

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DO VALOR CLÍNICO DO EIXO IMUNOMODULADOR PD-1:
PD-L1/PD-L2 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS FELINOS RAROS

MARIA CARREIRO FRANCO

ORIENTADOR:
Doutor Jorge Manuel Jesus Correia
COORIENTADOR:
Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2024

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DO VALOR CLÍNICO DO EIXO IMUNOMODULADOR PD-1:PD-L1/PD-L2 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS FELINOS RAROS

MARIA CARREIRO FRANCO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves
Gil Neves

VOGAIS:

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia
Doutora Rute Marina Garcia da Noiva

ORIENTADOR:

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

COORIENTADOR:

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2024

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE

Nome: Maria Carreiro Franco

Título da Tese ou Dissertação: ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DO VALOR CLÍNICO DO EIXO IMUNOMODULADOR PD-1: PD-L1/PD-L2 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS FELINOS RAROS

Ano de conclusão : 2024

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função X Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- X Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, X 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Resultados a serem alvo de publicação em artigo

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 6 de novembro de 2024

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge Correia, por me ter aceite como sua orientanda, pela oportunidade e confiança que me depositou para a elaboração deste trabalho e por toda a simpatia, ensinamentos e apoio.

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, pela constante disponibilidade, por toda a partilha de conhecimentos, dedicação e boa disposição.

À restante equipa do Laboratório de Anatomia Patológica, em especial às técnicas Mestre Sandra Carvalho e Beatriz Azevedo e à Professora Doutora Rute Noiva, pelo apoio, ensinamentos e carinho.

Ao Professor Doutor Telmo Nunes, pelo tempo que dispensou no esclarecimento das minhas questões durante a análise estatística.

À Doutora Sofia Valente e à Professora Doutora Ana Catarina Nascimento, pela auxílio e simpatia.

Aos meus colegas de estágio: Bárbara Oliveira, João Lopes, João Almeida, e Miguel Gomes, pelo apoio e amizade construída.

Aos que compartilharam os anos na ilha Terceira, em especial à minha madrinha Eduarda, à Guida, ao Gui e às Anas.

Aos meus amigos de sempre: Marta, Luísa, Mariana, Mitó, António, Alex e Teles.

E um final e especial agradecimento aos meus queridos Pais, irmão Hugo, Raquel, ao Bernardo, à avó Alda e restante família, pela preocupação e apoio constantes ao longo desta bonita jornada.

Obrigada!

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), no âmbito dos projetos UIDB/CVT/00772/2020 (CECAV), UIDB/00276/2020 (CIISA), LA/P/0059/2020 e AL4A-PROJ-LT3.2 (AL4AnimalS).



ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DO VALOR CLÍNICO DO EIXO IMUNOMODULADOR PD-1: PD-L1/PD-L2 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS FELINOS RAROS

Resumo

O carcinoma mamário felino (CMF) apresenta frequentemente um comportamento biológico agressivo com opções terapêuticas limitadas. Recentemente, o eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 tem-se revelado um excelente aliado na imunoterapia tumoral no tratamento do cancro da mama humano, com os anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1 a mostrarem uma boa eficácia. Neste trabalho, foi analisada a expressão do recetor PD-1 e dos ligandos PD-L1 e PD-L2 em CMF raros, bem como possíveis associações com diversas características clinicopatológicas. A expressão das proteínas foi avaliada através do método indireto de imunohistoquímica, mediante a utilização dos anticorpos primários anti-PD-1 (1:25, clone J116), anti-PD-L1 (1:100, clone CAL 10) e anti-PD-L2 (1:400, clone PA5-20344), em 48 amostras de tumores mamários felinos raros, diagnosticados nos últimos 12 anos pelo laboratório. Os níveis de expressão de cada uma das moléculas foram analisados nas células tumorais (CT), nos linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais (iLITs) e estromais (eLITs). A expressão de PD-1 foi observada em 13% (6/48), 85% (41/48) e 94% (45/48) das amostras nas CT, iLITs e eLITs, respetivamente, enquanto apenas 6% (3/48) das amostras não mostraram imunorreação para qualquer uma das subpopulações de células avaliadas. A expressão de PD-L1 foi detetada em 46% (22/48), 96% (46/48) e 100% (48/48) das amostras nas CT, iLITs e eLITs, respetivamente. Relativamente à expressão de PD-L2, 79% (38/48) e 100% (48/48) dos tumores foram positivos nas CT e em ambos os subgrupos de LITs, respetivamente. Observou-se ainda uma coexpressão de PD-L1 e de PD-L2 nas CT em 42% (20/48) das amostras imunofenotipadas. Várias correlações da expressão das proteínas entre as diferentes subpopulações de células, bem como entre as 3 proteínas foram encontradas. Maiores níveis de expressão de PD-1 pelas CT foram associados ao grau II de malignidade, relativamente ao grau III ($P = 0.012$) e à ausência de necrose tumoral ($P = 0.033$). A elevada expressão de PD-L1 pelos iLITs foi associada à presença de ulceração cutânea ($P = 0.009$). Adicionalmente, maiores níveis de expressão de PD-L2 pelas CT foram associados à ausência de ulceração cutânea ($P = 0.048$). Em conjunto, estes resultados sublinham a importância do eixo imunorregulador PD-1: PD-L1/PD-L2 no CMF considerando os níveis de expressão das 3 proteínas, nomeadamente de PD-L2, bem como as associações estatísticas observadas, suportando a necessidade de mais investigação e encorajando fortemente o desenvolvimento de terapêuticas de bloqueio dirigidas ao eixo PD-1: PD-L1/PD-L2, como estratégias potenciais para o tratamento de tumores mamários felinos.

Palavras-chave: Carcinoma mamário felino; PD-1; PD-L1; PD-L2; Imunohistoquímica

ANALYSIS OF THE EXPRESSION AND CLINICAL VALUE OF THE PD-1: PD-L1/PD-L2 IMMUNOMODULATORY AXIS IN RARE FELINE MAMMARY CARCINOMAS

Abstract

Feline mammary carcinoma (CMF) often displays aggressive behavior with limited therapeutic options. Recently, PD-1: PD-L1/PD-L2 axis has proved to be an excellent ally in tumor immunotherapy in the treatment of human breast cancer, with anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies showing great efficacy. This study analyzed the expression of the PD-1 receptor and the PD-L1 and PD-L2 ligands in rare CMF as well as possible associations with several clinicopathological characteristics. Protein expression was assessed using the indirect immunohistochemistry method, using the primary antibodies anti-PD-1 (1:25, clone J116), anti-PD-L1 (1:100, clone CAL 10) and anti-PD-L2 (1:400, clone PA5-20344) in 48 samples of rare feline mammary tumors diagnosed in the last 12 years by the laboratory. The expression levels of each molecule were analyzed in tumor cells (CT), intratumoral tumor infiltrating-lymphocytes (iLITs) and stromal (eLITs). PD-1 expression was observed in 13% (6/48), 85% (41/48) and 94% (45/48) of the samples in CT, iLITs and eLITs, respectively, while only 6% (3/48) of the samples showed no immunoreaction for any of the cell subpopulations evaluated. PD-L1 expression was detected in 46% (22/48), 96% (46/48) and 100% (48/48) of the samples in CT, iLITs and eLITs, respectively. Regarding PD-L2 expression, 79% (38/48) and 100% (48/48) of the tumors were positive in the CT and in both subgroups of LITs, respectively. A co-expression of PD-L1 and PD-L2 in CT was also observed in 42% (20/48) of the immunophenotyped samples. Several correlations of protein expression between the different subpopulations of cells, as well as between the 3 proteins were found. Higher levels of PD-1 expression by CT were associated with grade II malignancy, compared to grade III ($P = 0.012$) and with the absence of tumor necrosis ($P = 0.033$). High PD-L1 expression by iLITs was associated with the presence of skin ulceration ($P = 0.009$). In addition, higher levels of PD-L2 expression by CT were associated with the absence of skin ulceration ($P = 0.048$). Together, these results underline the importance of the PD-1: PD-L1/PD-L2 immunoregulatory axis in CMF considering the expression levels of the 3 proteins, particularly PD-L2, as well as the statistical associations observed, supporting the need for more research, and strongly encouraging the development of blocking therapies targeting the PD-1: PD-L1/PD-L2 axis as potential strategies for the treatment of feline mammary tumors.

Keywords: Feline mammary carcinoma; PD-1; PD-L1; PD-L2; Immunohistochemistry

Índice

Agradecimentos	ii
Apoio financeiro	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas	xi
1. Introdução	1
1.1. Relatório de Estágio	1
2. Estado da Arte	3
2.1. O Carcinoma mamário felino.....	3
2.1.1. Epidemiologia e fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias felinas	3
2.1.2. Aspetos e Estadiamento clínicos.....	3
2.1.3. Classificação histológica e atribuição do Grau de malignidade.....	4
2.1.3.1 Classificação Molecular	6
2.1.4. Fatores prognósticos clínicos e histológicos	7
2.1.5. Tratamento	8
2.2. Imunoterapia direcionada e biomarcadores prognósticos e preditivos	8
2.2.1. Estrutura e função de PD-1	9
2.2.2. Os ligandos de PD-1.....	10
2.2.3. Importância do eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 e o seu papel como escudo molecular para doenças neoplásicas malignas.....	11
2.2.4. Terapêuticas direcionadas anti-PD-1 e anti-PD-L1	13
2.2.5. Expressão de PD-L1 e PD-L2 nos tumores e as suas relações com o prognóstico	16
3. Materiais e Métodos.....	18
3.1. Caracterização da população.....	18
3.2. Análise Imunohistoquímica e interpretação	19
3.3. Análise estatística	22

4. Resultados	23
4.1. As células tumorais e os LITs intratumorais e estromais expressam PD-1, PD-L1 e PD-L2	23
4.2. Análise da expressão do recetor PD-1 e dos seus ligandos PD-L1 e PD-L2	24
4.3. Análise exploratória de correlações entre os níveis de expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nas CT e nos LITs intratumorais e estromais	27
4.4. Análise estatística da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2 com as diferentes características clinicopatológicas	30
5. Discussão	34
6. Conclusões	40
6.1. Perspetivas futuras.....	40
7. Referências Bibliográficas	41
8. Anexos	49

Lista de Figuras

Figura 1. Resistência Adaptativa à imunidade antitumoral mediada pelo eixo PD-1: PD-L1.....	12
Figura 2. Interação das vias imunorreguladoras na ativação ou inibição da atividade das células T.....	15
Figura 3. Imagem histológica de carcinoma mamário mucinoso (H&E, x200, barra=50 µm).....	19
Figura 4. Controlos negativos em linfonodo felino sem aplicação dos anticorpos primários (PD-1, PD-L1 e PD-L2) com os tampões de recuperação de (A) citrato (pH 6) e de (B) Triz-EDTA (pH 9) (x400, barra=20 µm).....	21
Figura 5. Imunomarcção representativa de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nos linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) intratumorais (iLITs) e estromais (eLITs) e nas células tumorais (CT) de carcinomas mamários felinos (x400, barra=20 µm).....	23
Figura 6. Histogramas representativos da distribuição das pontuações finais de imunohistoquímica de PD-1 nas células tumorais e nos linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais e estromais nos 48 casos analisados.....	24
Figura 7. Histogramas representativos da distribuição das pontuações finais de imunohistoquímica de PD-L1 e PD-L2 em diferentes subpopulações de células nos 48 casos analisados.....	25
Figura 8. Correlações de <i>Spearman</i> da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2 entre as diferentes subpopulações de células.....	28
Figura 9. Correlações de <i>Spearman</i> entre a expressão do recetor PD-1 com cada um dos seus ligandos PD-L1 e PD-L2 expressos pelas células tumorais (CT), linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais (iLITs) e LITs estromais (eLITs) e correlações entre a expressão de PD-L1 e PD-L2.....	28
Figura 10. Análise de <i>box-plot</i> da pontuação de Imunohistoquímica (IHQ) de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nos linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais (iLITs) e estromais (eLITs) e nas células tumorais (CT) e as suas associações com características clinicopatológicas.....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estadiamento clínico do carcinoma mamário felino (Owen 1980).....	4
Tabela 2. Classificação histológica de tumores mamários malignos segundo os critérios propostos por Misdorp et al. (1999) e Zappulli et al (2008).....	5
Tabela 3. Grau histológico para o carcinoma mamário felino (Gameiro et al. 2021).....	6
Tabela 4. Classificação molecular de tumores mamários felinos (Zappulli et al. 2008).....	7
Tabela 5. Características clinicopatológicas e histopatológicas de gatas com tumores mamários raros incluídas no estudo.....	18
Tabela 6. Resultados da análise estatística da associação da expressão de PD-1 com as várias características clinicopatológicas através dos testes de <i>Mann-Whitney</i> e <i>Kruskal-Wallis</i>	32
Tabela 7. Resultados da análise estatística da associação da expressão de PD-L1 e PD-L2 nas CT, LITs intratumorais e LITs estromais com as várias características clinicopatológicas através dos testes de <i>Mann-Whitney</i> e <i>Kruskal-Wallis</i>	33

Lista de Abreviaturas

AP-1- Proteína ativadora 1

AIQ- Amplitude interquartil

B7-H1- Homólogo de B7-1

CECA- Centro de Estudos em Ciência Animal

CECAV- Centro de Ciência Animal e Veterinária

CECP- Carcinoma escamoso da cabeça e do pescoço

CIISA- Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal

CK- Citoqueratinas

CMF- Carcinoma mamário felino

CPCNP- Carcinoma do pulmão de células-não-pequenas

CT- Células tumorais

CTLA-4- Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos

DAB- Diamina-benzidina

eLITs- Linfócitos infiltrantes tumorais estromais

FDA- *Food and Drug Administration*

FFEP- Fixados em formol e embebidos em parafina

HER2- *Human epidermal growth factor receptor 2*

ITF- γ - Interferão-gama

IHQ- Imunohistoquímica

iLITs- Linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais

IPCI- Inibidores dos pontos de controlo imunitário

ITIM- Motivo de sinalização inibitório baseado em tirosina

ITSM- Motivo de sinalização de troca baseado em tirosina

Ki-67- Antígeno *Kiel* 67

LITs- Linfócitos infiltrantes tumorais

MAT- Microambiente tumoral

Med- Mediana

MHC- *Major Histocompatibility Complex*

m.o- Microscópio ótico

NFATc1- Fator nuclear das células T ativadas 1

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAAF- Punção aspirativa com agulha fina

PAF- Punção com agulha fina

PCI- Pontos de controlo imunitário

PD-1- Proteína de morte celular programada 1

PD-L1- Ligando 1 de morte celular programada

PD-L2- Ligando 2 de morte celular programada

PD-L1L2-SE- *Super-enhancers* de PD-L1 e PD-L2

PF-IHQ- Pontuação final de IHQ

PI- Pontuação de intensidade

PP- Pontuação de percentagem

RCT- Recetor das células T

RE- Recetor de estrogénios

RP- Recetor de progesterona

SG- Sobrevivência global

SHP-1- Fosfatase-1 com domínio da região de homologia Src 2

SHP-2- Fosfatase-2 com domínio da região de homologia Src 2

SI- Sistema imunitário

TA- Temperatura ambiente

TLD- Tempo livre de doença

TMN- *Tumor, Nodes and Metastasis*

TN- Triplo-negativo

1. Introdução

O presente trabalho refere-se a uma Dissertação de Mestrado, realizada em cumprimento do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. O seu objetivo passa por avaliar e investigar a expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nas células imunitárias e tumorais de carcinomas mamários felinos raros, bem como explorar eventuais associações com diversas características clinicopatológicas. Assim, começa por apresentar um breve relatório de estágio, seguindo para a introdução do tema que aborda, organizado em revisão de literatura, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusões e perspetivas futuras.

1.1. Relatório de Estágio

Durante o 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, concluí o meu estágio curricular com interesse na área de Anatomia Patológica Veterinária. Este teve a duração de 6 meses, com um total de 624 horas, tendo sido realizado no Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob orientação do Professor Doutor Jorge Correia e coorientação do Professor Doutor Fernando Ferreira, de 4 de setembro a 15 de março. Ao longo destes meses, o meu tempo foi dividido pelas seguintes tarefas: acompanhamento e realização de necropsias, acompanhamento da técnica de punção aspirativa com agulha fina, análise macroscópica e microscópica de tecidos, incluindo o diagnóstico histopatológico e citológico. O tempo de estágio também envolveu períodos de estudo teórico necessários para um melhor entendimento dos assuntos integrados no tema de estágio. Durante este período, pude igualmente concluir os trabalhos laboratoriais para a realização da atual dissertação, os quais envolveram a técnica de Imunohistoquímica (IHQ) e, ainda, a oportunidade de colaborar em trabalhos inseridos no domínio do projeto AL4A-PROJ-LT3.2 (AL4AnimalS).

As necropsias foram principalmente realizadas no âmbito das aulas práticas da Unidade Curricular de Anatomia Patológica I e II, frequentadas pelos alunos do 2º e 3º anos de Medicina Veterinária, realizadas semanalmente. Pude desenvolver os meus prévios conhecimentos e, concomitantemente, auxiliar os alunos na sua aprendizagem. Das 56 necropsias realizadas, a maioria era apenas para fins didáticos, outras foram solicitadas por tutores de animais ou entidades oficiais, em que algumas eram necropsias forenses. Durante este período, para além de necropsias a animais de companhia, pude assessorar necropsias de aves, equídeos e de animais silvestres.

A avaliação macroscópica foi realizada semanalmente e consistiu na preparação de amostras de tecido fixadas em formol a 10%, para o exame microscópico, através da seleção

e corte das áreas que continham lesões tecidulares para posterior análise histopatológica. A maioria das amostras consistiu em glândula mamária e nos órgãos referentes aos aparelhos genitais de machos e fêmeas de animais de companhia, não obstante, tive também a oportunidade de auxiliar na preparação de amostras de tecido relativas a outros órgãos, bem como de outras espécies animais, como murganhos.

No que se refere à técnica de punção com agulha fina, acompanhei a colheita efetuada a um total de 18 lesões nodulares, todas estas cutâneas, incluindo as variantes aspirativa (PAAF) e não aspirativa (PAF) concretizadas no Hospital Escolar de Medicina Veterinária pelos patologistas Professor Doutor Jorge Correia e Professora Doutora Rute Noiva.

Quanto à análise microscópica, esta, numa fase inicial, consistiu no acompanhamento da avaliação feita pelo Professor Doutor Jorge Correia, em que pude compreender melhor a correta interpretação das lesões tecidulares ao microscópio. Numa fase posterior, as lâminas relativas aos casos mais interessantes eram selecionadas, avaliadas e o diagnóstico discutido com o Professor ou comparado com os relatórios emitidos pelo mesmo.

Semanalmente, acompanhei as Imunohistoquímicas que eram realizadas no laboratório, onde compreendi os principais fundamentos da técnica e onde adquiri parte dos conhecimentos necessários para que, posteriormente, pudesse utilizá-la como método para a realização da atual dissertação.

Durante os meses de estágio pude, ainda, colaborar em trabalhos incluídos no âmbito do projeto AL4Animals 2023, o qual se refere a um estudo colaborativo multicêntrico entre 3 laboratórios de investigação, dos quais o Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), o Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV) e o Centro de Estudos em Ciência Animal (CECA), cujo objetivo passa por investigar os tumores mamários raros e incomuns em cães e gatos através da caracterização clinicopatológica, imunohistoquímica e genética dos mesmos. Desta colaboração resultou a execução de 3 posters, dos quais participei como coautora (Anexos 2, 4 e 7), apresentados no congresso europeu “5th Cutting Edge Pathology” e no “European Society of Veterinary Oncology (ESVONC) Annual Congress 2024”, e tendo os resumos sido publicados nos livros de resumos dos respetivos congressos (Anexos 1,3,5 e 6).

2. Estado da Arte

2.1. O Carcinoma mamário felino

2.1.1. Epidemiologia e fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias felinas

Ao representar 17% da totalidade das neoplasias em fêmeas, o carcinoma mamário felino (CMF) constitui o 3º tipo de tumor mais comum nesta espécie (Gameiro et al. 2021), apresentando uma elevada taxa de mortalidade (Zappulli et al. 2005). Embora a sua etiologia seja desconhecida, especula-se que, quase certamente, seja multifatorial (Giménez et al. 2010). O CMF mostra-se particularmente mais frequente em gatas com idades compreendidas entre os 10 e 12 anos, com risco crescente até aos 14 anos, constatando-se maior propensão para as raças domésticas de pelo curto e Siameses (Goldschmidt et al. 2017). Embora esta doença seja mais comumente observada em fêmeas, 1-5% das neoplasias afetam os machos (Giménez et al. 2010). Segundo Goldschmidt et al. (2017), a incidência da doença revela-se aumentada em gatas não esterilizadas, pelo que, a ovariectomia realizada previamente aos 6 meses de idade, poderá ter uma profunda influência benéfica bem como um efeito protetor no que concerne ao desenvolvimento desta doença (Goldschmidt et al. 2017). Não obstante, nos casos em que fêmeas esterilizadas venham a desenvolvê-la, não se verifica qualquer diferença no tempo livre de doença (TLD), definido como o intervalo temporal entre o tratamento/remissão e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos relativos à recidiva da doença, ou no tempo de sobrevivência global (SG), referente ao período que decorre desde o momento do diagnóstico até ao subsequente desfecho fatal (Goldschmidt et al. 2017). Outros aspetos que poderão estar associados a um maior risco de desenvolvimento da doença, incluem dietas ricas em lípidos e a obesidade, que podem ser responsáveis por níveis mais elevados de estrogénio (Goldschmidt et al. 2017) e, como tal, predispor ao desenvolvimento de neoplasias mamárias.

2.1.2. Aspetos e Estadiamento clínicos

Estima-se que 80 a 90% das neoplasias mamárias felinas apresentem comportamento maligno (Gameiro et al. 2021). Clinicamente, o paciente poderá apresentar um ou múltiplos nódulos discretos, nestes com uma prevalência de 55% (Soares et al. 2016a), geralmente localizados em glândulas mamárias ipsilaterais adjacentes, frequentemente resultantes da disseminação linfática de um único tumor primário (Zappulli et al. 2005), pensando-se não existir qualquer propensão para uma glândula específica (Goldschmidt et al. 2017). Neoplasias mamárias de tipo histológico distinto, quer sejam glândulas adjacentes ou não, poderão igualmente ser encontradas (Zappulli et al. 2005). Contrariamente ao que é

observado em canídeos, nesta espécie, pensa-se que a dimensão tumoral não esteja diretamente correlacionada com o comportamento biológico do tumor, na medida em que massas de pequenas dimensões podem igualmente apresentar comportamento maligno (Goldschmidt et al. 2017). A taxa de metastização do CMF é elevada (Soares et al. 2016a) nomeadamente, para os linfonodos regionais (83%) e para os pulmões (83%), seguindo-se o fígado (25%) e a pleura (22%) (Gameiro et al. 2021). Embora a incidência de tumores mamários malignos seja elevada, lesões benignas e não neoplásicas são também observadas (Goldschmidt et al. 2017).

O diagnóstico é geralmente efetuado numa fase já avançada da doença, nomeadamente, aquando do surgimento de inflamação secundária e/ou ulceração e necrose (Goldschmidt et al. 2017), estimando-se que cerca de 25% dos pacientes afetados mostrem ulceração associada a necrose tumoral extensa ao momento do diagnóstico (Giménez et al. 2010). Para a atribuição do estadiamento clínico, é utilizada uma modificação do sistema TNM (*Tumor, Nodes and Metastasis*) estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), já aplicado no carcinoma mamário em Medicina Humana (Owen 1980), representado na Tabela 1.

Tabela 1. Estadiamento clínico do carcinoma mamário felino (Owen 1980)

Estadio	Tamanho tumoral (T)	Invasão linfonodos (N)	Metástases (M)
I	T1: <2cm	N0	M0
II	T2: 2-3cm	N0	M0
III	T1 ou T2	N1	M0
	T3: >3cm	qualquer N	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M1

N0- sem invasão do linfonodo; N1- com invasão do linfonodo; M0- sem metástases; M1-com metástases.

2.1.3. Classificação histológica e atribuição do Grau de malignidade

Para a emissão de um correto diagnóstico e prognóstico, é imperativa uma precisa classificação do tumor, revelando-se, para esse efeito, a biópsia um método complementar crucial (Gameiro et al. 2021). Misdorp et al. adaptaram o sistema de classificação das neoplasias mamárias em humanos, estabelecido pela OMS, para os tumores mamários felinos (Misdorp et al. 1999). No entanto, esta adaptação não seria suficiente para fornecer um diagnóstico e prognóstico precisos (Zappulli et al. 2008), tendo surgido, mais tarde, um sistema de classificação específico para os animais domésticos (Zappulli et al. 2008). A

classificação histológica para os tumores mamários malignos, de ambos os sistemas de classificação, encontram-se representados na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação histológica de tumores mamários malignos segundo os critérios propostos por Misdorp et al. (1999) e Zappulli et al. (2008)

Misdorp et al. (1999)	Zappulli et al. (2008)
1. Tumores malignos	1. Neoplasias Epiteliais Malignas
1.1. Carcinoma não infiltrativo (in situ)	1.1. Carcinoma in situ
1.2. Carcinoma tubulopapilar	1.2. Carcinomas simples
1.3. Carcinoma sólido	1.2.1. Carcinoma tubular
1.4. Carcinoma cribiforme	1.2.2. Carcinoma tubulopapilar
1.5. Carcinoma de células escamosas	1.2.3. Carcinoma sólido
1.6. Carcinoma mucinoso	1.2.4. Carcinoma micropapilar invasivo*
1.7. Carcinosarcoma	1.2.5. Comedocarcinoma
1.8. Carcinoma ou sarcoma num tumor benigno	1.2.6. Carcinoma anaplásico*
	1.3. Carcinomas não simples
	1.4. Carcinomas associados aos ductos
	1.4.1. Carcinoma ductal
	1.4.2. Carcinoma papilar intraductal
	1.5. Tipos especiais
	1.5.1. Carcinoma de células escamosas
	1.5.2. Carcinoma adenoescamoso*
	1.5.3. Carcinoma mucinoso*
	1.5.4. Carcinoma rico em lípidos*
	1.5.5. Carcinoma de células fusiformes
	1.5.6. Carcinoma mamário inflamatório*
	2. Neoplasias Mesenquimais Malignas
	2.1. Osteossarcoma
	2.2. Condrossarcoma
	2.3. Fibrossarcoma
	2.4. Hemangiossarcoma
	3. Carcinosarcoma*

*Tumores mamários felinos raros

Aquando da classificação histológica, é igualmente atribuído um grau de malignidade. O sistema numérico de Elston e Ellis, anteriormente designado por sistema de Nottingham, desenvolvido para neoplasias mamárias em humanos, é o atualmente mais utilizado para o CMF (Avallone et al. 2021). Este leva em consideração características morfológicas distintas,

entre as quais a percentagem de formação tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico, que são pontuados e somados a fim de gerar uma nota que se correlaciona com o grau de malignidade e o prognóstico (Mills et al. 2015) (Tabela 3). Posteriormente, foi desenvolvido um novo sistema de classificação (sistema de Mills), com base em critérios histológicos considerados por serem fatores prognósticos independentes como a invasão linfovascular, a forma nuclear e o índice mitótico (Mills et al. 2015). Este sistema foi igualmente adotado para uso no CMF (Goldschmidt et al. 2017).

Tabela 3. Grau histológico para o carcinoma mamário felino (Gameiro et al. 2021)

Grau de malignidade (Sistema de Elston e Ellis)			
Característica histológica	Pontuação		
Formação tubular			
>75%	1		
10-75%	2		
<10%	3		
Pleomorfismo nuclear			
Ligeiro	1		
Moderado	2		
Marcado	3		
índice mitótico (em 10 campos no m.o)			
0-5	1		
6-10	2		
>11	3		

m.o- microscópio ótico

2.1.3.1 Classificação Molecular

Historicamente, o carcinoma mamário era considerado uma doença singular com características histopatológicas variadas e que respondia a terapêutica sistémica (Reis-Filho and Pusztai 2011). No entanto, na sequência de estudos de perfil de expressão génica baseados em técnicas de microarranjo, verificou-se que, na verdade, consiste num conjunto de doenças, com diferentes características moleculares intrínsecas e, por conseguinte, apresentando distintas respostas a terapêuticas sistémicas (Weigelt et al. 2010). A classificação molecular atualmente utilizada é baseada em imunohistoquímica e estabelece 6 subtipos distintos, dos quais: luminal A, luminal B/*Human epidermal growth factor 2* (HER2)-negativo, luminal B/HER2-positivo, HER2-positivo, triplo negativo (TN) basal-like e TN normal-like (Goldhirsch et al. 2013). A caracterização de cada um dos subtipos está representada na Tabela 4.

Embora os subtipos luminais estejam associados a um melhor prognóstico, verifica-se que o subtipo luminal B apresenta um comportamento biológico mais agressivo, quando

comparado com o subtipo luminal A (Goldhirsch et al. 2013). Aliás, em oncologia humana, pacientes com neoplasias mamárias que se incluem nestes subtipos (luminal A e B), geralmente beneficiam de terapêutica hormonal já que possuem positividade para os recetores hormonais: recetores de estrogénio (RE) e de progesterona (RP) (Goldhirsch et al. 2013). No referente ao subtipo HER2-positivo, este caracteriza-se pela sobre-expressão da proteína HER2, estando associado a um pior prognóstico (Goldhirsch et al. 2013). Apesar disso, com o surgimento de terapêuticas direcionadas anti-HER2 (Trastuzumab), em Medicina Humana, tem-se vindo a contemplar uma melhoria considerável na taxa de sobrevivência desses pacientes (Reis-Filho and Pusztai 2011; Soares et al. 2016a).

Tabela 4. Classificação molecular de tumores mamários felinos (Zappulli et al. 2008)

Subtipo Molecular	Marcador celular luminal*	RE + e/ou RP +	HER2+	Marcador celular basal**	Ki-67
Luminal A	Sim	Sim (alto)	Não	Sim/Não	Sim (baixo)
			Sim	Sim/Não	qualquer
Luminal B	Sim	Sim (baixo)	Não	Sim/Não	alto
HER2-positivo	Sim/Não	Não	Sim	Sim/Não	qualquer
TN basal-like	Não	Não	Não	Sim	qualquer
TN normal-like	Sim/Não	Sim/Não	Não	Não	qualquer

*Marcadores celulares luminiais- citoqueratinas (CK): CK7, CK8, CK18, CK19; RE- Recetor de estrogénios; RP- Recetor de progesterona; HER2- *Human epidermal growth factor receptor 2*; **Marcadores celulares basais- CK5/6, CK14, p63, *p-cadherin*; Ki-67- índice de proliferação celular; TN- Triplo-negativo.

De entre todos os subtipos moleculares suprarreferidos, os TN (normal e basal-like) são os que apresentam um pior prognóstico, na medida em que se associam a tumores de maiores dimensões, pouco diferenciados e com maior grau de malignidade (Soares et al. 2016a) e, à semelhança do que se verifica no carcinoma mamário da mulher, foi relatado que no CMF os subtipos HER2-positivo e TN, se correlacionam com um prognóstico menos favorável (Nascimento et al. 2020), sendo na espécie felina, o subtipo HER2-positivo o mais frequentemente observado (Soares et al. 2016a).

2.1.4. Fatores prognósticos clínicos e histológicos

A dimensão tumoral representa um importante fator prognóstico no CMF (Giménez et al. 2010), uma vez que massas superiores a 3 cm estão frequentemente associadas a menores TLD e de SG (Goldschmidt et al. 2017). Adicionalmente, o estadiamento clínico representa um excelente indicador prognóstico, ao refletir uma diminuição progressiva do tempo de SG do estadio I e II (12-29 meses), para o estadio III (6-9 meses) ou IV (1 mês) (Goldschmidt et al. 2017). Outros parâmetros morfológicos que têm sido considerados como

indicadores de prognóstico, incluem a presença de necrose tumoral e de ulceração da pele adjacente, o crescimento infiltrativo, a presença de inflamação crônica envolvendo o tumor e margens cirúrgicas incompletas (Goldschmidt et al. 2017). Adicionalmente, o grau histológico do tumor, a presença de invasão linfática e/ou linfovascular e o subtipo molecular do tumor, demonstram estar altamente correlacionados com a SG (Goldschmidt et al. 2017; Gameiro et al. 2021). Recentemente, têm sido identificados biomarcadores que provavelmente terão um papel determinante na emissão de um prognóstico mais preciso do CMF (Gameiro et al. 2021), tais incluem, por exemplo, o índice de proliferação celular antigénio *Kiel* 67 (Ki-67) (Soares et al. 2016b), ou a sobre-expressão da proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) (Urbano et al. 2020).

2.1.5. Tratamento

As opções terapêuticas atualmente disponíveis para o CMF revelam-se bastante limitadas, sendo a mais amplamente aceite a mastectomia unilateral ou bilateral radical isolada, com remoção dos respetivos linfonodos, ou em combinação com protocolos de quimioterapia adjuvante quando a expressão de Ki-67 se mostra superior a 14%, representando tumores com alto risco de progressão da doença (Soares et al. 2016b; Gameiro et al. 2021). Todavia, embora procedimentos mais radicais estejam associados a TLD mais longos, não se verifica um efeito significativo nas taxas de SG (Giménez et al. 2010). No referente aos fármacos utilizados no contexto da quimioterapia, como doxorrubicina ou ciclofosfamida, estes tendem a demonstrar uma eficácia restrita, principalmente após a ocorrência de metástase ocasionando, supletoriamente, efeitos secundários severos (Giménez et al. 2010; Gameiro et al. 2021). A radioterapia é raramente utilizada, uma vez que ainda carece de evidências científicas que sustentem efeito no aumento das taxas de sobrevivência nesta espécie (Giménez et al. 2010). Assim, a Medicina Veterinária requer uma urgente procura por opções terapêuticas alternativas destinadas ao melhoramento do progresso clínico dos pacientes-alvo de neoplasias mamárias malignas (Gameiro et al. 2021).

2.2. Imunoterapia direcionada e biomarcadores prognósticos e preditivos

Biomarcadores prognósticos referem-se a características específicas, sejam estas clínicas, moleculares ou patológicas, que podem prever o desfecho clínico de um paciente ou de uma doença (Webster et al. 2011). Em contrapartida, os marcadores preditivos relacionam-se com características ligadas à resposta, ou ao resultado de um tratamento específico (Webster et al. 2011). Como suprarreferido, o CMF geralmente apresenta comportamento biológico agressivo e infiltrativo, com prognóstico bastante reservado. Adicionalmente, o diagnóstico é tardio e as terapêuticas atualmente disponíveis são limitadas e demonstram-se

pouco eficazes. Com isto, surge uma urgência na procura de novas alternativas terapêuticas, assim como por biomarcadores prognósticos e preditivos na oncologia veterinária (Webster et al. 2011).

Ao longo dos últimos anos, tem-se vindo a observar resultados excecionalmente promissores em ensaios clínicos realizados na Medicina Humana, com recurso a inibidores dos pontos de controlo imunitário (IPCI) em variados tipos de neoplasias malignas (Garon et al. 2015; Robert et al. 2015), inclusive no tratamento do carcinoma mamário (Abad et al. 2022). Tais resultados têm despertado um crescente interesse no entender mais profundo da resposta imunitária antitumoral, bem como no desenvolvimento de estratégias mais efetivas que auxiliem o sistema imunitário (SI) a combater esta devastadora doença. Os pontos de controlo imunitário (PCI) ou *immune checkpoints*, correspondem a um conjunto de vias imunorreguladoras que auxiliam na manutenção da autotolerância, previnem a autoimunidade e atenuam eventuais danos colaterais aos tecidos (Ghosh et al. 2021), através de uma orquestra biológica orientada pela receção de sinais coestimulatórios ou coinibitórios, que regulam as funções das células imunitárias. Nesta perspetiva, a via PD-1: PD-L1/PD-L2 desempenha um papel fulcral no envio de sinais coinibitórios à ativação das funções das células T (Schütz et al. 2017).

2.2.1. Estrutura e função de PD-1

Em 1992, a descoberta de uma glicoproteína presente na membrana das células T, conhecida como proteína de morte celular programada 1 (PD-1) ou CD279, foi identificada como uma participante no processo de apoptose celular (Ishida et al. 1992). Esta integra a família de moléculas correguladoras B7-CD28 e a sua expressão é frequentemente observada em linfócitos T infiltrantes CD8+ e CD4+, células T *natural killer*, células B, monócitos ativados e células dendríticas (Li et al. 2019). A sua função primordial está intrinsecamente ligada à modulação do SI, agindo como um coinibidor essencial para manter a autotolerância e prevenir respostas imunitárias excessivas ao regular negativamente a atividade das células T efectoras nos tecidos (Schütz et al. 2017). Estruturalmente, é composta por um domínio extracelular (Ig-V), seguida por um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática com dois motivos de sinalização inibitório (ITIM) e de troca (ITSM), baseados em tirosina (Ghosh et al. 2021), que desempenham um papel fundamental na sinalização intracelular para a regulação da resposta imunitária. Foi demonstrado que o motivo ITSM é necessário para que a função imunossupressora de PD-1 sobre as células T ativadas seja exercida com sucesso (Jiang et al. 2019).

Como chave da regulação da tolerância e exaustão imunitária, a expressão de PD-1 é altamente controlada. Nas células T virgens, a molécula PD-1 apenas é expressa a um nível basal, porém, aquando da estimulação imunitária inicial, a sua expressão poderá ser induzida (Ghosh et al. 2021). O gene *Pdcd1* codifica esta proteína e, adicionalmente, uma diversidade de fatores de transcrição como o fator nuclear das células T ativadas 1 (NFATc1) e a proteína ativadora 1 (AP-1) que, por sua vez, ativam a transcrição de PD-1 (Ghosh et al. 2021). Nos linfócitos T citotóxicos (CD8+), a transcrição pode ser estimulada pela sinalização do recetor das células T (RCT). A ativação deste recetor ativa os fatores de transcrição que, consecutivamente, se ligam a elementos reguladores do gene *Pdcd1*, ativando a transcrição de PD-1 (Ghosh et al. 2021). Esta glicoproteína funciona como um recetor, que é ativado mediante a interação com os seus ligandos específicos: PD-L1 (ligando 1 de morte celular programada) e PD-L2 (ligando 2 de morte celular programada) (Mkrtichyan et al. 2011).

2.2.2. Os ligandos de PD-1

Os genes que codificam as proteínas PD-L1 e PD-L2 são, respetivamente, CD274 e CD273, e ambos estão localizados no cromossoma 9p24.1 (Fan et al. 2022). Descoberta em 1999, PD-L1 também conhecida como o homólogo de B7-1 (B7-H1), é uma glicoproteína transmembranar do tipo 1, estruturalmente constituída por 290 resíduos de aminoácidos e apresentando dois domínios de imunoglobulina extracelular (Ig-V e Ig-C), um domínio transmembranar e uma cauda curta citoplasmática (Lawson et al. 2020). A expressão de PD-L1 ocorre em baixos níveis nas células B e T, células dendríticas, mastócitos, macrófagos, células epiteliais, células endoteliais e é adicionalmente observada em determinados tipos de células tumorais (CT) (Ghosh et al. 2021), não estando presente no tecido mamário saudável (Ghebeh et al. 2006). Em contraste, a expressão de PD-L2 (B7-DC), limita-se às células dendríticas, células B e macrófagos (Yamazaki et al. 2002), podendo igualmente ser expresso em CT (Baptista et al. 2016). Estes ligandos partilham uma identidade de 40% de aminoácidos (Ghosh et al. 2021), porém, apesar da semelhança estrutural existente entre ambos, foi demonstrado que a afinidade de ligação destes ao recetor PD-1 é diferente. De facto, análises estruturais revelaram que a ligação de PD-1 e PD-L1 induz a formação de complexas alterações da configuração molecular, ao passo que a interação entre PD-1 e PD-L2 é mais simples (Yang et al. 2024). Adicionalmente, análises de ressonância plasmónica de superfície evidenciaram que a afinidade de ligação entre o 2º ligando e o recetor é 2-6 vezes superior àquela observada com PD-L1 (Wang et al. 2023).

2.2.3. Importância do eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 e o seu papel como escudo molecular para doenças neoplásicas malignas

Em condições fisiológicas, a via inibitória PD-1: PD-L1/PD-L2 tem um papel chave na manutenção da homeostasia imunitária, na medida em que reduz o repertório de células T, suprime a produção de citocinas e ativa sinais de tolerância intrínseca das células, reconhecendo-as como próprias ao organismo (Swaika et al. 2015). No entanto, as células tumorais adquiriram a habilidade de sequestrar esta via, empregando-a como um “escudo molecular” para escapar ao ataque do SI, dificultando a capacidade das células imunitárias em reconhecer e controlar a progressão do tumor (Ghosh et al. 2021). A interação entre o recetor PD-1 e o ligando PD-L1, resulta na fosforilação de resíduos de tirosina presentes na região da cauda citoplasmática de PD-1, nomeadamente, no motivo de sinalização ITSM (Jiang et al. 2019). Consequentemente, ocorre o recrutamento de fosfatase-2 com domínio da região de homologia Src 2 (SHP-2), que por sua vez provoca a fosforilação de outras proteínas localizadas a jusante, o que leva à inibição da sinalização e das funções biológicas das células T (Jiang et al. 2019). Nesta perspetiva, conjectura-se que a expressão de PD-L1 e/ou de PD-L2 pelas CT, quando acoplada(s) a PD-1, facilite a apoptose das células T ativadas ao causar disfunção e anergia (Vranic et al. 2021).

A regulação de PD-L1, nas CT, é um processo complexo que envolve múltiplos mecanismos, que podem ser intrínsecos ou extrínsecos ao tumor. Os primeiros incluem eventos de aberração genética, controle de transcrição e modulação pós-transcricional (Ghosh et al. 2021). Por outro lado, a via de citocinas, como o interferão-gama (ITF- γ) (X. Li et al. 2016), integra-se nos mecanismos extrínsecos, uma vez que depende da presença de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) no microambiente tumoral (MAT) (X. Li et al. 2016). O ITF- γ é produzido principalmente por células inflamatórias, nomeadamente pelos linfócitos T ativados (Fan et al. 2022). Assim, embora PD-L1 esteja ausente na maioria dos tecidos saudáveis, a sua expressão pode ser induzida pela presença de ITF- γ (Fan et al. 2022). Portanto, caso a resposta imunitária seja estimulada pela neoplasia, os níveis de PD-L1 nas células tumorais podem ser positivamente regulados pela exposição a ITF- γ (Fan et al. 2022). Esta dinâmica cria um paradoxo, pois, embora esta citocina inflamatória possa melhorar a função efetora dos LITs mediante a sua diferenciação, poderá também levar à inibição da função destes, caso PD-L1, agora sobre-expresso, se conjugue ao seu recetor PD-1 (Ghosh et al. 2021). O aproveitamento da via PD-1/PD-L1 por tumores malignos pode ser descrito como uma forma de resistência adaptativa, esquematicamente representada na Figura 1.

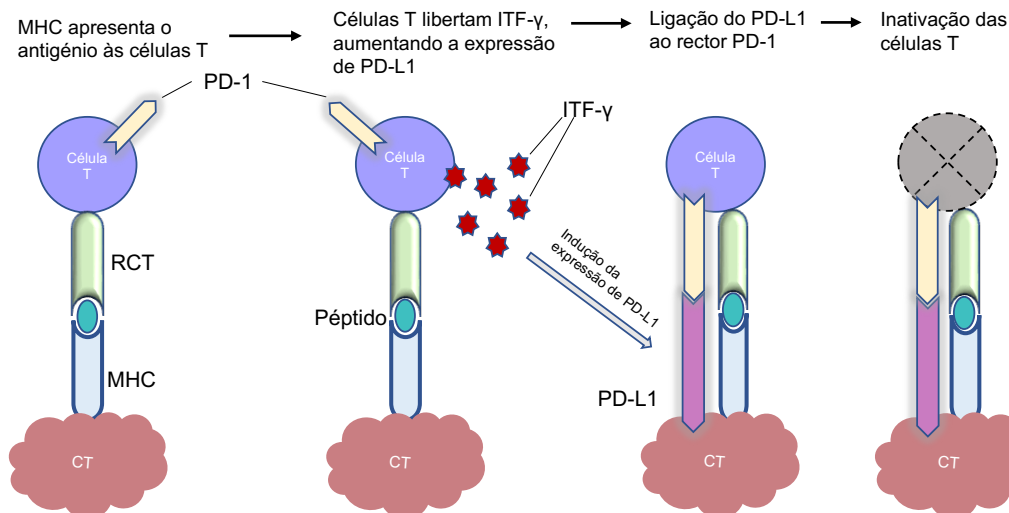


Figura 1. Resistência Adaptativa à imunidade antitumoral mediada pelo eixo PD-1: PD-L1. O Complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) apresenta as células tumorais (CT) às células T através do recetor de células T (RCT). Como resposta antitumoral, as células T libertam citocinas como o ITF-γ, que por sua vez estimula a expressão de PD-L1 no microambiente tumoral. Ao ligar-se a PD-1, PD-L1 envia um sinal supressivo às células T, levando à disfunção destas e possibilitando a progressão do tumor. Adaptado de: A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway (Ghosh et al. 2021)

Entre os vários tipos de neoplasias, o carcinoma mamário na mulher destaca-se por apresentar uma frequência relativamente elevada de amplificação do gene PD-L1 (Vranic et al. 2021), embora seja importante notar que nem sempre existe uma correlação entre a amplificação e a expressão da proteína (Vranic et al. 2021). Ainda assim, diversos estudos relataram uma sobre-expressão da proteína PD-L1 nos subtipos mais agressivos (HER2-positivo e TN) do carcinoma mamário na mulher (Noske et al. 2019; Vranic et al. 2021). E, em 2020, um estudo conduzido por Nascimento et al. revelou que no CMF, PD-L1 também se encontrava sobre-regulado para os mesmos subtipos (Nascimento et al. 2020). Posteriormente, a expressão de PD-L1 foi identificada noutros tipos de tumor felino incluindo o carcinoma de células escamosas, carcinoma das células renais e fibrossarcoma (Maekawa et al. 2023). No que se refere ao 2º ligando de PD-1, em Medicina Humana, estudos recentes relataram que PD-L2 é igualmente sobre-expresso em diversos tipos de tumores, incluindo o carcinoma escamoso da cabeça e do pescoço (CECP), o adenocarcinoma esofágico e o carcinoma colorretal (Wang et al. 2023). Recentemente, foi relatada a existência de um potencial *super-enhancer* (PD-L1L2-SE) envolvido na promoção da coexpressão de ambos os ligandos, no carcinoma mamário da mulher (Xu et al. 2020), refletindo eventuais interações entre PD-L1 e PD-L2.

Deste modo, o reconhecimento de que o eixo imunomodulador PD-1: PD-L1/PD-L2 estaria envolvido na progressão tumoral, forneceu raciocínios científicos para o desenvolvimento de fármacos, nomeadamente anticorpos monoclonais, especificamente

dirigidos para o eixo PD-1: PD-L1/PD-L2, capazes de regenerar significativamente as funções antitumorais das células T (Pardoll 2012; Zou et al. 2016).

2.2.4. Terapêuticas direcionadas anti-PD-1 e anti-PD-L1

O advento da imunoterapia revolucionou o tratamento de uma panóplia de tumores malignos, devendo grande parte do seu sucesso aos avanços no bloqueio dos pontos de controlo imunitário uma vez que ao fortalecer o SI do hospedeiro, é possível desencadear uma resposta antitumoral mais eficaz. Esta emergente e promissora alternativa terapêutica, mediante o uso de anticorpos monoclonais, tem a habilidade de induzir respostas imunitárias robustas ao revigorar as funções das células T (Iwai et al. 2002). Neste contexto, o desenvolvimento de fármacos direcionados para a molécula PD-1 ou para os seus ligandos PD-L1 e PD-L2, desperta especial interesse, uma vez que permite a obtenção de uma resposta terapêutica direcionada, com potencial redução da toxicidade e de eventuais efeitos adversos (Fan et al. 2022).

De entre os benefícios clínicos relatados, incluem-se efeitos duradouros, aplicabilidade a um amplo espectro de tipos de neoplasias malignas e toxicidade tolerável (Vranic et al. 2021). Ao longo dos últimos anos, a imunoterapia anti-PD-1/PD-L1 tem demonstrado resultados positivos em diversas aplicações clínicas, induzindo a regressão do crescimento tumoral e metástase (Ghosh et al. 2021). É, no entanto, de notar que até à data, não existem ainda ensaios clínicos sobre regimes de imunoterapia contra o ligando 2, sendo ainda necessária uma investigação mais aprofundada. No carcinoma mamário da mulher, apesar de a resposta à terapêutica com IPCI não ser frequente (aproximadamente 20%), aparenta ser duradoura, particularmente nos subtipos mais agressivos (HER2-positivo e TN) (Vranic et al. 2021). Foi demonstrado que o subtipo TN, apresenta um aumento na expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização imunitária, incluindo a via PD-1: PD-L1/PD-L2, sendo considerado um tipo de tumor mais imunogénico e, por conseguinte, constituindo a imunoterapia uma opção de tratamento viável (Yam et al. 2017). E, recentemente, diversos ensaios clínicos, em Medicina Humana, têm vindo a confirmar o benefício da utilização de IPCI no carcinoma mamário TN localmente avançado ou metastático (Schmid et al. 2018; Cortes et al. 2020).

Não obstante, as taxas de resposta a esta modalidade terapêutica são ainda limitadas (Ghosh et al. 2021). Pensa-se que os níveis de expressão de PD-L1, a infiltração de linfócitos T no MAT e a carga de mutação tumoral, sejam os fatores mais importantes que afetam a eficácia do bloqueio PD-1/PD-L1 (Ai et al. 2020). No entanto, um recente trabalho mostrou que as mutações detetadas no gene PD-L1 felino não modificavam o domínio extracelular da proteína, o qual é reconhecido pelo anticorpo monoclonal aprovado para o tratamento do

carcinoma mamário humano, tendo os autores defendido que este facto não deverá comprometer o futuro desenvolvimento de terapêutica anti-PD-L1 para o tratamento do CMF (Nascimento et al. 2020).

Por outro lado, o ligando 1, possui outros parceiros de ligação para além de PD-1, como o B7-1, podendo interagir com este na membrana das células T (Ghosh et al. 2021). B7-1 não funciona apenas como um ligando de CD28 para fornecer sinais coestimulatórios, ou de CTLA-4 fornecendo sinais coinibitórios, mas, pode igualmente comportar-se como um recetor de PD-L1 propiciando sinais inibitórios para as funções das células T (Ghosh et al. 2021), como representado na Figura 2. Tal revela que, teoricamente, é possível que um anticorpo anti-PD-1 iniba a ligação de PD-L1 e PD-L2 a PD-1, sem, porém, impedir a ligação do PD-L1 a B7-1. Por outro lado, a maioria dos anticorpos anti-PD-L1, bloqueia a ligação do PD-L1 a PD-1 e a B7-1, mas não impossibilita a ligação do PD-L2 ao recetor PD-1 (Pardoll 2012).

Assim, a imunoterapia combinada tem sido considerada uma alternativa ao melhoramento da taxa de resposta à terapêutica anti-PD-1/PD-L1, ao associá-la a outros IPCI, como o CTLA-4 (Rotte 2019), ou à radioterapia, quimioterapia e a vacinas tumorais (Mkrtichyan et al. 2011; Ghosh et al. 2021), pois, desta forma torna-se possível o bloqueio de diferentes vias de sinalização, com recurso a concentrações mais baixas do medicamento. Em 2018, um estudo conduzido por Schmid et al. estabeleceu o benefício de conjugar um IPCI à quimioterapia padrão como tratamento de primeira linha do carcinoma mamário TN (Schmid et al. 2018). Tal estudo, referente à fase 3 de um ensaio clínico anti-PD-L1, levou a que a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovasse o Atezolizumab (anticorpo anti-PD-L1) combinado com quimioterapia (nab-Paclitaxel) para o tratamento de pacientes com carcinoma mamário do subtipo TN PD-L1-positivo, inoperável e localmente avançado ou metastático (Vranic et al. 2021) e, juntamente com o medicamento, foi também aprovado o ensaio VENTANA PD-L1 (SP142) como teste de diagnóstico complementar para avaliar a expressão de PD-L1 dos pacientes previamente ao tratamento (Vranic et al. 2021). Atualmente, a FDA já aprovou 6 drogas direcionadas para o eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 para o tratamento de vários tipos de neoplasias malignas, das quais 3 correspondem a anticorpos monoclonais dirigidos para PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab e Cemiplimab) e os restantes anti-PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) (Fan et al. 2022).

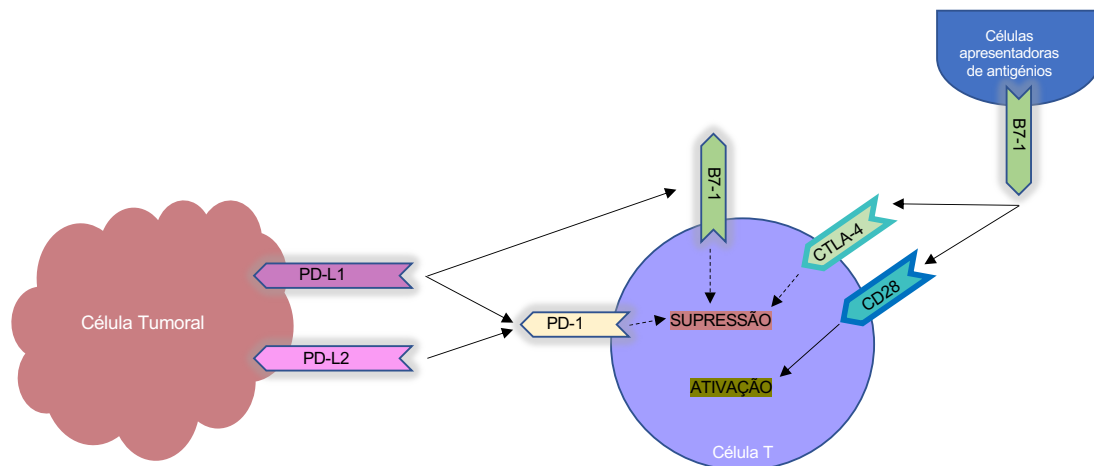


Figura 2. Interação das vias imunorreguladoras na ativação ou inibição da atividade das células T. A conjugação dos ligandos PD-L1 ou PD-L2 com o recetor PD-1, leva à supressão da atividade das células T. Para além do PD-1, B7-1 constitui um outro parceiro de ligação de PD-L1, em que a interação destes também inibe a atividade das células T. B7-1 não funciona apenas como um ligando de CD28 para fornecer sinais coestimulatórios, ou de CTLA-4 fornecendo sinais coinibitórios, mas, pode igualmente comportar-se como um recetor de PD-L1 propiciando sinais inibitórios para as funções das células T (Imagem original da autora).

Em Medicina Veterinária, a imunoterapia comportando o eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 já demonstrou eficácia antitumoral no melanoma oral maligno canino e no sarcoma indiferenciado (Maekawa et al. 2017; Maekawa et al. 2021). Todavia, até ao momento, nenhum anticorpo para o bloqueio deste eixo para tumores em felinos foi desenvolvido. Entretanto, dada a homologia entre o sistema imunitário e os processos envolvidos na gênese de tumores em mamíferos, Maekawa et al. (2023) formulam a hipótese de que a aplicação da imunoterapia com IPCI, representa uma estratégia promissora para o tratamento de neoplasias em felinos (Maekawa et al. 2023). Adicionalmente, sugerem que pela elevada similaridade observada nas sequências e nas estruturas conservadas dos domínios de PD-1, PD-L1 e PD-L2 entre diversas espécies de mamíferos, possa indicar uma equivalência funcional na via PD-1: PD-L1/PD-L2 como um mecanismo supressor da resposta imunitária mediada por células T (Maekawa et al. 2023).

Quanto ao papel de PD-L1 como biomarcador preditivo de resposta à terapêutica anti PD-1/PD-L1, pensa-se que a sua expressão nas CT não deva ser aplicada, uma vez que a elevada expressão de PD-L1 não garante a resposta à terapêutica e a baixa ou nenhuma expressão, não exclui a possibilidade de resposta (Aguar et al. 2017), destacando a necessidade de pesquisa sobre o 2º ligando de PD-1 e que, paralelamente à avaliação da expressão de PD-L1, PD-L2, também deverá ser considerado para prever a eficiência da terapêutica anti-PD-1. De facto, foi demonstrado que a taxa de resposta global a terapêutica com Pembrolizumab (anti-PD-1) no CECP, foi de duas vezes superior em pacientes com tumores positivos para ambos os ligandos PD-L1 e PD-L2, quando comparado com apenas

PD-L1 isolado (Yearley et al. 2017). Tais resultados refletem a potencial relação entre o PD-L1 e o PD-L2 e reforçam que os níveis de expressão de PD-L2 devem ser igualmente considerados para prever a eficácia da terapêutica anti-PD-1, bem como a necessidade de investigar terapêuticas anti-PD-L1/PD-L2 (Yang et al. 2024). Contudo, foi demonstrado que a expressão de PD-L1 pelos LITs, está relacionada com a resposta clínica ao bloqueio do eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 com imunoterapia direcionada anti-PD-L1 (Atezolizumab) (Cimino-Mathews et al. 2016; Schmid et al. 2018).

2.2.5. Expressão de PD-L1 e PD-L2 nos tumores e as suas relações com o prognóstico

A expressão de PD-L1 tem sido motivo de debate, não apenas quanto ao seu potencial papel preditivo para a eficácia das terapêuticas de bloqueio da via PD-1/PD-L1, mas também quanto ao seu valor como marcador prognóstico (Huang et al. 2019). Um estudo conduzido por Muenst et al. (2014), em Medicina Humana, foi o primeiro a evidenciar a associação da expressão de PD-L1 nas células do tumorais da mama com um prognóstico desfavorável, independentemente de outros fatores de prognóstico estando, adicionalmente, associada a um pior tempo de SG (Muenst et al. 2014). Tal estudo ainda revelou uma sólida correlação entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais e a presença de LITs PD-1 positivos (Muenst et al. 2014). Posteriormente, uma meta-análise validou igualmente a associação entre a elevada expressão de PD-L1 e um prognóstico adverso, tendo sido associada a preditores de mau prognóstico como o elevado grau e a invasão linfovascular (X. Li et al. 2016).

Contraditoriamente, estudos adicionais destacaram que PD-L1 poderá desempenhar um papel como biomarcador de prognóstico favorável no carcinoma mamário humano, uma vez que a expressão desta proteína demonstrou uma associação significativa com uma maior SG, sugerindo que este resultado poderia dever-se à presença de uma forte resposta imunitária antitumoral que levaria à indução da expressão de PD-L1 (Baptista et al. 2016). Assim, com o intuito de esclarecer o valor prognóstico de PD-L1, em 2019, Huang et al. levaram a cabo uma meta-análise abrangente, a qual incluiu 47 estudos com um total de 14367 pacientes com neoplasias mamárias malignas, onde os resultados fortaleceram a associação adversa entre a expressão de PD-L1 nas CT e os desfechos prognósticos negativos. Adicionalmente, fatores clinicopatológicos desfavoráveis, como o elevado grau histológico (Grau III), uma dimensão tumoral considerável, alto índice de proliferação celular ki-67 e a ausência de RE e RP, apresentaram correlações positivas com a expressão de PD-L1 nas células tumorais. Para além disso, pacientes com tumores PD-L1 positivos, foram significativamente associados a menores TLD e de SG. Destacou-se, no entanto, que a expressão de PD-L1 nos LITs pode, potencialmente, ser um biomarcador de prognóstico

favorável (Huang et al. 2019; Vranic et al. 2021). Esta observação introduz uma luz na compreensão da relação entre PD-L1 e o prognóstico, sugerindo que a expressão desta proteína nos diferentes tipos celulares poderá ter implicações distintas no desfecho clínico.

Apesar de os níveis séricos de PD-1 e PD-L1 serem menos estudados, um recente estudo, em Medicina Veterinária, demonstrou que quando estes se encontram elevados, poderão desenvolver uma imunossupressão sistêmica, que contribui para a progressão tumoral e, portanto, devem ser considerados como fatores prognósticos adversos (Nascimento et al. 2020). O mesmo estudo relatou ainda que nos subtipos HER2-positivo e TN normal-like do CMF, os elevados níveis séricos destas proteínas apresentaram uma forte concordância com a sobre-expressão das mesmas nos tecidos mamários imunofenotipados, sugerindo que a análise sérica poderá, eventualmente, tornar-se uma ferramenta não invasiva para a avaliação destas moléculas de PCI no CMF (Nascimento et al. 2020).

Assim, os resultados controversos nos diversos estudos, acerca do real valor prognóstico da expressão de PD-L1 nas neoplasias mamárias malignas, parcialmente devidos a questões técnicas relacionadas com clones de anticorpos díspares utilizados e distintos sistemas de pontuação, levam à clara necessidade de uma maior padronização do ensaio de avaliação de PD-L1, para que finalmente se possa esclarecer o seu valor como biomarcador prognóstico no carcinoma mamário.

No que se refere a PD-L2, estudos realizados em Medicina Humana, têm demonstrado que a sobre-expressão deste ligando está associada a prognósticos mais reservados em diversos tipos de tumores (Yang et al. 2024), nomeadamente no carcinoma escamoso da cabeça e do pescoço, uma expressão aumentada de PD-L2 foi associada a piores TLD e SG (Qiao et al. 2021).

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização da população

Em concordância com o projeto AL4AnimalS 2023, a população alvo do presente estudo incluiu gatas com tumores mamários raros, diagnosticados nos últimos 12 anos (2011-2022) no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, segundo a classificação proposta por Zappulli et al. (2008) (Tabela 2). Amostras de tecido de tumores mamários que não se encontrassem adequadamente preservadas, ou que não tivessem seguido protocolos rigorosos de processamento, como um tempo de fixação em formol a 10% inferior ou igual a 48 horas, foram excluídas do presente estudo. Deste modo, foram incluídas 47 gatas e reunidas 48 amostras de carcinomas mamários raros, uma vez que uma das pacientes apresentava dois tipos de tumores histologicamente distintos. As seguintes características clinicopatológicas foram registadas: idade ao momento do diagnóstico, raça, dimensão tumoral, presença de ulceração cutânea, classificação histopatológica, grau de malignidade, presença de necrose tumoral, distribuição da lesão (unifocal ou multifocal), permeação vascular, envolvimento dos linfonodos regionais (Tabela 5), e adicionalmente, o TLD e a SG.

Tabela 5. Características clinicopatológicas e histopatológicas de gatas com tumores mamários raros incluídas no estudo

Características clinicopatológicas	Nº animais(%) (n=47)*	Características histopatológicas	Nº de amostras(%) (n=48)**
Idade (anos)		Classificação histológica	
< 8 anos	3 (6%)	Carcinoma mucinoso	36 (75%)
8-12 anos	21 (45%)	Carcinoma adenoescamoso	8 (17%)
>12 anos	21 (45%)	Carcinosarcoma	4 (8%)
Desconhecida	2 (4%)	Grau de malignidade	
Raça		I	1 (2%)
Europeu Comum	33 (70%)	II	10 (21%)
Siamês	2 (4%)	III	37 (77%)
Doméstico	2 (4%)	Necrose tumoral	
Persa	3 (7%)	Sim	33 (69%)
Bosque da Noruega	1 (2%)	Não	15 (31%)
Birmanês	1 (2%)	Distribuição da lesão	
Indeterminada	5 (11%)	Unifocal	26 (54%)
		Multifocal	22 (46%)
Características clinicopatológicas	Nº amostras(%) (n=48)**	Permeação Vascular	
Tamanho tumoral (cm)		Sim	8 (17%)
< 2 cm	9 (19%)	Não	40 (83%)
≥ 2 cm	39 (81%)	Envolvimento linfonodo	
Ulceração cutânea		Sim	12 (25%)
Sim	10 (21%)	Não	20 (42%)
Não	38 (79%)	Desconhecido	16 (33%)

*n=47: corresponde às 47 gatas incluídas no estudo; **n=48: corresponde às 48 amostras de tecido de carcinoma mamário felino (Tabela original da autora)

Brevemente, a população em estudo foi constituída por 47 gatas com média de idades de 12.2 anos (intervalo 4–20 anos), em que a maioria das pacientes (42/47, 89%) apresentou idades iguais ou superiores a 8 anos ao momento do diagnóstico. De acordo com a Tabela 5, a raça predominante foi europeu comum (33/47, 70%). Constatou-se que 81% (39/48) dos tumores apresentaram dimensões iguais ou superiores a 2 cm. Adicionalmente, 79% (38/48) das neoplasias mamárias apresentaram ausência de ulceração cutânea. Quanto à classificação histopatológica, das 48 amostras, a maioria 36 (75%) correspondeu a carcinomas mucinosos (Figura 3), seguidos por 8 (17%) carcinomas adenoescamosos e 4 (8%) carcinosarcomas (Tabela 5). A média do TLD foi 10.0 meses (n=15; 95% IC: 3.4 – 16.4 meses) e a média da SG foi 12.7 meses (n=15, 95% IC: 6.0 – 19.4 meses).

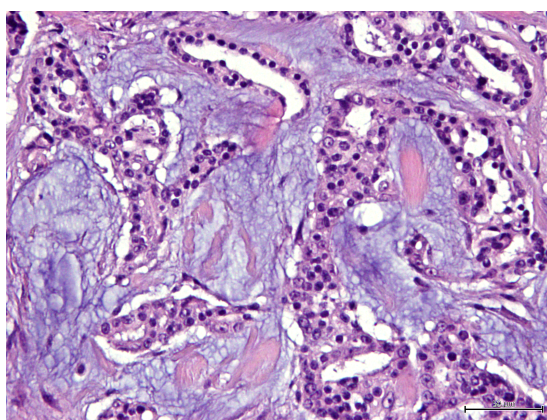


Figura 3. Imagem histológica de carcinoma mamário mucinoso (H&E, x200, barra=50 µm). Caracterizado pela produção abundante de muco a partir de uma população de células epiteliais lúminais neoplásicas, sem proliferação de células mioepiteliais (Fotografia original da autora).

As amostras de tecido utilizadas para posterior imunofenotipagem provieram de pacientes submetidas a mastectomia, tendo sido seguidamente fixadas em solução de formol a 10% embebidas em parafina e conservadas em blocos (FFEP).

3.2. Análise Imunohistoquímica e interpretação

Com o intuito de avaliar a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2 nas amostras de tecido mamário tumoral, as regiões providas de maior área que incluisse a neoplasia sem artefactos ou necrose, foram delimitadas com um marcador nas respectivas 48 lâminas histológicas, ao que se seguiu a delimitação das mesmas áreas nos relativos blocos FFEP, com auxílio de um *punch* de biópsia de 8 mm de diâmetro. Seguidamente, com recurso a um micrótomo, as amostras de tecido, de cada tumor, foram seccionadas resultando em cortes histológicos dos blocos FFEP com uma espessura equivalente a 3 µm e, consecutivamente, colocadas em lâminas de vidro adesivas e providas de carga. Procedeu-se à secagem das mesmas, colocando-as em estufa a 64 °C durante a noite.

Para a realização da técnica de IHQ, primordialmente, os cortes foram colocados no PT-Link (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA), um equipamento apto para realizar a desparafinação, re-hidratação e recuperação dos epítomos, durante 40 min a 96 °C, utilizando um tampão de recuperação de citrato a pH 6.0 (Dako, K8000) para os anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L2, e um tampão de Triz-EDTA a pH 9.0 (Dako, K8000) para o anticorpo anti-PD-L1. Consecutivamente, as lâminas foram arrefecidas à temperatura ambiente (TA) durante 20 min e enxaguadas com água destilada (2x5 min), ao que se seguiu a delimitação das amostras de tecido com auxílio de uma caneta hidrofóbica. A atividade da peroxidase endógena foi neutralizada com solução de Peroxidase Block Novocastra (Novocastra, Leica Biosystems, Newcastle, UK) por 15 min à TA, seguida por lavagem com PBS (2x5 min). Para evitar a ligação inespecífica de imunoglobulinas, as amostras de tecido foram incubadas com solução de Protein Block Novocastra (Leica Biosystems) por 15 min à TA. Após duas lavagens com PBS (2x5 min), procedeu-se à incubação com o anticorpo monoclonal anti-PD-1 (diluição 1:25, clone J116, eBioscience), ou com o anticorpo monoclonal anti-PD-L1 (diluição 1:100, clone CAL 10, Abcam, USA), ou com o anticorpo policlonal anti-PD-L2 (diluição 1:400, clone PA5-20344, Invitrogen, USA), à TA durante 60 min, ao que se seguiram novas lavagens com PBS (2x5 min). De seguida, foi utilizada a solução Post Primary Novocastra (Leica Biosystems), com o intuito de saturar quaisquer locais de ligação ainda disponíveis no tecido alvo que não tivessem sido anteriormente bloqueados pelo anticorpo primário, por um período de 30 min à TA. Após novas lavagens com PBS (2x5 min), procedeu-se à incubação com o Novolink Polymer (Leica Biosystems) durante 30 min. Sequencialmente, e previamente a lavagem adicional com PBS (2x5 min), a revelação da marcação foi realizada recorrendo a uma solução constituída por 1 gota de cromogéneo diamina-benzidina (DAB) (Dako, K8000) diluída em 1 ml de tampão substrato (Dako, K8000), durante 5 min. Seguiu-se a lavagem com água destilada por 5 min e o contraste com hematoxilina de Harris por 1 min e posterior desidratação dos tecidos numa série contínua e graduada de etanol e xilol e, por último, cobertas por uma lamela de vidro. Para cada um dos anticorpos, linfonodo e tecido mamário saudável de felino foram utilizados como controlos positivo e negativo, respetivamente. Adicionalmente, controlos negativos com linfonodo felino, mediante a ausência da aplicação dos anticorpos primários foram realizados, para ambos os tampões de recuperação (citrato e Triz-EDTA), onde se verificou que o passo para a aplicação do reagente pós-primário (Post Primary Novocastra) não conferia marcação inespecífica (Figura 4).

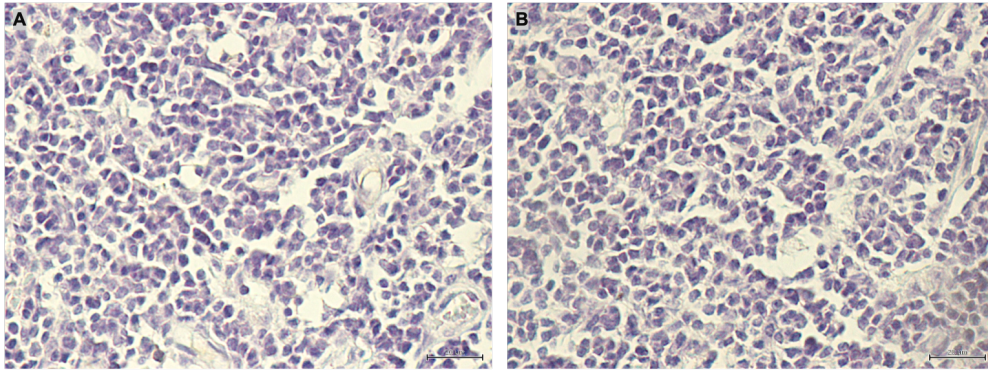


Figura 4. Controlos negativos em linfonodo felino sem aplicação dos anticorpos primários (PD-1, PD-L1 e PD-L2) com os tampões de recuperação de (A) citrato (pH 6) e de (B) Triz-EDTA (pH 9) (x400, barra=20 μ m). (Fotografias originais da autora).

O acesso aos LITs foi realizado segundo as recomendações propostas pelo *International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group* (Hendry et al. 2017). Brevemente, os LITs devem ser reportados separadamente para o compartimento estromal (% LITs estromais) e para o compartimento das células tumorais (% LITs intratumorais), embora no carcinoma mamário possa ser decidido avaliar apenas os LITs estromais. Os LITs devem ser avaliados apenas dentro dos limites do tumor invasivo, como uma variável contínua, e zonas tumorais providas de artefactos técnicos, necrose ou hialinização devem ser excluídas aquando da avaliação. Ademais, todas as células mononucleadas devem ser contadas, porém os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos devem ser excluídos. Uma secção (3 μ m, ampliação 200-400x) por tumor é considerada suficiente, no entanto recomenda-se a avaliação de secções adicionais para cada caso sempre que possível, devido à heterogeneidade tumoral (Hendry et al. 2017). Por conseguinte, para a avaliação da imunomarcção das proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2 nos LITs e nas células mamárias tumorais, para cada tumor, as amostras de tecido foram avaliadas em 7-9 campos individuais, com ampliação de 400x: 3-4 campos para observação dos LITs intratumorais (iLITs), definidos como células mononucleadas positivamente marcadas em contacto com as células tumorais ou no íntimo dos ninhos de células tumorais (Hendry et al. 2017); 3-4 campos para análise dos LITs estromais (eLITs), referentes a células mononucleadas coradas positivamente no estroma intersticial que envolve as CT (Hendry et al. 2017); e 1 campo para apreciação individual das CT. A variabilidade quanto ao número de campos examinados, deveu-se à intenção em avaliar um número de células igual ou superior a 100, para cada uma das subpopulações avaliadas, garantindo uma representação mais precisa destas proteínas no tecido tumoral tendo em conta a heterogeneidade intratumoral. Para as CT, iLITs e eLITs, a percentagem de marcação (Anexos 8, 9 e 10) foi alcançada mediante a divisão do número de células positivamente marcadas, pelo número total de células (marcadas e não marcadas), incorporadas nos campos observados, e multiplicadas por 100. Posteriormente, foi atribuída

uma escala de pontuação de percentagem (PP) de células positivamente marcadas, classificada da seguinte forma: 0 (<1%), 1 (1–5%), 2 (6–30%) e 3 (>30%). Adicionalmente, foi atribuída uma pontuação de intensidade (PI) de marcação, avaliada em quatro categorias: 0 (negativo), 1+ (fraca), 2+ (moderada), 3+ (forte) e 4+ (muito forte), tal como previamente reportado (Nascimento et al. 2020). Por último, a PI e a PP foram multiplicadas, para obtenção de uma pontuação final de IHQ (PF-IHQ), resultando numa escala com valores de pontuação compreendidos entre 0 e 12. Dado que, até ao momento, não existem *guidelines* para os valores de *cut-off*, a pontuação final de IHQ da expressão de cada uma das moléculas (PD-1, PD-L1 e PD-L2) igual ou superior a 1 ($PI \times PP \geq 1$), foi considerada positiva ao avaliar as CT e os LITs (intratumorais e estromais), de um modo semelhante a trabalhos prévios, os quais consideraram positiva a expressão de, pelo menos, 1% de células com qualquer intensidade (Nascimento et al. 2020; Mehan et al. 2022; Choi et al. 2023).

3.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no IBM SPSS *Statistic* versão 29.0.0.0 para MacOS. O valor de $P < 0.05$, foi considerado como estatisticamente significativo, para um intervalo de confiança de 95%. Os histogramas foram traçados no SPSS, e os restantes gráficos alcançados pelo programa GraphPad Prism versão 10.2.3 para MacOS. As tabelas foram realizadas no Microsoft Excel para MacOS. Primeiramente, foi verificada a distribuição das variáveis dependentes a serem comparadas, isto é, as pontuações de imunohistoquímica de PD-1, PD-L1 e PD-L2 expressos pelas células tumorais, iLITs e eLITs, para decidir os próximos testes que seriam aplicados. Para tal, foram realizados testes de normalidade, especificamente o Teste de *Shapiro-Wilk*. O teste do Coeficiente de *Spearman*, utilizado para dados não paramétricos, com $n > 30$ foi aplicado para explorar possíveis correlações entre a expressão das 3 proteínas nas CT, nos iLITs e nos eLITs. Para a comparação da expressão das moléculas PD-1, PD-L1 e PD-L2 nas células tumorais e nos LITs com diferentes localizações (intratumorais e estromais) entre pacientes com diferentes tipos histológicos de tumores, raças, idades e graus de malignidade, foi aplicado o Teste de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de comparações múltiplas de *Dunn*, uma vez que se refere a uma análise não paramétrica para comparar 3 ou mais grupos. Para a análise estatística, a característica clínica correspondente à idade foi subdividida em 3 grupos: animais mais jovens com menor risco de ocorrência da doença (<8 anos), adultos com maior risco (8-12 anos) e idosos (>12 anos). O Teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar os níveis de expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nos LITs e nas CT com diversas características clinicopatológicas como a dimensão da massa, ulceração cutânea, necrose tumoral, distribuição da lesão, permeação vascular e invasão do linfonodo regional. Os resultados foram apresentados como valores medianos.

4. Resultados

4.1. As células tumorais e os LITs intratumorais e estromais expressam PD-1, PD-L1 e PD-L2

A análise das 48 amostras de CMF revelou que o anticorpo anti-PD-1 mostrou forte imunorreação para o citoplasma e para a membrana celular das CT, LITs intratumorais e estromais (Figura 5A, 5B e 5C). Adicionalmente, observou-se que a expressão de PD-L1 nas CT ocorre no citoplasma e na membrana nuclear (Figura 5D, E), enquanto em ambas as subpopulações de LITs (intratumorais e estromais) a imunomarcacão ocorreu no citoplasma e na membrana celular (Figura 5E, F).

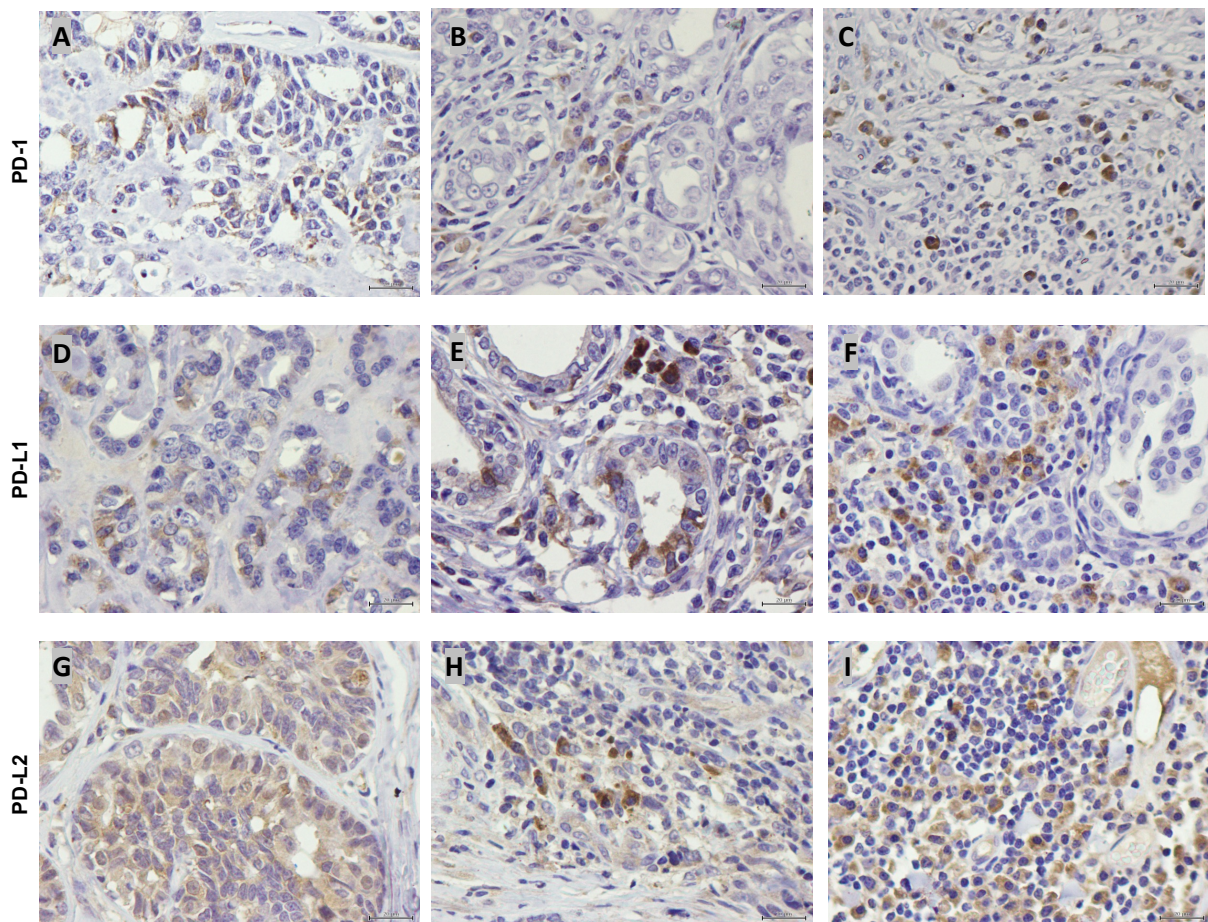


Figura 5. Imunomarcacão representativa de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nos linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) intratumorais (iLITs) e estromais (eLITs) e nas células tumorais (CT) de carcinomas mamários felinos (x400, barra=20 µm). Imunomarcacão com PD-1 (A) nas CT com pontuação de intensidade moderada (2+), (B) nos iLITs com pontuação de intensidade fraca (1+) e (C) nos eLITs com pontuação de intensidade forte (3+). Imunomarcacão com PD-L1 (D) nas CT com pontuação de intensidade 2+, (E) nas CT com intensidade 3+ contrastando com a intensidade muito forte (4+) dos iLITs e (F) nos iLITs com intensidade 2+. (G) pontuação de intensidade 1+ de PD-L2 nas CT positivas, (H) nos iLITs e (I) nos eLITs com pontuações de intensidades 2+ (Fotografias originais da autora).

Relativamente à proteína PD-L2, constatou-se que a sua expressão nas CT, mostrou imunorreacção citoplasmática e nuclear (Figura 5G) e membranar, citoplasmática e/ou nuclear em ambos os LITs (Figura 5H, I). Constatou-se uma marcação de fraca intensidade de PD-L2 em células fusiformes (Figura 5H), no endotélio (Figura 5I) e em macrófagos.

4.2. Análise da expressão do recetor PD-1 e dos seus ligandos PD-L1 e PD-L2

Após a atribuição da pontuação final de IHQ (PF-IHQ) para a expressão do recetor e dos seus ligandos PD-L1 e PD-L2 e considerando como marcação positiva uma PF-IHQ ≥ 1 , observou-se que PD-1 apresentou positividade em 13% (6/48) das amostras nas CT, como representado na Figura 6a.

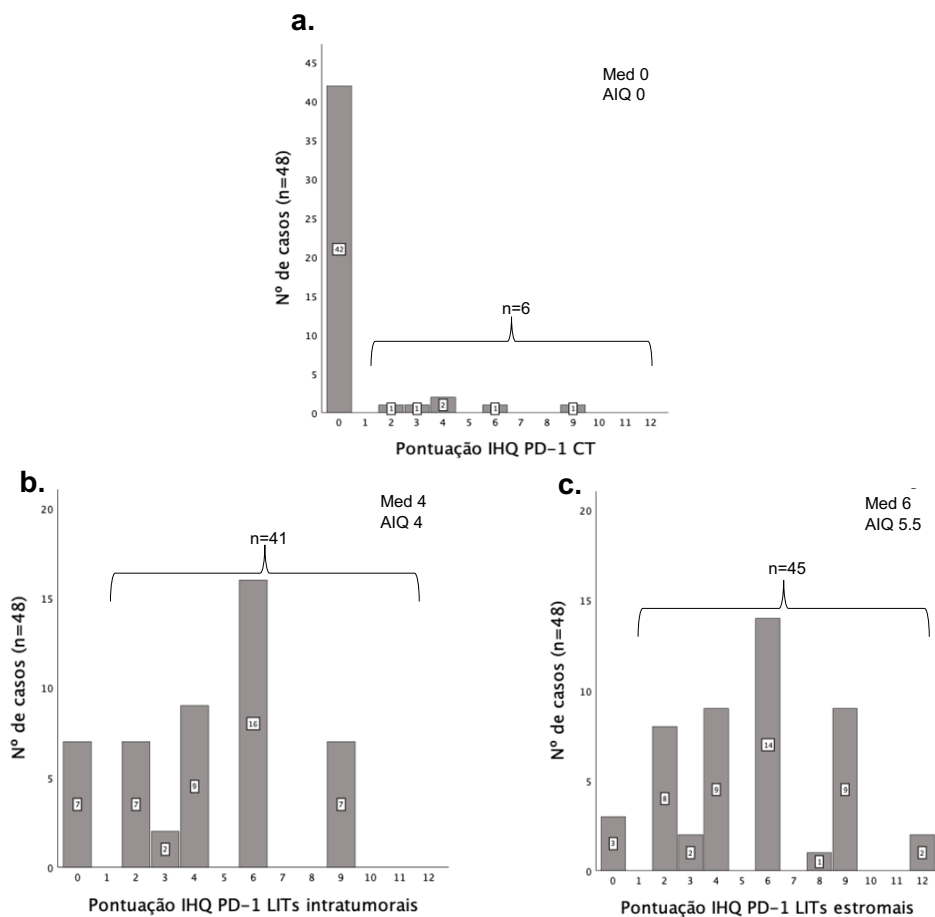


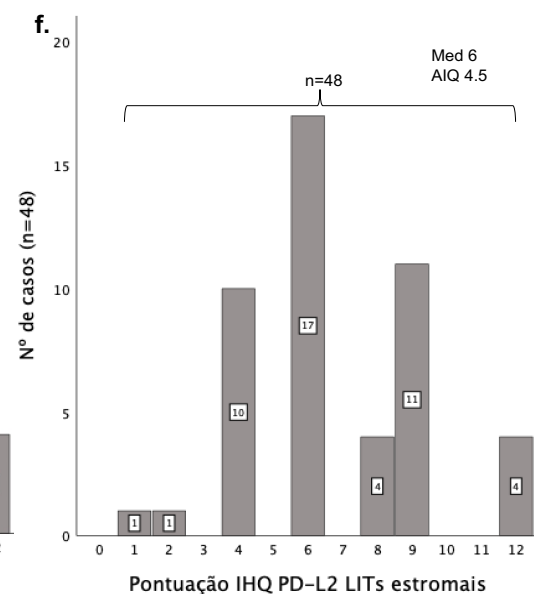
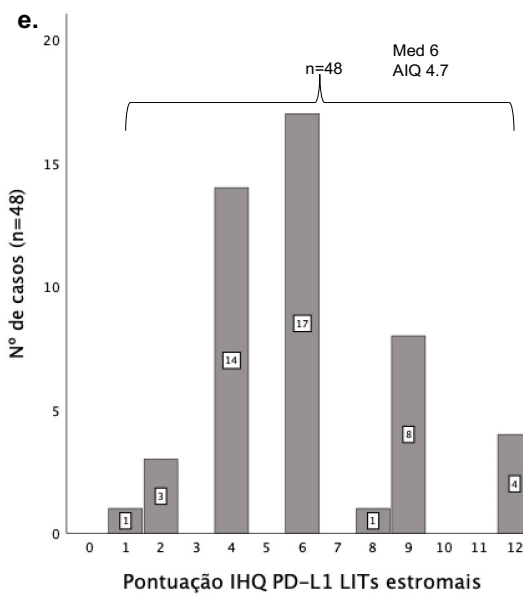
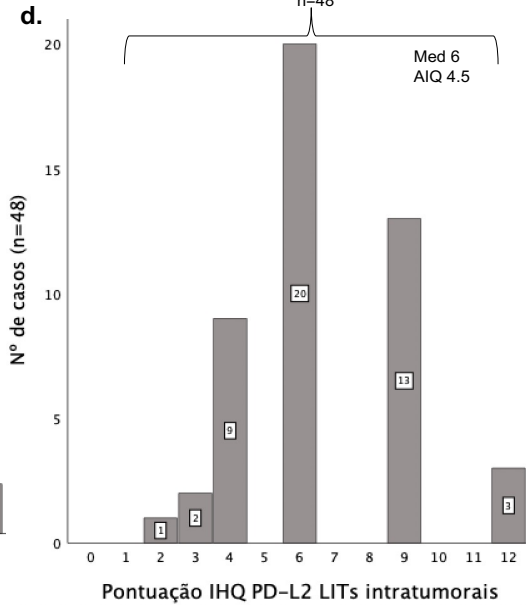
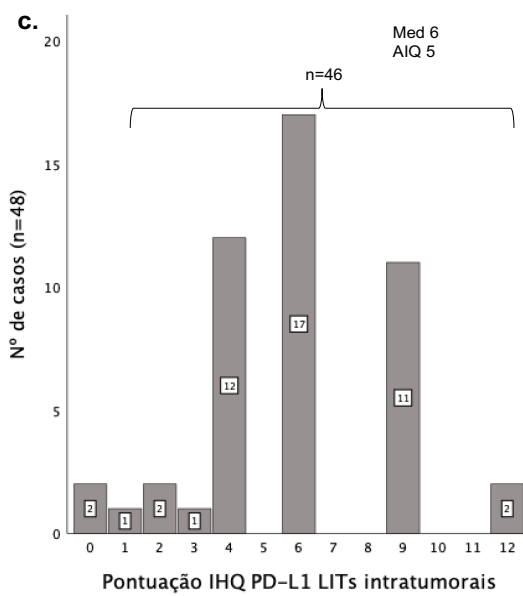
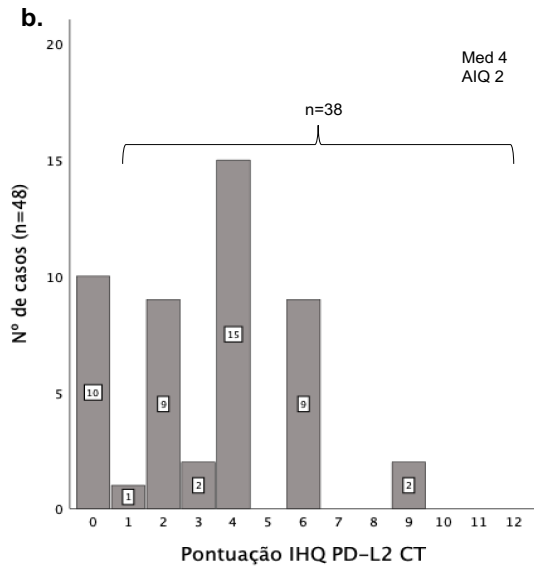
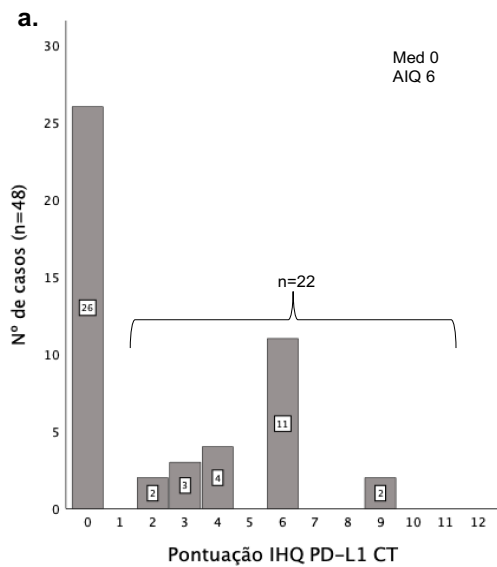
Figura 6. Histogramas representativos da distribuição das pontuações finais de imunohistoquímica de PD-1 nas células tumorais e nos linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais e estromais nos 48 casos analisados. Distribuição das pontuações finais de imunohistoquímica (IHQ) nas (a) células tumorais (CT), nos (b) linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) intratumorais e nos (c) LITs estromais, com a respetivas medianas (Med) e amplitudes interquartis (AIQ). O “n” localizado sobre as chavetas corresponde ao número de casos nos quais a imunomarcação foi positiva (≥ 1) (Figura original da autora).

Quanto aos LITs intratumorais e estromais, o recetor PD-1 mostrou ser expresso em 85% (41/48) e 94% (45/48) dos casos, respetivamente (Figura 6b e 6c), indicando que a prevalência de positividade para PD-1 foi ligeiramente superior nos eLITs. Constatou-se, ainda, que em 6% (3/48) das amostras de carcinoma mamário, não se verificou imunorreacção de PD-1 para qualquer uma das subpopulações de células analisadas. Para além disso, os LITs estromais apresentaram maiores PF-IHQ com uma mediana 6 (AIQ 5.5), relativamente aos LITs intratumorais com mediana 4 (AIQ 4), como mostrado nas Figura 6b e 6c. Foi observado que a maioria dos casos com LITs intratumorais (56%; 23/41) e estromais (58%; 26/45) positivos para o recetor apresentaram PF-IHQ ≥ 6 , o que indica que, nestes casos, um mínimo de 6% de LITs apresentaram marcação para PD-1 (PP: 2 [6-30%] ou 3 [>30%]), com intensidades de coloração variando de forte (3+) a muito forte (4+), o que reflete que uma parte extraordinária das amostras de tecido analisadas, revelou uma forte expressão de PD-1 pelas células imunitárias.

No que se refere ao ligando PD-L1, observou-se que a sua expressão apresentou elevada prevalência nas amostras de tumores mamários analisadas. Assim, o PD-L1 mostrou imunomarcação em 46% (22/48), 96% (46/48) e 100% (48/48) das amostras de tecido imunofenotipadas nas CT, LITs intratumorais e LITs estromais, respetivamente (Figura 7a, 7c e 7e). Além disso, observou-se que as PF-IHQ da expressão de PD-L1, em ambas as subpopulações de LITs (63%; 30/48) e pelas CT (59%; 13/22) foram ≥ 6 na maioria dos casos estudados como se mostra nos histogramas representados na Figura 7, refletindo a elevada expressão de PD-L1 numa parte considerável das 48 amostras de CMF.

No que se refere à proteína PD-L2 a sua expressão foi observada em 79% (38/48) das amostras nas CT (Figura 7b) e 100% (48/48) dos casos mostraram imunorreacção a PD-L2 em ambas as subpopulações de LITs intratumorais (Figura 7d) e estromais (Figura 7f). De um modo análogo ao verificado para a expressão de PD-L1, verificou-se que a expressão do ligando PD-L2 nos iLITs e eLITs apresentou uma pontuação de IHQ ≥ 6 na maioria dos casos (75%; 36/48; Figura 7d e 7f). Assim, PD-L2 mostrou uma elevada prevalência de expressão nas amostras de CMF analisadas e apresentou uma maior prevalência de positividade relativamente ao PD-L1.

Figura 7. Histogramas representativos da distribuição das pontuações finais de imunohistoquímica de PD-L1 e PD-L2 em diferentes subpopulações de células nos 48 casos analisados. Distribuição da pontuação final de IHQ da expressão de PD-L1 (a) nas células tumorais (CT), (c) nos linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) intratumorais e (e) nos LITs estromais com as respetivas medianas (Med) e amplitudes interquartis (AIQ) e de PD-L2 (b) nas CT, (d) nos LITs intratumorais e (f) nos LITs estromais. O “n” sobre as chavetas corresponde ao número de casos nos quais a imunomarcação para cada um dos anticorpos foi positiva (≥ 1) (Figura original da autora).



Os nossos resultados também mostraram que 42% (20/48) das amostras de tumores mamários analisadas apresentaram uma expressão simultânea de ambos os ligandos (PD-L1 e PD-L2) pelas CT.

4.3. Análise exploratória de correlações entre os níveis de expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nas CT e nos LITs intratumorais e estromais

Inicialmente, através do teste do Coeficiente de *Spearman*, foram exploradas possíveis correlações da pontuação de IHQ da expressão de cada uma das 3 moléculas entre as diferentes subpopulações de células (CT, iLITs e eLITs). Os dados obtidos mostraram uma correlação positiva, forte e significativa ($r = 0.677$) das pontuações de expressão de PD-1 entre os iLITs e os eLITs (Figura 8a). Adicionalmente, observou-se uma correlação positiva ($r = 0.520$) das pontuações de expressão de PD-L1 entre os iLITs e eLITs (Figura 8b), constatando-se, ainda, que as CT e os iLITs ($r = 0.345$) (Figura 8c), assim como as CT e os eLITs ($r = 0.524$) (Figura 8c) mostraram correlações positivas, moderadas e significativas. Complementarmente, foi encontrada uma correlação positiva e moderada ($r = 0.520$) das pontuações de expressão de PD-L2 entre os iLITs e os eLITs (Figura 8d).

Em seguida, foram investigadas possíveis correlações da expressão do recetor PD-1 nas CT, iLITs e eLITs, com cada um dos seus ligandos, igualmente expressos nas diferentes subpopulações de células. Relativamente à análise realizada entre PD-1 e PD-L1, ao realizar o teste de correlação de variáveis, apenas se constatou uma correlação positiva, moderada e significativa ($r = 0.374$) das pontuações de IHQ entre os eLITs de ambas as proteínas (Figura 9a). Relativamente à análise de comparação entre PD-1 e PD-L2, os dados obtidos mostraram que estas moléculas apresentaram uma correlação positiva, moderada e significativa ($r = 0.353$), quando expressas pelas CT (Figura 9b). O teste do coeficiente de *Spearman* revelou, ainda, que a expressão de PD-1 pelos iLITs se correlacionou positivamente com os níveis de PD-L2 quando expresso pelos iLITs ($r = 0.431$) (Figura 9c) e pelos eLITs ($r = 0.307$) (Figura 9e), sendo que as pontuações de IHQ da expressão de PD-1 pelos eLITs foi também positivamente correlacionada com as pontuações de PD-L2 quando expresso pelos eLITs ($r = 0.381$) (Figura 9d), bem como pelos iLITs ($r = 0.345$) (Figura 9f).

Por fim, foi investigada a existência de correlações entre os níveis de expressão de PD-L1 e de PD-L2. O teste do coeficiente de *Spearman* revelou uma correlação positiva, moderada e significativa ($r = 0.457$) entre os níveis de expressão de PD-L1 pelas CT e de PD-L2 expresso pelas CT (Figura 9g). Ademais, a expressão de PD-L1 pelos iLITs foi positivamente correlacionada ($r = 0.318$) com a expressão de PD-L2 pelos eLITs (Figura 9h).

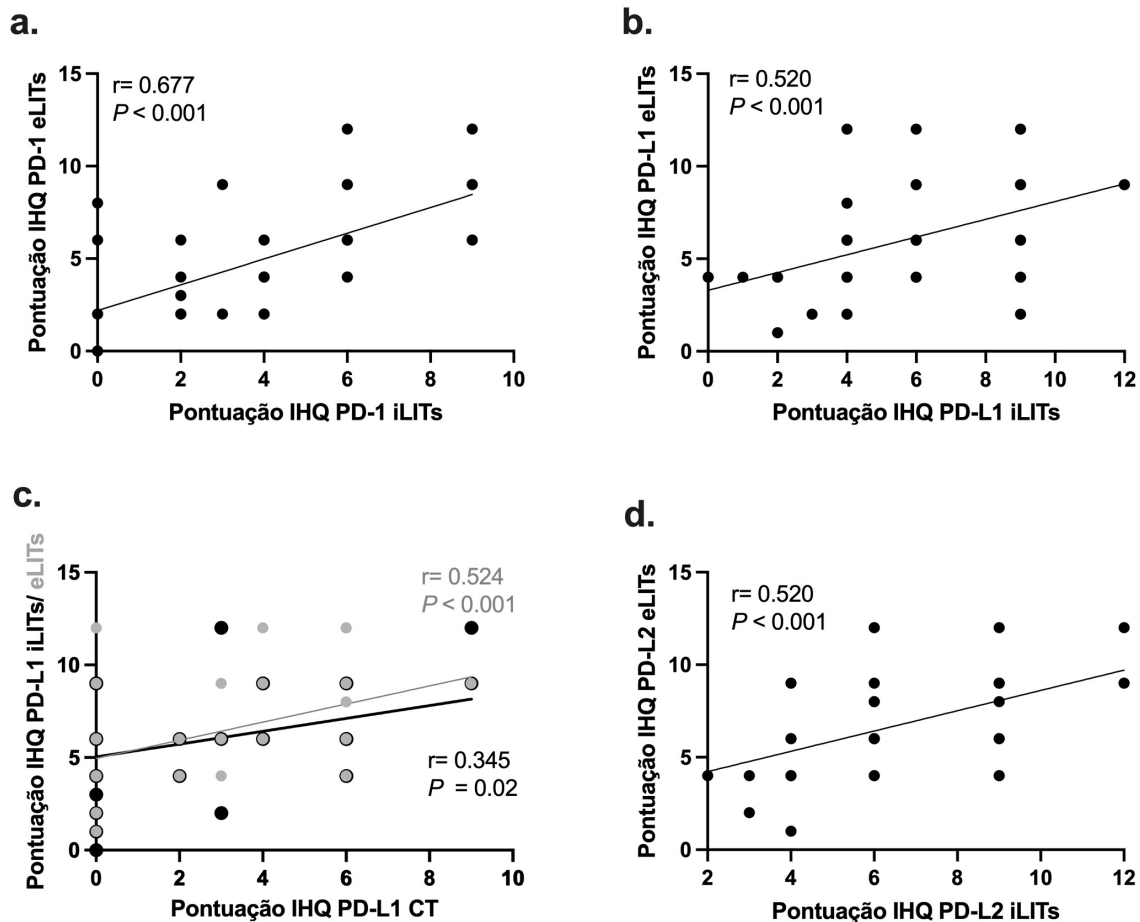
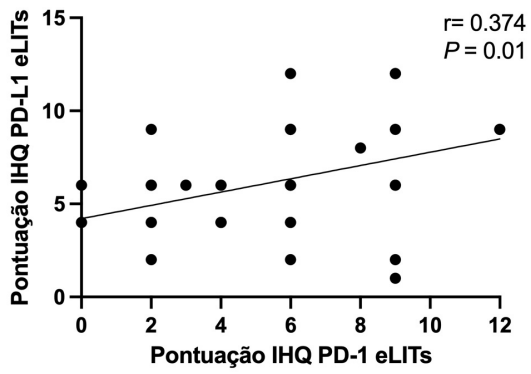


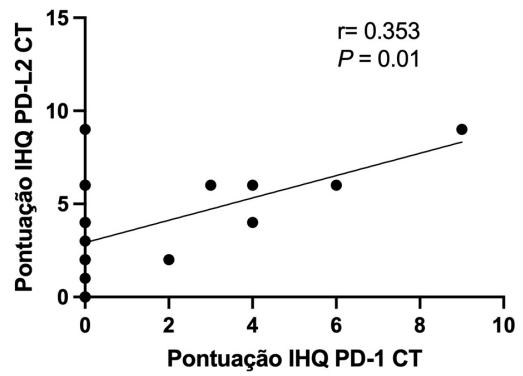
Figura 8. Correlações de Spearman da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2 entre as diferentes subpopulações de células. A pontuação de imunohistoquímica (IHQ) dos linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais (iLITs) apresentou correlação positiva com os LITs estromais (eLITs) para a expressão de (a) PD-1 ($r = 0.677$ $P < 0.001$), (b) PD-L1 ($r = 0.520$ $P < 0.001$) e (d) PD-L2 ($r = 0.520$ $P < 0.001$). A pontuação de IHQ da expressão de PD-L1 pelas células tumorais (CT) mostrou correlação positiva com (c) os iLITs ($r = 0.345$ $P = 0.02$) e com os eLITs ($r = 0.524$ $P < 0.001$) (Figura original da autora).

Figura 9. Correlações de Spearman entre a expressão do recetor PD-1 com cada um dos seus ligandos PD-L1 e PD-L2 expressos pelas células tumorais (CT), linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais (iLITs) e LITs estromais (eLITs) e correlações entre a expressão de PD-L1 e PD-L2. A pontuação de imunohistoquímica (IHQ) da expressão de PD-1 (a) pelos eLITs foi positiva e significativamente correlacionada com os níveis de PD-L1 expresso pelos eLITs ($r = 0.374$ $P = 0.01$). PD-1 expresso pelas CT (b) foi correlacionado com PD-L2 expresso pelas CT ($r = 0.353$ $P = 0.01$). Os níveis de expressão de PD-1 pelos iLITs foram positivamente correlacionados com (c) os níveis de PD-L2 expresso pelos iLITs ($r = 0.431$ $P < 0.01$) e (e) pelos eLITs ($r = 0.307$ $P = 0.03$). Os níveis de expressão de PD-1 pelos eLITs, apresentaram correlação positiva com (d) os níveis de PD-L2 expresso pelos eLITs ($r = 0.381$ $P < 0.01$) e (f) pelos iLITs ($r = 0.345$ $P = 0.02$). A expressão de PD-L1 pelas CT foi positivamente correlacionada ($r = 0.457$ $P < 0.001$) com a (g) expressão de PD-L2 pelas CT. PD-L1 expresso pelos iLITs apresentou correlação positiva ($r = 0.318$ $P = 0.03$) com (h) PD-L2 expresso pelos eLITs (Figura original da autora).

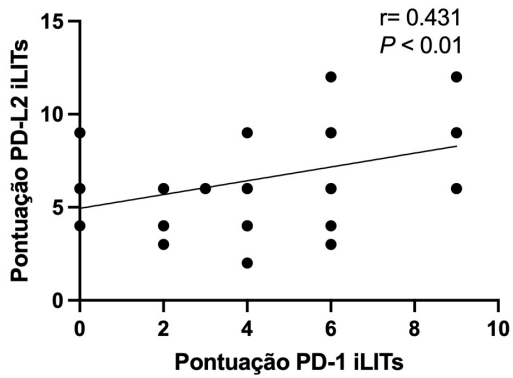
a.



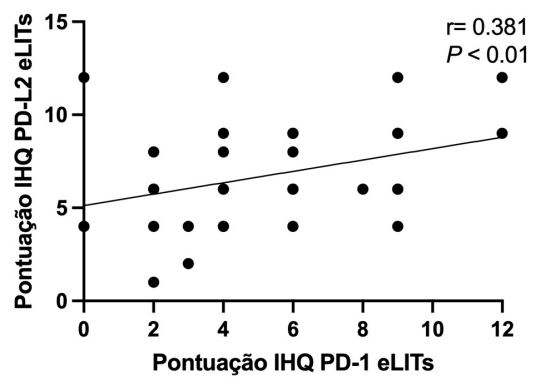
b.



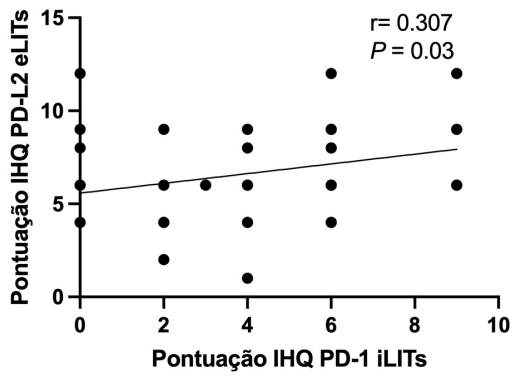
c.



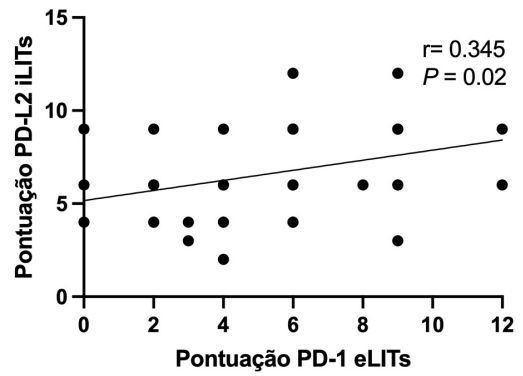
d.



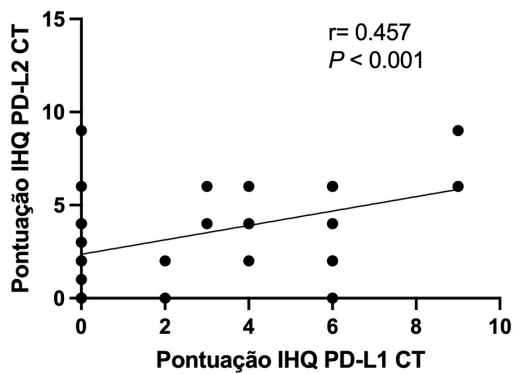
e.



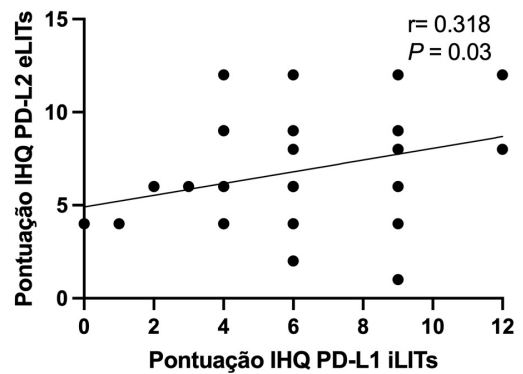
f.



g.



h.



4.4. Análise estatística da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2 com as diferentes características clinicopatológicas

Posteriormente, foi realizada a análise estatística com o intuito de investigar possíveis associações entre a expressão de PD-1, PD-L1 ou PD-L2 nas diferentes subpopulações de células (CT e iLITs e eLITs), com as várias características clinicopatológicas apresentadas pelos animais incluídos no presente trabalho.

Observou-se que a expressão de PD-1 pelas CT se encontra associada a características clínicas relacionadas com um comportamento mais benigno do tumor. Assim, ao ser avaliada a pontuação de IHQ de PD-1 nas células tumorais, entre os grupos relativos à presença ou ausência de necrose tumoral, foi possível verificar, através do teste U de *Mann-Whitney*, que houve diferença estatisticamente significativa ($U = 192,500$; $P < 0.05$), sendo que os tumores que não apresentavam necrose mostraram (Med 0 ± 4) maiores pontuações finais de IHQ para PD-1 nas CT, relativamente aos tumores com necrose (Med 0 ± 0), como representado na Figura 10a e na Tabela 6. Adicionalmente, através do teste de *Kruskal-Wallis* (H) foi possível verificar diferença na expressão de PD-1 entre os graus histológicos II e III [$H(2) = 8,788$; $P < 0.05$], onde se constatou que as neoplasias com grau III apresentaram menores pontuações finais de IHQ da expressão de PD-1 pelas CT (Med 0 ± 0), relativamente aos tumores com grau II (Med 0 ± 4), como mostrado na Figura 10b e na Tabela 6.

Relativamente a PD-L1, através do teste U de *Mann-Whitney* observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($U = 89,000$; $P < 0.05$) entre a expressão de PD-L1 nos LITs intratumorais e os grupos relativos à presença ou ausência de ulceração cutânea, onde, os tumores com ulceração cutânea apresentaram maiores pontuações finais de IHQ (Med 9 ± 3), comparativamente àqueles com ausência de ulceração (Med 6 ± 2), como mostrado na Figura 10c e na Tabela 7.

Finalmente, ao comparar as pontuações finais de IHQ para a expressão de PD-L2 nas CT, com os grupos relativos à presença ou ausência de ulceração cutânea, curiosamente foi notada uma associação inversa àquela observada para PD-L1 expresso pelos LITs intratumorais, uma vez que com a realização do teste U de *Mann-Whitney* ($U = 112,000$; $P < 0.05$), constatou-se que os tumores com a ausência de ulceração cutânea (Med 4 ± 4) apresentaram maiores pontuações finais de IHQ para a expressão de PD-L2 nas CT, comparativamente àqueles providos de ulceração (Med 2 ± 4), como mostrado na Figura 10d e na Tabela 7.

Não foram encontradas mais associações significativas entre a expressão das 3 moléculas e as várias características clinicopatológicas avaliadas (Tabela 6 e 7).

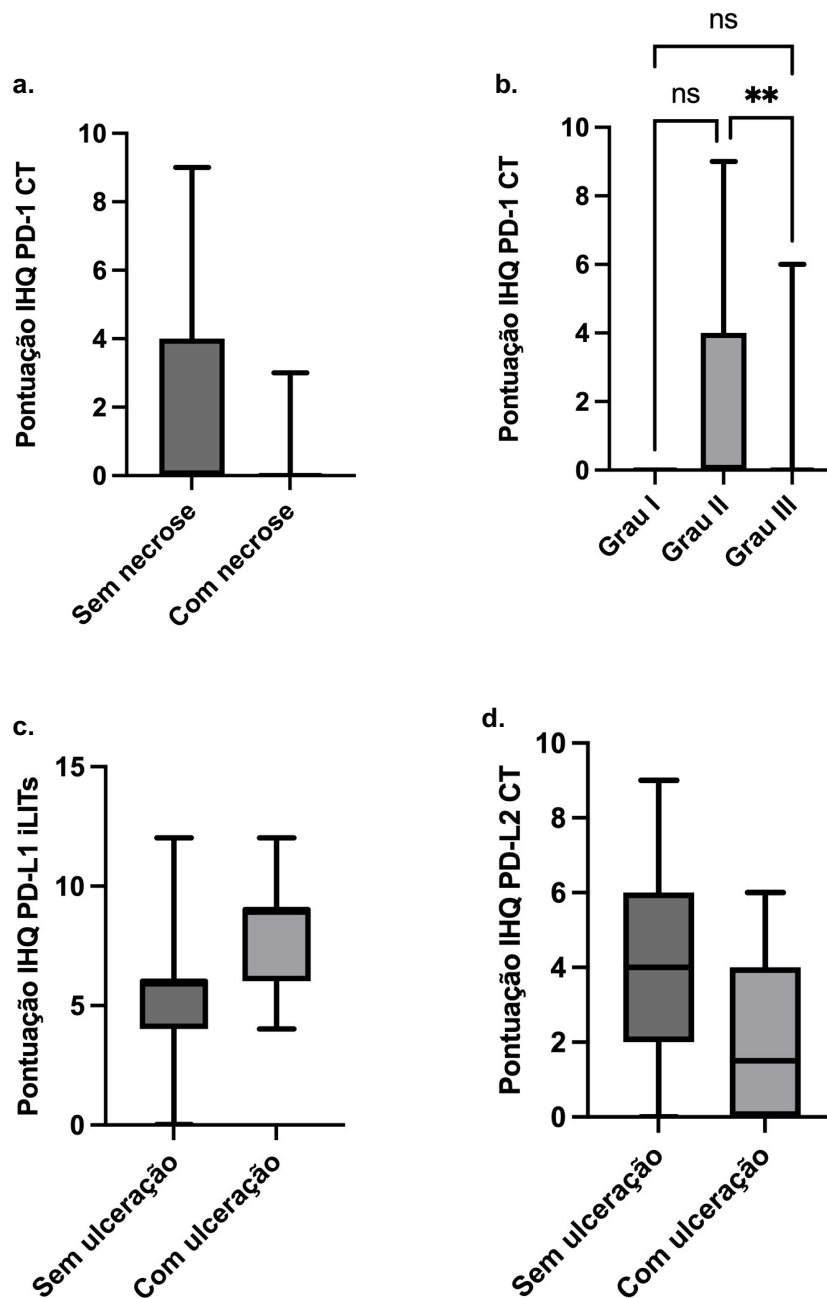


Figura 10. Análise de *box-plot* da pontuação de Imunohistoquímica (IHQ) de PD-1, PD-L1 e PD-L2 nos linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais (iLITs) e estromais (eLITs) e nas células tumorais (CT) e as suas associações com características clinicopatológicas. (a) uma maior pontuação de IHQ da expressão de PD-1 pelas CT foi associado a tumores com ausência de necrose e (b) ao grau histológico II, relativamente ao grau III (** $P < 0.05$; ns- não significativo). (c) a maior pontuação da expressão de PD-L1 pelos iLITs foi associada a tumores com presença de ulceração cutânea. (d) a maior pontuação de IHQ da expressão de PD-L2 pelas CT foi associada a tumores com ausência de ulceração cutânea (Figura original da autora).

Tabela 6. Resultados da análise estatística da associação da expressão de PD-1 com as várias características clinicopatológicas através dos testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*

Características clinicopatológicas	Pontuação final de IHQ para a expressão de PD-1					
	CT Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>	iLITs Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>	eLITs Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>
Idade (anos)**						
<8 anos	0 (.)		3 (.)		3 (.)	
8-12 anos	0 (0)		6 (3)		6 (6)	
>12 anos	0 (0)	0.23	4 (4)	0.34	6 (3)	0.74
Raça**						
Europeu Comum	0 (0)		4 (4)		4 (4)	
Siamês	0 (0)		6 (.)		6 (.)	
Doméstico	0 (0)		4 (.)		6 (.)	
Persa	0 (.)		3 (.)		9 (.)	
Bosque da Noruega	4 (0)		4 (0)		4 (0)	
Birmanês	0 (0)	0.17	6 (0)	0.96	9 (0)	0.57
Indeterminada	0 (2)		6 (2)		6 (4)	
Dimensão tumoral (cm)						
< 2 cm	0 (0)		4 (5)		6 (5)	
≥2 cm	0 (0)	0.98	4 (4)	0.72	6 (5)	0.82
Úlcera cutânea						
Sim	0 (0)		6 (4)		6 (2)	
Não	0 (0)	0.83	4 (4)	0.35	5 (7)	0.77
Classificação histológica**						
Carcinoma mucinoso	0 (9)		4 (4)		6 (4)	
Carcinoma adenoescamoso	0 (0)		5 (4)		6 (6)	
Carcinosarcoma	0 (0)	0.72	7 (7)	0.65	5 (6)	0.99
Grau de malignidade**						
I	0 (0)		4 (0)		4 (0)	
II	0 (4)		4 (5)		5 (5)	
III	0 (0)	0.012	6 (4)	0.70	6 (5)	0.85
Necrose tumoral						
Sim	0 (0)		4 (4)		4 (4)	
Não	0 (4)	0.033	6 (2)	0.21	6 (5)	0.06
Distribuição da lesão						
Unifocal	0 (0)		4 (4)		6 (6)	
Multifocal	0 (0)	0.14	5 (3)	0.61	4 (4)	0.45
Permeação Vascular						
Sim	0 (0)		4 (4)		6 (4)	
Não	0 (0)	0.95	5 (4)	0.56	6 (5)	0.49
Envolvimento linfonodo						
Sim	0 (0)		6 (4)		6 (4)	
Não	0 (0)	0.92	4 (4)	0.25	4 (4)	0.14

**Características que foram avaliadas através do teste de *Kruskal-Wallis*. Os valores de *P* a negrito são estatisticamente significativos ($P < 0.05$). (.)- AIQ indeterminada. iLITs- Linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais; eLITs- LITs estromais; CT- Células tumorais; Med- Mediana; AIQ- Amplitude interquartil.

Tabela 7. Resultados da análise estatística da associação da expressão de PD-L1 e PD-L2 nas CT, LITs intratumorais e LITs estromais com as várias características clinicopatológicas através dos testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*

Características clinicopatológicas	Pontuação final de IHQ para a expressão de PD-L1						Pontuação final de IHQ para a expressão de PD-L2					
	CT Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>	iLITs Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>	eLITs Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>	CT Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>	iLITs Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>	eLITs Med (AIQ)	Valor de <i>P</i>
Idade (anos)**												
<8 anos	6 (.)		6 (.)		6 (.)		6 (.)		6 (.)		6 (.)	
8-12 anos	2 (5)		6 (5)		6 (5)		4 (3)		6 (4)		6 (3)	
>12 anos	0 (6)	0.59	6 (2)	0.56	6 (5)	0.51	2 (4)	0.08	6 (3)	0.71	8 (4)	0.27
Raça**												
Europeu Comum	0 (4)		6 (5)		6 (2)		4 (4)		6 (5)		6 (5)	
Siamês	6 (.)		6 (.)		9 (.)		6 (.)		6 (0)		8 (.)	
Doméstico	2 (.)		4 (.)		4 (.)		3 (.)		5 (.)		6 (0)	
Persa	2 (.)		4 (.)		6 (.)		4 (.)		6 (.)		6 (.)	
Bosque da Noruega	3 (0)		6 (0)		6 (0)		4 (0)		6 (0)		6 (0)	
Birmanês	6 (0)		6 (0)		12 (0)		4 (0)		3 (0)		4 (0)	
Indeterminada	0 (3)	0.12	6 (5)	0.75	6 (7)	0.29	2 (5)	0.98	6 (5)	0.62	8 (3)	0.67
Dimensão tumoral (cm)												
< 2 cm	0 (5)		4 (3)		4 (7)		4 (4)		9 (4)		6 (4)	
≥2 cm	0 (6)	0.87	6 (5)	0.07	6 (4)	0.96	4 (3)	0.14	6 (5)	0.36	6 (5)	0.74
Úlcera cutânea												
Sim	1 (6)		9 (3)		6 (4)		2 (4)		6 (4)		6 (2)	
Não	0 (5)	0.61	6 (2)	0.009	6 (3)	0.18	4 (4)	0.048	6 (5)	0.83	6 (5)	0.83
Classificação histológica**												
Carcinoma mucinoso	3 (6)		6 (2)		6 (5)		4 (4)		6 (5)		6 (5)	
Carcinoma adenoescamoso	0 (5)		6 (5)		6 (2)		2 (4)		6 (3)		7 (3)	
Carcinosarcoma	0 (0)	0.16	8 (5)	0.30	6 (2)	0.56	4 (2)	0.43	8 (8)	0.63	5 (4)	0.58
Grau de malignidade**												
I	0 (0)		4 (0)		4 (0)		2 (0)		2 (0)		4 (0)	
II	2 (6)		4 (2)		5 (3)		6 (5)		6 (5)		6 (4)	
III	0 (5)	0.58	6 (5)	0.21	6 (5)	0.45	4 (3)	0.13	6 (3)	0.18	6 (4)	0.44
Necrose tumoral												
Sim	0 (6)		6 (5)		6 (5)		0 (6)		6 (4)		6 (5)	
Não	0 (4)	0.57	4 (6)	0.18	6 (5)	0.76	0 (4)	0.15	9 (3)	0.16	6 (3)	0.61
Distribuição da lesão												
Unifocal	0 (6)		6 (5)		6 (2)		4 (3)		6 (4)		6 (5)	
Multifocal	0 (4)	0.57	6 (5)	0.82	4 (5)	0.06	3 (5)	0.48	6 (5)	0.62	6 (4)	0.64
Permeação Vascular												
Sim	0 (3)		8 (5)		6 (5)		1 (6)		6 (0)		9 (3)	
Não	0 (6)	0.42	6 (2)	0.14	6 (4)	0.33	4 (2)	0.23	6 (5)	0.88	6 (5)	0.18
Envolvimento linfonodo												
Sim	1 (6)		6 (5)		6 (5)		1 (4)		6 (2)		7 (3)	
Não	0 (4)	0.39	6 (2)	0.35	6 (2)	0.69	4 (2)	0.24	6 (4)	0.21	6 (5)	0.37

**Características que foram avaliadas através do teste de *Kruskal-Wallis*. Os valores de *P* a negrito são estatisticamente significativos ($P < 0.05$). (.)- AIQ indeterminada. iLITs- Linfócitos infiltrantes tumorais intratumorais; eLITs- LITs estromais; CT- Células tumorais; Med- Mediana; AIQ- Amplitude interquartil.

5. Discussão

Os tumores mamários representam o 3º tipo de neoplasia mais comum na espécie felina com elevadas taxas de mortalidade, em parte, pela limitada eficácia nas terapêuticas atualmente disponíveis. Em Medicina Humana, a imunoterapia mediante a utilização de anticorpos monoclonais dirigidos para o eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 tem vindo a revolucionar o tratamento de neoplasias malignas com resultados extraordinários, inclusive no carcinoma mamário. O CMF partilha as mesmas características clinicopatológicas, histopatológicas e epidemiológicas e ainda, a classificação molecular com neoplasias mamárias malignas na mulher (Cannon 2015; Nascimento et al. 2020), pelo que, se acredita que esta modernidade terapêutica possa igualmente demonstrar eficácia no CMF. Todavia, ainda pouco se sabe acerca do eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 e a sua associação com doenças tumorais em gatos e, até à data, nenhum anticorpo terapêutico para bloqueio deste eixo imunorregulador foi desenvolvido. Explorar e avaliar a expressão do recetor e dos seus ligandos em amostras de carcinomas mamários felinos, revela-se, então, um passo primordial e importante.

Os resultados da análise da expressão imunohistoquímica para PD-1 revelaram que a proteína era expressa nas CT em 13% (6/48) das amostras de carcinoma mamário felino. Embora a expressão do recetor seja mais frequentemente observada nas células do SI, e a maioria dos investigadores tenha focado a avaliação de PD-1 nos LITs, estudos recentes demonstraram que PD-1 também pode ser expresso numa variante intrínseca nas CT, como identificado no carcinoma do pulmão de células-não-pequenas (CPCNP), no carcinoma do cólon, no melanoma, no carcinoma hepatocelular, no adenocarcinoma pancreático e no carcinoma mamário triplo-negativo (Chen et al. 2023). O mecanismo molecular que resulta na expressão de PD-1 nas CT é ainda desconhecido, mas especula-se que alterações no número de cópias do gene, alterações epigenéticas ou no microambiente tumoral sejam fatores que possam estar envolvidos (Yao et al. 2018). Adicionalmente, no presente estudo, os níveis mais elevados da expressão de PD-1 nas CT mostraram associar-se a tumores mamários com um comportamento biológico menos agressivo, nomeadamente à ausência de necrose tumoral, bem como ao grau II de malignidade, relativamente ao grau III. Ora, estas associações podem potencialmente parecer contraintuitivas, uma vez que a expressão de PD-1 é frequentemente associada à exaustão imunitária e consequente progressão tumoral (McLane et al. 2019). No entanto, Du et al. (2018) levaram a cabo um estudo, onde verificaram que em pacientes com carcinoma do pulmão com CT PD-1 positivas, a doença progrediu rapidamente após iniciação com terapêutica anti-PD-1 (Du et al. 2018), o que sugere que a expressão de PD-1 pelas CT terá, potencialmente, um papel determinante na supressão da progressão do tumor quando acoplado aos ligandos PD-L1 ou PD-L2 expressos noutras CT. Além disso, no carcinoma do cólon, a expressão de PD-1 pelas CT foi associada a um estadio

patológico inferior (Ieranò et al. 2022). Todavia, a expressão do recetor pelas CT poderá, em contrapartida, promover a evolução da doença como relatado para o carcinoma mamário TN na mulher, onde se verificou que a expressão de PD-1 pelas CT facilitou significativamente o crescimento tumoral e a metástase (Wu et al. 2022). Investigadores sugeriram que uma possível explicação para a dualidade do papel de PD-1 intrínseco ao tumor pode ser obtida através da determinação das consequências complexas das fosfatases: fosfatase-1 com domínio da região de homologia Src 2 (SHP-1) e SHP-2, que interagem com os motivos funcionais imunossupressores (ITIM e ITSM) presentes na cauda citoplasmática de PD-1 ativado. SHP-1 e SHP-2 constituem mediadores da sinalização de PD-1, levando à anergia das células T. Embora amplamente reconhecida como uma fosfatase oncogénica, SHP-2 não funciona uniformemente como um proto-oncogene em todos os tipos histológicos de tumores malignos ou em todos os cenários de mutação (Du et al. 2018). Apesar de já ter sido reportado que os motivos ITIM e ITSM permanecem conservados no recetor PD-1 felino, a transmissão de sinais e a supressão das funções das células T, não foram ainda investigadas experimentalmente (Maekawa et al. 2023). Assim, dado o número limitado de fontes de informação, é notória a necessidade de elucidar completamente os mecanismos de ação do PD-1 expresso pelas CT, a fim de se compreender a função deste recetor quando presente em diferentes subpopulações de células em tumores mamários felinos. Verificou-se, adicionalmente, uma elevada prevalência de amostras positivas para PD-1 nos iLITs (85%, 41/48) e eLITs (94%, 45/48). De facto, resultados semelhantes tinham já sido relatados, em Medicina Humana, no carcinoma mamário (Ghebeh et al. 2008), no carcinoma gástrico (Saito et al. 2013) e no linfoma de Hodgkin (Yamamoto et al. 2008). Nas infeções agudas, PD-1 é regulado positivamente após a ativação das células T, diminuindo com a resolução da infeção. Todavia, nas infeções crónicas e no contexto tumoral, a expressão de PD-1 é mantida em níveis elevados, levando a um estado de exaustão das células T, com perda progressiva de função e de capacidade proliferativa (McLane et al. 2019), contribuindo para um MAT imunossupressor. Tal sugere que os LITs PD-1 positivos estão presentes, porém, funcionalmente comprometidos. Tomando esta hipótese em linha de conta, conjuntamente com a elevada prevalência de amostras tumorais PD-1 positivas observadas no presente trabalho, sugere-se que felinos com carcinomas mamários raros, especificamente, carcinomas mucinosos, adenoescamosos e carcinosarcomas, poderão apresentar-se como fortes candidatos a imunoterapia com IPCI, nomeadamente, anticorpos dirigidos para o eixo PD-1: PD-L1/PD-L2, os quais poderiam reativar as funções dos linfócitos T, restaurando a capacidade de resposta antitumoral (Angelico et al. 2023).

Relativamente ao ligando PD-L1, e no que se refere à sua imunolocalização, estudos em humanos referem diferentes abordagens para esta avaliação, sendo que alguns estudos

apenas descreveram expressão membranar (Kim et al. 2017; Noske et al. 2019; Paver et al. 2021), enquanto outros, de acordo com os nossos achados, descreveram ambas as marcações citoplasmática e membranar (Gatalica et al. 2014; Muenst et al. 2014; Baptista et al. 2016). Ademais, Nascimento et al. (2020) também relatou que nas CT, a imunomarcação foi distribuída pelo citoplasma e membrana nuclear (Nascimento et al. 2020), o que corrobora as nossas observações. Os níveis de expressão desta proteína no carcinoma mamário, em Medicina Humana, variam consideravelmente, compreendendo valores de imunomarcação nas CT, de 1.7% a 64% (Huang et al. 2019), em parte pela inexistência de uma técnica de IHQ padrão para avaliar o ligando, pela variedade de anticorpos disponíveis e diferentes valores de *cut-off* utilizados. À semelhança dos nossos resultados, Li et al. relataram imunorreação para PD-L1 nas CT em 46.1% (231/501) das suas amostras de carcinoma mamário na mulher (Z. Li et al. 2016) e, resultados comparáveis foram, posteriormente, publicados por outros autores (Park et al. 2016; Chen et al. 2017; Lee et al. 2019). Está bem relatado, na oncologia humana, que como parte de uma resposta imunitária antitumoral, os LITs, nomeadamente, as células T citotóxicas (CD8+), libertam citocinas incluindo o ITF- γ , o qual, por sua vez, induz a expressão de PD-L1 pelas CT (Fan et al. 2022). De facto, foi demonstrado que as células T CD8+ são atores fundamentais no microambiente tumoral do CMF (Nascimento et al. 2022) e, consistentemente, um recente estudo conduzido por Maekawa et al., demonstrou que o tratamento com o ITF- γ induziu a expressão de PD-L1 em macrófagos felinos e em linhagens celulares de adenocarcinoma mamário (Maekawa et al. 2023). No nosso estudo, foi ainda encontrada uma correlação positiva dos níveis de expressão de PD-L1 entre ambos os LITs e as CT. Ao considerarmos os resultados dos estudos anteriormente mencionados, com os resultados aqui obtidos, sugere-se que os elevados níveis de PD-L1 expresso pelas CT nas amostras testadas, possa ter forte associação com a via das citocinas, como um mecanismo extrínseco de resistência adaptativa por parte do tumor, e que é provável que o eixo PD-1: PD-L1/PD-L2 desempenhe um papel preponderante na evolução desta doença em felinos. Apesar de uma parte considerável dos autores se ter focado meramente na avaliação da expressão da proteína PD-L1 pelas CT, torna-se cada vez mais notável a importância da avaliação abrangente da expressão de PD-L1 não só nas CT, mas também nos LITs. De facto, no carcinoma mamário humano, a expressão de PD-L1 nas células imunitárias que infiltram o tumor, tem sido crescentemente associada a um prognóstico favorável (Huang et al. 2019) e, suplementarmente, relacionada com a resposta clínica ao bloqueio da via PD-1: PD-L1/PD-L2 com imunoterapia direcionada anti-PD-L1 (Emens et al. 2019). No decorrente estudo, a positividade de expressão de PD-L1 pelos iLITs e eLITs foi observada em 96% (46/48) e 100% (48/48) das amostras imunofenotipadas, respetivamente. Constatou-se, ainda, que na maioria dos casos (30/48, 63%) ambas as subpopulações de LITs apresentaram uma pontuação final de IHQ ≥ 6 ,

refletindo uma percentagem de, no mínimo, 6% de células positivamente marcadas com intensidades variando de forte a muito forte. Estes resultados elucidam e reforçam a ideia de que, possivelmente, a população aqui estudada inclui candidatos interessantes a terapêuticas anti-PD-1 (Adams et al. 2019) ou anti-PD-L1, tal como demonstrado num estudo relativo à fase 3 de um ensaio clínico anti-PD-L1 no carcinoma mamário TN na mulher, no qual se verificou que o bloqueio com Atezolizumab se mostrou mais eficaz em tumores com LITs PD-L1 positivos (Schmid et al. 2018). No presente trabalho, os maiores níveis de expressão de PD-L1 pelos iLITs foram associados a tumores com presença de ulceração cutânea. As úlceras representam soluções de continuidade causadas pela lesão tecidual, como consequência de uma resposta imunitária contínua e intensificada. Efetivamente, está bem documentado que os LITs PD-L1 positivos estão relacionados com níveis aumentados de linfócitos infiltrantes ativados (Huang et al. 2019), refletindo uma imunidade antitumoral ativa que, apesar de equilibrada pela via PD-1: PD-L1/PD-L2, já que o ITF- γ produzido pelos LITs leva à indução de PD-L1 pelas CT, é suficiente para gerar um microambiente tumoral inflamado e imunossupressor, capaz de lesar os tecidos levando, por conseguinte, à formação de úlcera e contribuindo para a progressão tumoral. Curiosamente, tal associação foi apenas obtida para os LITs intratumorais, os quais estão na frente do combate ao tumor, o que fortalece a existência de uma resposta robusta do SI na tentativa de eliminar o tumor. Novamente, os resultados elucidam que a via PD-1: PD-L1/PD-L2 poderá desempenhar um papel crucial no cenário do carcinoma mamário felino.

Relativamente ao ligando PD-L2, este apresentou uma imunomarcação principalmente citoplasmática e nuclear nas CT, validando observações já anteriormente relatadas (Baptista et al. 2016). Em Medicina Humana, numerosos estudos têm identificado a expressão de PD-L2 em vários tipos de tumores, incluindo, mas não limitado, ao carcinoma mamário (Baptista et al. 2016), carcinoma hepatocelular (Jung et al. 2017), carcinoma do pulmão (Takamori et al. 2019), carcinoma gástrico (Nakayama et al. 2020) e carcinoma escamoso da cabeça e do pescoço (CECP) (Qiao et al. 2021). Neste estudo, identificou-se que PD-L2 foi expresso em 79% (38/48) das amostras nas CT e em 100% das amostras para ambos os LITs. A elevada prevalência de expressão nas amostras analisadas do ligando PD-L2 revela que provavelmente desempenha um papel preponderante no MAT do CMF, bem como na progressão da doença (Baptista et al. 2016). Em concordância com os nossos achados, um número considerável de publicações, em oncologia humana, confirmou que PD-L2 é altamente expresso em variados tipos de tumores (Wang et al. 2023). Um resultado interessante deveu-se à observação de que, nas amostras testadas, PD-L2 foi mais frequentemente expresso pelas CT relativamente a PD-L1 (79% vs. 46%). Tal leva-nos a questionar: terá o ligando 2, uma influência mais notável sobre o eixo imunossupressor,

relativamente a PD-L1 no CMF? Consistentemente com os nossos resultados, em Medicina Humana, no CECP, Qiao et al. (2021) verificaram que a sobre-expressão de PD-L2 foi dramaticamente mais prevalente relativamente à expressão de PD-L1, tendo sido a positividade para PD-L2 observada em 62.7% dos pacientes, representando mais do que o dobro da expressão de PD-L1 (Qiao et al. 2021), e tendo o autor sugerido que o PD-L2 poderá ser um potencial alvo imunoterapêutico (Qiao et al. 2021), tal como sugerem os nossos resultados. Adicionalmente, constatámos que 42% (20/48) das amostras testadas, apresentaram coexpressão de PD-L1 e PD-L2 pelas CT, tendo sido ainda encontrada uma correlação positiva entre a expressão de PD-L1 e PD-L2 pelas CT. Estas observações mostram-se de tamanha relevância uma vez que, recentemente, em Medicina Humana, Xu et al. (2020) reconheceram a presença de um potencial *super-enhancer* localizado entre os genes que codificam PD-L1 e PD-L2, designado por PD-L1L2-SE e, paralelamente, observaram que a sua inibição reduzia consideravelmente a expressão síncrona de ambos os ligandos, sugerindo que PD-L1L2-SE impulsiona a coexpressão de PD-L1 e PD-L2 pelas CT (Xu et al. 2020). Os autores sugeriram ainda que, visar o bloqueio de *super-enhancers* específicos do tumor para reduzir a expressão de PD-L1 e PD-L2, pode aumentar, notavelmente, o efeito anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (Xu et al. 2020). Por conseguinte, ao ter em conta estas perceções, é possível que a expressão concomitante de PD-L1 e PD-L2 observada nas amostras analisadas, seja igualmente devida à existência de um *super-enhancer*, pelo que explorar os mecanismos funcionais e clínicos associados à expressão de PD-L1 e PD-L2 nos tumores mamários felinos mediante uma maior amostra de pacientes, assim como estudos de perfil de expressão génica, será um importante objeto de investigações futuras, para que esta hipótese possa ser validada. Adicionalmente, num estudo envolvendo 172 pacientes com CECP tratados com Pembrolizumab (anti-PD-1), verificou-se que a taxa de resposta global foi de duas vezes superior em pacientes positivos para ambos os ligandos, relativamente àquela observada em pacientes positivos apenas para PD-L1 (Yearley et al. 2017). Tal revela que uma compreensão profunda do processo regulatório da expressão de PD-L2, pode estratificar os animais que mais hipóteses têm para beneficiar de imunoterapia anti-PD-1. A análise estatística revelou que os maiores níveis de expressão de PD-L2 pelas CT foram associados à ausência de ulceração cutânea, isto é, o inverso do observado para PD-L1 para a mesma característica clinicopatológica, porém, em diferentes subpopulações de células (CT vs. LITs). De facto, para ser um ligando de PD-1, PD-L2 medeia uma função imunossupressora. Adicionalmente, em Medicina Humana, PD-L2 foi anteriormente correlacionado com a exaustão de linfócitos T citotóxicos, sugerindo que a sobre-expressão deste ligando foi responsável pela progressão de tumores malignos avançados e com alta capacidade de proliferação (Wang et al. 2023). Isto significa que tumores que expressem elevados níveis de PD-L2 têm a capacidade de suprimir mais

eficazmente a resposta imunitária local, o que pode resultar num microambiente tumoral menos inflamado e, consecutivamente, com menor propensão à apresentação de úlceras. Além disso, foi relatado que a afinidade de ligação de PD-L2 com o recetor é de 2 a 6 vezes superior àquela observada com PD-L1 (Wang et al. 2023), o que sugere que o ligando 2 possa ser mais hábil em inibir as funções dos LITs quando acoplado ao recetor PD-1, reforçando a correlação antagónica obtida para os dois ligandos.

Para a realização do atual trabalho, algumas limitações e dificuldades foram encontradas. Em primeiro lugar, as elevadas taxas de positividade de expressão obtidas para os 3 anticorpos analisados, podem dever-se ao pequeno tamanho da amostra. Tal deveu-se, essencialmente, à inclusão de apenas carcinomas mamários felinos raros, embora um número de anos abrangente (12 anos) tenha sido uma medida previamente levada a cabo a fim de o evitar. Adicionalmente, dado que o estudo da via PD-1: PD-L1/PD-L2 no contexto tumoral em Medicina Veterinária, nomeadamente no CMF, revela-se uma área bastante recente de investigação e, para nossa satisfação, este foi o primeiro estudo a analisar a expressão de PD-L2 em amostras de tecido tumoral mamário felino, a realização da técnica de IHQ revelou-se difícil, na medida em que não existem, até ao momento, protocolos padronizados de coloração e análise e, deste modo, vários ensaios foram necessários a fim de identificar um bom método da técnica para avaliar a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2. Outra limitação deveu-se à dificuldade na obtenção de dados relativos à data de morte dos animais incluídos no estudo, assim como ao acesso da sua história clínica completa, a fim de se entender se teria ocorrido recorrência da doença e quando. De facto, alterações nos *softwares* veterinários, a eliminação das fichas clínicas após 5 anos da morte dos pacientes ou a mudança de Centro de Atendimento Médico-Veterinário, foram fatores limitantes que impossibilitaram o seguimento dos animais e, nos casos mais recentes, os dados relativos à recidiva e/ou morte só serão posteriormente obtidos. Assim, não foi possível traçar curvas de sobrevivência para o TLD e SG já que poderiam originar erros de estatística do tipo 1 ou do tipo 2.

6. Conclusões

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que as proteínas PD-1, PD-L1 e PD-L2 mostravam um elevado nível de expressão nas amostras analisadas, sublinhando a importância destas no CMF, particularmente do ligando 2. Para além disso, os resultados sugerem que a expressão de cada uma das moléculas nas CT, nos iLITs ou nos eLITs pode contribuir para prever desfechos clínicos distintos em gatas com carcinomas mamários raros. De acordo com os nossos resultados, a expressão de PD-1 pelas CT aparenta ter um efeito protetor no que concerne ao desenvolvimento e progressão da doença, uma vez que as maiores pontuações de expressão foram associadas a características clinicopatológicas relacionadas com um comportamento tumoral menos agressivo, nomeadamente, a ausência de necrose tumoral e o grau II de malignidade, relativamente ao grau III. Por outro lado, a maior expressão de PD-L1 pelos iLITs foi associada à presença de ulceração cutânea, sugerindo a existência de uma resposta imunitária antitumoral ativa na tentativa de eliminar o tumor, porém, neutralizada, provavelmente, pela indução de PD-L1 nas CT pelo ITF- γ . Já os maiores níveis de expressão de PD-L2 pelas CT, foram associados a tumores com ausência de ulceração cutânea, sugerindo a importante inibição das funções dos LITs pela glicoproteína PD-L2, como um mecanismo de evasão do tumor ao SI.

6.1. Perspetivas futuras

Embora ainda não seja claro se a imunidade mediada por células T felinas possa ser reativada pelo bloqueio da via PD-1: PD-L1/PD-L2, a elevada prevalência de positividade observada nas amostras de tecido analisadas para as 3 proteínas sugere que a imunoterapia mediante o bloqueio deste eixo imunossupressor, nomeadamente, anticorpos anti-PD-L2, poderá ser uma estratégia promissora na terapêutica de alguns tipos raros de CMF. Assim, os resultados encorajam fortemente o desenvolvimento de novos estudos sobre a interação da via PD-1: PD-L1/PD-L2 com o microambiente tumoral felino, bem como uma investigação mais aprofundada dos IPCI como potenciais imunoterapias.

7. Referências Bibliográficas

Abad MN, Calabuig-Fariñas S, Lobo de Mena M, Torres-Martínez S, González CG, García JÁG, González-Cruz VI, Herrero CC. 2022. Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) as Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 14(2). doi:10.3390/CANCERS14020307. [accessed 2024 Feb 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35053471/>.

Adams S, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, Winer EP, Mukai H, Tamura K, Armstrong A, et al. 2019. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Annals of Oncology*. 30:405–411. doi:10.1093/annonc/mdy518.

Aguiar PN, De Mello RA, Hall P, Tadokoro H, De Lima Lopes G. 2017. PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: updated survival data. *Immunotherapy*. 9(6):499–506. doi:10.2217/IMT-2016-0150. [accessed 2024 Jan 6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28472902/>.

Ai L, Xu A, Xu J. 2020. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. p. 33–59.

Angelico G, Broggi G, Tinnirello G, Puzzo L, Vecchio GM, Salvatorelli L, Memeo L, Santoro A, Farina J, Mulé A, et al. 2023. Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILS) and PD-L1 Expression in Breast Cancer: A Review of Current Evidence and Prognostic Implications from Pathologist's Perspective. *Cancers (Basel)*. 15(18). doi:10.3390/CANCERS15184479. [accessed 2024 Apr 16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37760449/>.

Avallone G, Rasotto R, Chambers JK, Miller AD, Behling-Kelly E, Monti P, Berlato D, Valenti P, Roccabianca P. 2021. Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine. *Vet Pathol*. 58(5):809–828. doi:10.1177/0300985821999831. [accessed 2024 Feb 23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33769136/>.

Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SFM, Pinto GA, Vassallo J. 2016. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol*. 47(1):78–84. doi:10.1016/J.HUMPATH.2015.09.006. [accessed 2023 Dec 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26541326/>.

Cannon CM. 2015. Cats, Cancer and Comparative Oncology. *Vet Sci*. 2(3):111–126. doi:10.3390/VETSCI2030111. [accessed 2023 Nov 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29061935/>.

Chen M, Bie L, Ying J. 2023. Cancer cell-intrinsic PD-1: Its role in malignant progression and immunotherapy. *Biomed Pharmacother*. 167. doi:10.1016/J.BIOPHA.2023.115514. [accessed 2024 Jun 1]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37716115/>.

Chen S, Wang RX, Liu Y, Yang WT, Shao ZM. 2017. PD-L1 expression of the residual tumor serves as a prognostic marker in local advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer*. 140(6):1384–1395. doi:10.1002/IJC.30552. [accessed 2024 Jun 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27925176/>.

Choi JE, Lee JS, Jin MS, Nikas IP, Kim K, Yang Sunah, Park SY, Koh J, Yang Sohyeon, Im SA, et al. 2023. The prognostic value of a combined immune score in tumor and immune cells assessed by immunohistochemistry in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 25(1). doi:10.1186/S13058-023-01710-8. [accessed 2024 Apr 17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37924153/>.

Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, Xu H, Sharma R, Lecksell K, Cornish TC, et al. 2016. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor

microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol.* 47(1):52–63. doi:10.1016/j.humpath.2015.09.003.

Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, Lipatov O, Barrios CH, Holgado E, et al. 2020. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet.* 396(10265):1817–1828. doi:10.1016/S0140-6736(20)32531-9. [accessed 2024 Apr 23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33278935/>.

Du S, McCall N, Park K, Guan Q, Fontina P, Ertel A, Zhan T, Dicker AP, Lu B. 2018. Blockade of Tumor-Expressed PD-1 promotes lung cancer growth. *Oncoimmunology.* 7(4). doi:10.1080/2162402X.2017.1408747. [accessed 2024 Jun 1]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29632720/>.

Emens LA, Cruz C, Eder JP, Braithel F, Chung C, Tolaney SM, Kuter I, Nanda R, Cassier PA, Delord JP, et al. 2019. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol.* 5(1):74–82. doi:10.1001/JAMAONCOL.2018.4224. [accessed 2024 Jun 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30242306/>.

Fan Z, Wu C, Chen M, Jiang Y, Wu Y, Mao R, Fan Y. 2022. The generation of PD-L1 and PD-L2 in cancer cells: From nuclear chromatin reorganization to extracellular presentation. *Acta Pharm Sin B.* 12(3):1041–1053. doi:10.1016/j.apsb.2021.09.010.

Gameiro A, Urbano A, Ferreira F. 2021. Emerging Biomarkers and Targeted Therapies in Feline Mammary Carcinoma. *Vet Sci.* 8(8):164. doi:10.3390/vetsci8080164.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, et al. 2015. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 372(21):2018–2028. doi:10.1056/nejmoa1501824.

Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, Overberg P, Rose I, Basu GD, Vranic S, et al. 2014. Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 23(12):2965–2970. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0654.

Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Elkum N, Al-Tweigeri T, Dermime S. 2008. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer.* 8. doi:10.1186/1471-2407-8-57. [accessed 2024 May 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18294387/>.

Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Amer S Bin, Tulbah A, et al. 2006. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia.* 8(3):190–198. doi:10.1593/NEO.05733. [accessed 2024 Jun 14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16611412/>.

Ghosh C, Luong G, Sun Y. 2021. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer.* 12(9):2735–2746. doi:10.7150/JCA.57334. [accessed 2023 Dec 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33854633/>.

Giménez F, Hecht S, Craig LE, Legendre AM. 2010. Early detection, aggressive therapy: optimizing the management of feline mammary masses. *J Feline Med Surg.* 12(3):214–224. doi:10.1016/J.JFMS.2010.01.004. [accessed 2024 Apr 9]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20193912/>.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ, Albain KS, André F, Bergh J, et al. 2013. 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*. 24(9):2206–2223. doi:10.1093/ANNONC/MDT303.

Goldschmidt M, Peña L, Zappulli V. 2017. Tumors of the Mammary Gland. In: Meuten J D, editor. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed. Wiley Blackwell. p. 723–765.

Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, Van De Vijver K, Estrada M V., Gonzalez-Ericsson PI, et al. 2017. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol*. 24(5):235–251. doi:10.1097/PAP.000000000000162. [accessed 2024 Apr 29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28777142/>.

Huang W, Ran R, Shao B, Li H. 2019. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 178(1):17–33. doi:10.1007/S10549-019-05371-0. [accessed 2023 Dec 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31359214/>.

Ieranò C, Righelli D, D'alterio C, Napolitano M, Portella L, Rea G, Auletta F, Santagata S, Trotta AM, Guardascione G, et al. 2022. In PD-1+ human colon cancer cells NIVOLUMAB promotes survival and could protect tumor cells from conventional therapies. *J Immunother Cancer*. 10(3). doi:10.1136/JITC-2021-004032. [accessed 2024 Jun 1]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35246475/>.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 11(11):3887–3895. doi:10.1002/J.1460-2075.1992.TB05481.X. [accessed 2024 Jan 8]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1396582/>.

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(19):12293–12297. doi:10.1073/PNAS.192461099/ASSET/0E18DCD1-4D55-4829-AD15-01D16A1FBDD7/ASSETS/GRAPHIC/PQ1924610004.JPEG. [accessed 2024 Apr 23]. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.192461099>.

Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. 2019. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*. 15(5):1111–1122. doi:10.1080/21645515.2019.1571892. [accessed 2024 Jun 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30888929/>.

Jung H II, Jeong D, Ji S, Ahn TS, Bae SH, Chin S, Chung JC, Kim HC, Lee MS, Baek MJ. 2017. Overexpression of PD-L1 and PD-L2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res Treat*. 49(1):246–254. doi:10.4143/CRT.2016.066. [accessed 2024 Jun 5]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27456947/>.

Kim A, Lee SJ, Kim YK, Park WY, Park DY, Kim JY, Lee CH, Gong G, Huh GY, Choi KU. 2017. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in tumour cell and tumour infiltrating lymphocytes of HER2-positive breast cancer and its prognostic value. *Sci Rep*. 7(1). doi:10.1038/S41598-017-11905-7. [accessed 2023 Dec 17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28916815/>.

Lawson NL, Dix CI, Scorer PW, Stubbs CJ, Wong E, Hutchinson L, McCall EJ, Schimpl M, DeVries E, Walker J, et al. 2020. Mapping the binding sites of antibodies utilized in programmed cell death ligand-1 predictive immunohistochemical assays for use with immunoncology therapies. *Mod Pathol.* 33(4):518–530. doi:10.1038/S41379-019-0372-Z. [accessed 2023 Dec 30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31558782/>.

Lee J, Kim DM, Lee A. 2019. Prognostic Role and Clinical Association of Tumor-Infiltrating Lymphocyte, Programmed Death Ligand-1 Expression with Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat.* 51(2):649–663. doi:10.4143/CRT.2018.270. [accessed 2024 Jun 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30064200/>.

Li S, Chen L, Jiang J. 2019. Role of programmed cell death ligand-1 expression on prognostic and overall survival of breast cancer.

Li X, Li M, Lian Z, Zhu H, Kong L, Wang P, Yu J. 2016. Prognostic Role of Programmed Death Ligand-1 Expression in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Target Oncol.* 11(6):753–761. doi:10.1007/S11523-016-0451-8. [accessed 2024 Jan 21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27422273/>.

Li Z, Dong P, Ren M, Song Y, Qian X, Yang Y, Li S, Zhang X, Liu F. 2016. PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3(+) Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *J Cancer.* 7(7):784–793. doi:10.7150/JCA.14549. [accessed 2024 Jun 3]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27162536/>.

Maekawa N, Konnai S, Asano Y, Otsuka T, Aoki E, Takeuchi H, Kato Y, Kaneko MK, Yamada S, Kagawa Y, et al. 2023. Molecular characterization of feline immune checkpoint molecules and establishment of PD-L1 immunohistochemistry for feline tumors. *PLoS One.* 18(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0281143. [accessed 2024 Feb 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36701405/>.

Maekawa N, Konnai S, Nishimura M, Kagawa Y, Takagi S, Hosoya K, Ohta H, Kim S, Okagawa T, Izumi Y, et al. 2021. PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma. *NPJ Precis Oncol.* 5(1). doi:10.1038/S41698-021-00147-6. [accessed 2024 Feb 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33580183/>.

Maekawa N, Konnai S, Takagi S, Kagawa Y, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Deguchi T, Nakajima C, et al. 2017. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci Rep.* 7(1). doi:10.1038/s41598-017-09444-2.

McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. 2019. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol.* 37:457–495. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-041015-055318. [accessed 2024 May 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30676822/>.

Mehan A, Anthony ML, Paul P, Syed A, Chowdhury N, Rao S, Hussain N, Ravi B. 2022. Expression of Programmed Cell Death-1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Breast Cancers and Its Association with Clinicopathological Parameters. *J Lab Physicians.* 14:27–31. doi:10.1055/s-0041-1736522. <https://doi.org/>

Mills SW, Musil KM, Davies JL, Hendrick S, Duncan C, Jackson ML, Kidney B, Philibert H, Wobeser BK, Simko E. 2015. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. *Vet Pathol.* 52(2):238–249. doi:10.1177/0300985814543198. [accessed 2024 Feb 23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25060990/>.

Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. 1999. *Histological Classification of Mammary Tumors of the dog and the Cat*. second. Misdorp W, editor. Washington, D.C.: World Health Organization.

Mkrtichyan M, Najjar YG, Raulfs EC, Abdalla MY, Samara R, Rotem-Yehudar R, Cook L, Khleif SN. 2011. Anti-PD-1 synergizes with cyclophosphamide to induce potent anti-tumor vaccine effects through novel mechanisms. *Eur J Immunol*. 41(10):2977–2986. doi:10.1002/EJL.201141639. [accessed 2023 Dec 28]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201141639>.

Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Droeser RA, Muraro MG, Zajac P, Zanetti R, Gillanders WE, et al. 2014. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 146(1):15–24. doi:10.1007/S10549-014-2988-5. [accessed 2024 Jan 19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24842267/>.

Nakayama Y, Mimura K, Kua LF, Okayama H, Min AKT, Saito K, Hanayama H, Watanabe Y, Saito M, Momma T, et al. 2020. Immune suppression caused by PD-L2 expression on tumor cells in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 23(6):961–973. doi:10.1007/S10120-020-01079-Z. [accessed 2024 Jun 5]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32367440/>.

Nascimento C, Gameiro A, Correia J, Ferreira J, Ferreira F. 2022. The Landscape of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Feline Mammary Carcinoma: Pathological and Clinical Implications. *Cells*. 11(16). doi:10.3390/CELLS11162578. [accessed 2024 Jun 3]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36010653/>.

Nascimento C, Urbano AC, Gameiro A, Ferreira J, Correia J, Ferreira F. 2020. Serum PD-1/PD-L1 Levels, Tumor Expression and PD-L1 Somatic Mutations in HER2-Positive and Triple Negative Normal-Like Feline Mammary Carcinoma Subtypes. *Cancers (Basel)*. 12(6):1386. doi:10.3390/cancers12061386.

Noske A, Möbus V, Weber K, Schmatloch S, Weichert W, Köhne CH, Solbach C, Ingold Heppner B, Steiger K, Müller V, et al. 2019a. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node-positive study. *Eur J Cancer*. 114:76–88. doi:10.1016/J.EJCA.2019.04.010. [accessed 2023 Dec 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31075727/>.

Noske A, Möbus V, Weber K, Schmatloch S, Weichert W, Köhne CH, Solbach C, Ingold Heppner B, Steiger K, Müller V, et al. 2019b. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node-positive study. *Eur J Cancer*. 114:76–88. doi:10.1016/J.EJCA.2019.04.010. [accessed 2024 May 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31075727/>.

Owen L. 1980. *TMN Classification of tumors in domestic animals*. 1st ed. Owen L, editor. Geneva: World Health Organization.

Pardoll DM. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. doi:10.1038/nrc3239. [accessed 2024 Jan 6]. www.nature.com/reviews/cancer.

Park IH, Kong SY, Ro JY, Kwon Y, Kang JH, Mo HJ, Jung SY, Lee S, Lee KS, Kang HS, et al. 2016. Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Association With Programmed Death Ligand 1 Expression in Early-Stage Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 16(1):51–58. doi:10.1016/J.CLBC.2015.07.006. [accessed 2024 Jun 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26364145/>.

Paver EC, Cooper WA, Colebatch AJ, Ferguson PM, Hill SK, Lum T, Shin J-S, O'Toole S, Anderson L, Scolyer RA, et al. 2021. Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology*. 53(2):141–156. doi:10.1016/j.pathol.2020.10.007.

Qiao Y, Liu C, Zhang X, Zhou Q, Li Y, Xu Yini, Gao Z, Xu Yiqi, Kong L, Yang A, et al. 2021a. PD-L2 based immune signature confers poor prognosis in HNSCC. *Oncoimmunology*. 10(1). doi:10.1080/2162402X.2021.1947569. [accessed 2024 Jun 19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34377590/>.

Qiao Y, Liu C, Zhang X, Zhou Q, Li Y, Xu Yini, Gao Z, Xu Yiqi, Kong L, Yang A, et al. 2021b. PD-L2 based immune signature confers poor prognosis in HNSCC. *Oncoimmunology*. 10(1). doi:10.1080/2162402X.2021.1947569. [accessed 2024 May 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34377590/>.

Reis-Filho JS, Pusztai L. 2011. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *The Lancet*. 378(9805):1812–1823. doi:10.1016/S0140-6736(11)61539-0.

Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, et al. 2015. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 372(4):320–330. doi:10.1056/NEJM1412082. [accessed 2024 Feb 4]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25399552/>.

Rotte A. 2019. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 38(1). doi:10.1186/S13046-019-1259-Z. [accessed 2024 Apr 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31196207/>.

Saito H, Kuroda H, Matsunaga T, Osaki T, Ikeguchi M. 2013. Increased PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 107(5):517–522. doi:10.1002/JSO.23281. [accessed 2024 May 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23129549/>.

Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im S-A, Shaw Wright G, et al. 2018. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 379(22):2108–2121. doi:10.1056/NEJM1809615. [accessed 2024 Apr 23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30345906/>.

Schütz F, Stefanovic S, Mayer L, Von Au A, Domschke C, Sohn C. 2017. PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncol Res Treat*. 40(5):294–297. doi:10.1159/000464353. [accessed 2024 Apr 7]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28346916/>.

Soares Maria, Madeira S, Correia J, Peleteiro M, Cardoso F, Ferreira F. 2016a. Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. *Breast*. 27:44–51. doi:10.1016/J.BREAST.2016.02.016. [accessed 2023 Dec 11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27212699/>.

Soares M., Ribeiro R, Carvalho S, Peleteiro M, Correia J, Ferreira F. 2016b. Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value? *Vet Pathol*. 53(1):37–43. doi:10.1177/0300985815588606. [accessed 2024 Feb 26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26080833/>.

Swaika A, Hammond WA, Joseph RW. 2015. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol Immunol*. 67(2 Pt A):4–17. doi:10.1016/J.MOLIMM.2015.02.009. [accessed 2023 Dec 30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749122/>.

Takamori S, Takada K, Azuma K, Jogo T, Shimokawa M, Toyokawa G, Hirai F, Tagawa T, Kawahara A, Akiba J, et al. 2019. Prognostic Impact of Programmed Death-Ligand 2

Expression in Primary Lung Adenocarcinoma Patients. *Ann Surg Oncol.* 26(6):1916–1924. doi:10.1245/S10434-019-07231-Z. [accessed 2024 Jun 5]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30815801/>.

Urbano AC, Nascimento C, Soares M, Correia J, Ferreira F. 2020. Clinical Relevance of the serum CTLA-4 in Cats with Mammary Carcinoma. *Sci Rep.* 10(1). doi:10.1038/S41598-020-60860-3. [accessed 2023 Dec 11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32123292/>.

Vranic S, Cyprian FS, Gatalica Z, Palazzo J. 2021. PD-L1 status in breast cancer: Current view and perspectives. *Semin Cancer Biol.* 72:146–154. doi:10.1016/j.semcancer.2019.12.003.

Wang Yuqing, Du J, Gao Z, Sun H, Mei M, Wang Yu, Ren Y, Zhou X. 2023. Evolving landscape of PD-L2: bring new light to checkpoint immunotherapy. *Br J Cancer.* 128(7):1196–1207. doi:10.1038/s41416-022-02084-y.

Webster JD, Dennis MM, Dervisis N, Heller J, Bacon NJ, Bergman PJ, Bienzle D, Cassali G, Castagnaro M, Cullen J, et al. 2011. Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. *Vet Pathol.* 48(1):7–18. doi:10.1177/0300985810377187. [accessed 2024 Feb 7]. <http://vet.sagepub.com7>.

Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. 2010. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol.* 220(2):263–280. doi:10.1002/PATH.2648. [accessed 2024 Jan 3]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19927298/>.

Wu Q, Xu Y, Li X, Liu H, You T, Cai T, Yang F. 2022. YB-1 promotes cell proliferation and metastasis by targeting cell-intrinsic PD-1/PD-L1 pathway in breast cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 153. doi:10.1016/J.BIOCEL.2022.106314. [accessed 2024 Jun 1]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36265523/>.

Xu Y, Wu Y, Zhang S, Ma P, Jin X, Wang Z, Yao M, Zhang E, Tao B, Qin Y, et al. 2020. A Tumor-Specific Super-Enhancer Drives Immune Evasion by Guiding Synchronous Expression of PD-L1 and PD-L2. *Cell Rep.* 32(4). doi:10.1016/J.CELREP.2020.108000. [accessed 2024 May 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32726615/>.

Yam C, Mani SA, Moulder SL. 2017. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist.* 22(9):1086–1093. doi:10.1634/THEONCOLOGIST.2017-0095. [accessed 2024 Feb 3]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28559413/>.

Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, Kondo T, Ohmori K, Kurata M, Hayashi T, et al. 2008. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 111(6):3220–3224. doi:10.1182/BLOOD-2007-05-085159. [accessed 2024 May 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18203952/>.

Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, et al. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol.* 169(10):5538–5545. doi:10.4049/JIMMUNOL.169.10.5538. [accessed 2024 Jan 8]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12421930/>.

Yang Y, Yan X, Bai X, Yang J, Song J. 2024. Programmed cell death-ligand 2: new insights in cancer. *Front Immunol.* 15. doi:10.3389/FIMMU.2024.1359532. [accessed 2024 May 21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38605944/>.

Yao H, Wang H, Li C, Fang JY, Xu J. 2018. Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy. *Front Immunol.* 9. doi:10.3389/FIMMU.2018.01774. [accessed 2024 Jun 1]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30105035/>.

Yearley JH, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J, Lunceford J, Cheng J, Chow LQM, Seiwert TY, et al. 2017. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clin Cancer Res.* 23(12):3158–3167. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1761. [accessed 2024 May 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28619999/>.

Zappulli V, Peña L, Rasotto R, Goldschmidt M, Gama A, Scruggs J, Kiupel M. 2008. *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals*. Kiupel M, editor. Michigan: Davis-Thompson DVM Foundation.

Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M. 2005. Feline mammary tumours in comparative oncology. *Journal of Dairy Research.* 72(S1):98–106. doi:10.1017/S0022029905001263.

Zou W, Wolchok JD, Chen L. 2016. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med.* 8(328). doi:10.1126/SCITRANSLMED.AAD7118. [accessed 2024 Jan 6]. <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aad7118>.

8. Anexos

Anexo 1- Página 257 do livro de resumos do congresso europeu “5th Cutting Edge Pathology”, o qual contém o nosso resumo submetido para apresentação em formato de Poster



POSTER ABSTRACTS

Veterinary Pathology: Small Animal

257 | ANALYSIS OF PD-1:PD-L1/PD-L2 AXIS IN FELINE MUCINOUS MAMMARY CARCINOMAS

F. Ferreira^a, J. Correia^a, M. Franco¹, A. Gama², F. Seixas², M. dos Anjos Pires², A. Alves², A. Santos³, C. Marrinhas⁴, H. Vilhena⁵, J. Santos⁶, P. Faisca⁷, P. Dias Pereira⁸

¹ Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (AL4Animals), Lisbon, Portugal

² Dep. Vet. Sciences, UTAD, CECAV, AL4Animals Associate Laboratory, Vila Real, Portugal

³ CECA, AL4Animals Associate Laboratory, ICBAS-UPorto, Porto, Portugal

⁴ CIVG-EUVG; Onevetgroup - Hosp. Veterinário do Baixo Vouga, Águeda, Portugal

⁵ CECAV, AL4Animals Associate Laboratory; CIVG, Esc. Univ. Vasco Gama (EUVG), Onevetgroup HVUC, Coimbra, Portugal

⁶ DNAtch Veterinary Laboratory, CECAV, FMV-ULusófona, Centro Univ. de Lisboa, Lisboa, Portugal

⁷ Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Univ. do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal

⁸ CIISA, AL4Animals Associate Laboratory; FMV-ULisboa, Lisboa, Portugal

Background

Feline mammary carcinoma often displays aggressive behavior with limited therapeutic options. Recently, PD-1:PD-L1/PD-L2 axis has become a masterpiece in tumor immunotherapy, with anti-PD-L1 antibodies showing great efficacy in human breast cancer. In this work, we analyzed PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression in feline mucinous mammary carcinoma (FMCC), and mutations in the PD-L1 gene.

Materials & Methods

PD-1, PD-L1/2 expression was evaluated in 36 FMCC by immunohistochemistry. Positivity (≥1% of cells) was explored in intratumoral (iTILs) and stromal (sTILs) tumor-infiltrating lymphocytes, as well as in tumor cells (TC). Genomic DNA extraction was performed in 7 FMCC and exons of interest in the PD-L1 gene were amplified using PCR. The sequenced fragments were aligned with the ClustalW tool.

Results

PD-1 expression was found in TC, iTILs and sTILs of 13.8%, 72.2% and 91.7% of tumors, while 8.3% of samples did not show expression of any protein. PD-L1 expression was detected in 52.8%, 94.4% and 100% of tumors in TC, iTILs and sTILs, respectively. Regarding the PD-L2 expression, 80.6% and 100% of tumors were positive in TC and in both subgroups of TILs. Finally, DNA sequencing results showed no somatic mutations or rearrangements in the five protein-coding exons of feline PD-L1 gene.

Conclusion

These findings highlight the importance of the PD-1:PD-L1/PD-L2 axis in FMCC, considering the expression levels of the three proteins and the absence of mutations in the PD-L1 gene, supporting the development of checkpoint-blocking therapies targeting the PD-1:PD-L1/PD-L2 axis for the treatment of FMCC.

Anexo 2- Poster submetido para comunicação no congresso europeu “5th Cutting Edge Pathology”

Analysis of PD-1: PD-L1/PD-L2 axis in Feline Mucinous Mammary Carcinomas

Maria Franco¹, Adelina Gama^{1,2,3}, Fernanda Seixas^{1,2,3}, Maria dos Anjos Pires^{1,2,3}, Anabela Alves^{1,2,3}, Andreia Santos^{1,4,5}, Carla Marrinhas⁶, Hugo Vilhena^{1,3,7}, Joana Santos⁹, Patrícia Dias Pereira⁵, Pedro Faisca^{8,9}, Fernando Ferreira^{1,10}, Jorge Correia^{1,10}

1. Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (AL4Animal), Portugal; 2. Department of Veterinary Sciences, School of Agrarian and Veterinary Sciences (CEAV), University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal; 3. Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), UTAD Vila Real, Portugal; 4. Centro de Estudos em Gênesis Animal (CEGA), and Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (AL4Animal), Porto, Portugal; 5. Instituto de Gênesis Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal; 6. Onevetgroup - Hospital Veterinário do Baixo Vouga, Águeda, Portugal; 7. Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Onevetgroup Hospital Veterinário de Coimbra (HVUC), Coimbra, Portugal; 8. DNAtch Veterinary Laboratory, Lisboa, Portugal; 9. Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, Portugal; 10. CIISA - Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (FMV-ULisboa), Lisbon, Portugal;

Introduction

Feline mammary carcinoma (FMC) often displays aggressive behavior with limited therapeutic options^[1]. Recently, PD-1: PD-L1/PD-L2 axis has become a masterpiece in tumor immunotherapy, with anti-PD-1 and anti-PD-L1 monoclonal antibodies showing great efficacy in human breast cancer^[2, 3]. In this work, we analyzed PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression in mucinous FMC, a rare histological type of FMC, as well as potential mutations in PD-L1 gene.

Material and Methods

From 2011 to 2022, FMC were retrospectively selected from the laboratory database. In a total of 660 cases, 36 (5.4%) were mucinous carcinoma. The following techniques were performed:

- **Immunohistochemistry:** Tissues were incubated with anti-PD-1 monoclonal antibody (MAb) (1:25, clone J116, eBioscience), anti-PD-L1 MAb (1:100, clone CAL 10, Abcam) and with anti-PD-L2 polyclonal Ab (1:400, clone PA5-20344, Invitrogen). Positivity was explored in intratumoral (iTILs) and stromal (sTILs) tumor-infiltrating lymphocytes, as well as in tumor cells (TC), and was defined as staining $\geq 1\%$ ^[4,5,6]. Scores of percentages of positive cells were recorded as: 0 (<1%), 1 (1–5%), 2 (6–30%) or 3 (>30%) and intensity scores as: 0 (negative), 1+ (weak), 2+ (moderate), 3+ (strong) and 4+ (very strong)^[6].
- **PCR:** Genomic DNA extraction was performed in 7 mucinous FMC and the exons of interest in PD-L1 gene were amplified by using specific primers and PCR procedures ^[6]. The sequenced fragments were aligned with ClustalW tool (Bioedit software).

Results and Conclusions

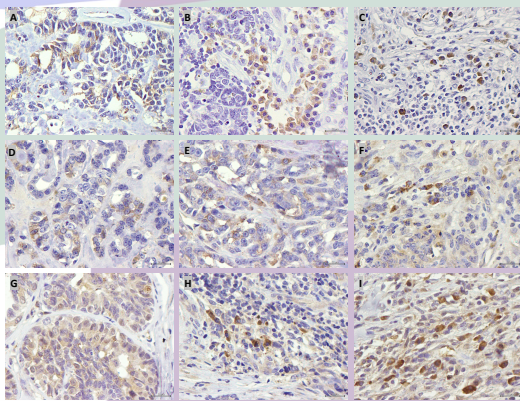


Figure 2. PD-1, PD-L1 and PD-L2 immunostaining in tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and tumor cells (TC) in feline mammary mucinous carcinoma (40x). PD-1 immunostaining of TC with strong staining intensity (SI) 3+ (A); intratumoral TILs with moderate SI 2+ in contrast with no staining detected in the surrounding TC (B), and stromal TILs with very strong SI 4+ (C); PD-L1 immunostaining of TC with 2+ score intensity (D, E) and intratumoral TILs with 3+ SI (F); PD-L2 with weak staining intensity (1+) in positive cancer cells (G) and in intratumoral TILs (H) and stromal TILs (I) with score 3+.

Analysis of the 36 mucinous FMC samples revealed that PD-1 showed strong immunoreactivity for the cytoplasm and cell membrane of TC, iTILs and sTILs (Figure 2A, 2B and 2C). Furthermore, PD-L1 expression, in TC, was localized to the cytoplasm and nuclear membrane (Figure 2D, E), while in TILs it was mainly distributed to the cell membrane and cytoplasm (Figure 2F). Regarding PD-L2, it was found immunoreactivity for nucleus and cytoplasm in TC (Figure 2G) and membranous, cytoplasmic and/or nuclear staining in both TILs (Figure 2H, 2I).

➤ **PD-1** expression was found in TC, iTILs and sTILs of **13.8%** (5/36), **72.2%** (26/36) and **91.7%** (33/36) of mucinous FMC (Fig. 3A, 3B and 3C), while 8.3% (3/36) of samples showed no expression. **PD-L1** expression was detected in **52.8%** (19/36), **94.4%** (34/36) and **100%** (36/36) of tumors in TC, iTILs and sTILs, respectively (Fig. 3D, 3E and 3F). Regarding **PD-L2** expression, **80.6%** (29/36) and **100%** of tumors were positive in TC and in both subgroups of TILs (Fig. 3G, 3H, 3I).

➤ Results from DNA sequencing showed **no somatic mutations or rearrangements** in the five protein-encoding exons of feline **PD-L1** gene in analyzed tumor samples.

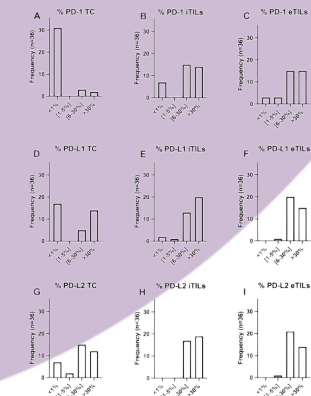


Figure 3. Scores of PD-L1, PD-L1 and PD-L2 expression in tumor cells (TC), intratumoral tumor-infiltrating lymphocytes (iTILs) and stromal TILs (sTILs).

Together these findings highlight the importance of the PD-1: PD-L1/PD-L2 axis in mucinous FMC, considering the expression levels of the three proteins and the absence of mutations in PD-L1 gene, supporting the development of checkpoint-blocking therapies targeting the PD-1: PD-L1/PD-L2 axis to treatment of mucinous FMC.

Acknowledgements: This work was financed by national funds through FCT-Portuguese Foundation for Science and Technology within the scope of the projects UIDB/CV1/00772/2020 (CECAV), UIDB/00276/2020 (CIISA), LA/P/0059/2020 and AL4A-PROJ-LT3.2 (AL4AnimalS).

References: [1] Giamberini A, Cichetto A, Ferrera F. 2015. Vet Sci. 38:106. [2] Adams S, Galka S, Foppert B, et al. 2019. Annals of Oncology. 30:1011–111. [3] Robert F, Adams S, Ridge RP, et al. 2018. N Engl J Med. 379:722-732. [4] Nishimura H, Uehara M, Gotoh A, et al. 2009. Cancer Res. 69:1296. [5] Mohan A, Ashraf M, Paul P, et al. 2012. J. Pathol. 217:11–17. [6] Chai J, Lee J, Ju S, et al. 2012. Breast Cancer Res. 23:1.



Anexo 3- Página 273 do livro de resumos do congresso europeu “5th Cutting Edge Pathology”, o qual contém o nosso resumo submetido para apresentação em formato de Poster

5TH CUTTING EDGE PATHOLOGY CONGRESS
28-31 August 2024
San Lorenzo de El Escorial (Madrid) Spain

PROCEEDINGSBOOK



POSTER ABSTRACTS

Veterinary Pathology: Small Animal

273 | CANINE INFLAMMATORY MAMMARY CARCINOMA: A PORTUGUESE MULTICENTRIC RETROSPECTIVE STUDY

G. Adelina^{1,2}, F. Seixas³, G. Vicente⁴, I. Simões⁵, M. dos Anjos Pires⁶, A. Alves⁷, C. Marrinhas⁸, H. Vilhena⁹, A. Santos¹⁰, F. Ferreira¹¹, M. Franco¹², J. Santos¹³, P. Dias Pereira¹⁴, J. Correia¹⁵, P. Faisca¹⁶

¹ UTAD - University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

² Animal and Veterinary Research Centre, Vila Real, Portugal

³ Dep. Vet. Sciences, UTAD, CECAV, ALAAnimals Associate Laboratory, Vila Real, Portugal

⁴ Fac. Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Univ. São Paulo (FZEA-USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil

⁵ School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, Brazil

⁶ CIVG-EUVG; Onevetgroup - Hosp. Veterinário do Baixo Vouga, Águeda, Portugal

⁷ CECAV, ALAAnimals Associate Laboratory; CIVG, Esc. Univ. Vasco Gama (EUVG), Onevetgroup HVUC, Coimbra, Portugal

⁸ CECA, ALAAnimals Associate Laboratory, ICBAS-UPorto, Porto, Portugal

⁹ CIISA, ALAAnimals Associate Laboratory; FMV-ULisboa, Lisboa, Portugal

¹⁰ Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (ALAAnimals), Lisbon, Portugal

¹¹ DNAtech Veterinary Laboratory, CECAV, FMV-ULusófona, Centro Univ. de Lisboa, Lisboa, Portugal

¹² Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Univ. do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal

Background Canine inflammatory mammary carcinoma (CIMC) is an uncommon but highly aggressive mammary tumor (MT) subtype. The aim of this multicentric study was to gather and characterize a consistent number of CIMC from four Portuguese institutions.

Materials & Methods Cases of dogs with MT submitted for histopathology between 2001 and 2022 were retrospectively assessed from the laboratory databases. MT with a diagnosis compatible with CIMC were reviewed and histologically graded (Zappulli et al., 2019). Immunohistochemistry was performed for molecular phenotype classification (Goldhirsch et al., 2013), using antibodies for estrogen/progesterone receptors (ER/PR), HER-2 and Ki-67.

Results A total of 49 cases were diagnosed as CIMC, characterized by the presence of neoplastic embolization of superficial dermal lymphatic vessels, associated with distinctive clinical features. Dogs were mainly mixed breed (n=20; 40.8%), with a mean age of 10.86 years. The most frequent histotypes were tubulopapillary (n=16; 32.7%), anaplastic (n=11; 22.5%), micropapillary (n=10; 21.3%), and comedocarcinoma (n=5; 10.6%). Most carcinomas were high-grade (n=43; 87.8%) and all cases with available lymph nodes (LN) (n=26) presented LN metastases. CIMC were classified as Luminal B-like (HER2 negative) (ER and/or PR+;HER2-<Ki67<20%) (n=32; 68%), Triple Negative (TN) (ER and PR-;HER2-) (n=12; 25.5%), Luminal A-like (ER and/or PR+;HER2-<Ki67<20%) (n=2; 4.3%) and Luminal B-like (HER2 positive) (ER and/or PR+;HER2+; any Ki67) (n=1; 2.1%).

Conclusion CIMC were generally high-grade carcinomas, with LN involvement at diagnosis and classified as Luminal B-like (highly proliferative) or TN immunophenotypes, both classically associated with poor outcome. Further research is required to identify novel therapeutic targets for CIMC, fostered by the participation of collaborative multicenter networks.

Anexo 4- Poster submetido para comunicação no congresso europeu “5th Cutting Edge Pathology”

Canine inflammatory mammary carcinoma: a Portuguese multicentric retrospective study

Gama A^{1,2}, Seixas F^{1,2}, Vicente G, Simões I, Pires MA^{1,2}, Alves A^{1,2}, Marrinhas C^{3,4}, Vilhena H^{2,4}, Santos A^{5,6}, Ferreira F^{7,8}, Franco M^{7,8}, Santos J^{9,10}, Dias Pereira P⁶, Correia J^{7,8}, Faisca P^{9,10}

1. Centro de Estudos em Gírcia Animal (CECA), and Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (ALA/Animals), Porto, Portugal; 2. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal; 3. Department of Veterinary Sciences, School of Agrarian and Veterinary Sciences (EGAV), University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal; 4. Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), UTAD and Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (ALA/Animals), Vila Real, Portugal; 5. Onevetgroup - Hospital Veterinário do Baixo Vouga, Aveiro, Portugal; 6. Centro de Investigação Yasso da Gama (CIVG), Escola Universitária Viseu da Gama (EUVG), Onevetgroup Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVICU), Coimbra, Portugal; 7. Department of Genetics and Biotechnology, School of Life and Environmental Sciences (ECVA), UTAD, Vila Real, Portugal; 8. Center of the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CTAB), UTAD, Vila Real, Portugal; 9. Center of Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA), University of Lisbon and Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (ALA/Animals), Portugal; 10. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, FMVULisboa, Lisboa, Portugal; 11. DNVtech Veterinary Laboratory, Lisboa, Portugal; 12. Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, Portugal

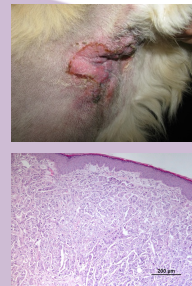
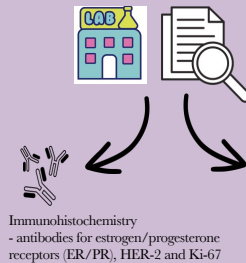


Introduction

Canine inflammatory mammary carcinoma (CIMC) is an uncommon but highly aggressive mammary tumor (MT) subtype. The aim of this multicentric study was to gather and characterize a consistent number of CIMC from four Portuguese institutions.

Material and Methods

Cases of dogs with MT submitted for histopathology between 2001 and 2022 were retrospectively assessed from four laboratory databases. MT with a diagnosis compatible with CIMC were histologically reviewed and graded (Zappulli et al., 2019). Immunohistochemistry was performed for molecular phenotype classification (Goldhirsch et al., 2013), using antibodies for estrogen/progesterone receptors (ER/PR), HER-2 and Ki-67.



Canine IMC (n=49)

Results and Conclusions

A total of 49 cases were diagnosed as CIMC, characterized by the presence of neoplastic embolization of superficial dermal lymphatic vessels, associated with distinctive clinical features. Dogs were mainly mixed breed (n=20; 40.8%), with a mean age of 10.86 years. The most frequent histotypes were tubulopapillary (n=16; 32.7%), anaplastic (n=11; 22.5%), micropapillary (n=10; 21.3%), and comedocarcinoma (n=5; 10.6%).

Most carcinomas were high-grade (n=43; 87.8%) and all cases with available lymph nodes (LN) (n=26) presented LN metastases.

CIMC were classified as Luminal B-like (HER2 negative) (ER and/or PR+; HER2-; Ki67≥20%) (n=32; 68%), Triple Negative (TN) (ER and PR-; HER2-) (n=12; 25.5%) (Fig. 1), Luminal A-like (ER and/or PR+; HER2-; Ki67<20%) (n=2; 4.3%) and Luminal B-like (HER2 positive) (ER and/or PR+; HER2+; any Ki67) (n=1; 2.1%).

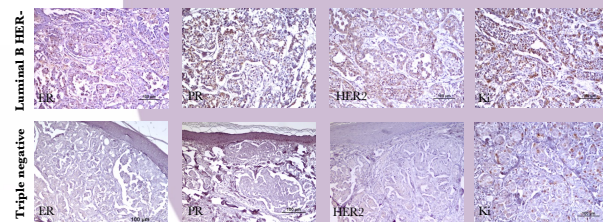
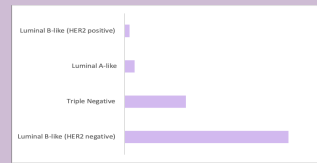


Fig. 1. Canine inflammatory mammary carcinomas. Immunohistochemical expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptors (PR), HER-2 and Ki-67. Representative image of a luminal B-like (HER2 negative) carcinoma, positive for ER and PR, negative for HER2 and with a Ki67 index ≥20% and of a triple negative carcinoma, negative for both hormone receptors and for HER2.



CIMC were generally high-grade carcinomas, with LN involvement at diagnosis and classified as Luminal B-like (highly proliferative) or TN immunophenotypes, both classically associated with poor outcome. Further research is required to identify novel therapeutic targets for CIMC, fostered by the participation of collaborative multicenter networks.

Acknowledgements: This work was financed by national funds through FCT-Portuguese Foundation for Science and Technology within the scope of the projects UIDB/CVT/00772/2020 (CECAV), UIDB/00276/2020 (CIISA), LA/P/0059/2020 and AL4A-PROJ-LT3.2 (ALA/Animals).



5th Cutting Edge Pathology Congress

28 - 31 AUGUST 2024
SAN LORENZO DE EL ESCORIAL
(MADRID) SPAIN



Anexo 5- Página 108 do livro de resumos do congresso “European Society of Veterinary Oncology (ESVONC) Annual Congress 2024”, o qual contém o nosso resumo submetido para apresentação em formato de Poster

MULTICENTRIC PORTUGUESE STUDY ON RARE AND UNCOMMON CANINE AND FELINE MALIGNANT MAMMARY TUMOURS

Andreia Santos^{1,2}, Fernanda Seixas^{3,4}, Maria dos Anjos Pires^{3,4}, Anabela Alves^{3,4}, Carla Marrinhas^{5,6}, Hugo Vilhena^{5,6}, Estela Bastos^{7,8}, Fernando Ferreira^{9,10}, Maria Franco¹⁰, Joana Santos¹¹, Patrícia Dias Pereira², Jorge Correia^{9,10}, Pedro Faisca^{11,12}, Adelina Gama^{3,4}

¹ *Centro de Estudos em Ciência Animal (CECA), and Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (AL4Animals), Porto, Portugal*

² *Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal*

³ *Department of Veterinary Sciences, School of Agrarian and Veterinary Sciences (ECAV), University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal*

⁴ *Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), UTAD and Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (AL4Animals), Vila Real, Portugal (projects UIDB/00772/2020, Doi:10.54499/UIDB/00772/2020, LA/P/0059/2020 and AL4A-PROJ-LT3.2)*

⁵ *Onevetgroup - Hospital Veterinário do Baixo Vouga, Aveiro, Portugal*

⁶ *Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Onevetgroup Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC), Coimbra, Portugal*

⁷ *Department of Genetics and Biotechnology, School of Life and Environmental Sciences (ECVA), UTAD, Vila Real, Portugal*

⁸ *Center of the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), UTAD, Vila Real, Portugal*

⁹ *Center of Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA), University of Lisbon and Associate Laboratory for Animal and Veterinary Science (AL4Animals), Portugal (project UIDB/00276/2020, CIISA)*

¹⁰ *Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, FMV-ULisboa, Lisboa, Portugal*

¹¹ *DNAtch Veterinary Laboratory, Lisboa, Portugal*

¹² *Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, Portugal*

Introduction

Mammary tumours (MT) are frequently diagnosed in female dogs and cats. Different entities have been recognized by the recent classification on MT, with several histotypes considered as uncommon or rare. With this multicentric study, we aimed to assemble and further characterize a large series of rare/uncommon canine and feline malignant MT (RUMT) from four different Portuguese institutions.

Materials and methods

Canine and feline MT submitted for histopathology from 2013 to 2022 were retrospectively selected from the laboratories database; MT with a diagnosis compatible with RUMT (special histotype, invasive micropapillary carcinoma (IMC), anaplastic carcinoma (AC), carcinosarcoma (CSa), carcinoma and malignant myoepithelioma (CMM)) were reviewed and histologically graded.

Anexo 6- Página 109 do livro de resumos do congresso “European Society of Veterinary Oncology (ESVONC) Annual Congress 2024”, o qual contém o nosso resumo submetido para apresentação em formato de Poster

Results

From a total of 8883 MT (6528 canine and 2355 feline, excluding hyperplasias/dysplasias), 458 RUMT were diagnosed in 450 animals. Dogs presented a higher prevalence of RUMT (356; 5.45%). CSa (n=112; 1.72%) was the most common, followed by adenosquamous carcinoma (AdC) (n=74; 1.13%), AC (n=42; 0.64%), IMC (n=34; 0.52%), malignant myoepithelioma (MM) (n=30; 0.46%), mucinous carcinoma (MC) (n=24; 0.37%), CMM (n=17; 0.27%), spindle cell carcinoma (SCC) (n=10; 0.15%), micropapillary (n=9; 0.14%) and lipid-rich (n=4; 0.06%). In cats, 102 RUMT (4.33%) were found: the most common was MC (n=43; 1.83%), followed by AdC (n=20; 0.85%), CSa (n=12; 0.51%), AC (n=10; 0.42%), IMC (n=9; 0.38%) and micropapillary (n=8; 0.34%). The vast majority was classified as moderate/high grade.

Conclusions

This study confirms these MT histotypes as unusual (less than 2%), but emphasizes differences between both species. Further investigation of specific RUMT will benefit its comprehensive characterization.

Anexo 7- Poster submetido para comunicação no congresso “European Society of Veterinary Oncology (ESVONC) Annual Congress 2024”

Multicentric Portuguese Study On Rare And Uncommon Canine And Feline Malignant Mammary Tumours

Santos A 1,2, Seixas F 3,4, Pires MA 3,4, Alves A 3,4, Marrinhas C 5,6, Vilhena H 4,6, Bastos E 7,8, Ferreira F 9,10, Franco M 10, Santos J 11, Dias Pereira P 2, Correia J 9,10, Faisca P 11,12, Gama A 3,4

1. Centro de Estudos em Ciências Veterinárias (CECV), and Associated Laboratory for Animal and Veterinary Science (LA/AVS), Porto, Portugal; 2. Instituto de Ciências Biomédicas do Abel Salazar de Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal; 3. Department of Veterinary Sciences, School of Agrarian and Veterinary Sciences (EGAV), University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal; 4. Animal and Veterinary Research Center (CICAV), UTAD and Associated Laboratory for Animal and Veterinary Science (LA/AVS), Vila Real, Portugal; 5. Oncogenetics - Hospital Veterinário do Baixo Vouga, Aveiro, Portugal; 6. Centro de Investigação Veterinária do Centro (CIVC), Escola Veterinária Veterinária do Centro (EVVC), Universidade Hospital Veterinária Universidade de Coimbra (UHVC), Coimbra, Portugal; 7. Department of Genetics and Biotechnology, School of Life and Environmental Sciences (SLEAS), UTAD Vila Real, Portugal; 8. Center of the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CTAAB), UTAD, Vila Real, Portugal; 9. Center of Interdisciplinary Research in Animal Health (CIRAH), University of Lisbon and Associated Laboratory for Animal and Veterinary Science (LA/AVS), Portugal; 10. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, FMV (Lisboa, Lisboa, Portugal); 11. DNAtech Veterinary Laboratory, Lisboa, Portugal; 12. Animal and Veterinary Research Center (CICAV), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusitana, Campus Universidade de Lisboa, Portugal



Introduction

Mammary tumours (MT) are frequently diagnosed in female dogs and cats. Different entities have been recognized by the recent classification on MT, with several histotypes considered as uncommon or rare. With this multicentric study, we aimed to assemble and further characterize a large series of rare/uncommon canine and feline malignant MT (RUMT) from four different Portuguese institutions.

Material and methods

Canine and feline MT submitted for histopathology from 2013 to 2022 were retrospectively selected from the laboratories database; MT with a diagnosis compatible with RUMT (special histotype, invasive micropapillary carcinoma (IMiC), anaplastic carcinoma (AC), carcinosarcoma (CSa), carcinoma and malignant myoepithelioma (CMM)) were reviewed and histologically graded.



Results and conclusions

From a total of 8883 MT (6528 canine and 2355 feline, excluding hyperplasias/dysplasias), 458 RUMT were diagnosed in 450 animals. Dogs presented a higher prevalence of RUMT (356; 5.45%). CSa (n=112; 1.72%) was the most common, followed by adenocarcinoma (AdC) (n=74; 1.13%), AC (n=42; 0.64%), Inflammatory mammary carcinoma (IMC) (n=34; 0.52%), malignant myoepithelioma (MM) (n=30; 0.46%), mucinous carcinoma (MC) (n=24; 0.37%), CMM (n=17; 0.27%), spindle cell carcinoma (SCC) (n=10; 0.15%), IMiC (n=9; 0.14%) and lipid-rich (n=4; 0.06%). In cats, 102 RUMT (4.33%) were found: the most common was MC (n=43; 1.83%), followed by AdC (n=20; 0.85%), CSa (n=12; 0.51%), AC (n=10; 0.42%), IMC (n=9; 0.38%) and IMiC (n=8; 0.34%). The vast majority was classified as moderate/high grade.

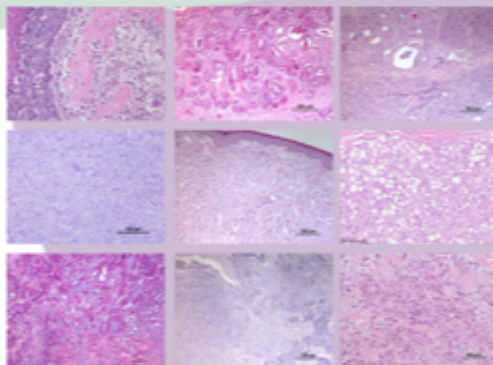


Fig. 1 Dog Carcinosarcoma; Fig. 2 Dog Adenocarcinoma; Fig. 3 Dog Anaplastic carcinoma; Fig. 4 Dog Malignant myoepithelioma; Fig. 5 Dog Inflammatory mammary carcinoma; Fig. 6 Dog Lipid-rich carcinoma; Fig. 7 Cat Mucinous carcinoma; Fig. 8 Cat Carcinosarcoma; Fig. 9 Cat Adenocarcinoma; Fig. 10 Cat Anaplastic carcinoma; Fig. 11 Cat Malignant myoepithelioma; Fig. 12 Cat Inflammatory mammary carcinoma



This study confirms these MT histotypes as unusual (less than 2%), but emphasizes differences between both species. Further investigation of specific RUMT will benefit its comprehensive characterization.

Acknowledgments: This work was financed by national funds through FCT - Portuguese Foundation for Science and Technology, within the scope of the projects UIDB-CYT/04075/2020 (CICAV), UIDB/00276/2020 (CIVC), LA P/0049/2020 and ALAA-PRG/1.73.1 (LA/AVS).



Anexo 8- Percentagens obtidas de imunomarcção para PD-1 e respectivas pontuações de intensidade

Caso	PD-1					
	% iLITs	PI iLITs	% eLITs	PI eLITs	% CT	PI CT
1	24	1	16.9	1	0	0
2	59	1	15.1	1	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	59,1	2	45.9	3	0	0
5	8,8	2	22.5	2	0	0
6	46,1	3	45.0	4	0	0
7	0	0	5.3	2	0	0
8	50	2	31.5	2	0	0
9	0	0	20.9	3	0	0
10	22,5	2	12.5	2	0	0
11	29,8	1	42.7	1	58.1	1
12	47,5	2	30.2	3	0	0
13	61,3	2	39.6	2	0	0
14	37,1	2	75.4	2	0	0
15	62	2	49.3	3	0	0
16	0	0	18.1	4	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	50,8	3	45.8	3	35.8	3
20	72	3	41.2	2	0	0
21	20,6	2	14.6	2	6.8	2
22	23,2	3	10.4	3	0	0
23	43,1	3	21.4	3	0	0
24	23,5	2	14.4	3	0	0
25	6,4	2	1.6	2	0	0
26	0	0	16.3	1	0	0
27	12,2	1	32.6	1	0	0
28	9	3	36.2	4	0	0
29	72,5	3	33.3	2	0	0
30	7,4	2	9.5	2	0	0
31	20,5	3	21.0	2	0	0
32	13,1	1	17.4	1	0	0
33	69,5	2	29.9	2	0	0
34	7,3	1	11.3	1	0	0
35	10,1	1	35.6	2	0	0
36	13,5	3	11.2	3	0	0
37	23,6	2	6.9	2	0	0
38	36,7	3	46.2	3	0	0
39	37,8	2	32.2	3	0	0
40	39,6	2	40.3	3	28.7	2
41	33,7	2	45.1	2	0	0
42	31,7	1	34.7	3	13.6	1
43	31	2	46.7	2	0	0
44	44,6	3	30.7	3	23.6	3
45	35,9	2	13.2	2	0	0
46	15,5	2	32.0	2	0	0
47	11,6	2	5.4	2	0	0
48	6,7	2	7.9	2	0	0

PI- Pontuação de intensidade

Anexo 9- Percentagens obtidas de imunomarcção para PD-L1 e respetivas pontuações de intensidade

Caso	PD-L1					
	% iLITs	PI iLITs	% eLITs	PI eLITs	% CT	PI CT
1	30,8	3	20,2	3	0	0
2	53,7	2	40,4	2	0	0
3	0	0	15,7	2	0	0
4	27,2	3	36,9	4	30,3	2
5	15,8	2	14,5	2	0	0
6	33,9	4	33,8	3	40,7	1
7	32,1	2	22,6	2	31,1	2
8	20,7	2	7,8	1	0	0
9	19,3	2	22,6	3	0	0
10	24,8	2	29	2	0	0
11	38,8	2	40,4	2	67,6	2
12	14,4	2	30,8	4	33,2	2
13	26,3	2	36,1	2	0	0
14	37	2	21,6	2	29,6	1
15	35,2	2	43,8	2	0	0
16	22,7	2	11	4	36,7	2
17	51,3	2	31,6	2	53,3	2
18	4,4	1	24	2	0	0
19	83,7	3	43	3	55,3	3
20	45,8	2	39	2	21	2
21	30,1	2	47,6	2	31,5	1
22	44,1	4	30,8	3	36,5	3
23	46,1	2	38,8	3	46,1	2
24	29	2	8,7	2	0	0
25	37	3	9	1	0	0
26	41,3	3	46,9	3	20,8	2
27	50,4	2	46,5	2	35,9	2
28	41,6	3	39,7	3	31,1	2
29	50,9	3	38,2	2	0	0
30	0	0	11	2	0	0
31	23,5	2	16,5	3	0	0
32	30,3	3	12,4	2	0	0
33	23,6	2	24	2	0	0
34	45,4	2	50,4	2	25,3	2
35	51,7	2	44,1	3	0	0
36	28,7	1	17	2	94,5	1
37	54,3	2	11,3	2	64,7	2
38	61,1	2	23,5	3	0	0
39	16,9	1	4,7	1	0	0
40	39,1	1	18,8	1	0	0
41	44,3	3	46,5	4	0	0
42	23,2	2	21,6	3	19,2	1
43	45,7	3	36,2	3	33,8	2
44	38,9	3	31,2	4	28,5	2
45	32,4	3	25,7	2	0	0
46	49,5	2	22,4	3	0	0
47	21,3	3	18,4	3	0	0
48	16,1	2	15,3	2	0	0

PI- Pontuação de intensidade

Anexo 10- Percentagens obtidas de imunomarcção para PD-L2 e respetivas pontuações de intensidade

PD-L2						
Caso	% iLITs	PI iLITs	% eLITs	PI eLITs	% CT	PI CT
1	40,4	2	21,8	2	15,1	2
2	32,2	2	53,4	2	19,7	2
3	24,3	2	28,6	2	28,5	2
4	33,7	1	17,8	2	27,3	2
5	18,4	1	11,1	2	16,1	1
6	29,9	3	41,6	4	36,8	2
7	39,7	2	14,2	3	88,4	2
8	31,6	3	7,9	2	12,6	1
9	27,5	3	47,1	3	0	0
10	23	2	36,3	3	0	0
11	32,3	1	28,7	1	43,4	2
12	46	3	28,7	3	51,4	2
13	56,2	3	46,2	3	20,6	2
14	14,9	2	27,3	3	0	0
15	58,3	3	33,3	3	0	0
16	11,4	3	10,1	3	23	1
17	35,7	2	40,2	4	36,4	2
18	31,8	3	28,6	2	45,3	1
19	41,9	4	47,1	4	41,5	3
20	38,1	3	35,9	2	1,7	2
21	24,5	3	19,6	3	21,4	2
22	25	3	23,4	4	34,4	2
23	29,4	3	29,7	3	0	0
24	51,3	3	58,8	3	84,1	3
25	9,6	2	3,3	1	34,2	1
26	37,4	3	11,2	2	21,9	2
27	20,7	2	25,6	2	16,8	1
28	38	3	40,2	3	29	2
29	43,4	3	49,1	2	21,3	2
30	24,4	3	13,7	2	17,9	2
31	49,3	3	35,5	4	12,2	2
32	16,6	3	26	3	0	0
33	35,5	2	27,8	2	0	0
34	27,2	2	31,4	2	21,6	2
35	13,1	2	46,3	3	0	0
36	33,1	2	28,6	3	14,5	2
37	21,8	3	12,9	3	40,8	2
38	56,9	4	41,2	3	27,2	2
39	33	2	36,4	2	14,1	1
40	31,1	2	14,4	3	36	2
41	48,6	4	39,9	3	0	0
42	43,4	2	29,7	3	25,9	1
43	48,8	3	36,1	3	9,9	2
44	31,6	3	35,8	3	33,1	2
45	18	3	10,1	4	0	0
46	26,7	2	15,8	3	5,9	1
47	17,3	3	8,4	4	13,6	1
48	17,7	2	14,1	2	13,5	1

PI-Pontuação de intensidade