L2	Ligante Celular de Morte Programada 2
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
TBS	Solução Tris Salina Tamponada
TCR	Receptor de células T
TILs	Linfócitos infiltrantes de tumor

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 Tumores mamários em cadelas .....	17
2.1.1 Diagnóstico e Prognóstico.....	17
2.1.2 Marcadores prognósticos imuno-histoquímicos .....	22
2.1.3 Classificação molecular dos carcinomas mamários caninos.....	23
2.1.4 Tratamento.....	24
2.2 Microambiente tumoral e o sistema imune .....	26
2.2.1 Linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) .....	27
2.3 <i>Checkpoints</i> Imunológicos e o Câncer .....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Amostras do estudo .....	37
4.2 Processamento histopatológico .....	38
4.3 Processamento imuno-histoquímico .....	38
4.4 Análise das imunomarcações .....	40
4.5 Análise estatística .....	42
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga cerca de 52,2 milhões de cães, sendo o segundo país com a maior população de caninos no mundo. O câncer tem sido relatado como a principal causa de morte em cães, ultrapassando a senilidade e as doenças cardíacas (ADAMS et al., 2010; CASSALI, 2017).

Os tumores de mama são os que mais acometem as fêmeas caninas não castradas, sendo que aproximadamente 50% são de origem maligna. Os tumores de origem epitelial são os que ocorrem com maior frequência, seguido pelos tumores mistos. Atualmente, são utilizadas duas propostas de classificação histológica (GOLDSCHMIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2013), sendo que a proposta baseada na classificação da Organização Mundial de Saúde (GOLDSCHMIDT et al., 2011) é a mais difundida internacionalmente. Utilizando esta proposta, os diagnósticos mais frequentes são: adenoma complexo, tumor misto benigno, carcinoma complexo, carcinoma sólido e carcinossarcoma (ALONSO-DIEZ et al., 2019; SALAS et al., 2015; SORENMO, 2003).

Os tumores de mama em cadelas podem servir como um modelo relevante para o estudo do câncer de mama em humanos, uma vez que, compartilham várias características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas. A glândula mamária canina é homóloga à glândula mamária humana, com características de desenvolvimento similares e, além disso, o câncer de mama é o principal responsável causador de óbitos em mulheres, o que reforça a importância de estudar e compreender melhor os mecanismos da doença (STOVRING et al., 1997; KLOPFLEISCH et al., 2011; PEÑA et al., 2014; SCHICK, et al., 2021).

Devido aos avanços em oncologia veterinária, novos marcadores prognósticos e preditivos têm sido estudados com o objetivo de prever o desfecho clínico e eleger pacientes para terapias específicas e individuais. A proteína de morte celular programada (PD-1) é uma molécula de checkpoint imunológico presente em células T e seu ligante, PD-L1, pode ser expresso por células tumorais. A interação ligante-receptor permite que as células tumorais impeçam as respostas antitumorais das células T e escapem da destruição pelo sistema imune (LUDIN e ZON, 2017). A interação entre PD-1 e PD-L1 é de suma importância para proteger o organismo de doenças autoimunes, atuando também na promoção da

autotolerância imunológica, ambas têm importante função na atenuação de respostas efetoras das células T (AMBROSIUS et al., 2017).

As células inflamatórias presentes no microambiente tumoral podem desempenhar um papel significativo na progressão do tumor. E os linfócitos são o subtipo celular predominante no infiltrado inflamatório em neoplasias mamárias caninas (SOUZA et al., 2018). Os linfócitos T citotóxicos (LTC) CD8+ identificam e eliminam as células tumorais, eles são considerados marcadores prognósticos úteis no câncer. Tumores com alta densidade de LTC CD8+ tendem a responder de forma mais eficiente frente à imunoterapia, do que tumores com baixa densidade (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEE, 2018; XIE; DING; CHEN, 2021). A presença de LTC CD8+ em carcinomas mamários caninos está relacionada a melhores taxas de sobrevida (ESTRELA-LIMA et al., 2010). Já os linfócitos T regulatórios (LTR) FOXP3+, controlam negativamente os LTC CD8+, uma vez que, atuam no controle da homeostase e autotolerância imunológica, suprimindo a atividade de células imunes. Por isso, acredita-se que estão envolvidos na progressão tumoral, devido ao seu papel imunossupressor. Em cadelas com carcinoma mamário a alta infiltração de LTR FOXP3+ está associada a um prognóstico ruim (KIM et al., 2012; SAKAI et al., 2017).

Junto à crescente disponibilidade no número de tratamentos para pacientes oncológicos, e devido ao estresse e potenciais efeitos colaterais aos quais os animais são submetidos com as terapias tradicionais, aos custos financeiros, ou em alguns casos a ineficácias do tratamento, torna-se necessária a identificação e caracterização de novos marcadores prognósticos que forneçam informações precisas acerca de recorrências, metástases, sobrevida global e intervalos livres de doença (WEBSTER et al., 2011), bem como possam ser utilizados como marcadores preditivos no futuro próximo.

Os objetivos do presente estudo foram caracterizar a expressão do PD-L1 e do infiltrado de LTCs e LTRs pela técnica de imuno-histoquímica e verificar seus valores como fatores prognósticos em tumores de mama em cadelas. A expressão de PD-L1 e o infiltrado de células T foram analisados em amostras de carcinomas mamários de diferentes subtipos histopatológicos. Os resultados obtidos foram também comparados com a expressão de receptores hormonais (RE e RP), HER2, Calponina e índice de Ki67 entre os tipos e graus histológicos e com a sobrevida pós-cirúrgica.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tumores mamários em cadelas

Sabe-se que a etiologia do câncer de mama em cadelas está relacionada a fatores hormonais, nutricionais e genéticos. A idade é um fator de risco importante, com maior incidência em cadelas idosas, entre 9 e 12 anos. Cães mais jovens apresentam maiores chances de desenvolver tumores benignos do que cães mais velhos. Cadelas de qualquer raça podem ser acometidas, mas raças pequenas, seguidas pelas de médio e grande porte respectivamente, são as que ocorrem com maior frequência. Poodle miniatura, Maltês, Yorkshire Terrier, Cocker Spaniel, Dachshund e Pastor Alemão são relatadas como raças predispostas a neoplasias mamárias, comprovando um componente fatorial genético (SALAS et al., 2015; SORENMO, 2003).

A exposição no início da vida a hormônios ovarianos endógenos contribui significativamente com o risco do desenvolvimento de tumores mamários, que aumenta conforme o tempo de castração do animal: se a cadela for castrada antes do primeiro cio, o risco de desenvolvimento de tumores mamários gira em torno de 0,5%, aumentando para 8% quando é castrada após o primeiro cio, e chegando a atingir 26% quando a castração é mais tardia (SCHNEIDER et al., 1969). Também, a utilização de hormônios exógenos como contraceptivos à base de progestina para evitar a ocorrência de estros são considerados importantes fatores (STOVRING et al., 1997). Dieta rica em carne vermelha, e obesidade com ao menos um ano de idade também foram associadas ao envolvimento de neoplasias mamárias (ALENZA et al., 1998; SORENMO et al., 2011).

#### 2.1.1 Diagnóstico e Prognóstico

O diagnóstico é feito a partir de uma anamnese completa, exame físico geral e específico, incluindo uma palpação minuciosa das mamas, e, também, de exames complementares (SORENMO et al., 2011). A citologia é indicada como um exame de triagem, uma vez que, é possível diferenciar e identificar processos reativos ou inflamatórios dos processos neoplásicos e excluir diagnósticos diferenciais tal como: mastocitomas, lipomas,

mastite, entre outros (CASSALI et al., 2011; CASSALI, 2017). Os linfonodos regionais também precisam ser examinados e, havendo linfadenomegalia, é recomendada a realização de aspirados por agulha fina para a avaliação citológica, com o intuito de analisar a presença ou não de metástases, pois estas podem interferir no estadiamento clínico do tumor e, conseqüentemente, na abordagem de sobrevivência do animal e no tratamento (CASSALI et al., 2011; SORENMO et al., 2011). Invasão linfática e/ou vascular e metástases em linfonodos estão relacionadas a um mau prognóstico (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Complementarmente, também devem ser realizadas ao menos três projeções de radiografias torácicas e abdominais em cães com tumores mamários malignos, uma vez que, o pulmão é o órgão mais acometido por metástases (SORENMO et al., 2011).

A histopatologia representa o método padrão-ouro para o diagnóstico, a qual classifica e fornece informações prognósticas sobre cães com tumores de mama (RASOTTO et al., 2017). Também, o exame histopatológico pode fornecer informações histomorfológicas do tumor, tais como o índice mitótico, presença de necrose, grau de diferenciação e pleomorfismo (CASSALI et al., 2011).

Goldschmidt et al. (2011) propuseram uma classificação e graduação de tumores de mama caninos feita com base no tecido de origem: tecido epitelial, mesenquimal e mioepitelial, dividindo-se em: neoplasias epiteliais malignas (carcinomas), neoplasias mesenquimais malignas (sarcomas), tumor misto maligno (carcinossarcoma), neoplasias benignas e hiperplasia/displasia como mostra o Quadro 1.

**Quadro 1** - Classificação histológica de tumores mamários caninos proposta por Goldschmidt et al. (2011)

1. Neoplasias epiteliais malignas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Carcinoma <i>in situ</i></li> <li>▪ Carcinoma simples               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Tubular</li> <li>b. Tubulopapilar</li> <li>c. Cístico-papilar</li> <li>d. Cribriforme</li> </ul> </li> <li>▪ Carcinoma micropapilar invasivo</li> <li>▪ Carcinoma sólido</li> <li>▪ Comedocarcinoma</li> <li>▪ Carcinoma anaplásico</li> <li>▪ Carcinoma surgindo em adenoma complexo/Tumor misto</li> <li>▪ Carcinoma complexo</li> </ul>
-----------------------------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Carcinoma e mioepitelioma maligno</li> <li>▪ Carcinoma misto</li> <li>▪ Carcinoma ductal</li> <li>▪ Carcinoma papilar intraductal</li> </ul>
2. Neoplasias epiteliais malignas – tipos especiais	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Carcinoma de células escamosas</li> <li>▪ Carcinoma adenoescamoso</li> <li>▪ Carcinoma mucinoso</li> <li>▪ Carcinoma rico em lipídios</li> <li>▪ Carcinoma de células fusiformes               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Mioepitelioma maligno</li> <li>b. Carcinoma de células escamosas - variante fusiforme</li> <li>c. Carcinoma - variante fusiforme</li> </ul> </li> <li>▪ Carcinoma inflamatório</li> </ul>
3. Neoplasias mesenquimais malignas – Sarcomas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Osteossarcoma</li> <li>▪ Condrossarcoma</li> <li>▪ Fibrossarcoma</li> <li>▪ Hemangiossarcoma</li> <li>▪ Outros sarcomas</li> </ul>
4. Carcinossarcoma - Tumor mamário misto maligno	
5. Neoplasias benignas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adenoma simples</li> <li>▪ Adenoma papilar intraductal</li> <li>▪ Adenoma ductal</li> <li>▪ Fibroadenoma</li> <li>▪ Mioepitelioma</li> <li>▪ Adenoma complexo</li> <li>▪ Tumor misto benigno</li> </ul>
6. Hiperplasia/Displasia	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ectasia ductal</li> <li>▪ Hiperplasia lobular (adenose)               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Regular</li> <li>b. Com atividade secretora</li> <li>c. Com fibrose interlobular</li> <li>d. Com atipia</li> </ul> </li> <li>▪ Epiteliose</li> <li>▪ Papilomatose</li> <li>▪ Alteração fibroadenomatosa</li> <li>▪ Ginecomastia</li> </ul>
7. Neoplasias do mamilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adenoma</li> <li>▪ Carcinoma</li> <li>▪ Carcinoma com infiltração epidermal</li> </ul>
8. Hiperplasia/displasia do mamilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Melanose da pele do mamilo</li> </ul>

Fonte: (GOLDSCHMIDT et al., 2011, p. 119).

Também, são analisadas três principais características morfológicas como critérios de malignidade para posterior graduação. Peña et al. (2012) propuseram um sistema de graduação histológica em cães baseado na graduação proposta por Elston e Ellis (1991) utilizada em humanos, como mostra o Quadro 2.

**Quadro 2 - Critérios para grau histológico maligno**

Pontuação	Formação de túbulos	Pleomorfismo nuclear	Mitoses por 10 HPF
1 ponto	> 75% de formação tubular	Núcleo pequeno uniforme ou regular e nucléolos ocasionais	0–9 mitoses/10 HPF
2 pontos	Formação moderada de arranjos tubulares (10-75% das amostras) misturados com áreas de crescimento tumoral	Grau moderado de variação no tamanho e forma do nuclear, núcleo hiper cromático e presença de nucléolos (alguns proeminentes)	10–19 mitoses/10 HPF
3 pontos	Mínima ou nenhuma formação de túbulos (< 10%)	Variação acentuada no tamanho nuclear e núcleo hiper cromático, com um ou mais nucléolos proeminentes	> 20 mitoses/10 HPF

Fonte: (PEÑA et al., 2012, p. 3).

Legenda: HPF: Campos de alta marcação.

O grau de malignidade do tumor é obtido através da soma dos escores pontuados a partir dos critérios de malignidade, que variam de 3 a 9, de acordo com o Quadro 3.

**Quadro 3 - Grau de malignidade histológica das neoplasias mamárias**

Pontuação total	Grau de malignidade
3 a 5	I (Baixo)
6 a 7	II (Intermediário)
8 a 9	III (Alto)

Fonte: (PEÑA et al., 2012, p. 3).

Um estudo prospectivo realizado por Peña et al. (2012), reproduziu a classificação histológica proposta por Goldschmidt et al. (2011) e demonstrou que a mesma apresenta valor prognóstico em análises univariadas. Portanto, concluíram que essa metodologia é útil para prever o prognóstico, como também para simplificar a interpretação clínica de diagnósticos histológicos difíceis em cães. Canadas et al. (2019) observaram que cadelas com tumores de grau I apresentaram uma sobrevida global significativamente mais longa do que as com tumores graus II ou III. Im et al. (2014) analisaram amostras tumorais de 2.072

animais e relataram associação significativa tanto com o grau quanto com a presença de invasão linfática.

O estadiamento clínico do tumor tem como objetivo acompanhar a evolução clínica do paciente com o intuito de obter um significado prognóstico. O sistema de estadiamento TNM proposto por Lana, Rutteman e Withrow (2007) é uma modificação do sistema proposto por Owen (1980) e pela Organização Mundial da Saúde, no qual se avalia o tamanho tumoral, status do linfonodo regional e a presença/ausência de metástase à distância, descrita conforme o Quadro 4 (SORENMO et al., 2011). O diâmetro tumoral é um fator prognóstico independente em cães com neoplasias mamárias (RASOTTO et al., 2017).

**Quadro 4** - Estadiamento clínico adaptado de Owen (1980)

<b>T = Tamanho do tumor</b>	<b>T1</b> = <3 cm		
	<b>T2</b> = 3-5 cm		
	<b>T3</b> = >5 cm		
<b>N = Status dos Linfonodos regionais</b>	<b>N0</b> = Sem metástase		
	<b>N1</b> = Metástase		
<b>M = Metástase à distância</b>	<b>M0</b> = Sem metástase à distância		
	<b>M1</b> = Metástase à distância detectada		
<b>Estadiamento</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T3	N0	M0
Estágio IV	Qualquer T	N1	M0
Estágio V	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007, p.623).

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma excelente ferramenta auxiliar na determinação do diagnóstico, prognóstico e do tratamento dos tumores mamários em cadelas. Sabe-se que, em uma única glândula mamária, podem ser encontrados múltiplos tumores, assim como pode ocorrer o envolvimento de glândulas mamárias múltiplas, inclusive com tipos histológicos diferentes (CASSALI et al., 2013; PEÑA et al., 2014). Os tumores de mama compostos por células fusiformes são um grande desafio na rotina diagnóstica de patologistas veterinários. Poucos estudos fornecem informações objetivas sobre o comportamento e sobre como diferenciar as células entre alguns tipos histológicos: mioepiteliomas benigno e maligno, carcinoma e mioepitelioma maligno, carcinoma de células escamosas (variante fusiforme), fibrossarcoma, hemangiossarcoma e

carcinoma de células fusiformes. Marcadores para células mioepiteliais em cães foram descritos, tais como p63, actina de músculo liso (SMA), calponina, entre outros (ALONSO-DIEZ et al., 2019). Alonso-Diez et al. (2019) realizaram um estudo retrospectivo em cadelas com tumores mamários de células fusiformes e notaram que o diagnóstico inicial realizado em lâminas coradas por H&E diferiu do diagnóstico feito por IHQ em 75% dos casos de neoplasmas malignos, confirmando que a IHQ é muito importante para o diagnóstico final.

### **2.1.2 Marcadores prognósticos imuno-histoquímicos**

Dentre os principais marcadores prognósticos imuno-histoquímicos avaliados em tumores mamários caninos destacam-se os receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), o índice de proliferação celular, a enzima COX-2 e o receptor tipo 2 do Fator de crescimento Epidérmico Humano (HER2) (CASSALI et al., 2011).

Os receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP) participam do crescimento e desenvolvimento do tecido mamário normal. Entretanto, podem também contribuir com a evolução tumoral quando ligados às células-alvo (JIN et al., 2018). Desta forma, a avaliação da expressão desses receptores pode fornecer informações importantes referentes ao comportamento tumoral. Rotineiramente, as expressões de RE e RP são analisadas para avaliar respostas à terapia endócrina em mulheres com câncer de mama. Já em cães, esse método não é muito aplicado, pois são poucos os estudos acerca da utilização de RE e RP como fatores prognósticos em tumores de mama, uma vez que seu valor prognóstico é causa de debate entre patologistas veterinários e os resultados dos estudos sobre este assunto ainda são contraditórios e de difícil comparação (GAMA et al., 2008; PEÑA et al., 2014; BRUNETTI et al., 2021a).

O oncogene *erbB2*, também conhecido como HER2, é fisiologicamente expresso em pequenas proporções em células mesenquimais e epiteliais, e atua na proliferação e diferenciação celulares. Porém, quando amplificado, pode atuar na progressão tumoral, devido a mutações ou alterações que afetam a atividade tirosina quinase, causando a desregulação de sua atividade e conseqüentemente tornando-se maligna (BERTAGNOLLI et al., 2011; BRUNETTI et al., 2021b). Diferentemente de humanos, em que a expressão de HER2 é considerada um fator prognóstico e preditivo para câncer de mama, o valor da

expressão deste marcador não está totalmente elucidado nos cães, principalmente devido à variedade de resultados encontrados na literatura. As taxas de superexpressão de HER2 variam de 17,6% a 48% em tumores mamários malignos caninos (PEÑA et al., 2014). Entretanto, com o intuito de padronizar a técnica e a forma de analisar os resultados, Peña e colaboradores (2014) realizaram um estudo de revisão e propuseram um consenso com diretrizes sobre marcadores de fenótipo epitelial e mioepitelial, avaliação de receptores hormonais e HER2.

Ki67 é a proteína mais frequentemente utilizada para avaliar a proliferação celular. O alto índice de Ki67 está relacionado à menor sobrevida e recidiva. Nos cães e nos humanos, o Ki67 é um marcador prognóstico muito bem definido e utilizado, sendo associado a um pior prognóstico e progressão da doença em carcinomas mamários (BRUNETTI et al., 2021; HASHMI et al., 2019; SILVA et al., 2019)

### **2.1.3 Classificação molecular dos carcinomas mamários caninos**

Em virtude da heterogeneidade do câncer de mama, a classificação molecular dos subtipos histológicos é utilizada em humanos com o objetivo de encontrar alvos terapêuticos para os tumores, por meio de um painel de marcadores imuno-histoquímicos, definidos em quatro subtipos: Luminal A (RE e RP+, HER2- e Ki67 baixo), Luminal B (RE+, PR- ou baixo, HER2- ou + e Ki67 alto), Superexpressão de HER2 (HER2 superexpresso ou amplificado, RE e RP-) e o subtipo Basal ou Triplo Negativo (Negativo para RE, RP e HER2) (GOLDHIRSCH, et al., 2013).

Zappulli et al. (2019) propuseram uma classificação molecular de tumores mamários caninos e felinos, descrita no Quadro 5. Em cadelas, o subtipo luminal é o mais frequente, enquanto que o subtipo basal é comumente associado a uma sobrevida global mais curta, comumente associado a carcinomas grau III e carcinomas sólidos. A classificação humana foi aplicada em cães por Gama et al. (2008), que estudaram um painel imuno-histoquímico baseado em cinco marcadores moleculares: HER2, RE, citoqueratina 5 (CK5), P-caderina e p63, e classificaram carcinomas mamários caninos em quatro fenótipos moleculares: Luminal A, Luminal B, Basal e Superexpressão de HER2. Neste estudo, cerca de 30% dos casos corresponderam ao subtipo Basal, ou seja, negativo para RE e HER2 e positivo para um

marcador basal (CK5 e/ou P-caderina e/ou p63), os quais apresentaram um comportamento clínico mais agressivo. Os demais subtipos, Luminal A (44,8%), Luminal B (13,5%) e com superexpressão de HER2 (8,3%), apresentaram maiores taxas de sobrevida. Porém, Sassi et al. (2010) não encontraram nenhuma associação entre a classificação molecular e a sobrevida pós-cirúrgica em cadelas com carcinomas mamários. O valor prognóstico da classificação molecular ainda merece investigação mais detalhada em cães, uma vez que os resultados são contraditórios entre diferentes estudos (ZAPPULLI et al,2019).

**Quadro 5** - Classificação molecular dos carcinomas mamários caninos

Subtipo molecular	Marcador de células luminais	RE+ e/ou RP+	HER2+	Marcador de células basais	Ki67	Marcadores de tecido adiposo/estromal
<b>Luminal A</b>	Sim	Sim (Alto)	Não	Sim/Não	Baixo	Não
<b>Luminal B</b>	Sim	Sim (Baixo)	Sim/Não	Sim/Não	Algun (HER2+) Alto HER2-	Não
<b>Superexpressão de HER2</b>	Sim/Não	Não	Sim	Sim/Não	Algun	Não
<b>Basal (Triplo-negativo)</b>	Não	Não	Não	Sim	Algun	Não
<b>Normal</b>	Sim/Não	Sim/Não	Não	Não	Algun	Sim

Fonte: (ZAPPULLI et al., 2019, p.59).

Legenda RE: Receptor de estrógeno, RP: Receptor de progesterona. HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. Marcadores de células luminais: Citoqueratinas CK7, CK8, CK18, CK19. Marcadores de células basais: CK5, CK6, CK14, p63, P-caderina.

#### 2.1.4 Tratamento

O tratamento cirúrgico é o procedimento de eleição para tumores mamários caninos, o qual consiste na remoção das glândulas alteradas e tem como principal objetivo proporcionar o controle locorregional da doença, bem como promover a melhora da qualidade de vida do paciente (LAVALLE et al., 2017). As técnicas cirúrgicas mais utilizadas são: nodulectomia, mamectomia (mastectomia simples), mastectomia regional, unilateral e bilateral. Estas podem ser ou não realizadas em conjunto com a ovariossalpingo-



histerectomia. A excisão dos linfonodos que drenam o parênquima mamário é recomendada, uma vez que eles podem ser acometidos por metástases. Em cadelas com carcinoma inflamatório a excisão cirúrgica não é recomendada (CASSALI et al., 2020). Durante o consenso sobre o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários caninos e felinos, que ocorreu em 2019, Cassali e colaboradores (2020) definiram diretrizes para determinar a técnica cirúrgica e extensão para tumores mamários caninos únicos, a depender da localização do tumor, conforme o Quadro 6.

**Quadro 6** - Diretrizes para determinar a técnica cirúrgica e extensão para tumores mamários únicos

Localização do tumor	Tamanho do tumor	Tipo de cirurgia
<b>M1</b>	<3 cm	Mastectomia regional (M1-M2 + linfonodo axilar)
	>3 cm	Mastectomia unilateral
<b>M2</b>	<3 cm	Mastectomia regional (M1, M2, M3 + linfonodo axilar)
	>3 cm	Mastectomia unilateral
<b>M3</b>	Qualquer tamanho	Mastectomia unilateral
<b>M4</b>	<3 cm	Mastectomia regional (M3, M4, M5 + linfonodo inguinal)
	>3 cm	Mastectomia unilateral
<b>M5</b>	<3 cm	Mastectomia regional (M4-M5 + linfonodo inguinal)
	>3 cm	Mastectomia unilateral

Fonte: (CASSALI et al., 2020, p.156).

As terapias complementares mais utilizadas são a radio e a quimioterapia. No entanto, torna-se dificultoso o emprego destes métodos em consequência do estresse ou dos efeitos adversos causados (MAEKAWA et al., 2014). A quimioterapia sistêmica é utilizada em casos onde há maior risco ou confirmação de metástase à distância, para cães com estágio clínico IV e V com metástase e para qualquer carcinoma grau III. Fatores levados em consideração para selecionar pacientes que poderão se beneficiar desse tratamento incluem: tipo e grau histológico, estadiamento clínico e marcadores prognósticos avaliados por IHQ (CASSALI et al., 2020).

A imunoterapia utiliza a resposta imune inata e adaptativa, com o intuito de destruir as células tumorais. Quando comparada às terapias tradicionais, apresenta efeito positivo na sobrevivência do paciente, com menor ocorrência de efeitos colaterais. Nesta, modula-se a ação

do sistema imunológico do indivíduo, por meio da utilização de anticorpos monoclonais recombinantes, os mais utilizados neste tratamento (CHOI et al., 2020; KOCIKOWSKI et al., 2020).

## 2.2 Microambiente tumoral e o sistema imune

O equilíbrio no microambiente tecidual é fundamental para a maturação, diferenciação e proliferação das células normais e, também, para as neoplásicas. Sabe-se que a mutação gênica não é a única responsável por favorecer o desenvolvimento de tumores, células não-tumorais presentes no microambiente também participam da progressão. O microambiente tumoral é modulado pelas células neoplásicas durante a tumorigênese, com a participação de vários tipos celulares, o que o torna bastante heterogêneo. As células do sistema imune são encontradas em grande parte das lesões tumorais e incluem macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células Natural Killer (NK) e linfócitos B e T. Podem promover o desenvolvimento do tumor a partir da liberação de moléculas de sinalização como, por exemplo: Fator de crescimento Endotelial Vascular (VEGF), o qual auxilia na promoção da angiogênese tumoral; Fator de crescimento Epidérmico (EGF); Quimiocinas e Citocinas que amplificam a inflamação, entre outros fatores. As células imunes infiltrantes podem estar presentes no centro do tumor, na margem invasiva ou nas estruturas linfoides adjacentes. Por isso, podem contribuir para a disseminação e formação de metástases, e possibilitar a invasão tecidual (HANAHAN e WEINBERG, 2011; TENG et al., 2015).

As células tumorais têm a capacidade de reprogramar características importantes do sistema imune para evitar a imunovigilância. Um importante mecanismo utilizado consiste na ativação de vias inibitórias de *checkpoints* imunológicos, tal como o PD-1, sendo atraído pelo seu ligante PD-L1, os quais juntos regulam negativamente a atividade de linfócitos T (VIEIRA; CERQUEIRA; MACHADO, 2022; XIE; DING; CHEN, 2021). Outro mecanismo é a imunoedição. A imunoedição sustenta a teoria dos três “Es”: eliminação, equilíbrio e evasão. As células tumorais que não forem eliminadas poderão gerar mutações, tornando-se resistentes. Desse modo, a evasão do sistema imunológico é fundamental para a progressão,

desenvolvimento e resistência tumoral (DOMINGUES; BHATT; LEPIQUE, 2022; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

### 2.2.1 Linfócitos infiltrantes de tumor (TILs)

Quando os leucócitos deixam o sangue e se infiltram em tumores primários e metástases, passam a ser chamados de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e incluem: células T regulatórias, células T efectoras, células dendríticas (DC), células NK, células supressoras de origem mieloide (MDSCs) e macrófagos (VIEIRA; CERQUEIRA; MACHADO, 2022).

Os LTC CD8+ são um subtipo de linfócitos T que expressam a glicoproteína de membrana CD8. Desenvolvem-se no timo, e podem ser encontrados residentes em linfonodos ou circulantes. Essas células são classificadas conforme seu estado de diferenciação em: células T naïve, células T efectoras e subconjuntos de células T de memória (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEI, 2018).

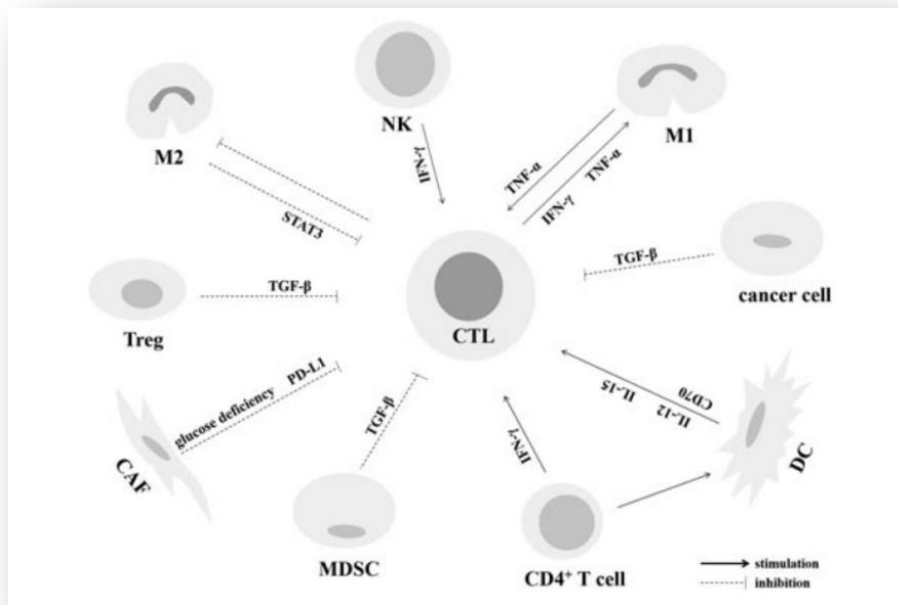
São responsáveis por reconhecer e destruir as células infectadas por patógenos intracelulares. Além disso, reconhecem antígenos tumorais apresentados pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I presente nas células tumorais. A ativação das LTCs CD8+ ocorre quando os receptores de células T (TCRs) reconhecem o antígeno peptídico ligado ao MHC-I, o qual é exibido pelas células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e DCs. Logo após o reconhecimento do antígeno, os LTCs CD8+ ativos geram mediadores citolíticos, como perforinas e granzimas. As perforinas causam poros na membrana celular das células-alvo levando a um desequilíbrio osmótico que pode causar a morte celular. Já as granzimas, adentram nas células-alvo através de poros causados pelas perforinas e induzem a apoptose por meio da ativação de vias das caspases (STRIOGA et al., 2011; XIE; DING; CHEN, 2021; YASUMARU et al., 2021). As principais citocinas produzidas pelos LTC CD8+ são: interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), o qual estimula macrófagos M1 a realizar uma atividade intratumoral, e o fator de necrose tumoral (TNF) (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEI, 2018; XIE; DING; CHEN, 2021).

Além disso, as células T efectoras interagem com outros tipos celulares dentro do microambiente tumoral, fazendo *cross-talking* positivo com células NK, T CD4+, DCs e

macrófagos tipo 1 (M1). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estimulam a atividade de LTC CD8<sup>+</sup> por meio da secreção de citocinas, que ocorre devido à interação entre o MHC-II e antígenos. As DCs e os macrófagos M1 participam da apresentação de antígenos aos linfócitos T. As células NK auxiliam na ativação de LTC CD8<sup>+</sup> através da liberação de IFN- $\gamma$ , além de participar ativamente na eliminação de células tumorais. Já o *cross-talking* negativo é realizado por LTR, macrófagos M2 e fibroblastos associados ao câncer (CAFs). Os macrófagos M2 suprimem a atividade do sistema imune. Já os CAFs podem causar a redução do número de LTC CD8 devido à deficiência de glicose no microambiente, causada pela indução do aumento da taxa do metabolismo glicolítico, ocasionando uma competitividade entre as células tumorais e células T (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEE, 2018) (Figura 1).

Os LTC CD8<sup>+</sup> também são esgotados/freados pelas vias de *checkpoint* imunológico, as quais podem ser ativadas pelas células tumorais, principal mecanismo utilizado por elas para a o escape imunológico (XIE; DING; CHEN, 2021).

**Figura 1** - Relação entre LTC CD8<sup>+</sup> e outras células no microambiente tumoral



Fonte: (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEE, 2018, p. 4).

Legenda: NK: Células natural killer; M1: Macrófagos tipo 1; DC: Célula dendrítica; MDSC: Células supressoras de origem mieloide; CAFs: Fibroblastos associados ao câncer; Treg: LTR; M2: Macrófago tipo 2; IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$ . As células tumorais podem coordenar as células no microambiente tumoral com o intuito de causar atividades imunossupressoras.

Os LTRs são caracterizados como imunossupressores, pois atuam inibindo respostas do sistema imune inato e adaptativo. São uma subpopulação de células T CD4+ que expressam a proteína Forkhead box P3 (FOXP3), o que os diferencia de outras células T (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEI, 2018; SAKAI et al., 2017; TRIULZI et al., 2012). Além disso, é imprescindível para a função e o desenvolvimento destas células. Pode ser encontrado, também, em células tumorais de múltiplas linhagens e de diferentes origens teciduais, distribuídas ao longo dos tecidos linfoides e não-linfoides, e também em células epiteliais normais e no sangue periférico (TRIULZI et al., 2012).

Os LTR FOXP3+ suprimem a atividade de outras células imunes pela produção de citocinas como as interleucinas 10 (IL-10) e 35 (IL-35) e o Fator de crescimento Transformante beta (TGF- $\beta$ ), que controlam as ações de células T CD8+, CD4+, células NK, e DCs (QIU et al., 2022; SALMI et al., 2021; XIE; DING; CHEN, 2021). Também, por meio de mecanismos de contato celular e humoral, podem controlar as ações de células B e macrófagos (TANAKA; SAKAGUCHI, 2017). Ainda, podem causar a apoptose de células T efetoras através da liberação de granzimas e perforinas (DOMINGUES; BHATT; LEPIQUE, 2022) e são mediadoras da autotolerância imunológica. Portanto, a perda de sua função pode ocasionar a atenuação de vários mecanismos de supressão imunológica e o desencadeamento de doenças autoimunes graves (DONG et al., 2021).

Alguns *checkpoints* imunológicos, ligantes inibitórios e receptores celulares são expressos por LTRs, como PD-1, PD-L1 e CTLA-4. Porém, essa expressão pode ser desregulada devido a modificações epigenéticas criadas pelas células tumorais, podendo atrapalhar a função imunossupressora das LTRs. Uma vez que as células tumorais também podem expressar a PD-L1, sua ligação com a PD-1 pode impedir as ações de LTRs e células T efetoras, ou seja, a inibição epigenética pode atrapalhar a resposta imune antitumoral (QIU et al., 2022).

Quando presentes no microambiente tumoral estas ações podem impedir os processos inflamatórios beneficiando a progressão tumoral e contribuindo com a evasão das células tumorais. Portanto, devido ao seu papel imunossupressor, estudos que elucidem os mecanismos por trás de suas funções são de suma importância, principalmente no desenvolvimento de terapias antitumorais mais eficientes (KOIKE et al., 2020; QIU et al., 2022). A presença de LTR FOXP3+ foi descrita em tumores caninos como melanoma oral

maligno, carcinoma espinocelular oral, adenocarcinoma pulmonar, mastocitoma, osteossarcoma e tumores mamários, e a mesma foi associada a indicadores de mau prognóstico (BILLER et al., 2007; KIM et al., 2012; SAKAI et al., 2017).

### **2.3 Checkpoints Imunológicos e o Câncer**

O sistema imune conta com uma rede de vários sinais que inibem e estimulam suas ações para funcionar corretamente, minimizando a lesão tecidual: a atividade conjunta de proteínas conhecidas como *checkpoints* imunológicos ou moléculas de ponto de verificação imune. A PD-1 é uma molécula de ponto de verificação imune co-inibitória, que regula a duração e intensidade das respostas das células T, mecanismo este responsável por limitar os danos teciduais causados pelas mesmas. Desta forma, torna-se possível a manutenção da autotolerância imunológica, isto é, a prevenção da autoimunidade, e a proteção do indivíduo frente a patógenos e ao câncer (COY et al., 2017; PARDOLL, 2016; TENG et al., 2015).

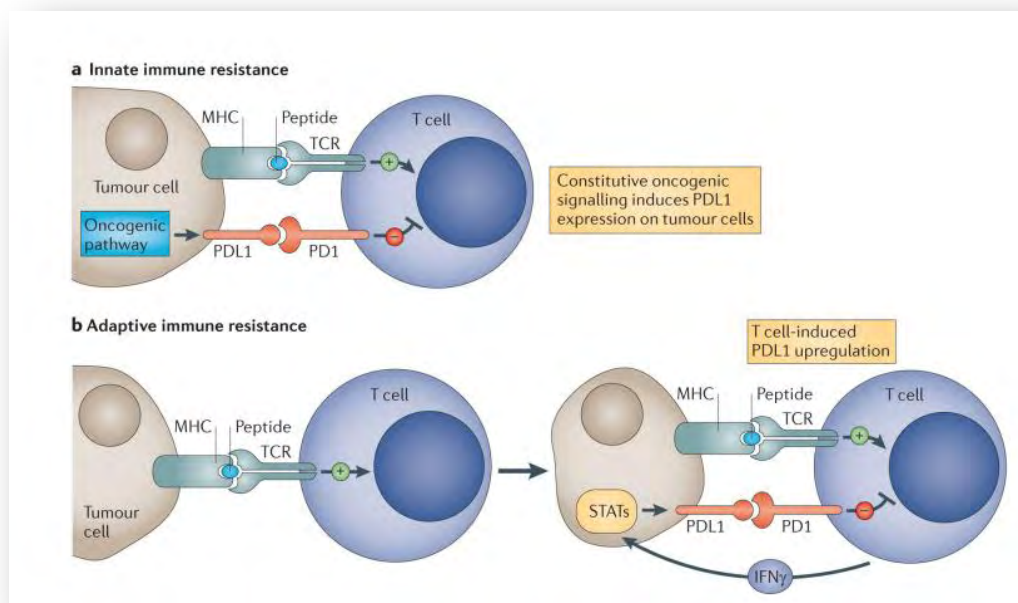
O PD-1 é um receptor da família CD28, que dispõe de dois ligantes celulares: os Ligantes celulares de Morte Programada 1 (PD-L1) e 2 (PD-L2). É expresso na superfície das membranas de células T CD4+, T CD8+, células dendríticas (DCs), células T regulatórias, células B e células natural killer (NK) (MAEKAWA et al., 2016; SHARPE et al., 2017). Níveis mais elevados da expressão de PD-1 foram encontrados em células T CD4+ de cães com câncer em relação a cães saudáveis (COY et al., 2017). As taxas de expressão de PD-1 variam de 80,2% a 96,8% em células T CD4+ e 70,9% a 96,6% em células T CD8 em cães com melanoma oral (MAEKAWA et al., 2016).

O PD-L1 também conhecido como B7-H1 ou CD274, é uma proteína transmembranar que faz parte da família de receptores B7, presente em DCs, células NK, macrófagos, células T e B, células endoteliais, epiteliais, como também na barreira materno-fetal. Sua principal função durante a resposta inflamatória é limitar a ação dos linfócitos T (BLANK e MACKENSEN, 2007; HARTLEY et al., 2016; WU et al., 2019).

Alguns tipos celulares como células B e T, monócitos, DCs, macrófagos e, inclusive, células tumorais, podem regular positivamente a expressão de PD-L1 em resposta a citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-2, IL-12, IL-15, IL-17 e IFN- $\gamma$ . As células tumorais expressam PD-L1 em resposta à liberação de IFN- $\gamma$  pelas células imunes com o intuito de inibir a ação

das células T, caracterizando uma resistência imune adaptativa (MESSEHA et al., 2021; PARDOLL, 2016; TENG et al., 2015). Além disso, alguns genes também foram descritos como reguladores da expressão de PD-L1 como PI3K, JAK2, STAT3, PTEN, TNF- $\gamma$ , HIF-1 entre outros, através da sinalização oncogênica constitutiva, indicando uma resistência imunológica inata (PARDOLL, 2016; WANG et al., 2018 (Figura 2).

**Figura 2-** Regulação positiva de PD-L1: resistência imune inata e adaptativa



Fonte: (PARDOLL, 2016, p. 29).

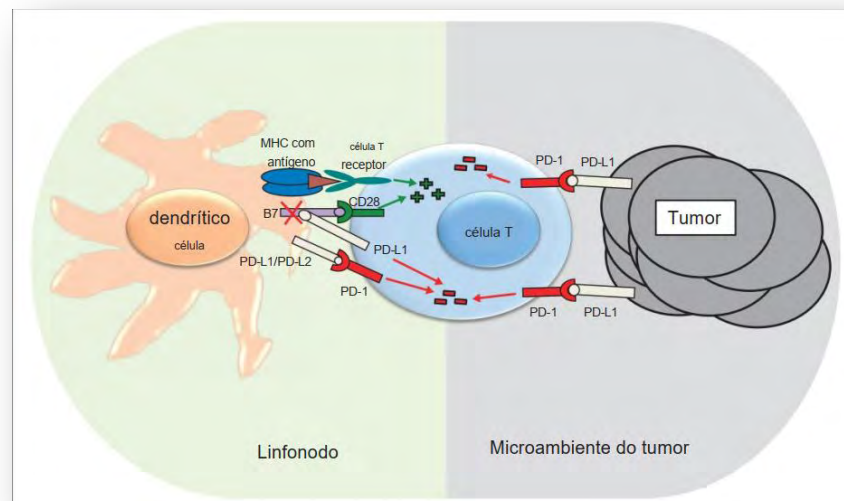
Legenda: As resistências imunes inatas e adaptativas foram descritas para explicar como acontece a regulação de PD-L1 pelas células tumorais. Na resistência imune inata, a expressão de PD-L1 é regulada por vias oncogênicas. Já na resistência imune adaptativa as células tumorais expressam PD-L1 em resposta a citocinas, principalmente a IFN- $\gamma$ .

A PD-1 e o PD-L1 atuam como indicadores de um estímulo imune prejudicado, uma vez que, são expressos em situações de comprometimento das células T (MESSEHA et al., 2021). Shosu et al. (2016) avaliaram a expressão de PD-L1 por IHQ em tecidos caninos normais, e notaram positividade em células da glia, cérebro e cerebelo, células epiteliais no estômago, em linfócitos no duodeno, timo, baço e linfonodo, assim como no epitélio de transição na vesícula urinária.

A via PD-1/PD-L1 é o que mantém o equilíbrio entre tolerância e autoimunidade e o desequilíbrio dessa via está associado a doenças autoimunes (WANG et al., 2018; WU et al.,

2019). Entretanto, as células tumorais podem ativar as vias inibitórias dos *checkpoints* imunológicos com PD-L1 e, com isso, controlar a proporção de linfócitos T em renovação (XIE; DING; CHEN, 2021) (Figura 3). As células tumorais geralmente expressam a proteína PD-L1 em suas superfícies e isso permite que elas impeçam as respostas antitumorais das células T e escapem da destruição pelo sistema imune, tornando-se um recurso subjacente à evasão imunológica do câncer (LUDIN e ZON, 2017). A ligação entre PD-1 e PD-L1 inibe a transdução do sinal dos TCRs, induzindo a exaustão, falta de reação ou a morte de células T efetoras (DOMINGUES; BHATT; LEPIQUE, 2022).

**Figura 3 - Eixo PD-1/PD-L1**



Fonte: (POSTOW et al., 2015, p. 3).

Legenda: PD-1 é expresso nas células T. PD-L1 é expresso em células dendríticas e células tumorais. A interação entre PD-1 e PD-L1 ocasiona a supressão das respostas imune pelas células T.

A expressão de PD-L1 foi descrita em diversos tumores em cães, como demonstra a tabela a seguir (Tabela 1).

**Tabela 1 - Taxas de expressão de PD-L1 em tumores caninos**

Tipo de tumor	Tumores positivos	Anticorpo utilizado	Autores
Adenoma mamário	6/9	Rabbit monoclonal antibody to human PD-L1	Shosu et al., 2016
Adenocarcinoma mamário	4/6	(EPR1161; Abcam, Tokyo, Japan)	



Melanoma oral	36/40 (90%)		
Osteossarcoma	7/10 (70%)		
Hemangiossarcoma	6/10 (60%)		
Mastocitoma	3/5 (60%)	PD-L1 antibody 6G7-E1	Maekawa et al., 2016
Adenocarcinoma de próstata	3/5 (60%)		
Adenocarcinoma mamário	4/5 (80%)		
Adenocarcinoma mamário	20/20 (100%)	PD-L1 antibody 6G7-E1	Maekawa et al., 2021

Fonte: (SHOSU et al., 2016; MAEKAWA et al., 2016; MAEKAWA et al., 2021).

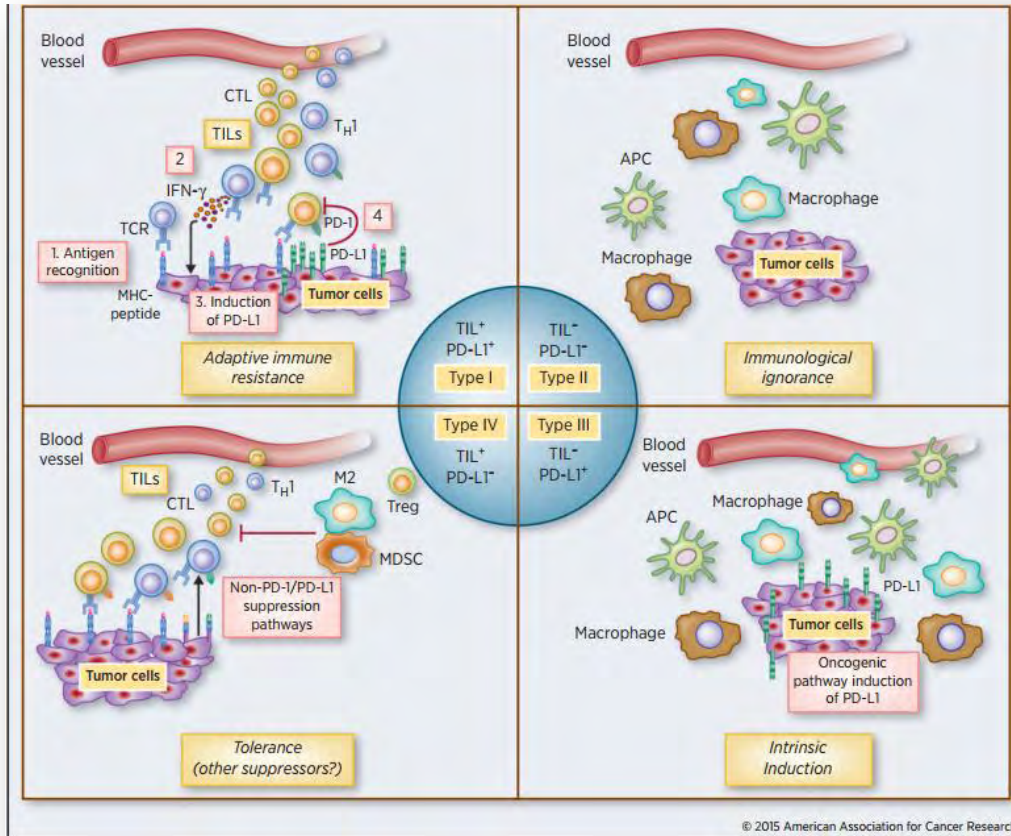
O bloqueio do eixo PD-1/PD-L1 por meio de um anticorpo anti-PD-1/PD-L1 pode impedir a evasão do sistema imune no câncer e contribui para o reconhecimento e a eliminação de células tumorais. Isso provoca a reativação de células T e restaura a função dos linfócitos exauridos, o que se tornou uma estratégia amplamente utilizada em terapias de vários tipos de câncer em humanos (MAEKAWA et al., 2014; WANG et al., 2018). A utilização de um anticorpo anti-PD-1 *in vitro* para avaliar os efeitos do bloqueio do eixo PD-1/PD-L1 demonstrou aumento da ativação de células T, revertendo sua supressão induzida por PD-L1, apontando seu potencial para a utilização na imunoterapia no combate do câncer em cães (COY et al., 2017).

Atualmente, terapias de bloqueio dos *checkpoints* imunológicos já são utilizadas no tratamento de pacientes com câncer. Foram desenvolvidos anticorpos monoclonais contra *checkpoints* imunológicos (receptores e ligantes), abordagem terapêutica conhecida como *Immune Checkpoint Blockade*. Dentre os medicamentos aprovados direcionados a proteína PD-L1 em humanos destacam-se: Atezolizumabe para o tratamento de câncer de pulmão de células pequenas, câncer de mama triplo negativo (TNBC) e carcinoma hepatocelular irressecável; Avelumabe, para carcinomas renais em estadios avançados; e Durvalumabe, para carcinoma urotelial metastático ou localmente invasivo. O *Immune Checkpoint Blockade* ficou mundialmente conhecido após as descobertas de Tasuku Honjo e James P. Allison em pesquisas sobre o impacto de terapias com o bloqueio de dois *checkpoints* imunológicos PD-1 e CTLA-4, as quais lhes renderam o Prêmio Nobel de Medicina de 2018 (KOCIKOWSKI et al., 2020; KORNEPATI; VADLAMUDI; CURIEL, 2022; ZHOU et al., 2023). Faltam, ainda, informações tais como o papel do PD-1 com outros moduladores imunes e o impacto do PD-1 em outras células imunes, além das células T (LIU et al., 2020).

Nenomoto et al. (2018), desenvolveram e caracterizaram anticorpos monoclonais contra PD-1 e PD-L1 caninos, e confirmaram que os anticorpos recém gerados aumentaram a ativação das células T. Maekawa et al. (2021) analisaram a eficácia e a segurança da terapia anti-PD-L1 utilizando um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 quimérico canino (c4G12) em 29 cães com melanoma maligno oral (OMM) com metástase pulmonar. A duração média dos tratamentos foi de 98 dias e, em dois cães, todos os tumores detectáveis desapareceram, com sobrevida de mais de 1 ano. Em outros dois animais, todas as lesões metastáticas pulmonares desapareceram, embora as dos linfonodos e o tumor primário persistiram. A taxa de sobrevida foi maior no grupo de tratamento com c4G12, com uma mediana de sobrevida de 143 dias. A eficácia e a segurança de terapias anti-PD-L1 em cães ainda não foram adequadamente investigadas e são apontadas evidências limitadas da expressão de PD-L1 em cânceres nesta espécie. Ambrosius et al. (2017) sugeriram que terapias anti-PD-L1 podem ser clinicamente benéficas para parte dos cães com linfoma difuso de grandes células B, apesar de não encontrarem associação entre a expressão de RNAm desta proteína e a sobrevida livre de doença.

Devido à sua heterogeneidade, e com o objetivo de prever e direcionar a resposta imunoterapêutica frente ao bloqueio dos *checkpoints* imunológicos, foi proposta uma classificação com o intuito de estratificar o microambiente tumoral em quatro tipos. O tipo 1, com PD-L1 e Linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) positivos, indica resistência imune adaptativa e abrange tumores que possivelmente podem se beneficiar de terapias de bloqueio anti-PD-1/PD-L1. Os tumores do tipo 2, PD-L1 e TILs negativos, indicando ignorância imunológica, e os do tipo 3, com PD-L1 positivo e TILs negativo, indicando indução intrínseca, exibem ausência em infiltrados de células T. Por isso, terapias de bloqueio podem não ser tão efetivas nestes casos. Apesar da ausência da expressão de PD-L1, em tumores do tipo 4, que apresentam PD-L1 negativo e TILs positivo, indicando o papel de outros supressores na promoção da resistência imunológica, outras terapias podem ser utilizadas redirecionando diferentes vias imunossupressoras, ou outros *checkpoints* imunológicos (TENG et al., 2015) (Figura 4).

**Figura 4** - Estratificação do microambiente tumoral com base na expressão de PD-L1 e ausência ou presença de TILs



Fonte: (TAUBE et al., 2012 citado por TENG et al. 2015).

Legenda: APC: Célula apresentadora de antígeno; CTL: Linfócitos T efetores; TILs: Linfócitos infiltrantes de tumor; TH1: Linfócito T Helper 1; TCR: Receptor de célula T; M2: Macrófago M2.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar a expressão de PD-L1 e o infiltrado de células T citotóxicas e regulatórias em tumores de mama em cadelas e verificar seu potencial para marcadores prognósticos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Quantificar a expressão de PD-L1 e os linfócitos T citotóxicos e regulatórios em tumores mamários de cadelas;
- II. Comparar a expressão de PD-L1 com o número de linfócitos T nos tecidos neoplásicos, entre neoplasias mamárias benignas e malignas, e entre os principais tipos histológicos de neoplasias mamárias e graus histológicos;
- III. Verificar o valor da expressão de PD-L1 e da população de linfócitos T citotóxicos e regulatórios intratumorais como indicadores prognósticos independentes quanto à sobrevida pós-cirúrgica;
- IV. Verificar a relação entre a expressão de PD-L1, linfócitos T citotóxicos e regulatórios com a expressão de RE, RP, Ki67, Calponina e HER2.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras do estudo

As amostras utilizadas são provenientes do Banco de Tumores do Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (FZEA-USP), como também do setor de patologia veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), campus Jaboticabal. Para a realização desta pesquisa a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA (CEUA), foi obtida sob o protocolo 7498190221.

Foram selecionados tumores de mama de fêmeas caninas de diferentes tipos histopatológicos, malignos e benignos, tratados por cirurgia e/ou quimioterapia, com acompanhamento clínico pós-cirúrgico mínimo de 180 dias para casos censurados na análise de sobrevivência. Inicialmente foram analisados 119 tumores mamários provenientes de 106 cadelas, entretanto, devido ao caráter retrospectivo do estudo, em alguns casos, informações referentes ao *status* de vida do animal não puderam ser obtidas. Por esse motivo, foram utilizados 87 casos para a análise estatística. Para as cadelas que possuíam múltiplas neoplasias mamárias, foi considerado o tipo histológico de pior prognóstico. As informações clínicas foram obtidas por meio da análise de prontuários e/ou entrevistas com tutores e/ou médicos veterinários responsáveis pelos animais.

Os dados clínicos obtidos incluíam: registro do paciente, idade, raça, localização do tumor, data do surgimento do tumor, data da cirurgia, *status* reprodutivo, uso de anticoncepcional, presença ou não de metástase em linfonodo e/ou à distância, tempo de sobrevivência após cirurgia, uso de quimioterapia antineoplásica, recidiva e *causa mortis*. O acompanhamento para os casos em que os animais ainda se encontravam vivos foi realizado por meio de contatos telefônicos com tutores com o intuito de obter informações sobre o *status* de vida do animal.

## 4.2 Processamento histopatológico

As amostras foram processadas conforme as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Cortes de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina para confirmação do diagnóstico e graduação histológica segundo Goldschmidt et al. (2011). A confirmação da classificação preliminar foi realizada por três observadores simultâneos que ao final chegaram a um consenso.

## 4.3 Processamento imuno-histoquímico

Os cortes histológicos foram aderidos em lâminas de vidro silanizadas (*Starfrost*<sup>®</sup>) e desparafinizadas em estufa por 1 hora a 60°C. Em seguida foram imersas em xilol I e II por 15 minutos cada, seguido pela imersão no álcool 100%, 95% e 70% por 5 minutos cada. Para finalizar houve um banho em água destilada para re-hidratação. A recuperação antigênica induzida por calor foi realizada utilizando o *steamer* a 95°C para os anticorpos contra PD-L1, FOXP3 e CD8 em solução tampão de citrato (pH 6.0), e nos demais a recuperação foi feita utilizando o micro-ondas na potência de 750w por três ciclos de 5 min. cada com o mesmo tampão. As lâminas foram mantidas em descanso por 20 minutos ainda em solução tampão de citrato para garantir a diminuição de temperatura. Posteriormente, foram lavadas por 3 vezes em solução tampão por 5 minutos cada. Os bloqueios da peroxidase endógena, de proteínas inespecíficas e os tampões de lavagem realizados estão de acordo com as condições constantes no quadro 7. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando peróxido de hidrogênio a 3% (*EasyLink ONE*, EasyPath) por 20 minutos, em câmara escura. Em seguida foram realizadas 3 lavagens por 5 minutos cada. Após as lavagens, os cortes foram incubados com os anticorpos primários específicos diluídos em solução tampão de lavagem (Quadro 7).

Em seguida, após as lavagens, as amostras com os anticorpos anti-PD-L1 e anti-CD8 foram incubadas com o anticorpo secundário (Polímero *EASYLINK ONE HRP*, EasyPath) em temperatura ambiente, por 20 minutos. Para o anticorpo primário anti-FOXP3 foi utilizado o anticorpo secundário *Goat anti-Rat IgG*, HRP (Invitrogen, código: 31470). O cromógeno utilizado foi o Diaminobenzidina (Cromógeno DAB, EP-12-20542, EasyPath), seguido de

banho em água destilada. A contracoloração foi realizada em hematoxilina de Harris, por 30 segundos, seguido de banho em água destilada. Por fim, realizou-se a desidratação em soluções seriadas de álcool e xilol, finalizando com a montagem da lâmina com cola histológica *Permount*<sup>®</sup>.

As reações de IHQ contra os anticorpos RE, RP, HER2, Ki67 e Calponina foram realizadas utilizando o *Kit Max Polymer Detection System*, Novolink (REF: RE7280-K, LOTE: 6089660, Leica Biosystems Newcastle Ltd). Tais reações foram realizadas no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias (ECAV, UTAD), durante o Estágio de Pesquisa de Mestrado no exterior (BEPE-MS), sob supervisão da Profa. Dra. Adelina Gama.

Cortes histológicos de carcinoma mamário canino foram incluídas como controles positivos para RE, RP, HER2, Ki67 e Calponina. Para PD-L1, CD8 e FOXP3 foram utilizados placenta, tonsila e linfonodo de cão, respectivamente. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos.

**Quadro 7-** Protocolos de IHQ utilizados

	Anticorpo	Diluição do anticorpo	Recuperação antigênica	Bloqueios realizados	Tampão de lavagem
PD-L1	Policlonal de coelho anti-PDL1 (Código:#IM-0774, RheaBiotech <sup>®</sup> )	1/500 ( <i>Overnight</i> ) 16h	<i>Steamer</i> (95° C, 20 min.)	Peroxidase endógena	PBS pH= 9,0
CD8	Policlonal de coelho anti-CD8 (Código: ab4055, Abcam)	1/200 ( <i>Overday</i> ) 1h	<i>Steamer</i> (95° C, 25 min.)	Peroxidase endógena + Proteínas Inespecíficas	TBS pH= 9,0
FOXP3	Monoclonal de rato anti-FOXP3 (FJK-16s) (Código: 14-5773-82, eBioscience <sup>®</sup> )	1/100 ( <i>Overnight</i> ) 16h	<i>Steamer</i> (95° C, 25 min.)	Peroxidase endógena + Proteínas Inespecíficas	TBS pH= 7,6
RE	Monoclonal de camundongo/Receptor de estrógeno alfa, Er $\alpha$ , (Clone: C311, Santa Cruz)	1/100 ( <i>Overnight</i> ) 16h	Micro-ondas (3 ciclos de 5 min.)	Peroxidase endógena + Proteínas Inespecíficas	PBS pH= 7,6
RP	Monoclonal/Receptor de progesterona, NCL-L-PGR (Clone: 1A6, Novocasta)	1/40 ( <i>Overnight</i> ) 16h	Micro-ondas (3 ciclos de 5 min.)	Peroxidase endógena + Proteínas Inespecíficas	PBS pH= 7,6
HER2	Policlonal de coelho/Anti- c-erbB-2 humano (Código: A0485, DAKO)	1/40 ( <i>Overnight</i> ) 16h	Micro-ondas (3 ciclos de 5 min.)	Peroxidase endógena + Proteínas Inespecíficas	PBS pH= 7,6

Ki67	Monoclonal de camundongo/Anti-Ki67 humano (Clone: MIB-1, DAKO)	1/50 ( <i>Overnight</i> ) 16h	Micro-ondas (3 ciclos de 5 min.)	Peroxidase endógena + Proteínas Inespecíficas	PBS pH= 7,6
Calponina	Monoclonal de camundongo/Anti-Calponina humano (Clone: CALP, Código: M3556, DAKO)	1/400 ( <i>Overnight</i> ) 16h	Micro-ondas (3 ciclos de 5 min.)	Peroxidase endógena + Proteínas Inespecíficas	PBS pH= 7,6

Fonte: Própria autoria.

Legenda: PBS: Solução Salina Tamponada, TBS: Solução Tris Salina Tamponada.

#### 4.4 Análise das imunomarcações

A análise das imunomarcações foi realizada após a captura de imagens com o auxílio de um microscópio óptico com câmera digital (Leica DM500 e câmera Leica ICC50 HD).

Para avaliar PD-L1, LTR FOXP3 e LTC CD8 foram capturadas cinco fotomicrografias em áreas intratumorais de maior marcação ("*hotspots*"), à objetiva de 40x. Para FOXP3 e CD8 a avaliação foi realizada na região intratumoral, sendo 0 (sem imunomarcação), 1 (apenas células isoladas marcadas) e 2 (marcação em grupos de células) (YASUMARU et al., 2021).

As imunomarcações para PD-L1 foram realizadas de forma qualitativa (nuclear ou citoplasmática) e semiquantitativa em *hotspots*, na qual tumores com >10% de células neoplásicas marcadas para PD-L1 foram considerados positivos (SHOSU et al., 2016). A intensidade da coloração foi classificada como fraca, moderada ou forte, utilizando-se os padrões de referência da Figura 8: B, C e D respectivamente.

Para avaliação do Ki67, foram capturadas cinco fotomicrografias em campos de alta marcação ("*hotspots*") à objetiva de 40x. A taxa de proliferação foi definida como alta ( $\geq 20\%$  de células positivas) ou baixa ( $< 20\%$ ) (GOLDHIRSCH et al., 2013). A porcentagem de células positivas e negativas foi determinada com o auxílio do software de análise de imagens *ImageJ* (NIH, EUA).

Para analisar a expressão de RE e RP, foi utilizado o sistema de pontuação de Allred, como descrito nas diretrizes publicadas por Peña et al. (2014), no qual são consideradas a porcentagem de células positivas e intensidade da imunomarcação. Foram analisados semiquantitativamente, em *hotspots*, os núcleos de células tumorais positivos em células epiteliais nos tumores mamários caninos, considerando-se positivos aqueles com pontuação total maior ou igual a três (Quadro 8).



**Quadro 8** - Método de análise dos dados de IHQ para RE e RP

Porcentagem de marcação	Pontuação
Sem marcação	0
<1%	1
1% - 10%	2
10% - 33%	3
33% - 66%	4
>66%	5
<b>Intensidade da coloração</b>	
Ausente	0
Fraca	1
Moderada	2
Forte	3
<b>Pontuação Total</b>	% de marcação + Intensidade da
<b>0 e 2 a 8</b>	coloração

Fonte: (PEÑA et al., 2014, p. 140).

A expressão de HER2 também foi analisada conforme descrito por Peña et al. (2014) (Quadro 9). Foram considerados positivos para HER2 os carcinomas com os escores 2+ e 3+. Os de escore 0 e 1+ foram considerados negativos (GAMA et al., 2008). Para a expressão de calponina, foram analisadas de forma semiquantitativa, em toda a lâmina, as células mioepiteliais com marcação do tipo citoplasmática e classificadas em escores: 0 (<10%), 1 (10-50%) e 2 (>50% das células marcadas) (PEÑA et al., 2014).

**Quadro 9** - Critérios para análise da expressão de HER2

Critério de interpretação	Escore de IHQ
Forte, completa, marcação de membrana homogênea (Arame de galinheiro) em >30% das células	3+
Forte, completa, marcação de membrana homogênea (Arame de galinheiro), em <= 30% das células; ou fraca/moderada, marcação de membrana heterogênea em pelo menos 10% das células	2+
Nenhuma marcação, ou marcação fraca de membrana incompleta em qualquer porcentagem de células	0-1+

Fonte: (PEÑA et al., 2014, p. 135).

#### 4.5 Análise estatística

Associações entre a expressão de PD-L1, CD8, FOXP3, RE, RP, HER2 e o grau histológico foram avaliadas pelo teste de Chi-quadrado. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre PD-L1, FOXP3 e CD8 entre si e com outros marcadores (RE, RP, ki67, calponina e HER2), bem como entre os grupos histológicos. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier, e as taxas de sobrevida foram comparadas pelos testes de log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Nos casos em que o animal apresentava mais de uma lesão tumoral, apenas o tumor com características mais agressivas (tipo histológico e grau) foi utilizado para caracterizar a análise da sobrevida. Os animais que morreram por causas não relacionadas ao tumor e os que se encontravam vivos ao final do período de acompanhamento foram censurados na análise estatística. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Inc., versão 9.5.1 para MacOS). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

## 5. RESULTADOS

Oitenta e sete casos de tumores mamários caninos foram analisados. A idade média das cadelas no momento do diagnóstico foi de 10 anos (variação de 5 a 17 anos). Dezoito raças foram representadas no estudo e os animais sem raça definida foram os mais acometidos, representando 29,89% (26/87) dos casos (Tabela 2). A maioria das cadelas era castrada (89,66%; 78/87) e em cinco casos essa informação não estava presente. O histórico do uso de anticoncepcionais foi relatado em apenas um caso.

**Tabela 2** - Raças representadas no estudo

Raça	N	%
American Pit Bull	2	2,30%
Blue Heeler	2	2,30%
Border Collie	2	2,30%
Boxer	1	1,15%
Cocker Spaniel	2	2,30%
Dachshund	6	6,90%
Fox Paulistinha	4	4,60%
Golden Retriever	3	3,45%
Labrador	3	3,45%
Lhasa Apso	4	4,60%
Maltês	1	1,15%
Pastor Alemão	1	1,15%
Pastor Belga	1	1,15%
Pinscher	9	10,34%
Poodle	12	13,79%
Shih-tzu	4	4,60%
SRD	26	29,89%
Yorkshire	4	4,60%
Total	87	100,00%

Fonte: Própria autoria.

O diâmetro médio dos tumores foi de 2 cm, sendo que em 10 casos essa informação não estava disponível. Os tumores localizaram-se mais frequentemente nas glândulas mamárias abdominais (43,68%; 38/87) e inguinais 25,29% (22/87). Metástase em linfonodo foi detectada em 14,94% (13/87) dos casos, sendo que em 30 casos a amostra linfonodal não estava disponível para análise. Metástases à distância foram detectadas em 25,29% (22/87) dos animais, sendo que em três casos essa informação não estava disponível. A recidiva do

tumor de mama foi confirmada em 16,09% (14/87) dos casos. Houve quimioterapia adjuvante em 21,84% (19/87) dos casos.

Em 27,59% (24/87) dos casos, a morte foi atribuída ao tumor, enquanto que 24,14% (21/87) morreram por causas não relacionadas à doença e 48,28% (42/87) dos animais encontravam-se vivos ao final do estudo.

O subtipo tumoral mais frequente foi o carcinoma complexo, representando 29,89% (26/87) dos casos, seguido pelo carcinoma tubular 18,39% (16/87) e carcinoma misto 17,24% (15/87). A graduação histológica resultou em 53,16% (42/79) tumores de grau I, 35,44% (28/79) de grau II e 11,39% (9/79) de grau III.

Devido ao grande número de subtipos histológicos, os mesmos foram agrupados de duas formas distintas para possibilitar análises estatísticas com valor prognóstico. As subdivisões são descritas nas Tabelas 3 e 4 (RASOTTO et al., 2017; BRUNETTI et al., 2021a).

**Tabela 3** - Subtipos tumorais representados no estudo conforme Rasotto et al. (2017)

	<b>Subtipo histológico</b>	<b>Número de casos</b>
<b>Tumores benignos</b> (n=6)	Adenoma complexo	3
	Adenoma simples	1
	Adenoma papilar intraductal	1
	Tumor misto benigno	1
<b>Tumores malignos menos agressivos</b> (n= 72)	Carcinoma complexo	26
	Carcinoma tubular	16
	Carcinoma misto	15
	Carcinoma papilar intraductal	7
	Carcinoma tubulopapilar	5
	Carcinoma e mioepitelioma maligno	2
	Carcinoma ductal	1
<b>Tumores malignos mais agressivos</b> (n=9)	Comedocarcinoma	4
	Carcinoma sólido	2
	Carcinoma adenoescamoso	1
	Carcinoma micropapilar invasivo	1
	Carcinoma anaplásico	1

Fonte: Própria autoria.

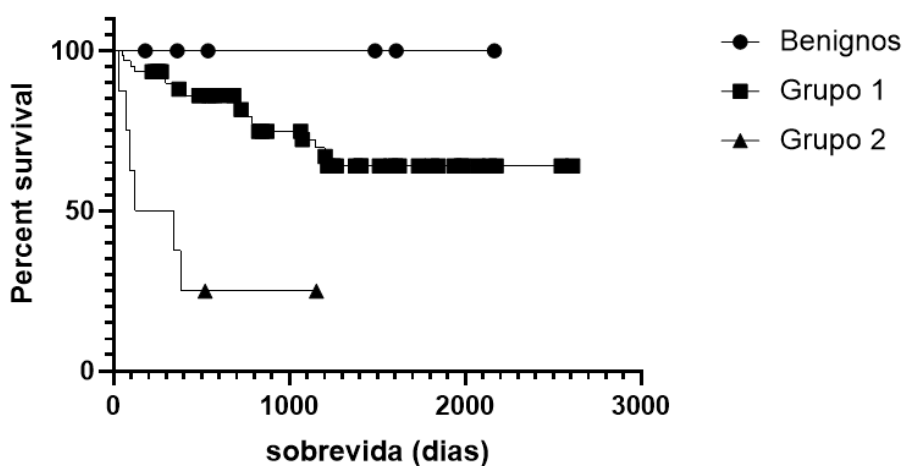
**Tabela 4** - Subtipos tumorais representados no estudo conforme Brunetti et al. (2021a)

	Subtipo histológico	Número de casos
<b>Tumores benignos</b> (n=6)	Adenoma complexo	3
	Adenoma simples	1
	Adenoma papilar intraductal	1
	Tumor misto benigno	1
<b>Tumores malignos menos agressivos</b> (n=41)	Carcinoma complexo	26
	Carcinoma misto	15
	Carcinoma tubular	16
	Carcinoma papilar intraductal	7
<b>Tumores malignos de agressividade intermediária</b> (n=31)	Carcinoma tubulopapilar	5
	Carcinoma e mioepitelioma maligno	2
	Carcinoma ductal	1
	Comedocarcinoma	4
<b>Tumores malignos de alta agressividade</b> (n=9)	Carcinoma sólido	2
	Carcinoma adenoescamoso	1
	Carcinoma micropapilar invasivo	1
	Carcinoma anaplásico	1

Fonte: Própria autoria

A análise de sobrevida após divisão dos carcinomas em dois grupos revelou diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5). Os animais com tumores mais agressivos (grupo 2) tiveram uma mediana de sobrevida pós-cirúrgica de 234 dias.

**Figura 5** - Curvas de sobrevida pós-cirúrgica em função dos grupos histológicos de baixa e alta agressividade, comparados aos tumores benignos



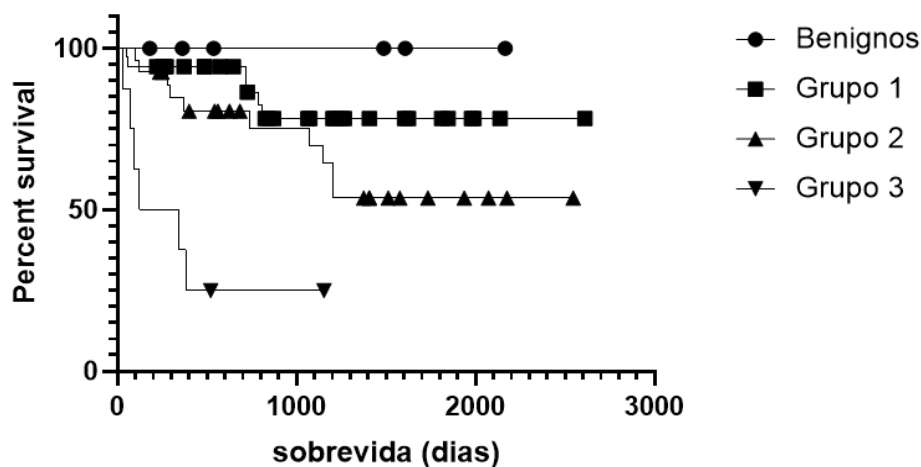
Fonte: Própria autoria.

Legenda: Animais do grupo 2, com tumores malignos considerados mais agressivos, apresentaram sobrevida pós-cirúrgica significativamente menor que os do grupo 1 e os com tumores benignos ( $\chi^2=21,13$ ;  $p < 0,0001$ ,

Kaplan-Meier, seguido do teste de Mantel-Cox; mediana de sobrevida para o grupo 2 = 234 dias).

Quando adicionado o grupo de malignidade intermediária, a análise geral de sobrevida se manteve significativa ( $p < 0,0001$ ), mas não foi observada diferença entre os tumores benignos e os do grupo 1 (baixa agressividade) ( $p = 0,3439$ ), nem entre os grupos 1 e 2 (agressividade intermediária) ( $p = 0,1265$ ; Fig. 6). Sendo assim, optamos por utilizar em nosso estudo o agrupamento dividindo os carcinomas em 2 grupos: tumores menos agressivos e mais agressivos, conforme a Tabela 3.

**Figura 6** - Curvas de sobrevida em função dos grupos histológicos de baixa, intermediária e alta malignidade comparados aos tumores benignos

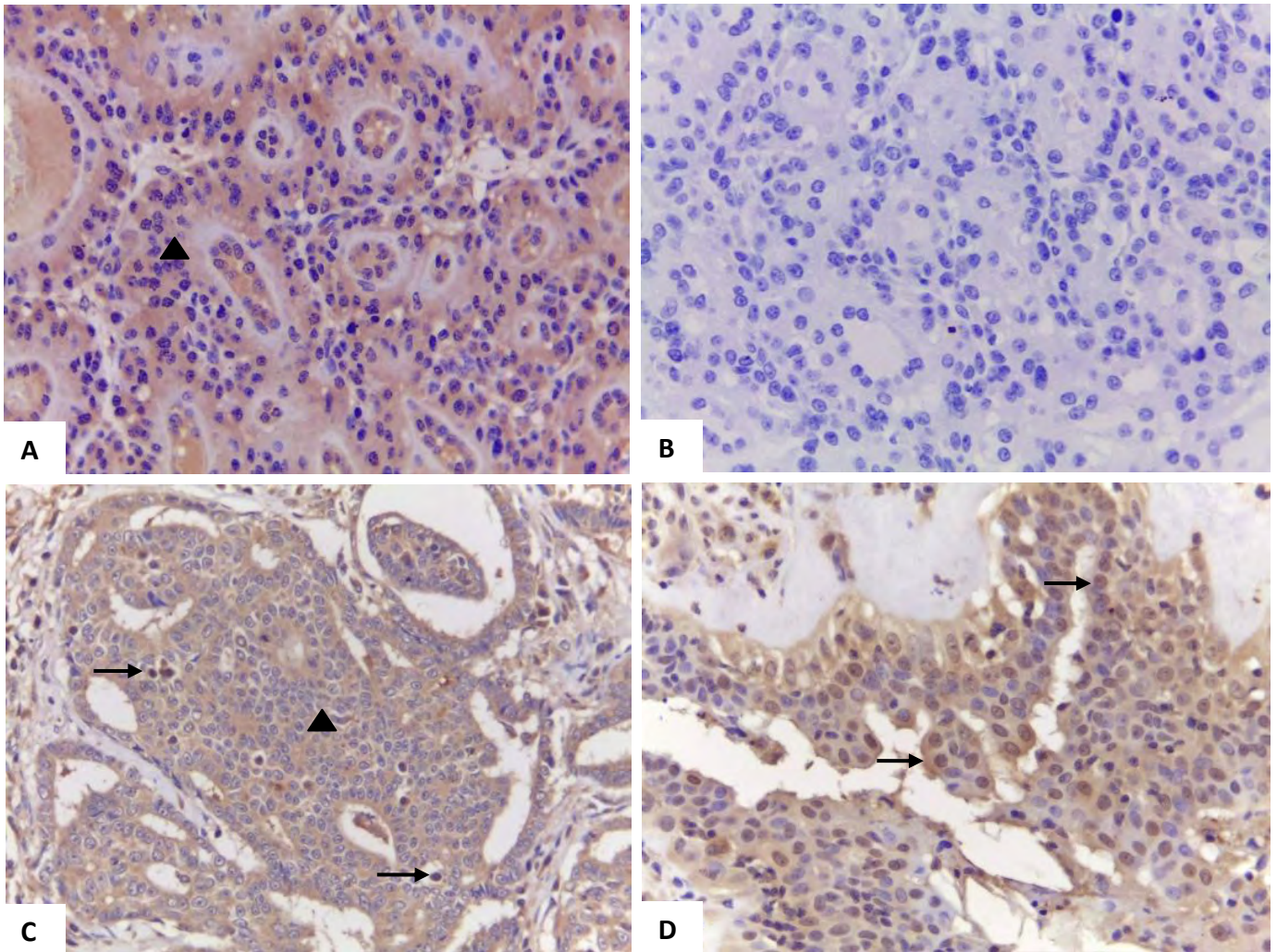


Fonte: Própria autoria.

Legenda: Animais do grupo 3, com tumores malignos considerados mais agressivos, apresentaram sobrevida pós-cirúrgica significativamente menor que os dos grupos 1 e 2, assim como dos animais com tumores benignos ( $\chi^2 = 24,36$ ;  $p < 0,0001$ , Kaplan-Meier, seguido do teste Mantel-Cox; mediana de sobrevida para o Grupo 3 = 234 dias).

A expressão de PD-L1 foi observada no citoplasma e no núcleo das células tumorais e apenas no citoplasma em linfócitos (Fig. 7 e 8).

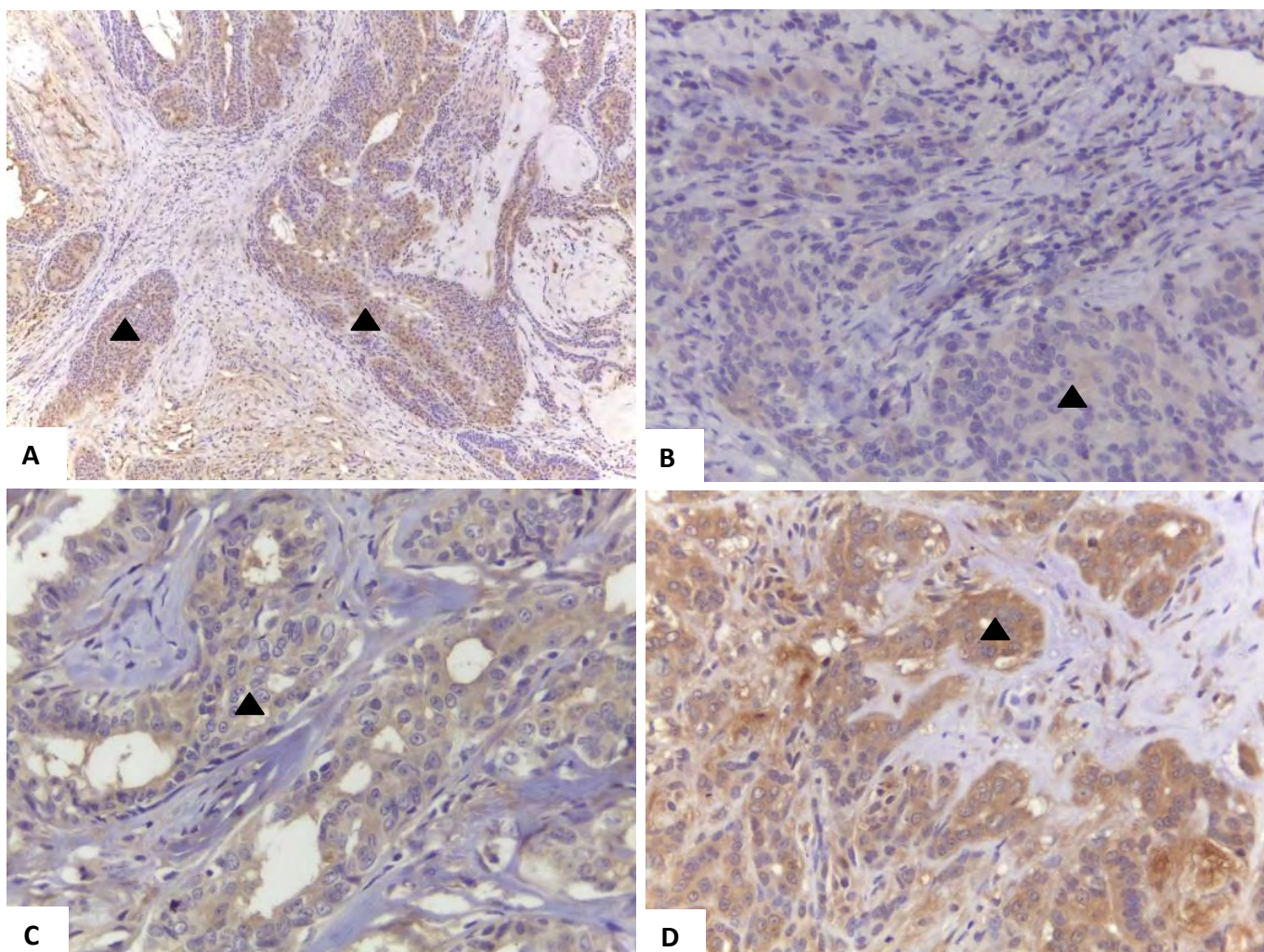
**Figura 7.** Padrões de imunomarcção para PD-L1



Fonte: Própria autoria.

Legenda: **(A)** Placenta de cão, controle positivo, imunomarcção positiva para PD-L1 do tipo citoplasmática (cabeça da seta) (Obj. 40x). **(B)** Placenta de cão, controle negativo (Obj. 40x). **(C)** Carcinoma mamário, imunomarcção citoplasmática positiva para PD-L1 em células tumorais (cabeça da seta) e em linfócitos (seta) (Obj. 40x). **(D)** Carcinoma mamário, imunomarcção citoplasmática e nuclear (setas) positiva para PD-L1 (Obj. 40x). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

**Figura 8** – Padrões de imunomarcção para PD-L1 em tumores mamários caninos



Fonte: Própria autoria.

Legenda: **(A)** Carcinoma mamário expressando PD-L1 nas células tumorais (cabeça da seta) (Obj. 10x). **(B)**, **(C)** e **(D)** Carcinomas mamários, imunomarcção positiva para PD-L1 de intensidades fraca, moderada e forte, respectivamente (cabeças de seta) (Obj. 40x). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

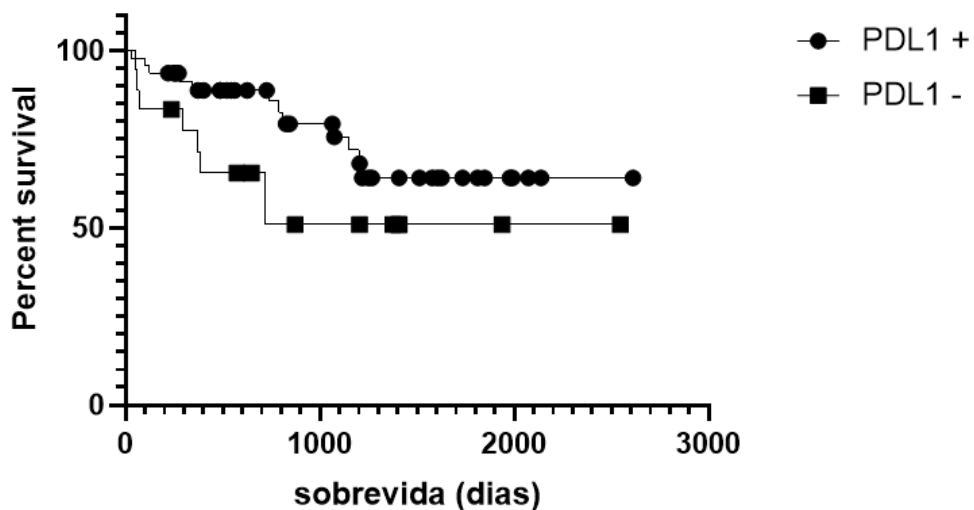
Os tumores positivos para PD-L1 compreenderam 71,95% (59/82) dos casos, e os negativos 28,05% (23/82). Animais com tumores negativos para PD-L1 apresentaram menor sobrevida pós-cirúrgica que animais com tumores positivos ( $p=0,0421$ ; Kaplan-Meier seguido de teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon; Figura 9). Não houve diferenças significantes quando comparada entre os graus histológicos ( $p=0,0631$ ), tumores benignos *versus* malignos ( $p=0,3423$ ) e entre os benignos, menos agressivos e mais agressivos ( $p=0,5205$ ).

Nos tumores positivos para PD-L1, 69,49% (41/59) expressaram PD-L1 apenas no citoplasma, enquanto 30,51% (18/59) expressaram no núcleo e no citoplasma. Em relação à



intensidade de coloração, 32,20% (19/59) apresentaram imunomarcção fraca, 44,07% (26/59) moderada, e 23,73% (14/59) forte. A comparação das sobrevidas entre os diferentes tipos de marcação ( $p=0,1640$ ) e as intensidades de imunomarcção ( $p=0,5346$ ) não revelou diferenças significantes, o mesmo ocorrendo quando comparados os casos positivos e negativos para PD-L1, RE, RP ( $p>0,9999$ ), HER2 ( $p=0,3529$ ) e calponina ( $p>0,9999$ ), e para a comparação entre animais que morreram em função da doença e animais censurados ( $p=0,4059$ ).

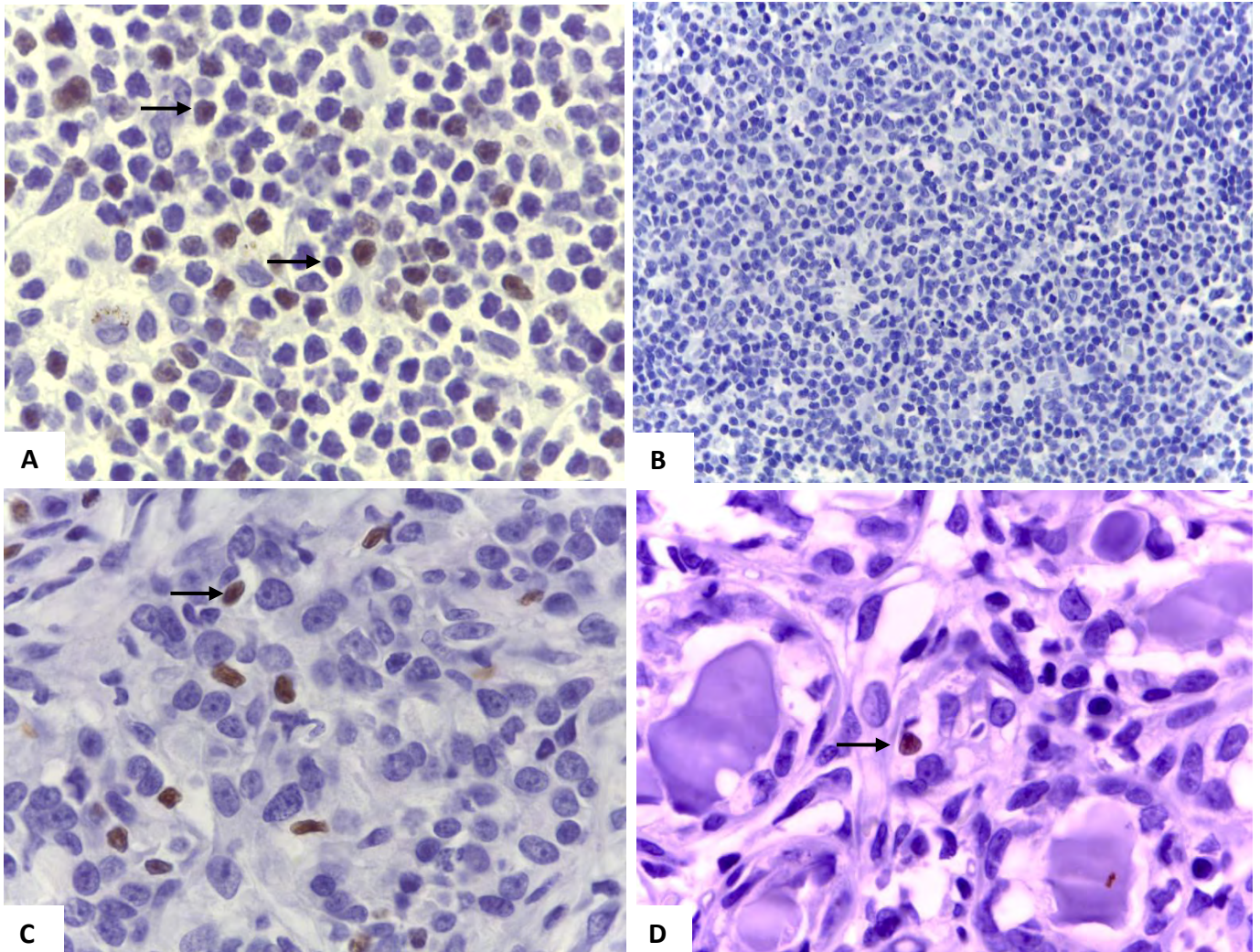
**Figura 9** - Curvas de sobrevida em função da expressão de PD-L1



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Animais com tumores negativos para PD-L1 apresentaram menor sobrevida pós-cirúrgica que animais com tumores positivos ( $\chi^2=4,132$ ;  $p=0,0421$ ; Kaplan-Meier seguido de teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

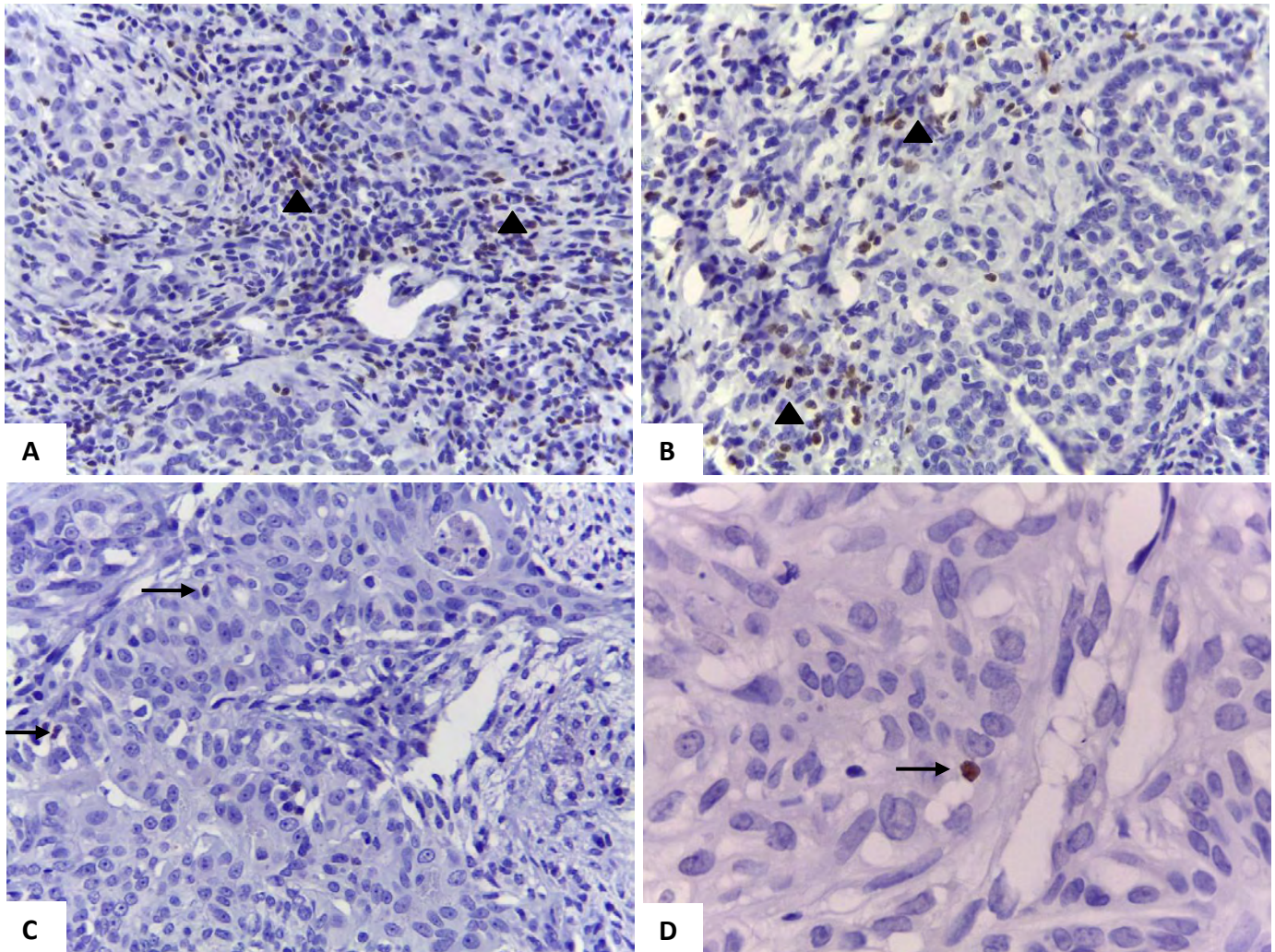
A marcação de LTR FOXP3+ foi do tipo nuclear nos tumores mamários caninos (Fig. 10 e 11). A maioria das amostras foi positiva para FOXP3 (60%; 21/35). Não houve diferença estatisticamente significativa para sobrevida considerando a positividade para expressão de FOXP3 quando avaliada a região intratumoral ( $p=0,5744$ ). Não foi possível comparar a relação entre a expressão de FOXP3 e de PD-L1, pois havia apenas três tumores PD-L1 negativos, inviabilizando análises estatísticas.

**Figura 10** - Imunomarcção de LTR FOXP3+

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **(A)** Linfonodo de cão, controle positivo, imunomarcção nuclear positiva para FOXP3 em linfócitos Treg (Obj. 100x) (setas). **(B)** Linfonodo de cão, controle negativo (Obj. 10x). **(C)** e **(D)** Carcinoma mamário canino, imunomarcção nuclear positiva para linfócito Treg FOXP3+ no compartimento intratumoral (setas). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

**Figura 11** - Padrões de imunomarcção de LTR FOXP3+

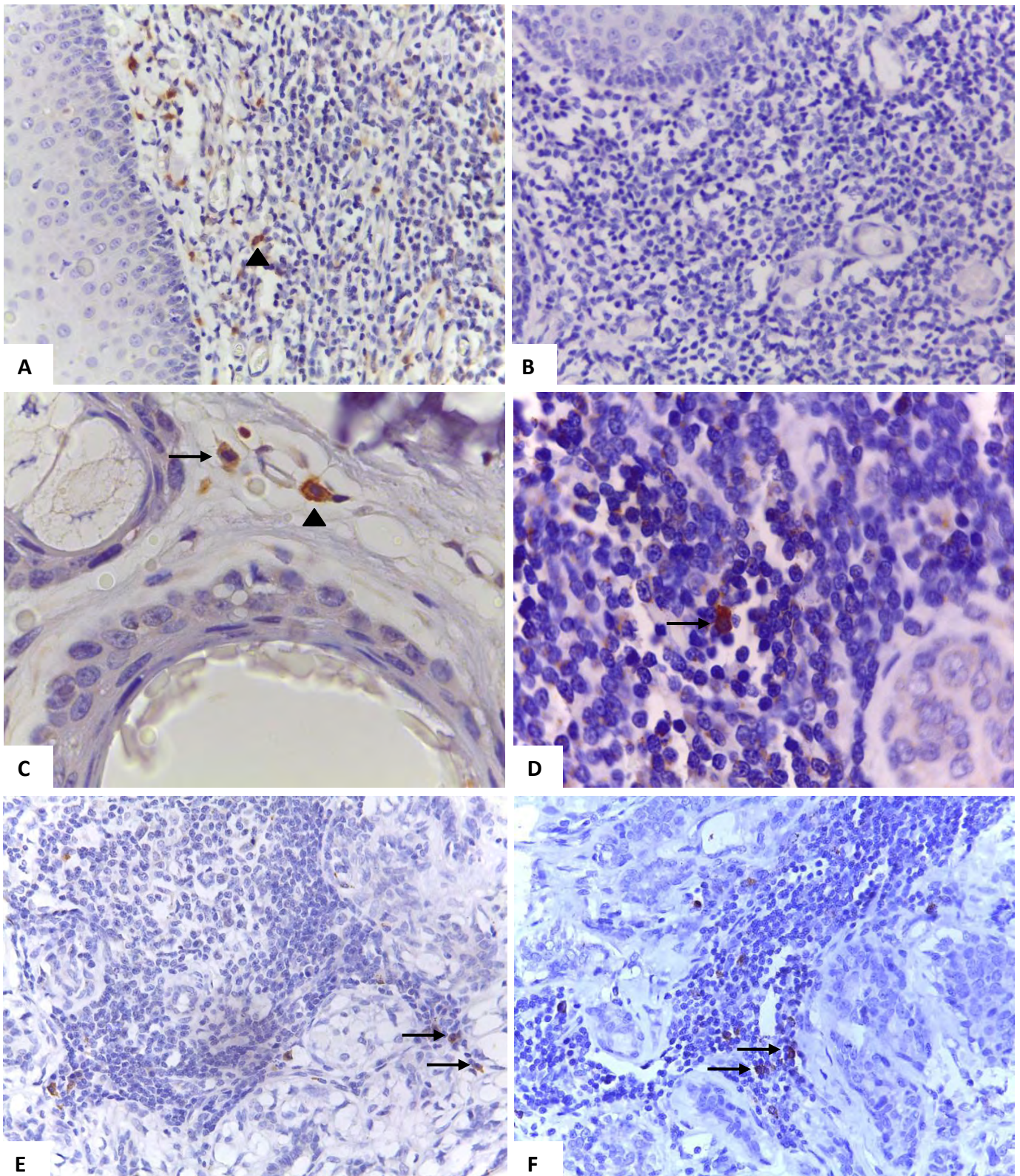


Fonte: Própria autoria.

Legenda: Carcinomas mamários caninos apresentando: **(A)** e **(B)** Imunomarcção nuclear positiva para FOXP3 em grupos de linfócitos Treg (Obj. 40x) (cabeças da seta); **(C)** e **(D)** Imunomarcção nuclear positiva para linfócitos Treg FOXP3+ isolados (seta) (Obj. 40x, Obj. 100x). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Já a marcação dos LTC CD8+ foi do tipo membranar e citoplasmática (Fig. 12). Os tumores mamários positivos para CD8 foram 43,37% (36/83) dos casos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para sobrevida considerando a expressão de CD8 avaliada na região intratumoral ( $p=0,6029$ ), assim como quando comparadas as positivities entre os tumores benignos, menos agressivos e mais agressivos ( $p=0,3977$ ), entre positivos e negativos para PD-L1 ( $p=0,1249$ ), e entre animais que morreram em função do tumor e animais censurados ( $p=0,6263$ ).

**Figura 12 - Padrões de imunomarcção de LTC CD8+**



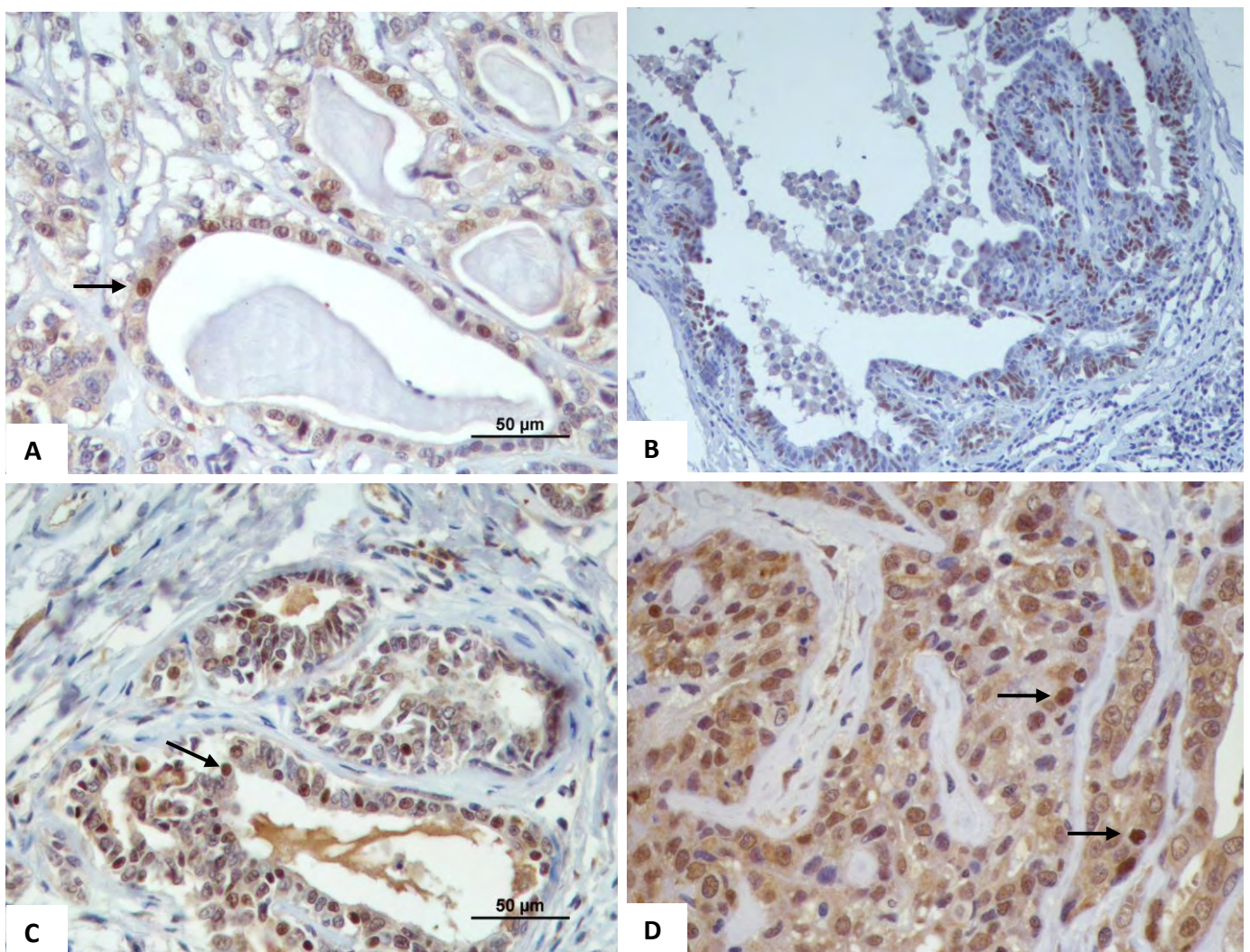
Fonte: Própria autoria.

Legenda: **(A)** Tonsila de cão, controle positivo, imunomarcção positiva para CD8 (cabeça da seta) em LTC (Obj. 40x). **(B)** Tonsila de cão, controle negativo. (Obj. 40x.). **(C)** e **(D)** Carcinoma mamário canino, imunomarcção

positiva no citoplasma (seta) e membrana (cabeça de seta) para LTC CD8+ em células isoladas (Obj. 100x.). **(E)** e **(F)** Carcinoma mamário canino, imunomarcação citoplasmática positiva para LTC CD8+, grupo de células (Obj. 40x). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris.

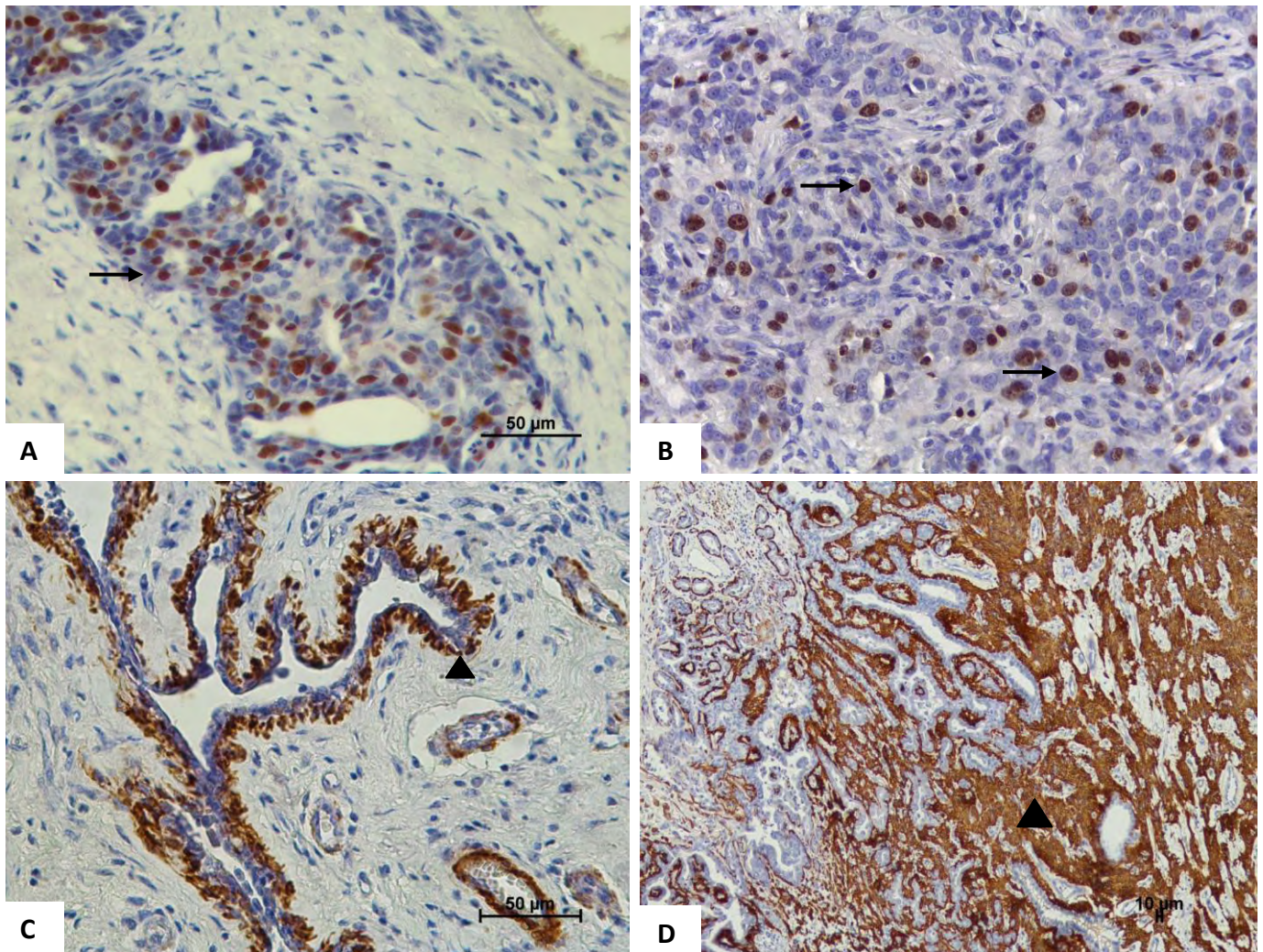
Os tumores positivos para RE, RP, e Ki67 apresentaram uma marcação do tipo nuclear em células epiteliais (Fig. 13 e 14). A expressão de calponina caracterizou-se por marcação do tipo citoplasmática nas células mioepiteliais (Fig. 14).

**Figura 13 - Padrões de imunomarcação para RE e RP**



Fonte: Própria autoria.

Legenda: **(A)** Imunomarcação para RE alfa em tecido mamário normal utilizado como controle apresentando marcação nuclear positiva para RE nas células epiteliais luminais (seta, Obj. 40x). **(B)** Imunomarcação para RE em carcinoma tubulopapilar com marcação nuclear positiva para RE nas células epiteliais luminais (Obj. 20x). **(C)** Imunomarcação para RP alfa em carcinoma mamário utilizado como controle, apresentando marcação nuclear positiva para RP nas células epiteliais luminais (seta). **(D)** Imunomarcação para RP em carcinoma complexo com marcação nuclear positiva para RP nas células epiteliais (setas, Obj. 60x). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Gill.

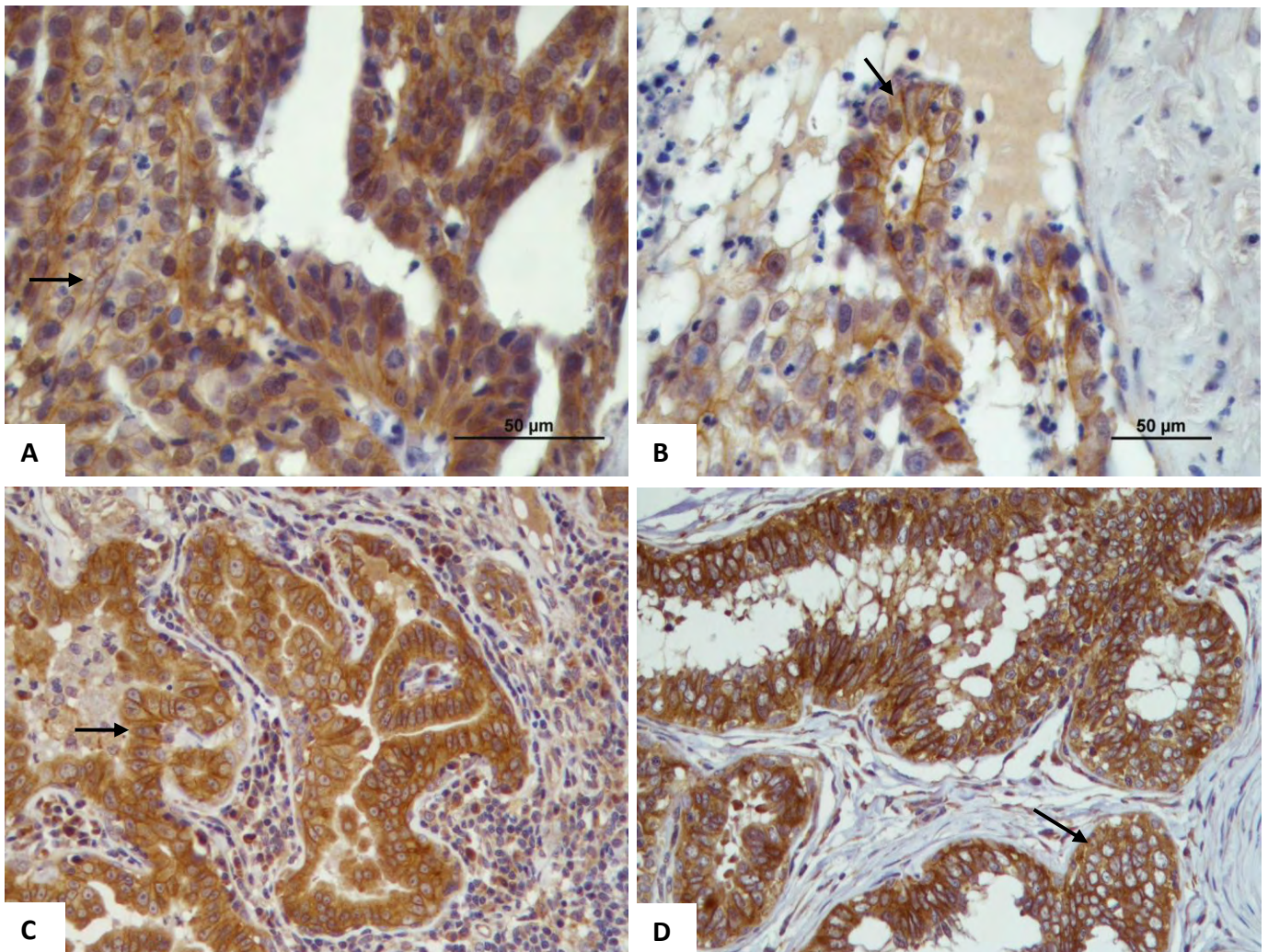
**Figura 14 - Padrões de imunomarcacão para Ki67 e Calponina**

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **(A)** Tecido mamário normal utilizado como controle, com imunomarcacão nuclear positiva para Ki67 nas células epiteliais (seta, Obj. 40x). **(B)** Imunomarcacão nuclear positiva para Ki67 em carcinoma sólido (setas, Obj. 40x). **(C)** Imunomarcacão citoplasmática positiva para calponina em tecido mamário normal utilizado como controle (cabeça de seta). **(D)** Carcinoma mamário, imunomarcacão positiva para calponina nas células mioepiteliais (cabeça de seta). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Gill.

Já os tumores positivos para HER2 mostraram uma marcação do tipo membranar (Fig. 15).

**Figura 15** - Imunomarcção para HER2 em carcinoma mamário canino



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Carcinomas mamários apresentando: **(A)** e **(B)** imunomarcção membranar positiva para HER2 nas células epiteliais com o escore 1+ (seta); **(C)** imunomarcção de membrana positiva para HER2 com o escore 2+ (seta, Obj. 40x); e **(D)** Carcinoma mamário utilizado como tecido controle, imunomarcção de membrana forte e completa para HER2 nas células tumorais com o escore 3+ (seta, Obj. 40x). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Gill.

As avaliações das expressões de RE e calponina foram realizadas em 42 tumores, RP em 41, e HER2 em 24. Isso se deve ao fato de que não havia o mesmo número de cortes histológicos disponíveis para todos os anticorpos. Os resultados da análise imuno-histoquímica de todos os marcadores estudados estão sumarizados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Expressão imuno-histoquímica de cada marcador estudado

<b>Marcador</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total de amostras</b>
<b>PD-L1</b>	59 (71,95%)	23 (28,05%)	82
<b>CD8</b>	36 (43,37%)	47 (56,63%)	83
<b>FOXP3</b>	21 (60%)	14 (40%)	35
<b>Receptor de estrógeno (RE)</b>	31 (73,81%)	11 (26,19%)	42
<b>Receptor de progesterona (RP)</b>	13 (31,71%)	28 (68,29%)	41
<b>HER2</b>	7 (29,17%)	17 (70,83%)	24
<b>Calponina</b>	34 (80,95%)	8 (19,05%)	42

Fonte: Própria autoria.

A maioria dos tumores foi positiva para o RE (31/42; 73,81%), enquanto que a porcentagem de casos positivos para RP foi menor (13/41; 31,71%). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as sobrevividas pós-cirúrgicas entre animais com tumores RE+ e RE- ( $p=0,0726$ ; mediana de sobrevida para RE- = 721 dias), nem com relação a tumores RP+ e RP- ( $p=0,7575$ ; mediana de sobrevida para PR+ = 1206 dias). Também não foram detectadas diferenças significantes nas expressões de RE e RP entre os graus histológicos ( $p=0,2282$  e  $p=0,2185$ , respectivamente).

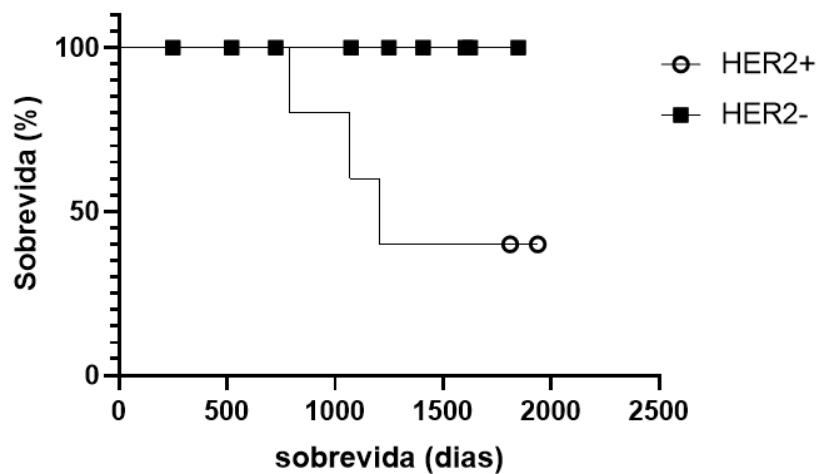
Dos 24 tumores analisados para expressão de HER2, quatro apresentaram escores 0 e 13 apresentaram escores 1+, correspondendo a 70,83% dos casos investigados para HER2. Todos os positivos receberam o escore 2+, nenhum escore 3+. Os tumores positivos para HER2 tiveram sobrevida pós-cirúrgica significativamente menor do que os tumores negativos ( $p=0,0372$ ; mediana de sobrevida para HER2+= 1203 dias) (Fig. 16). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tumores HER2+ e HER2- quando comparados aos graus histológicos ( $p=0,6027$ ).

A expressão de calponina esteve presente na maioria das amostras em células mioepiteliais (34/42; 80,95%). Em relação ao índice de Ki67, 87,50% (35/40) apresentaram



baixa atividade proliferativa. Quatro tumores não foram avaliados devido à imunorreatividade negativa do tecido, inclusive para controle interno (epiderme). Para ambos os marcadores, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparadas as sobrevidas pós-cirúrgicas de animais com tumores Calp+ e Calp- ( $p=0,4957$ ; mediana de sobrevida para Calp- = 1205 dias) e de animais com tumores de alta e baixa atividade proliferativa ( $p=0,1034$ ; mediana de sobrevida para Ki67 alto= 1203 dias).

**Figura 16** - Curvas de sobrevida em função da expressão de HER2



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Animais com tumores positivos para HER2 apresentaram menor sobrevida pós-cirúrgica que animais com tumores negativos ( $\chi^2= 4.188$ ;  $p=0,0372$ ; Kaplan-Meier seguido de teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon, mediana de sobrevida para tumores HER2 positivos de 1203 dias).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, 87 amostras de tumores de mama caninos foram analisadas por meio da técnica de imuno-histoquímica, com o intuito de investigar as expressões de PD-L1, LTC CD8+ e LTR FOXP3 e seus valores como indicadores prognósticos quanto à sobrevida pós-cirúrgica. Em relação às características epidemiológicas, confirmamos observações de outros autores, com animais sem raça definida como os mais frequentes, idade avançada ao diagnóstico, glândulas mamárias abdominais como as principais acometidas, e como subtipo histológico mais frequente o carcinoma complexo (NGUYEN et al., 2018; SALAS et al., 2015).

Devido ao número reduzido de amostras de determinados subtipos histológicos, bem como o comportamento biológico semelhante entre determinados tumores, optamos por dividir os subtipos histológicos em dois tipos de agrupamentos distintos para realizar a análise estatística, com base nas observações de Rasotto et al. (2017). A divisão dos carcinomas em dois grupos quanto à malignidade se mostrou mais eficaz para separação dos casos, por isso, foi eleita para as comparações de expressão dos marcadores imuno-histoquímicos.

Os tumores mamários caninos exibem um comportamento biológico muito variado e também são caracterizados por apresentar heterogeneidade morfológica, por isso, estudos que identifiquem novos marcadores ou fatores prognósticos e preditivos, ou que sejam complementares aos já existentes são de extrema importância na oncologia veterinária (ARIYARATHNA et al., 2020). A proteína celular de morte programada 1 (PD-1), também conhecida como uma molécula de *checkpoint* imunológico, quando se une ao seu ligante PD-L1, possui atividade imunossupressora, inibindo a função de células T efetoras, com o principal intuito de minimizar os danos teciduais causados por reações inflamatórias, como também para evitar reações autoimunes. Contudo, células tumorais podem expressar PD-L1 com o objetivo de impedir sua destruição pelas células T efetoras, ocasionando a evasão das células tumorais através do sistema imune (SHOSU et al., 2016). Dieci et al. (2020) relataram que a marcação imuno-histoquímica de PD-L1 conferiu informações prognósticas em pacientes com câncer de mama triplo negativo (TNBC), além dos linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

Em 30 a 50% dos tumores de mama humanos, o receptor PD-L1 superexpresso pôde ser encontrado na superfície celular (LA CRUZ; CZERNIECKI, 2018). Da mesma forma, Grosso et al. (2013) observaram que 18% (6/33) das amostras de TNBC em mulheres foram PD-L1+ com uma marcação do tipo membranar. Nossa expectativa era a de que PD-L1 estivesse expresso apenas na membrana celular, visto que realiza uma função importante nessa localização em células normais. Entretanto, observamos marcação do tipo citoplasmática em células epiteliais, como também em TILs nos tumores de mama. Apesar da localização membranar do PD-L1 ser descrita como a mais frequentemente encontrada, sua expressão já foi identificada em diferentes compartimentos celulares (HANKS, 2022). Ariyaratna et al. (2020) observaram tanto marcação citoplasmática como membranar em células tumorais e células imune infiltradas no tumor em tumores de mama caninos, com taxas de expressão variáveis de PD-L1. Semelhantemente, Maekawa et al. (2016) relataram que 80% (4/5) das amostras de adenocarcinoma mamário canino expressaram PD-L1 tanto na membrana como no citoplasma das células tumorais.

Algumas proteínas de membrana, incluindo a PD-L1, podem ser transportadas pelos endossomos de reciclagem até a superfície das células, ou seja, podendo-se translocar para o citoplasma, e o PD-L1 já foi encontrado em endossomos de reciclagem (WANG et al., 2018). Segundo Burr et al. (2017), a proteína CMTM6 foi descrita como responsável por manter a localização de PD-L1 na superfície celular. Ela também atua nos endossomos de reciclagem, evitando que o PD-L1 seja degradado por lisossomos, ou seja, quando há falta de CMTM6, a PD-L1 pode ser transportada pelos endossomos de reciclagem até o citoplasma.

O papel da PD-L1 quando expressa no citoplasma das células tumorais tem sido investigado, indicando que a mesma desempenha uma função na tumorigênese (HANKS, 2022). A expressão citoplasmática de PD-L1 induz sinais antiapoptóticos em células tumorais, resultando em proteção contra morte causada por linfócitos T citotóxicos (AZUMA et al., 2008).

Satelli et al. (2016) relataram que a expressão nuclear de PD-L1 em células tumorais circulantes foi associada a menor sobrevida em pacientes com câncer colorretal e câncer de próstata. Desta forma, sugeriram que a translocação nuclear de PD-L1 pode apresentar informações prognósticas importantes nesses cânceres. A localização nuclear de PD-L1 possui um papel regulatório importante, atuando na diminuição da imunidade antitumoral

induzida por células T, ou seja, favorecendo o desenvolvimento tumoral devido ao aumento da transcrição de moléculas imunossupressoras adicionais como PD-L2 e B7-H3, conhecidos por atuarem como ligantes de *checkpoints* imunológicos (QU et al., 2022). Segundo Ghebeh et al. (2010), o tratamento quimioterápico utilizando a doxorrubicina regula positivamente a expressão de PD-L1 no núcleo de células tumorais no câncer de mama, e regula negativamente sua expressão da membrana celular.

Em nosso estudo, 69,49% expressaram PD-L1 apenas no citoplasma, enquanto 30,51% expressaram no núcleo e no citoplasma. Porém, não encontramos associação entre a expressão citoplasmática e/ou nuclear de PD-L1 e a sobrevida pós-cirúrgica. Wu et al. (2019) observaram que 50% dos pacientes com câncer de mama que passaram por quimioterapia neoadjuvante expressaram PD-L1 nas células tumorais. Pacientes com tumores positivos para PD-L1 tiveram menor sobrevida do que os com tumores negativos e, além disso, não foi encontrada correlação entre a expressão de PD-L1 e de HER2, RE e RP. Dieci et al. (2020) sugeriram que é relevante testar inibidores de *checkpoint* imunológico no cenário pós-neoadjuvante, uma vez que foi comprovado o aumento da expressão de PD-L1 na doença residual após a quimioterapia.

Em cães, são escassas as informações acerca da expressão de PD-L1 em câncer de ocorrência natural (AMBROSIUS et al., 2017). Maekawa et al. (2021), relataram alta expressão de PD-L1 em diferentes tipos de tumores malignos em cães: 90% para carcinoma de células escamosas, 100% para adenocarcinoma nasal, 100% para carcinoma de células transicionais, 95% para carcinoma da glândula do saco anal, 70% para sarcoma de partes moles, 100% para osteossarcoma, 95% para melanoma oral, 100% para adenocarcinoma mamário, 90% para sarcoma histiocítico, 85% para linfoma difuso de grandes células B e 80% para adenocarcinoma gástrico. Shosu et al. (2016) avaliaram a expressão de PD-L1 por imuno-histoquímica em tumores mamários caninos e observaram que 4/6 adenocarcinomas e 6/9 adenomas expressaram o ligante, porém não analisaram o valor prognóstico do marcador nestes casos. No presente estudo, 71,95% (59/82) dos tumores mamários expressaram a proteína PD-L1 em células tumorais.

Hartley et al. (2016) analisaram 14 linhagens de células derivadas de diversos tumores caninos como melanoma, carcinoma de células de transição, hemangiossarcoma, mastocitoma, câncer de tireoide, linfoma de células T, osteossarcoma e sarcoma histiocítico,

assim como cultura celular de macrófagos e monócitos caninos. A expressão de PD-L1 foi analisada por citometria de fluxo e verificou-se que PD-L1 foi expresso em nível basal em todas as linhagens analisadas. Além disso, a combinação de algumas citocinas de células T com Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) estimulou a expressão tumoral de PD-L1. Desta forma, estes autores sugeriram que a citocina primária produzida por células T, responsável por controlar a expressão de PD-L1 em células de tumores caninos e macrófagos, é a IFN- $\gamma$ .

Ao nosso conhecimento, Ariyaratna et al. (2020) foram os únicos a investigar a associação entre a expressão de PD-L1 e dados clínicos em cadelas com tumores mamários. Estes autores observaram escores mais altos de imunomarcção para PD-L1 em tumores de mama malignos e menor sobrevida. Os tumores benignos apresentaram escores de imunomarcção significativamente menores. Ainda, estes autores verificaram que 11 dos 41 tumores mamários malignos expressaram PD-L1 em linfócitos intratumorais, entretanto, a expressão nessas células não foi associada ao desenvolvimento de metástases. Em nosso estudo, apenas as células tumorais foram avaliadas para a expressão de PD-L1, TILs que expressaram o ligante não foram levados em consideração para a análise, uma vez que já são descritos para expressar esse ligante em situações de comprometimento celular, atuando na regulação da autoimunidade.

No presente estudo, a positividade para PD-L1 foi um indicador para maior sobrevida pós-cirúrgica ( $p=0,0421$ ). Apesar de ser conhecido por promover a evasão das células tumorais através da supressão das células T, alguns estudos têm demonstrado que a expressão de PD-L1 pode ter um valor prognóstico favorável no câncer de mama. Schalper et al. (2014) relataram que a expressão de mRNA de PD-L1 foi associada a maior sobrevida livre de recorrência em carcinomas mamários em mulheres. Os mesmos autores sugerem que possivelmente, a expressão de PD-L1 pelas células tumorais pode refletir uma pressão imunológica antitumoral induzida por antígeno, mediada por linfócitos infiltrantes de tumor, não contribuindo desta forma com a evasão imune. Semelhantemente, Xiaoxian et al. (2016) afirmam que a expressão de PD-L1 em mulheres com câncer de mama triplo negativo está relacionada a maior sobrevida livre de doença. Porém, quando comparada à expressão dos outros marcadores estudados (RE, RP, CD8, Ki67, calponina e HER2) não houve associação significativa no presente estudo, assim como observado por Wu et al. (2019) em um estudo realizado em mulheres com câncer de mama.

O valor prognóstico da expressão de PD-L1 em tumores humanos ainda é controverso e os resultados são variados (PARDOLL, 2016). Isso significa que não há consenso sobre o *status* de expressão de PD-L1 em cada tipo de câncer, além do mais, são poucos os estudos que avaliaram a expressão de PD-L1 em cânceres caninos, como também seu valor prognóstico (MAEKAWA et al., 2021). Acreditamos que a falta de padronização para analisar a expressão do PD-L1 e a grande variedade de anticorpos disponíveis possam afetar os resultados obtidos em diferentes estudos. Além disso, a expressão de PD-L1 nas células tumorais apresenta um padrão de marcação heterogêneo, já descrita em membrana, estroma, citoplasma e núcleo das células tumorais, desta forma, podendo dificultar a análise de sua expressão. Wu et al. (2019) sugerem que o valor prognóstico de PD-L1 pode depender, ainda, de diferentes subtipos de câncer de mama.

A marcação de LTR FOXP3+ nos tumores de mama em cadelas foi bastante específica e definida, observando-se marcação do tipo nuclear, de fácil identificação e compatível com o que é esperado para esta proteína. Em cães, poucos estudos avaliaram a expressão de LTR FOXP3+ e seu papel prognóstico. Sakai et al. (2017), avaliaram a expressão de LTR em tumores malignos caninos de diferentes tipos histopatológicos: melanoma oral maligno, carcinoma espinocelular oral, adenocarcinoma pulmonar e mastocitoma, em áreas intratumorais, e observaram que a infiltração de LTR está associada a fatores de mau prognóstico, metástase à distância e acometimento linfonodal em carcinomas mamários e melanoma maligno oral. Ademais, em melanoma e carcinoma espinocelular orais e adenocarcinoma pulmonar, a alta densidade de LTR FOXP3+ foi associada à menor sobrevida global. O aumento do infiltrado de LTR FOXP3+ em tumores melanocíticos em cães foi associado ao maior risco de morte segundo um estudo realizado por Porcellato et al. (2020). Entretanto, Yasumaru et al. (2021) não encontraram relação entre a presença de LTR FOXP3+ e a sobrevida em cães com melanoma oral.

Parisi et al. (2023) analisaram a expressão imuno-histoquímica de LTR FOXP3+ em adenomas e carcinomas mamários caninos em diferentes áreas: compartimento intratumoral, estroma adjacente e estroma distante. Eles observaram que 98% dos carcinomas mamários apresentaram LTR FOXP3+ infiltrados, e que o número dessas células foi maior nos carcinomas. Além disso, características como tipo histológico, graduação e presença de invasão linfática foram significativamente correlacionadas com o alto número de

LTR FOXP3+. O maior número de LTR FOXP3+ foi associado a menor sobrevida, desta forma, sendo considerado um marcador prognóstico negativo. Kim et al. (2012) observaram que, em tumores com indicadores de mau prognóstico, contendo necrose, invasão linfática e alto grau histológico, havia maior infiltrado de LTR intratumorais. Estes autores sugeriram que os LTR podem exercer uma função fundamental na progressão do tumor, suprimindo a ação antitumoral do sistema imune.

Oh et al. (2012) observaram que 22,6% dos tumores mamários analisados foram positivos para FOXP3, e que 95% (38/40) dos tumores benignos e 45,5% (10/22) dos malignos expressaram em <25% de células tumorais em tumores benignos e malignos respectivamente. Características como a presença de inflamação e o tamanho tumoral foram correlacionadas positivamente com a expressão de FOXP3. Em nosso estudo, a proteína FOXP3 foi expressa em 60% (21/35) dos tumores mamários caninos em LTR. Merlo et al. (2009) sugeriram que a expressão da proteína FOXP3 em mulheres com câncer de mama pode ser um fator prognóstico útil. Neste estudo, sua expressão foi associada com a pior sobrevida global.

Considerando seu papel no microambiente tumoral, impedindo os processos inflamatórios e, desta forma, beneficiando a progressão das células tumorais, nossa expectativa era que o infiltrado de LTR FOXP3+ estivesse relacionado a pior prognóstico. Entretanto, não observamos relação significativa entre sua expressão e a sobrevida pós-cirúrgica. Acreditamos que isso tenha acontecido devido ao pequeno número de amostras nas quais foram feitas as análises imuno-histoquímicas para este anticorpo. Infelizmente houve problemas com as duas alíquotas de anticorpo recentemente adquiridas, que não apresentaram reatividade satisfatória. Além disso, alguns animais passaram por quimioterapia após a cirurgia, o que pode ter influenciado na análise de sobrevida. Devido ao papel imunossupressor dos LTR FOXP3+, estudos que elucidem os mecanismos por trás de suas funções são de suma importância, principalmente no desenvolvimento de terapias antitumorais eficientes (KOIKE et al., 2020; QIU et al., 2022).

Dieci et al. (2020), observaram que as células T CD8+ são o principal subtipo de linfócito infiltrante no câncer de mama triplo negativo (TNBC) em mulheres. O alto escore de LTC CD8+ no TNBC em mulheres foi indicador de maior sobrevida (OSHI et al., 2020) e um fator prognóstico positivo para pacientes com carcinoma de mama ductal invasivo (Peng et

al., 2019). Stanton e Disis (2016) observaram que maiores infiltrados de LTC CD8+ intratumorais está relacionada a maiores sobrevidas em pacientes com câncer de mama.

Yasumaru et al. (2021) sugeriram que a avaliação de TILs é importante para prever a agressividade do tumor e o prognóstico no melanoma oral em cães. Foram observadas maiores pontuações de TILs, especialmente LTC CD8+ infiltrados no tumor, em pacientes com maior sobrevida. Estrela-Lima et al. (2010) notaram que a presença de LTC CD8+ foi indicador da ausência de metástase e maior sobrevida em cadelas com carcinoma mamário. Por essa razão, sugeriram que a infiltração por TILs e a abundância de linfócitos T CD4+ e CD8+ podem caracterizar biomarcadores prognósticos importantes de sobrevida em cadelas com carcinomas mamários. Entretanto, Franzoni et al. (2019) avaliaram a associação de células T CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos infiltrantes de tumor com os parâmetros clínicos de cadelas com câncer de mama e observaram que cães com maior número de células inflamatórias apresentaram menor sobrevida.

Em nosso estudo, a marcação de LTC CD8+ nos tumores de mama foi do tipo membranar e citoplasmática. Observamos que menos da metade dos tumores mamários analisados apresentaram LTC CD8+. Esperávamos encontrar relação entre a expressão de CD8 e indicadores de bom prognóstico, uma vez que os LTC CD8+ são peças-chave para a resposta imune antitumoral devido à sua atividade citotóxica (XIE; DING; CHEN, 2021). Porém, sua expressão não foi associada estatisticamente a sobrevida pós-cirúrgica, nem diferiu significativamente entre os tumores benignos, menos agressivos e mais agressivos, ou entre casos positivos e negativos para PD-L1.

Em relação às taxas de expressão do RE, nossos resultados se contrapõem aos de Nguyen et al. (2018), que relataram apenas 16,3% dos tumores como RE+, sendo que os negativos foram os mais comuns em sua casuística, chegando a 58% dos casos. Além disso, quando comparados à recidiva locorregional, a negatividade para RE foi um fator prognóstico forte no referido estudo. Em nosso estudo, 73,81% (31/42) dos tumores foram positivos para RE. Brunetti et al. (2021a) analisaram o perfil de expressão do RE, Ki67 e TP53 em 170 carcinomas mamários caninos e observaram que 40,5% das amostras expressaram RE. Os casos positivos para RE tiveram sobrevida mais longa do que os negativos. Neste mesmo estudo, 48,3% dos tumores de grau I, 50% dos tumores grau II, e 17,7% dos tumores grau III expressaram RE, com associação significativa do RE ao baixo grupo de malignidade e



baixo grau histológico. Utilizando um valor de corte de 33% para Ki67, a maioria dos tumores (76,2%) foi classificada como baixa atividade proliferativa. Portanto, estes autores concluíram que o RE é um indicador prognóstico útil, relacionado à menor atividade proliferativa e comportamento clínico menos agressivo, sugerindo que as avaliações das expressões de RE, TP53 e Ki67 sejam realizadas de forma rotineira.

Os tumores negativos para RP foram a maioria (68,29%) em nossa casuística. Thuróczy et al. (2007) também observaram que tumores malignos apresentam menor expressão de receptores de progesterona, e um maior número de células positivas para Ki67. Geraldes et al. (2000) avaliaram o perfil de receptores hormonais e a proliferação celular em tumores mamários caninos espontâneos, sendo 11 benignos e 10 malignos. Apesar do reduzido número de amostras avaliadas, os autores verificaram que os tumores malignos que não expressaram o receptor de progesterona tiveram maiores taxas de proliferação, postulando que a diminuição na dependência de hormônios esteroides é acompanhada pela progressão da malignidade em tumores mamários caninos espontâneos. Em nosso estudo, apenas uma pequena parcela dos animais apresentou tumores com alta atividade proliferativa (12,5%) e não foram encontradas diferenças significantes quanto à sobrevida pós-cirúrgica quando comparados aos de baixa proliferação. Devido ao número reduzido de tumores altamente proliferativos com amostras processadas para RE e RP, não foi possível avaliar as relações entre estes parâmetros.

Nossos resultados mostram 29,17% dos tumores como positivos para HER2, semelhante ao relatado por Abadie et al. (2018). Gama et al. (2008) relataram que 21% dos carcinomas mamários caninos expressaram HER2 com os escores 2+ e 3+. Da mesma forma, Hsu et al. (2009) observaram que, em 29,7% dos casos de tumores malignos, a proteína HER2 foi superexpressa, com os escores 2+ e 3+. Estes também relataram associação entre a superexpressão de HER2 e o *status* de ovário-histerectomia: cadelas que passaram pelo procedimento cirúrgico antes ou no momento da remoção do tumor foram mais propensas a apresentar superexpressão da proteína HER2 do que as que não passaram por cirurgia. Outra observação de Hsu et al. (2009) foi de que cães com tumores malignos positivos para HER2 apresentaram sobrevida global mais longa, sugerindo que o desenvolvimento da malignidade do tumor pode não estar relacionado à superexpressão de HER2 como acontece em humanos, para os quais a superexpressão é associada a altas taxas de recorrência e

mortalidade (AHN et al., 2020). Bertagnolli et al. (2011) detectaram superexpressão de HER2 em 11% de 46 carcinomas em tumor misto benignos (CBMTs) em cadelas. A expressão de HER2 que variou entre os componentes histológicos benigno, epitelial invasivo maligno, epitelial maligno não-invasivo. Estes autores sugerem que a superexpressão de HER2 pode não estar relacionada à obtenção de um fenótipo epitelial maligno. Entretanto, Brunetti et al. (2021b), afirmam que a positividade para HER2 está associada a tumorigênese em carcinomas mamários caninos.

Em nosso estudo, os animais com tumores positivos para HER2 tiveram menor sobrevida do que com tumores HER2 negativos ( $p=0,0372$ ), apesar do pequeno número de casos no qual foi avaliada sua expressão ( $n=24$ ). Segundo Peña et al. (2014), devido às diferentes metodologias processamento das amostras e avaliação das marcações, os resultados quanto ao valor prognóstico de HER2 são de difícil comparação entre os estudos realizados em cães.

Diferentemente de humanos, os tumores de mama caninos apresentam uma elevada proliferação de células mioepiteliais. Alonso-Diez et al. (2019) observaram que 32/43 do mioepiteliomas malignos, 12/13 dos carcinomas e mioepiteliomas malignos, e todos os 5 hemangiossarcomas expressaram calponina. Em nosso estudo, 80,95% (34/42) dos carcinomas mamários expressaram calponina citoplasmática em células mioepiteliais. Além disso, foi observada uma marcação também em células musculares lisas vasculares, como descrito por Lopuszynski et al. (2019). Porém, não foi encontrada qualquer associação entre a expressão de calponina e a sobrevida pós-cirúrgica ( $p=0,4957$ ).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A divisão de tumores mamários malignos em dois grupos histológicos: menos agressivos e mais agressivos se mostrou eficaz, demonstrando que essa divisão pode ser útil em análises comparativas utilizando neoplasias mamárias malignas.
- ✓ Nossos resultados mostram que a ausência de expressão de PD-L1 em células epiteliais tumorais é um indicador de menor sobrevida pós-cirúrgica em cadelas com carcinomas mamários, sugerindo que a positividade para essa ligante pode ser um indicador de melhor prognóstico.
- ✓ Cães com carcinomas mamários positivos para HER2 tiveram uma sobrevida pós-cirúrgica significativamente menor que tumores HER2 negativos, sugerindo que, assim como em mulheres, esse marcador pode oferecer informações prognósticas em cadelas com carcinomas mamários. Porém, devido ao pequeno número de casos analisados no presente estudo, acreditamos que essas análises tenham que ser ampliadas a um maior número amostral para confirmar nossos achados.
- ✓ A expressão dos receptores hormonais de estrógeno e progesterona, o índice de Ki67 e a expressão de Calponina não apresentaram valor prognóstico em nossas análises.
- ✓ O infiltrado de LTC CD8+ não conferiu informações prognósticas em tumores mamários caninos e a análise de um maior número de casos para avaliar o infiltrado de LTR FOXP3+ será realizada, em breve, para a confirmação ou não dos resultados preliminares aqui apresentados. Acreditamos que o pequeno número amostral possa ter interferido na análise da expressão desse marcador.

## REFERÊNCIAS

ABADIE, J.; NGUYEN, F.; LOUSSOUARN, D.; PEÑA, L.; GAMA, A.; RIEDER, N.; BELOUSOV, A.; BEMELMANS, I.; JAILLARDON, L.; IBISCH, C.; CAMPONE, M. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 2, p. 459-468, 2018.

ADAMS, V. J.; EVANS, K. M.; SAMPSON, J.; WOOD, J. L. N. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, n. 10, p. 512-524, 2010.

AHN, S.; WOO, J. W.; LEE, K.; PARK, S. Y. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 54, n. 1, p. 34-44, 2020.

ALENZA, P. D.; RUTTEMAN, G. R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A. C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of veterinary internal medicine**, v.12, n. 3, p. 132-139, 1998.

ALONSO-DIEZ, A.; RAMOS, A.; ROCCABIANCA, P.; BARRENO, L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; TECILLA, M.; AVALLONE, G.; GAMA, A.; PEÑA, L. Canine Spindle Cell Mammary Tumor: A Retrospective Study of 67 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 4, p. 526-535, 2019.

AMBROSIUS, L. A.; DHAWAN, D.; RAMOS-VARA, J. A.; RUPLE, A.; KNAPP, D. W.; CHILDRESS, M. O. Quantification and prognostic value of programmed cell death ligand-1 expression in dogs with diffuse large B-cell lymphoma, **American journal of veterinary research**, v. 79, n. 6, p. 643-649, 2017.

ARIYARATHNA, H.; THOMSON, N. A.; ABERDEIN, D.; PERROTT, M. R.; MUNDAY, J.S. Increased programmed death ligand (PD-L1) and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) expression is associated with metastasis and poor prognosis in malignant canine mammary gland tumours. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.230, n. 110142, p. 1-10, 2020.

AZUMA, T.; YAO, S.; ZHU, G.; FLIES, A. S.; FLIES, S. J.; CHEN, L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. **Blood**, v.111, n. 7, p.3635-3643, 2008.

BERTAGNOLLI, A. C.; FERREIRA, E.; DIAS, E. J.; CASSALI, G. D. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 8, p. 312-317, 2011.

BILLER, B.J.; ELMSLIE, R.E.; BURNETT, R.C.; AVERY, A.C.; DOW, S.W. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.116, p. 69-78, 2007.

BLANK, C.; MACKENSEN, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to Tcell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunol Immunother**, v. 56, n. 5, p. 739-745, 2007.

BRUNETTI, B.; BACCI, B.; ANGELI, C.; BENAZZI, C.; MUSCATELLO, L. V. p53, ER, and Ki67 Expression in Canine Mammary Carcinomas and Correlation With Pathological Variables and Prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 2, p. 325-331, 2021(a).

BRUNETTI, B.; BACCI, B.; SARLI, G.; PANCIONI, E.; MUSCATELLO, L. V. Immunohistochemical Screening of HER2 in Canine Carcinomas: A Preliminary Study. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 1-6, 2021(b).

BURR, M. L.; SPARBIER, C. E.; CHAN, Y. C.; WILLIAMSON, J. C.; WOODS, K.; BEAVIS, P. A.; LAM, E. Y. N.; HENDERSON, M. A.; BELL, C. C.; STOLZENBURG, S.; GILAN, O.; BLOOR, S.; NOORI, T.; MORGENS, D. W.; BASSIK, M. C.; NEESON, P. J.; BEHREN, A.; DARCY, P. K.; DAWSON, S. J.; VOSKOBOINIK, I.; DAWSON, M. A. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. **Nature**, v.549, n.7670, p. 101–105, 2017.

CANADAS, A.; FRANÇA, M.; PEREIRA, C.; VILAÇA, R.; VILHENA, H.; TINOCO, F.; SILVA, M. J.; RIBEIRO, J.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, P.; DIAS-PEREIRA, P.; SANTOS, M. Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. **Veterinary Pathology**, v.56, n. 2, p.208-219, 2019.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnostic, Prognostic and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnostic, Prognostic and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2013.

CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 10, n. 3, p. 87-99, 2017.

CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Editora MEDVET, 2017.

CASSALI, G.; JARK, P. C.; GAMBA, C.; DAMASCENO, K. A.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; HORTA, R. S.; FIRMO, B. F.; SUEIRO, F. A. R.; RODRIGUES, L. C. S.; NAKAGAKI, K. Y. R. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555-574,2020.

CHOI, J. W.; WITHERS, S. S.; CHANG, H.; SPANIER, J. A.; DE LA TRINIDAD, V. L.; PANESAR, H.; FIFE, B. T.; SCIAMMAS, R.; SPARGER, E. E.; MOORE, P. E.; KENTID, M. F.; REBHUNID, R. B.; MCSORLEY, S. J. Development of canine PD-1/PD-L1 specific monoclonal antibodies and amplification of canine T cell function. **Plos One**, v. 15, n. 7, p. 1-23, 2020.

COY, J.; CALDWELL, A.; CHOW, A.; DOW, S. PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 4, p. 1487-1502, 2017.

DE LA CRUZ, L. M.; CZERNIECKI, B. J. Immunotherapy for Breast Cancer is Finally at the Doorstep: Immunotherapy in Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 10, p. 2852-2857, 2018.

DIECI, M. V.; TSVETKOVA, V.; GRIGUOLO, MIGLIETTA, F.; TASCA, G.; ALBERTO, A. G.; CUMERLATO, E.; MASSA, D.; LO MELE, ORVIETO, E.; GUARNERI, V.; CONTE, P. Integration of tumour infiltrating lymphocytes, programmed cell-death ligand-1, CD8 and FOXP3 in prognostic models for triple-negative breast cancer: Analysis of 244 stage IeIII patients treated with standard therapy. **European Journal of Cancer**, v. 136, p. 7-15, 2020.

DOMINGUES, A. C. M.; BHATT, D.; LEPIQUE, A. P. Resposta Imune e Evasão. In: CHAMMAS, R.; FOLGUEIRA, M. A. K.; VILLA, L. L. **ONCOLOGIA: Da Molécula à clínica**. São Paulo: Editora dos Editores, 2022. cap.16, p. 287-288.

DONG, Y.; YANG, C.; PAN, F. Post-Translational Regulations of Foxp3 in Treg Cells and Their Therapeutic Applications. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1-16, 2021.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three es of cancer immunoediting. **Annual review of immunology**, v.22, p. 329-360, 2004.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUINMELO, S. M.; CARDOSO, S. V.; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Research article Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, n. 256, p. 1-14, 2010.

FARHOOD, B.; NAJAFI, M.; MORTEZAEE, K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8509-8521, 2018.

FRANZONI, M. S.; BRANDIA, A.; MATOS, J. K. O.; ELIAS, P. F.; DALMOLIN, LAINETTIA, P. D. F.; M. C. M.; LEIS-FILHO, P. A. F.; FONSECA-ALVES, C. E. Tumor-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes and macrophages are associated with prognostic factors in triple-negative canine mammary complex type carcinoma. **Research in Veterinary Science**, v. 126, p. 29-36, 2019.

GAMA, A.; ALVEZ, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Arch**, v. 453, p. 123-132, 2008.

GERALDES, M.; GARTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Veterinary Record**, v. 146, p. 403-406, 2000.

GHEBEH, H.; LEHE, C.; BARHOUSH, E. ; AL-ROMAIIH, K.; TULBAH, A.; AL-ALWAN, M.; HENDRAYANI, S. F.; MANOGARAN, P.; ALAIYA, A.; AL-TWEIGERI, T.; ABOUSSEKHRA, A.; DERMIME, S. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. **Breast cancer research : BCR**, v. 12, n. 4, p. 1-12, 2010.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E. P.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; PICCART-GEBHART, M.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, p. 2206-2223, 2013.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GROSSO, J.; INZUNZA, D.; WU, Q.; SIMON, J.; SINGH, P.; ZHANG, X.; PHILIPS, P. S.; COGSWELL, J. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. **Journal for immunotherapy of cancer**, n. 53, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n.5, p. 646- 674, 2011.

HANKS, B. A. The 'Inside' Story on Tumor-expressed PD-L1. **Cancer Research**, v. 82, n. 11, p. 2069-2071, 2022.

HARTLEY, G.; ELMSLIE, R.; DOW, S.; GUTH, A. Checkpoint molecule expression by B and T cell lymphomas in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 3, p. 1-9, 2018.

HARTLEY, G.; FAULHABER, E.; CALDWELL, A.; COY, J.; KURIHARA, J.; GUTH, A.; REGAN, D.; DOW, S. Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 2, p. 534-549, 2016.

HASHMI, A. A.; HASHMI, K. A.; IRFAN, M.; KHAN, S. M.; EDHI, M. M.; ALI, J. P.; HASHMI, S. K.; ASI, H.; FARIDI, N.; KHAN, A. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 605, p. 1-5, 2019.

HSU, W. L.; HUANG, H. M.; LIAO, J. W.; WONG, M. L.; CHANG, S. C. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. **The Veterinary Journal**, v. 180, p. 116-123, 2009.

IM, K. S. ; KIM, N. H.; LIM, H. Y.; KIM, H. W.; SHIN, J. I.; SUR, J. H. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 549, p. 1-12, 2014.

JIN, Y. H.; HUA, Q. F.; ZHENG, J. J.; MA, X.H.; CHEN, T. X.; ZHANG, S.; CHEN, B.; DAI, Q.; ZHANG, X.H. Diagnostic Value of ER, PR, FR and HER-2- Targeted Molecular Probes for Magnetic Resonance Imaging in Patients with Breast Cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 271-281, 2018.

KIM, J. H.; HUR, J. H.; LEE, S.M.; IM, K. S.; KIM, N. H.; SUR, J. H. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 222-227, 2012.

KLOPFLEISCH, R.; EULER, H. V.; SARLI, G.; PINHO, S. S.; GARTNER, F.; GRUBER, A. D. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 98-116, 2011.

KOCIKOWSKI, M.; DZIUBEK, K.; PARYS, M. Hyperprogression Under Immune Checkpoint-Based Immunotherapy-Current Understanding, The Role of PD-1/PD-L1 Tumour-Intrinsic Signalling, Future Directions and a Potential Large Animal Model. **Cancers**, v. 12, p. 1-19, 2020.

KOIKE, K.; DEHARI, H.; OGI, K.; SHIMIZU, S.; NISHIYAMA, K.; SONODA, T.; SASAKI, T.; SASAYA, T.; TSUCHIHASHI, T.; HASEGAWA, T.; TORIGOE, T.; HIRATSUKA, H.; MIYAZAK, A. Prognostic value of FoxP3 and CTLA-4 expression in patients with oral squamous cell carcinoma. **Plos One**, v. 15, n. 8, p. 1-17, 2020.

KORNEPATI, A. V. R.; VADLAMUDI, R. K.; CURIEL, T. J. (2022). Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. **Nature reviews. Cancer**, v.22, n.3, p. 174-189, 2022.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumores da glândula mamária. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; MACEWEN'S. **Small Animal Clinical Oncology**. Missouri (EUA), Saunders Elsevier, 2007. p. 263.

LAVALLE, G.U.; CAMPOS, C.B.; HORTA, R.S. Cirurgia das Neoplasias da Glândula Mamária. In: CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo, 2017, cap. 14, p. 161-175.

LIU, Q.; CHENG, R.; KONG, X.; WANG, Z.; FANG, Y.; WANG, J. Molecular and Clinical Characterization of PD-1 in Breast Cancer Using Large-Scale Transcriptome Data. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-13, 2020.

ŁOPUSZYŃSKI, W.; SZCZUBIAŁ, M.; MILLÁN, Y.; GUIL-LUNA, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, R.; MARTIN DE LAS MULAS, J.; ŚMIECH, A.; BULAK, K. Immunohistochemical expression of p63 protein and calponin in canine mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 232-238, 2019.

LUDIN, A.; ZON, L. I.; The dark side of PD-1 receptor inhibition. **Nature**, v. 552, n. 7683, p. 41-42, 2017.



MAEKAWA, N.; KONNAI, S.; IKEBUCHI, R.; OKAGAWA, T.; ADACHI, M.; TAKAGI, S.; KAGAWA, Y.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; MURATA, S. Expression of PD-L1 on Canine Tumor Cells and Enhancement of IFN- $\gamma$  Production from Tumor Infiltrating Cells by PD-L1 Blockade. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1-14, 2014.

MAEKAWA, N.; KONNAI, S.; NISHIMURA, M.; KAGAWA, Y.; TAKAGI, S.; HOSOYA, K.; OHTA, H.; KIM, S.; OKAGAWA, T.; IZUMI, Y.; DEGUCHI, T.; KATO, Y.; YAMAMOTO, S.; YAMAMOTO, K.; TODA, M.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; MURATA, S.; OHASHI, K. PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma. **Nature/Precision Oncology**, v. 5, n. 10, p. 1-9, 2021.

MAEKAWA, N.; KONNAI, S.; OKAGAWA, T.; NISHIMORI, A.; IKEBUCHI, R.; IZUMI, Y.; TAKAGI, S.; KAGAWA, Y.; NAKAJIMA, C.; SUZUKI, Y.; KATO, Y.; MURATA, S.; OHASHI, K. Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. 1-13, 2016.

MERLO, A.; CASALINI, P.; CARCANGIU, M. L.; MALVENTANO, C.; TRIULZI, T.; MÉNARD, S.; TAGLIABUE, E.; BALSARI, A. FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 11, p. 1746-1752, 2009.

MESSEHA, S. S.; ZARMOUH, N. O.; SOLIMAN, K. F. A. Polyphenols Modulating Effects of PD-L1/PD-1 Checkpoint and EMT-Mediated PD-L1 Overexpression in Breast Cancer. **Nutrients**, v. 13, p. 1-26, 2021.

NENOMOTO, Y.; SHOSU, K.; OKUDA, M.; NOGUCHI, S.; MIZUNO, T. Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 198, p. 19-25, 2018.

NGUYEN, F.; PEÑA, L.; IBISCH, C.; LOUSSOUARN, D.; GAMA, A.; RIEDER, N.; BELOUSOV, A.; CAMPONE, M.; ABADIE, J. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 3, n. 167, p. 635-648, 2018.

OH, S. Y.; RYU, H. H.; YOO, D. Y.; HWANG, I. K.; KWEON, O. K.; KIM, W. H. Evaluation of FOXP3 expression in canine mammary gland tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 12, n. 1, p. 20-28, 2014.

O'MALLEY, D. P.; YANG, Y.; BOISOT, S.; SUDARSANAM, S.; WANG, J. F.; CHIZHEVSKY, V.; ZHAO, G.; ARAIN, S.; WEISS, L. M. Immunohistochemical detection of PD-L1 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology**, v. 32, n. 7, p. 929-942, 2019.

OSHI, M.; ASAOKA, M.; TOKUMARU, Y.; YAN, L.; MATSUYAMA, R.; ISHIKAWA, T.; ENDO, I.; TAKABE, K. CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6968, p. 1-16, 2020.

OWEN, L. N. Classification of Tumors in Domestic Animals, 1<sup>st</sup> ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1980. PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews. Cancer**, v.12, n. 4, p. 252–264, 2016.

PARISI, F.; MILLANTA, F.; NICASTRO, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Confirmation of the Prognostic Value of Foxp3+ Cells in Canine Mammary Tumors. **Animals**, v.13, n.3, p 1-10, 2023.

PEÑA, L.; DE ANDRÉS, P. J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PÉREZ-ALENZA, M. D. Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up : Relationship With Clinical and Histological Characteristics. **Veterinary Pathology**, v. 0, n. 0, p. 1-12, 2012.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; GÄRTNER, D. F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M. A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; LAS MULAS, J.M. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 127-145, 2014.

PENG, G. L.; LI, L.; GUO, Y. Y.; YU, P.; YIN, X. J.; WANG, S.; LIU, C. P. Chun-Ping Liu. CD8+ cytotoxic and FoxP3+ regulatory T lymphocytes serve as prognostic factors in breast cancer. **American journal of translational research** , v. 11, n. 8, p. 5039-5053, 2019.

PORCELLATO, I.; BRACHELENTE, C.; CAPPELLI, K.; MENCHETTI, L.; SILVESTRI, S.; SFORNA, M.; MECOCCI, S.; IUSSICH, S.; LEONARDI, L.; MECHELLI, L. FoxP3, CTLA-4, and IDO in Canine Melanocytic Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 1, p. 42-52, 2020.

POSTOW, M. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J.D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. **Journal of clinical oncology**, v. 33, n. 17, p. 1-10, 2015.

QIU, Y., KE, S., CHEN, J., QIN, Z., ZHANG, W., YUAN, Y., MENG, D., ZHAO, G., WU, K., LI, B.; LI, D. FOXP3+ regulatory T cells and the immune escape in solid tumours. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 1-14, 2022.

QU, L., JIN, J., LOU, J., QIAN, C., LIN, J., XU, A., LIU, B., ZHANG, M., TAO, H., & YU, W. The nuclear transportation of PD-L1 and the function in tumor immunity and progression. **Cancer immunology, immunotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2313–2323, 2022.

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ZAPPULLI, V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 571-578, 2017.

SAKAI, K.; MAEDA, S. ; YAMADA, Y.; CHAMBERS, J. K.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; YONEZAWA, T.; MATSUKI, N. 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.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015.

SALMI, S.; LIN, A.; HIRSCHOVITS-GERZ, B.; VALKONEN, M.; AALTONEN, N.; SIRONEN, R.; SIISKONEN, H.; PASONEN-SEPPÄNEN, S. The role of FoxP3+ regulatory T cells and IDO+ immune and tumor cells in malignant melanoma – an immunohistochemical study. **BMC Cancer**, v. 21, n. 641, p. 1-13, 2021.

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC veterinary research**, v. 6, n. 5, p. 1-9, 2010.

SATELLI, A.; BATH, I. S.; BROWNLEE, Z.; ROJAS, C.; MENG, Q. H.; KOPETZ, S.; LI, S. Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. **Scientific reports**, v.6, n. 28910, p. 1-7, 2016.

SCHALPER, K. A., VELCHETI, V., CARVAJAL, D., WIMBERLY, H., BROWN, J., PUSZTAI, L., & RIMM, D. L. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. **Clinical cancer research** : an official journal of the American Association for Cancer Research, v. 20, n. 10, p. 2773–2782, 2014.

SCHICK, J.; RITCHIE, R.P.; RESTINI, C. Breast Cancer Therapeutics and Biomarkers: Past, Present, and Future Approaches. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v.15, p. 1-19, 2021.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. **Journal of the national cancer institute**, v. 43, n. 6, p. 1249- 1261, 1969.

SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature reviews | Immunology**, v. 18, n. 3, p. 1-15, 2017.

SHOSU, K.; SAKURAI, M.; INOUE, K.; NAKAGAWA, T.; SAKAI, H.; MORIMOTO, M.; OKUDA, M.; NOGUCHI, S.; MIZUNO, T. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Canine Cancer. **In vivo**, v. 30, n. 3, p.195-204, 2016.

SILVA, J. L.; NUNES, N. C. C.; IZETTI, P.; MESQUITA, G.G.; MELO, A. C. Triple Negative Breast Cancer: a thorough review of biomarkers. **Oncology / Hematology**, v. 145, n. 102855, p. 1-31, 2019.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

- SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.
- SOUZA, T. A.; CAMPOS, C. B.; GONÇALVES, A. B. B.; NUNES, F. C.; MONTEIRO, L. N.; VASCONCELOS, R. O.; CASSALI, G. D. Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. **Research in Veterinary Science**, v. 119, p. 209-214, 2018.
- STANTON, S. E.; DISIS, M. L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 4, n. 59, p. 1-7, 2016.
- STOVRING, M.; MOE, L.; GLATTRE, E. A population-based control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 105, p. 590-596, 1997.
- STRIOGA, M.; PASUKONIENE, V.; CHARACIEJUS, D. CD8+ CD28) and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. **Immunology**, v. 134, p. 17-32, 2011.
- TANAKA, A.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Cells Research**, v. 27, n. 1, p. 109-118, 2017.
- TENG, M. W. N.; NGIOW, S. F.; RIBAS, A.; SMYTH, M. J. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. **Cancer Research**, v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 2015.
- THURÓCZY, J.; REISVAAG, G. J. K.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. Immunohistochemical Detection of Progesterone and Cellular Proliferation in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 122-129, 2007.
- TRIULZI, T.; TAGLIABUE, E.; BALSARI, A.; CASALINI, P. FOXP3 Expression in Tumor Cells and Implications for Cancer Progression. **Journal of cellular physiology**, v. 228, p.30-35, 2012.
- VIEIRA, I. L.; CERQUEIRA, O. L. D.; MACHADO, C. M. L. Microambiente tumoral. In: CHAMMAS, R.; FOLGUEIRA, M. A. K.; VILLA, L. L. **ONCOLOGIA: Da Molécula à clínica**. São Paulo: Editora dos Editores, 2022. cap.14, p. 237-238.
- WANG, Y.; WANG, H.; YAO, H.; LI, C.; FANG, J. Y.; XU, J. Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-13, 2018.
- WEBSTER, J. D. et al. Recommended Guidelines for the Conduct and Evaluation of Prognostic Studies in Veterinary Oncology. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 7-18, 2011.
- WU, Z.; ZHANG, L.; PENG, J.; XU, S.; ZHOU, L.; LIN, Y.; WANG, Y.; LU, J.; YIN, W.; LU, J. Predictive and prognostic value of PDL1 protein expression in breast cancer patients in neoadjuvant setting. **Cancer Biology & Therapy**, v. 20, n. 6, p. 941-947, 2019.

XIAOXIAN, L.; WETHERILT, C. S.; 2, KRISHNAMURTI, U.; YANG, J.; MA, Y.; STYBLO, T. M.; MEISEL, J. L.; PENG, L.; SIDDIQUI, M. T.; COHEN, C.; ANEJA, R. Stromal PD-L1 Expression Is Associated With Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 146, n. 4, P.496-502, 2016.

XIE, Q.; DING, J.; CHEN, Y. Role of CD8D T lymphocyte cells: Interplay with stromal cells in tumor microenvironment. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 6, p. 1365-1378, 2021.

YASUMARU, C. C.; XAVIER, J. G.; STREFEZZI, R. F.; GOMES, C. O. M. S. Intratumoral T-Lymphocyte Subsets in Canine Oral Melanoma and Their Association With Clinical and Histopathological Parameters. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 3, p. 491-502, 2021.

ZAPPULLI, V.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; GOLDSCHMIDT, M. H.; GAMA, A.; SCRUGGS, J. L.; KIUPEL, M. **Surgical pathology of tumors of domestic animals**, Volume 2: Mammary tumors, 2019.

ZHOU, Y. J.; GUOLI, L.; WANG, J.; MENGYUAN, L.; WANG, Z.; SONG, Y.; ZHANG, X.; WANG, X. PD-L1: expression regulation. **Blood Science**, v.5, p.77-91, 2023.