

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

TESE

**IMUNODETECÇÃO DA CADEIA ALFA DO RECEPTOR DE
INTERLEUCINA-3 (CD123) EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS
CANINOS DE BAIXO E ALTO GRAU: DESENVOLVIMENTO DE
PROTOCOLO E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE
DETECÇÃO DO KIT**

Bartolomeu Benedito Neves dos Santos

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

IMUNODETECÇÃO DA CADEIA ALFA DO RECEPTOR DE
INTERLEUCINA-3 (CD123) EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS
CANINOS DE BAIXO E ALTO GRAU: DESENVOLVIMENTO DE
PROTOCOLO E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE
DETECÇÃO DO KIT

BARTOLOMEU BENEDITO NEVES DOS SANTOS

Sob a orientação da Professora
Ticiano do Nascimento França

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária, no
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, Área de
Concentração em Patologia Animal

Seropédica, RJ
Março de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237i Santos , Bartolomeu Benedito Neves dos, 1991-
Imunodeteção da Cadeia Alfa do Receptor de
Interleucina-3 (CD123) em Mastocitomas Cutâneos
Caninos de Baixo e Alto Grau: Desenvolvimento de
Protocolo e Comparação Com o Método de Detecção do Kit
/ Bartolomeu Benedito Neves dos Santos . -
Seropédica, 2024.
91 f.: il.

Orientadora: Ticiania do Nascimento França.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Pós Graduação em Medicina Veterinária, 2024.

1. imuno-histoquímica. 2. prognóstico. 3. c-Kit. I.
do Nascimento França, Ticiania , 1974-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
Graduação em Medicina Veterinária III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

BARTOLOMEU BENEDITO NEVES DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Patologia Animal.

TESE APROVADA EM 21/03/2024

Ticiano do Nascimento França. Dra. UFRRJ
(orientadora)

Vivian de Assunção Nogueira Carvalho. Dra. UFRRJ

David Driemeier. Dr. UFRGS

Pedro Soares Bezerra Junior. Dr. UFPA

Samay Zillmann Rocha Costa. Dra. IFFar



TERMO N° 193/2024 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 26/03/2024 11:13)

TICIANA DO NASCIMENTO FRANCA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DESP (12.28.01.00.00.00.52)

Matrícula: ###476#8

(Assinado digitalmente em 26/03/2024 11:12)

VIVIAN DE ASSUNCAO NOGUEIRA CARVALHO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DESP (12.28.01.00.00.00.52)

Matrícula: ###061#5

(Assinado digitalmente em 26/03/2024 18:41)

PEDRO BEZERRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.237-##

(Assinado digitalmente em 26/03/2024 12:19)

SAMAY ZILLMANN ROCHA COSTA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.617-##

(Assinado digitalmente em 26/03/2024 13:50)

DAVID DRIEMEIER

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.809-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **193**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **26/03/2024** e o código de verificação: **2bbc0aeaa7**

DEDICATÓRIA

Novamente ao meu pai Bartolomeu Benedito (*in memoriam*) e à minha mãe Cordélia, por todo apoio, amor, carinho e dedicação que me fazem sentir seguro, amado, capaz e feliz e à minha abençoada família; escolheria todos vocês todas as vezes possíveis (se isso for uma possibilidade)!

AGRADECIMENTOS

Queridos companheiros de jornada,

Ao encerrar este capítulo marcante da minha vida acadêmica, é impossível não expressar a imensa gratidão que pulsa em meu coração. Cada um de vocês desempenhou um papel único e inestimável na minha trajetória até aqui, moldando não apenas o pesquisador, mas também a pessoa que sou hoje.

A Deus, agradeço pela força interior que me sustentou nos momentos desafiadores e pela luz que iluminou meu caminho, tornando possível esta e muitas outras conquistas e alegrias, sinto sempre que você está comigo.

À minha mãe, ser admirável, cujo amor inabalável e exemplo inspirador moldaram meu ser, dedico minha mais profunda gratidão. Seu carinho, sua força e sua generosidade são a raiz da pessoa que me tornei. Cada desafio que compartilhamos fortaleceu nossos laços e enriqueceu minha jornada. Sua presença constante e seu apoio incansável são minha âncora em meio às tempestades da vida. Esta e todas as conquistas sempre serão um tributo ao seu amor e dedicação, pois foi ao seu lado que aprendi a perseverar e a valorizar o verdadeiro significado da perseverança e do amor incondicional. Obrigado por iluminar meu caminho com sua sabedoria e amor.

Ao meu pai Bartolomeu Benedito dos Santos, que reside na eternidade, minha gratidão ultrapassa as palavras. Pai, sua sabedoria continua a inspirar-me, e a saudade é apenas um reflexo do amor que sinto por você, mesmo à distância finita. Essa conquista também é sua.

Ao Ivo, meu companheiro de jornada e pilar fundamental durante meu percurso nos últimos anos. Sua presença é uma constante fonte de apoio, admiração, inspiração e alento nos momentos desafiadores. A cada dia percebo através de você, como o amor transforma, impulsiona coisas boas e é fonte de uma felicidade inexplicável. Sua generosidade, compreensão, orientação e ajuda foram fundamentais para eu alcançar este momento. Agradeço por sua dedicação constante, por ser meu confidente e por compartilhar comigo o impacto renovador e impulsionador que o amor verdadeiro pode proporcionar.

Minha família, alicerce sólido da minha existência, obrigado por serem tão unidos, vocês são exemplos de base e ajudaram a sustentar esse sonho, a união, o sorriso e o amor nos encontros foram como recarga e renovação para eu continuar meu caminho. Tenho certeza de que nosso elo é imenso, independente da distância, amo muito todos vocês.

À Marina querida amiga e técnica do laboratório, obrigado pela pronta disposição em ajudar com um volume de trabalho considerável e em um tempo restrito e por ter executado o trabalho com perfeição, sem sua ajuda eu não teria conseguido, uma enorme gratidão!

Aos amigos, verdadeiros tesouros da minha vida, em especial a Juliana Rocha, Adriana Ventura, Letícia Pinto, Luís Tondo, Asheley Henrique, Izabel Reina, Amanda, Raisa, Raissa, Alana, André Marandola, Taina Barbosa, Samay e Ana Paula Pires, minha eterna gratidão, sem vocês talvez eu não estivesse aqui, foram responsáveis por ensinamentos, incentivos, colaboração e força que impulsionou minha caminhada acadêmica.

Gabriela Cid e Mariana D'avila, amigas tão queridas, agradeço a prontidão em separar as amostras que possibilitaram meu estudo. Sua colaboração foi vital e representa uma das essências do verdadeiro apoio entre amigos.

À minha orientadora Profa. Ticiane França, agradeço a sua dedicação, compreensão e estímulo constante de ideias ao longo de todo o meu percurso acadêmico. Sua prontidão em ajudar e orientar foi fundamental em cada etapa, desde os primeiros passos na monitoria, passando pela seleção para iniciação científica e mestrado, até este momento no doutorado. Sua formação e incentivo moldaram não apenas minha trajetória acadêmica, mas também meu crescimento profissional. Muito obrigado.

À Profa. Aparecida, pela sua generosidade ao disponibilizar o polímero com tanta boa vontade, obrigado pela gentileza. Sua contribuição foi essencial para o sucesso deste projeto muito antes dele acontecer, afinal, a histologia veio antes de tudo.

Aos professores Paulo Peixoto, Vívian Nogueira e Marilene Brito, que transcendem o papel de educadores e se tornam mentores inspiradores, meu profundo agradecimento. Sua dedicação, estímulo e confiança foram faróis que me guiaram nessa complexa jornada, desde os primórdios, serei eternamente grato.

Aos professores de todos os níveis acadêmicos que tive a honra de encontrar ao longo do caminho, minha admiração é imensa. Vocês são arquitetos da transformação social, moldando mentes e corações com amor, dedicação e sabedoria. O cansaço que possam sentir espero que seja eclipsado pela gratificação de verem tantas vidas transformadas por seu trabalho incansável, minha eterna gratidão.

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

SANTOS, Bartolomeu Benedito Neves. **Imunodeteção da Cadeia Alfa do Receptor de Interleucina-3 (CD123) em Mastocitomas Cutâneos Caninos de Baixo e Alto Grau: Desenvolvimento de Protocolo e Comparação com o Método de detecção do KIT.** 2024. 74p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Patologia e Ciência Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

RESUMO

O mastocitoma cutâneo canino (MCC) é uma das neoplasias mais frequentes em cães e seu prognóstico é muito variável. Apesar de existirem métodos de graduação histológica, marcadores imuno-histoquímicos e análises moleculares para auxiliar no prognóstico da maioria dos casos, não há nenhum meio de prever-se o comportamento de todos os casos de MCCs, sobretudo aqueles mais frequentes, os de Grau II Patnaik/Baixo Grau Kiupel. Além disso, os principais métodos complementares de imuno-histoquímica (IHQ) prognóstica para MCCs sofrem com a variedade de metodologias empregadas na literatura e conseqüentemente com a falta de padronização e consenso sobre essas metodologias. A cadeia α do receptor de interleucina 3 (CD123), que vem sendo estudada na Medicina Humana como marcador diagnóstico para neoplasias linfomatóides, é imunodetectada em parte das mastocitoses humanas e apontada como fator prognóstico. Esse marcador ainda vem sendo extensivamente testado em diversos experimentos como alvo terapêutico para neoplasias humanas, sobretudo leucemias refratárias/recidivantes e neoplasias de células dendríticas plasmocitoides blásticas. Apesar do aparente potencial desse biomarcador na Medicina Humana, na Medicina Veterinária ele ainda não havia sido reportado em estudos que demonstrassem claramente a sua detecção em amostras caninas. Essa pesquisa, a partir de uma amostragem de 63 MCCs (30 de baixo grau e 33 de alto grau), demonstrou que 58,7% (37/63) dos casos foram imunocorados com CD123, sendo 43,3% (13/30) dos casos de baixo grau e 72,7% (24/33) dos casos de alto grau positivos. Além disso, analisamos a intensidade da imunomarcagem nos casos positivos em dois níveis (fraca e consistente). A imunomarcagem dos MCCs com CD123 foi positivamente relacionada com o alto Grau de Kiupel ($p = 0,020$) e, a intensidade da imunomarcagem apresentou relação positiva para marcação consistente em MCCs de alto grau Kiupel ($p < 0,001$). Anteriormente a esse resultado realizamos uma metodologia extensa de padronização e validação por comparação de padrões de marcação do CD123, desde a verificação de reação de um anticorpo anti-CD123 monoclonal *versus* policlonal com diferentes sistemas de detecção e comparação com o padrão de marcação em controles humanos. Também investigamos a imunodeteção do CD123 em diversos tecidos caninos não neoplásicos e em amostras de neoplasias linfomatóides benignas e malignas em uma lâmina de TMA com cores de 2mm de espécimes de plasmocitomas cutâneos, histiocitomas cutâneos, sarcomas histiocíticos e mieloma múltiplo. Por fim, demonstramos que o método de detecção IHQ por polímero de duas etapas pode interferir no padrão de marcação do KIT em MCCs, em que casos imunomarcados como padrão KIT I e II no método de detecção por polímero em reação de uma etapa, se mostraram como um padrão KIT III no método de detecção por polímero de duas etapas, o que infere grande mudança na interpretação do prognóstico auxiliar dependente dessa técnica.

Palavras chave: imuno-histoquímica, prognóstico, c-Kit.

SANTOS, Bartolomeu Benedito Neves. **Immunodetection of the Alpha Chain of the Interleukin-3 Receptor (CD123) in Low and High-Grade Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Protocol Development and Comparison with the KIT Detection Method.** 2024. 74p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

ABSTRACT

Canine cutaneous mast cell tumor (MCTs) is one of the most common neoplasms in dogs, with a highly variable prognosis. Despite the existence of histological grading methods, immunohistochemical markers, and molecular analyses to aid in the prognosis of most cases, there is no means to predict the behavior of all MCTs cases, especially those most frequent, Grade II Patnaik/Low Grade Kiupel. Additionally, the main complementary methods of prognostic immunohistochemistry (IHC) for MCTs suffer from the variety of methodologies employed in the literature and consequently from the lack of standardization and consensus on these methodologies. The α chain of the interleukin-3 receptor (CD123), which has been studied in Human Medicine as a diagnostic marker for lymphohematopoietic neoplasms, is immunodetected in some human mastocytosis cases and is suggested as a prognostic factor. This marker has also been extensively tested in various experiments as a therapeutic target for human neoplasms, particularly refractory/relapsed leukemias and blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. Despite the apparent potential of this biomarker in Human Medicine, it had not been reported in Veterinary Medicine studies demonstrating its clear detection in canine samples. This research, based on a sample of 63 MCTs (30 low-grade and 33 high-grade), demonstrated that 58.7% (37/63) of cases were immunoreactive with CD123, with 43.3% (13/30) of low-grade cases and 72.7% (24/33) of high-grade cases being positive. Additionally, we analyzed the intensity of immunostaining in positive cases at two levels (weak and consistent). Immunostaining of MCTs with CD123 was positively related to high Kiupel Grade ($p = 0.020$), and the intensity of immunostaining showed a positive relationship for consistent staining in high-grade Kiupel MCTs ($p < 0.001$). Prior to this result, we demonstrated an extensive methodology of standardization and validation by comparing CD123 staining patterns, from checking the reaction of a monoclonal versus polyclonal anti-CD123 antibody with different detection systems and comparing with the staining pattern in human controls. We also investigated CD123 immunodetection in various non-neoplastic canine tissues and samples of benign and malignant lymphohematopoietic neoplasms on a TMA slide with 2mm cores of specimens from cutaneous plasmacytomas, cutaneous histiocytomas, histiocytic sarcomas, and multiple myeloma. Finally, we demonstrated that the two-step polymer IHC detection method may interfere with the KIT staining pattern in MCTs, where cases immunostained as KIT patterns I and II in the one-step polymer detection method were shown as a pattern KIT III in the two-step polymer detection method, which implies a significant change in the interpretation of prognosis depending on this technique.

Keywords: Immunohistochemistry, prognosis, c-Kit.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Distribuição da frequência de marcação CD123 e Grau de Kiupel por categorias de classificação de intensidade (consistente e fraca) e de Grau (baixo e alto) para casos de MCCs. | 42 |
| Tabela 2. Relação de amostras de MCCs graduadas como baixo grau Kiupel com grau de Patnaik, padrão de marcação do KIT e imunodeteção do CD123. | 44 |
| Tabela 3. Relação de amostras de MCCs graduadas como alto grau Kiupel com grau de Patnaik, padrão de marcação do KIT e imunodeteção do CD123. | 45 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Resumo da graduação histológica de MCCs proposta por Bostock (1973). | 4 |
| Quadro 2. Resumo da graduação histológica de MCC proposta por Patnaik e colaboradores (1984). | 4 |
| Quadro 3. Resumo da graduação histológica de MCCs proposta por Kiupel e colaboradores (2011). | 5 |
| Quadro 4. Sistema de classificação para a avaliação microscópica de metástases linfonodais em casos de MCCs proposto por Weishaar e colaboradores (2014). | 5 |
| Quadro 5. Órgãos selecionados para análise da imunodeteção do CD123 e respectivos registros das amostras. | 16 |
| Quadro 6. Amostras de tonsilas palatinas humanas e respectivo registro utilizadas como controle positivo para reação de IHQ com anticorpos anti-CD123 mono e policlonal. | 16 |
| Quadro 7. Imunodeteção do CD123 policlonal em células de diferentes tecidos de cães através de sistema baseado em polímero de uma etapa. | 28 |
| Quadro 8. Raça, sexo, idade, local anatômico e avaliação de linfonodos de 30 MCCs de baixo grau Kiupel. | 29 |
| Quadro 9. Raça, sexo, idade, local anatômico e avaliação de linfonodos de 33 MCCs de alto grau Kiupel. | 30 |
| Quadro 10. Critérios avaliados para graduação dos MCCs de baixo grau Kiupel e grau de Patnaik (continua). | 32 |
| Quadro 11. Critérios avaliados para graduação dos MCCs de alto grau Kiupel e grau de Patnaik (continua). | 35 |
| Quadro 12. Influência de métodos de detecção IHQ no padrão de visualização de imunomarcção do KIT. | 46 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Vias de sinalização do sistema IL-3R adaptado de Patnaik e colaboradores (2021).** IL-3: interleucina 3; IL-3R: receptor de interleucina 3; JAK: Janus quinase; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; P: fosfato; PI3K: fosfoinositol 3-quinase; GTP: guanosina-5'-trifosfato; Shc: proteína transformadora contendo domínio de homologia 2 de Src; Grb2: proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento; STAT: transdutores de sinal e ativadores de transcrição. AKT: proteína quinase B; ERK: quinases reguladas por sinal extracelular; Dados de Martinez-Moczygamba e Huston (2003)..... 11
- Figura 2. Comparação da imunocoloração com anticorpo anti-CD123 monoclonal com sistema de detecção baseado em polímero de uma e duas etapas em tonsila palatina humana.** **Figura A.** Sistema de detecção baseado em polímero em reação de uma etapa. Imunocoloração com intensidade mínima de poucas células interfoliculares e ausência de detecção do antígeno em vênulas do endotélio alto, IHQ polímero em uma etapa, CD123 (6H6), obj.40. **Figura B.** Sistema de detecção baseado em polímero em reação de duas etapas. Observa-se forte imunocoloração membranosa-citoplasmática de grupos de células dentríticas plasmocitoides e de vênulas do endotélio alto. IHQ polímero em duas etapas, CD123 (6H6), obj.40.20
- Figura 3. Distribuição da imunomarcação com anticorpo anti-CD123 monoclonal em tonsila palatina humana.** **Figura A.** Padrão de distribuição de células imunocoradas dispostas em grupos interfoliculares, IHQ em duas etapas, CD123 (6H6), obj.10. **Figura B.** Marcação de células interfoliculares e raríssimas células intrafoliculares. IHQ em duas etapas, CD123 (6H6), obj.40.21
- Figura 4. Distribuição da imomarcação com anticorpo policlonal anti-CD123 em tonsila palatina humana.** Padrão de distribuição de células imunocoradas dispostas em grupos interfoliculares, semelhante ao padrão demonstrado com anticorpo monoclonal (6H6), IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.10.22
- Figura 5. Grupos de células interfoliculares com forte marcação citoplasmática-membranosa com anticorpo policlonal anti-CD123 em tonsila palatina humana.** O padrão de marcação é similar ao do anticopo monoclonal (6H6). Marcação fraca de população linfoide, IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.22
- Figura 6. Tonsila palatina humana.** Forte marcação citoplasmática-membranosa em vênula do endotélio alto. O padrão de marcação é similar e mais intenso do que o observado com o uso do anticorpo monoclonal (6H6); há marcação fraca de população linfoide, IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.23
- Figura 7. Glândulas salivares remanescentes nas margens de amostra de tonsila palatina humana.** Forte imunomarcação membranosa-citoplasmática em ductos salivares e endotélio de alguns vasos, IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.23
- Figura 8. Controle negativo do polímero com sistema de detecção em duas etapas em linfonodo e tonsila palatina caninos.** **A.** Linfonodo de cão sem tratamento com anticorpo primário. Imunocoloração forte em cápsula, células da região interfolicular e paracortical, obj.10. **B.** Linfonodo da imagem A aproximada; as células fortemente imunocoradas são morfológicamente indistinguíveis de plasmócitos, obj.40. **C.** Tonsila palatina de cão; o estroma, células fusiformes e plasma apresentam forte imunocoloração com ausência do anticorpo primário, obj.40. **D.** Glândulas salivares remanescentes nas adjacências da tonsila palatina de

| | |
|--|----|
| cão; há forte imunocoloração do estroma, plasma e fraca coloração na secreção de poucas glândulas com ausência de tratamento com anticorpo primário, obj.10. | 24 |
| Figura 9. Controle negativo de linfonodo canino. Como esperado, não houve imunocoloração. A. obj.10. B. obj.40. IHQ utilizando sistema de detecção baseado em polímero de uma etapa com omissão do anticorpo primário. | 25 |
| Figura 10. Córtex linfonodo de cão. Agrupamento distinto de células fortemente imunocoradas à direita no canto superior da imagem, além de mínima intensidade de marcação de linfócitos. IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. | 25 |
| Figura 11. Comparação da imunodeteção do CD123 policlonal entre linfonodo de cão e tonsila palatina humana. A e C linfonodo de cão. Forte imunomarcação de grupos de células com citoplasma amplo, núcleo grande, pleomórfico com cromatina vesicular e menor número de células pequenas com núcleo hipercromático, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. B e D tonsila palatina humana. Em B o agrupamento de células fortemente imunocoradas apresenta citoplasma relativamente amplo, com células de núcleo pequeno e hipercromático e células com núcleos grandes de cromatina esparsa. Em D, as células são grandes, individualizadas, com forte marcação membranosa-citoplasmática e núcleo grande, pleomórfico com cromatina vesicular e nucléolos evidentes, semelhantes às observadas em cães, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. | 26 |
| Figura 12. Linfonodo de cão. Forte imunomarcação membranosa-citoplasmática de células com citoplasma relativamente abundante e núcleo pequeno, em pequenos grupos, em um subarranjo linear em região interfolicular. Não há imunomarcação de vênulas, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. | 27 |
| Figura 13. Tonsila palatina de cão. Forte imunomarcação membranosa-citoplasmática de células intraepiteliais, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. | 27 |
| Figura 14. Imunomarcação de MCC de baixo grau. A. MCC com fraca marcação em células neoplásicas, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.10. B. Mesma amostra de A, revelando fraca imunocoloração membranosa-citoplasmática, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. C. Mesma amostra imunocorada com KIT, evidenciando um padrão de marcação de membrana (KIT I), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-KIT policlonal, obj.40. D. Coloração de hematoxilina e eosina na mesma amostra, H.E., obj.40. | 39 |
| Figura 15. Imunomarcação de MCC de baixo grau. A. MCC com moderada a forte marcação em distribuição de células neoplásicas, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.10. B. Mesma amostra de A. com moderada a forte imunocoloração membranosa-citoplasmática em mastócitos neoplásicos, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. C. Mesma amostra imunocorada com KIT, evidenciando um padrão de marcação citoplasmático focal (KIT II), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-KIT policlonal, obj.40. D. Coloração de hematoxilina e eosina na mesma amostra, H.E., obj.40. | 40 |
| Figura 16. MCCs de alto grau comparação da intensidade de marcação do CD123 em duas amostras. Figuras A, C e E representam uma mesma amostra. A. Coloração H.E, obj.40; C. Fraca imunomarcação citoplasmática em mastócitos neoplásicos, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. E. Padrão de imunomarcação citoplasmático difuso (KIT III), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40. Figuras B, D e F representam uma mesma amostra. B. Coloração H.E, Obj.40. D. Imunomarcação citoplasmática muito forte em mastócitos neoplásicos, IHQ com polímero em | |

| | |
|---|----|
| reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. F. Padrão de imunomarcacão citoplasmático difuso (KIT III), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40..... | 41 |
| Figura 17. Contagem da imunodeteccão do CD123 em relação ao Grau de Kiupel para MCCs. Uma análise de regressão logística binária verificou que a marcação por CD123 foi positivamente relacionada com o alto Grau de Kiupel ($X^2(1) = 5,408$; $p = 0,020$)..... | 42 |
| Figura 18. Contagem das imunomarcacões por CD123 e Grau de Kiupel por categorias de classificacão de intensidade (consistente e fraca) e de Grau (baixo e alto) para casos de MCCs. Uma análise de regressão logística multinomial verificou que a intensidade de marcação por CD123 foi positivamente relacionada com o alto Grau de Kiupel ($X^2(1) = 18,054$; $p < 0,001$)..... | 43 |
| Figura 19. Padrão de imunodeteccão do c-Kit baseado em sistemas de polímero de uma e duas etapas. A. MCC baixo grau, coloraçãõ H.E, obj.40 B. Mesma amostra com forte marcação membranosa, padrão Kit I, IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40. C. Mesma amostra com intensa marcação membranosa e citoplasmática difusa que pode ser interpretada como padrão KIT III, IHQ com polímero em reação de duas etapas, c-Kit policlonal, obj.40. D. MCC alto grau, coloraçãõ H.E, obj.40 E. Mesma amostra com marcação citoplasmática focal, padrão Kit II, IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40.F. Mesma amostra com intensa marcação citoplasmática difusa, com foco de marcação mais intensa, que pode ser interpretada como padrão KIT III, IHQ com polímero em reação de duas etapas, c-Kit policlonal, obj.40. G. MCC alto grau, coloraçãõ H.E, obj.40 H. Mesma amostra com forte marcação citoplasmática difusa, padrão Kit III, IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40. I. Mesma amostra com marcação citoplasmática difusa mais intensa, padrão KIT III, IHQ com polímero em reação de duas etapas, c-Kit policlonal, obj.40..... | 47 |

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

| | |
|------------------|--|
| AgNOR | Regiões argirofílicas organizadoras nucleolares. |
| CD123 | Cadeia alfa do receptor de interleucina 3. |
| c-KIT | Proto-oncogene que codifica a uma proteína tirosina quinase receptora transmembrana conhecida como KIT. |
| CM | Contagem mitótica. |
| DIT | Duplicação interna em tandem. |
| DITs | Duplicações internas em tandem. |
| FCCT | Fator de crescimento de células tronco. |
| FEC-GM | Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos. |
| Foxp3 | Regulador transcricional mestre para células T reguladoras. |
| GISTs | Tumor estromal gastrointestinal. |
| IF | Imunofluorescência. |
| IFN γ | Interferon gama. |
| IFN α | Interferon alfa. |
| Ig | Imunoglobulina |
| IHQ | Imuno-histoquímica. |
| IL-3 | Interleucina 3. |
| IL-3R | Receptor de interleucina 3. |
| IL-4R α | Cadeia alfa do receptor de interleucina 4. |
| IL-5 | Interleucina 5. |
| IM | Índice mitótico. |
| JAK | Janus Kinase quinase. |
| Ki67 | Proteína codificada pelo gene MKI67, expressa em todas as fases do ciclo celular. |
| KIT/CD117/KITr | Receptor transmembrana ligante de fatores de crescimento de células tronco/fator de crescimento de mastócitos. |
| LMA | Leucemia mieloide aguda |
| LSAB | Estreptavidina-Biotina Marcada (geralmente com Peroxidase) |
| MCC | Mastocitoma cutâneo canino. |
| MCCs | Mastocitomas cutâneos caninos. |
| P.A. | Para Análise |
| PCNA | Antígeno nuclear de células em proliferação. |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase. |
| RNA _m | Ácido Ribonucleico Mensageiro |
| SARS-CoV-2 | Síndrome respiratória aguda grave associada ao Coronavírus 2. |
| SK | Sistema Kiupel. |
| SP | Sistema Patnaik. |
| STATs | Transdutores de sinal e ativador da proteína de transcrição. |
| TNF | Fator de necrose tumoral. |
| α | Alfa. |
| κ | Kappa. |
| λ | Lambda. |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1 Mastocitoma Cutâneo Canino | 2 |
| 2.1.1 Aspectos gerais clínico-epidemiológicos | 2 |
| 2.1.2 Graduação histológica..... | 3 |
| 2.1.3 Imuno-histoquímica para KIT/CD117 | 6 |
| 2.1.4 Parâmetros de avaliação de proliferação celular em MCCs | 6 |
| 2.1.5 Mutações no c-KIT | 7 |
| 2.2 Interleucina 3 (IL-3) e Seu Receptor (IL-3R) | 8 |
| 2.2.1 Produção de IL-3 | 8 |
| 2.2.2 Funções e considerações gerais da IL-3..... | 8 |
| 2.2.3 IL3 e mastócitos | 10 |
| 2.2.4 Cadeia α do IL3-R (CD123)..... | 11 |
| 2.2.5 Expressão celular do CD123 | 11 |
| 2.2.6 CD123 e mastocitoses humanas..... | 12 |
| 2.3 CD123 Como Alvo Terapêutico | 13 |
| 2.3.1 Conjugado ligante-toxina..... | 13 |
| 2.3.2 Anticorpo monoclonal | 13 |
| 2.3.3 Conjugados anticorpo-droga | 13 |
| 2.3.4 Anticorpos biespecíficos | 14 |
| 2.3.5 Terapia com células T do receptor de antígeno quimérico CD123 (CARs-T)..... | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 Levantamento de Casos de MCCs | 15 |
| 3.2 Amostras Seleccionadas e Analisadas na Coloração de Hematoxina e Eosina (H.E.) . | 15 |
| 3.3 Seleção de Órgãos Diversos Para Pesquisa de Marcação do CD123 e Comparação com a Literatura. | 15 |
| 3.4 Controles Humanos Para o CD123 | 16 |
| 3.5 Neoplasias em Microarranjo de Tecidos (TMA) Para Investigação da Imunodeteção do CD123 | 16 |
| 3.6 Imuno-histoquímica | 16 |
| 3.6.1 Padronização da diluição do anticorpo anti-CD123..... | 17 |
| 3.6.2 Padronização da diluição do anticorpo anti-KIT (CD117)..... | 17 |
| 3.6.3 Teste do método de detecção do CD123 em amostras de cães..... | 17 |
| 3.6.4 Ensaio para imunodeteção do KIT (CD117) com dois sistemas de detecção distintos..... | 18 |
| 3.6.5 Técnica geral para CD123 e CD117 | 18 |
| 3.6.6 Controles positivo e negativo para reação do CD123 e KIT/CD117..... | 19 |
| 3.7 Interpretação das Amostras Após Reação de IHQ..... | 19 |
| 3.8 Análises de Dados | 19 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 4.1 Avaliação Comparada da Imunodeteção dos Anticorpos Anti-CD123 Monoclonal (6H6) e Policlonal em Controles de Tonsilas Palatinas Humanas Utilizando Métodos de Detecção Baseados em Polímero de Uma e Duas Etapas..... | 20 |
| 4.2 Imunodeteção do CD123 em Controles Linfoides (Tonsilas Palatinas e Linfonodos) Caninos..... | 23 |
| 4.3 Imunodeteção do CD123 em Órgãos Não Linfoides Caninos | 28 |
| 4.3.1 Imunodeteção do CD123 em amostras de neoplasias caninas em TMA..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.4 MCCs | 29 |
| 4.4.1 Aspectos gerais das amostras analisadas | 29 |
| 4.5 Imunomarcção dos MCCs | 39 |
| 4.5.1 CD123 | 39 |
| 4.5.2 KIT | 43 |
| 4.6 Diferenças de Resultados Obtidos nos Padrões do KIT por Métodos de Detecção Baseados em Polímero de Uma e Duas Etapas | 45 |
| 5. DISCUSSÃO | 47 |
| 5.1 Padronização e Imunodeteção do CD123 em Tecidos Caninos | 48 |
| 5.2 Imunodeteção do CD123 em MCCs de Baixo e Alto Grau | 52 |
| 5.3 Diferenças de Resultados Obtidos nos Padrões do KIT por Métodos de Detecção Baseados em Polímero de Uma e Duas Etapas | 53 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| ANEXOS | 66 |
| ANEXO A: imunomarcção do CD123 em diversos tecidos caninos | 67 |
| ANEXO B: imunomarcção do CD123 em plasmocitoma cutâneo, histiocitoma cutâneo e sarcoma histiocítico caninos | 69 |
| ANEXO C: padrão KIT I, marcação membranosa, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x | 70 |
| ANEXO D: padrão KIT II, marcação citoplasmática focal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x | 71 |
| ANEXO E: padrão KIT III, marcação citoplasmática difusa, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x | 72 |
| ANEXO F: padrão KIT dúbio classificado como III, marcação citoplasmática difusa de menor intensidade com forte intensidade de marcação citoplasmática focal sobreposta, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40 | 73 |
| ANEXO G: uma amostra de MCC de alto grau com padrão KIT I e negativo par CD123 policlonal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x | 74 |

1 INTRODUÇÃO

O mastocitoma cutâneo canino (MCC) é uma das neoplasias potencialmente malignas mais frequentes na clínica de cães e, ainda que haja muitos estudos voltados para essa neoplasia tão importante devido à sua frequência e comportamento biológico muitas vezes incerto, ainda não existe um método ou combinações de métodos diagnósticos/prognósticos capazes de prever com acurácia o comportamento de todos os casos, sobretudo daqueles mais frequentes, os mastocitomas graduados como Grau II Patnaik/Baixo Grau Kiupel nos sistemas de graduação mais utilizados.

Atualmente, dois métodos imuno-histoquímicos são considerados importantes para o painel prognóstico de MCCs, são eles: o padrão da imunodeteção do KIT, um receptor tirosinaquinase relacionado ao crescimento tumoral e o índice Ki67, um marcador indicador de células em ciclo celular. Esses marcadores prognósticos detectados através de imuno-histoquímica, estão alicerçados sobre estudos com metodologias distintas, com ponto crítico no método de contagem e índice de corte para o Ki67 e anticorpos diferentes, em concentrações diferentes utilizados em protocolos diferentes para o KIT, o que torna difícil o estabelecimento de um consenso sobre o melhor método em termos de confiabilidade e reprodutibilidade (De Nardi *et al.*, 2022).

Mais especificamente com relação ao biomarcador KIT, um ponto sensível relativo ao método de detecção dessa glicoproteína em estudos mais atuais e, possivelmente na rotina de laboratórios de diagnóstico, é a utilização de tecnologias de sistemas de detecção mais recentes e sensíveis, como o sistema de detecção baseado em polímero de duas etapas. Quando esse marcador foi padronizado e proposto como fator prognóstico, Kiupel e colaboradores (2004) e uma série de outros autores utilizaram um método de detecção menos utilizado atualmente, o LSAB (estreptavidina-biotina-peroxidase), possivelmente menos sensível que métodos baseados em polímeros amplamente utilizados na atualidade. Desse modo, a importância da detecção dessa proteína como fator prognóstico, não está na sua simples imunocoloração, muito menos na intensidade de marcação e sim, na sua distribuição nos compartimentos celulares, que por serem contínuos, podem ser sensíveis a sistemas de detecção que amplificam muito a reação, como polímeros com uso de proteínas amplificadoras (sistema de polímeros baseado em duas etapas).

Além do problema da variação de protocolos de imuno-histoquímica (IHQ) para fatores prognósticos de MCCs, é importante investigar a possibilidade de novos biomarcadores prognósticos para essas neoplasias tão frequentes, visto que nenhum marcador ou graduação histológica, pode prever com precisão o comportamento de todos os MCCs (Vascellari *et al.*, 2013; Sabbatini *et al.*, 2015), essa lacuna deve ser explorada.

Nesse sentido, a cadeia α do receptor de interleucina 3 (CD123) é um antígeno muito utilizado em pesquisas humanas que envolvem doenças autoimunes e sobretudo neoplasias linfomatópóieticas. Esse biomarcador é utilizado para diagnóstico dessas neoplasias, e alguns estudos demonstraram que ele pode ter fator prognóstico em neoplasias humanas, inclusive mastocitoses. Além disso, o CD123 vem sendo intensamente estudado como alvo terapêutico através de estudos pré-clínicos e clínicos com diversas classes de agentes tendo essa proteína como alvo. Por outro lado, esse anticorpo ainda não foi bem estudado na Medicina Veterinária, sequer há relatos de padronização ou de expressão em tecidos de cães ou de outras espécies de animais de companhia.

O objetivo desse estudo é avaliar a imunodeteção do CD123 em diversos tecidos normais e em neoplasias de cães, a partir de um anticorpo policlonal e um anticorpo monoclonal anti-CD123, comparar o padrão de imunomarcagem com controles humanos na tentativa de padronizar esse anticorpo para amostras caninas e verificar se esse antígeno é detectado em

MCCs, bem como se sua detecção e intensidade de marcação em MCCs está relacionada ao grau do tumor (gradação Kiupel). Além disso, esse estudo tem o objetivo de investigar se o sistema de detecção de IHQ baseado em polímero em duas etapas pode alterar o padrão de marcação do KIT em MCCs e, portanto, a sua interpretação como fator prognóstico complementar ao grau histológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastocitoma Cutâneo Canino

2.1.1 Aspectos gerais clínico-epidemiológicos

De acordo com um estudo realizado a partir de banco e registros de 27 hospitais universitários veterinários da América do Norte que envolveu uma amostra de 1.139.616 cães para pesquisa de frequência de neoplasias cutâneas, o mastocitoma cutâneo canino (MCC) foi a neoplasia potencialmente maligna mais comum (Villamil *et al.*, 2011). Desse modo, o MCC é uma neoplasia frequente e relevante em cães, visto que representa entre 7 a 21% de todas neoplasias cutâneas diagnosticadas na espécie, com maior prevalência em animais de 4 a 14 anos de idade e, diversas raças foram relatadas como pré-dispostas a desenvolverem essa neoplasia, o que sugere algum fator de predisposição genética como fator de risco para determinadas raças de cães (Mochizuki *et al.*, 2017).

Parece não haver predisposição sexual para o desenvolvimento de MCCs, a etiologia é desconhecida; foram propostas como possíveis etiologias/fator de risco a predisposição genética/racial (Mochizuki *et al.*, 2017; Villamil *et al.*, 2011), dermatites crônicas e mutações no gene c-KIT (London *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Reguera *et al.*, 2000; Downing *et al.*, 2002; Zemke *et al.*, 2002; Turin *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2006, 2007; Letard *et al.*, 2008).

A apresentação clínica mais frequente do MCC é um nódulo cutâneo solitário (London; Seguin, 2003; Sledge *et al.*, 2016). No entanto, sua apresentação clínica pode ser bastante variável, com tumores múltiplos na pele, de diversos aspectos, com variações no contorno, textura, tamanho, cor, cobertura pilosa, ulceração, edema e prurido (De Nardi *et al.*, 2022).

O quadro clínico e o curso dos MCCs são variáveis, desde lesões cutâneas alopecias de crescimento lento, até variantes agressivas de crescimento rápido, muitas vezes ulcerativas com metástases nodais regionais e/ou em órgãos viscerais e que, muito raramente, evoluem para leucemia (Weiss, 2006; Willmann *et al.*, 2021).

Os órgãos mais frequentemente afetados por metástases são linfonodos, pele, baço e fígado e menos comumente os pulmões. Com relação aos sítios mais comuns, cerca de 50% dos casos se desenvolvem no tronco, perineo e região inguinal, 40% nos membros e 10% na cabeça e pescoço (De Nardi *et al.*, 2022).

A variação do comportamento biológico dos MCCs é um constante desafio na rotina de Médicos Veterinários, sobretudo clínicos e oncologistas e, o principal guia para esses profissionais é a gradação histológica, que recomenda a utilização concomitante do sistema Patnaik (SP) e Sistema Kiupel (SK) (Berlato *et al.*, 2021), uma vez que os sistemas podem se complementar, pois é possível que o sistema Kiupel aprimore o prognóstico incerto dos MCCs grau II de Patnaik e, por outro lado, é possível que o sistema de Patnaik aprimore o prognóstico dos MCCs de alto grau de Kiupel (Kiupel *et al.*, 2011; Vascellari *et al.*, 2013).

O potencial de disseminação metastática dos MCCs varia conforme sua gradação histopatológica. Em MCCs bem diferenciados, a ocorrência de metástases é observada em menos de 10% dos casos, enquanto em neoplasias moderadamente diferenciadas, esse índice

varia entre 5% e 22%. Nos casos pouco diferenciados, a taxa de metástases varia de 55% a 95% (De Nardi *et al.*, 2022).

MCCs grau II Patnaik e baixo grau Kiupel representam a maioria das graduações de MCCs, com incidência entre 53,6 e 57,6%. Esses MCCs são considerados menos agressivos que os graus II/alto grau, com uma taxa de sobrevida de 94% em um ano, em comparação a 46% para o segundo grupo (Kiupel *et al.*, 2011; Sabattini *et al.*, 2015; Stefanello *et al.*, 2015; Berlato *et al.*, 2021; Bellamy; Berlato, 2022).

Nenhum sistema de graduação e/ou marcador pode prever com certeza o comportamento biológico dos MCCs, pois um subconjunto dessas neoplasias não se comporta como previsto e, marcadores prognósticos complementares são recomendados (Vascellari *et al.*, 2013; Stefanello *et al.*, 2015). Até mesmo a localização anatômica pode ter algum valor prognóstico, tendo em vista que MCCs que se originam no leito ungueal, focinho, região inguinal, prepúcio, períneo e junções mucocutâneas foram associados a um pior prognóstico (Welle *et al.*, 2008).

De modo geral, os fatores prognósticos para MCCs podem basear-se em quatro alicerces: 1 – características clínicas como estágio clínico, raça, local anatômico e história de recorrência; 2- graduação histológica; 3- avaliação imuno-histoquímica do índice de marcação do Ki67 e do padrão de expressão do receptor transmembrana tirosina quinase/ receptor do fator de crescimento de mastócitos/células-tronco (KIT/CD117) e 4- características moleculares de mutações no proto-oncogene c-Kit (Horta *et al.*, 2018).

A contagem mitótica (CM) >5 ou < que 5 se mostrou como fator prognóstico independente de outros fatores prognósticos, entretanto, a contagem é bastante susceptível a variação inter e intraobservador (Romansik *et al.*, 2007). Mutações com duplicação interna em tandem (DIT) no éxon 11 do c-Kit em MCCs estão relacionadas a um pior prognóstico, por outro lado, DIT no éxon 8 do c-Kit podem estar associadas a maior sobrevida (Brocks *et al.*, 2021).

2.1.2 Graduação histológica

Apesar da elevada incidência como um dos tumores mais frequentes em cães, o prognóstico dos MCCs ainda é centro de muitas investigações, visto que essa neoplasia possui comportamento biológico variável e os sistemas de graduação propostos não são completamente sensíveis para detecção de MCCs agressivos (Patnaik *et al.*, 1984; Kiupel *et al.*, 2011).

Um estudo realizado na Universidade de Cambridge, Reino Unido, propôs a graduação histológica de MCCs em três níveis: 1 (pouco diferenciado), 2 (diferenciação intermediária) e 3 (bem diferenciado). Essa graduação foi elaborada a partir do acompanhamento clínico de 114 cães com MCCs e demonstrou que a taxa de sobrevivência dos cães com grau mais baixo (Grau 3) foi seis e duas vezes maior que a dos cães com grau mais alto (Grau 1) e intermediário (Grau 2), respectivamente. Os critérios histológicos desse estudo não são objetivos (Quadro 1) e o autor descreveu dificuldade em diferenciar a classificação em alguns casos, em particular entre MCCs graus 2 e 3 (Bostock, 1973) que são correspondentes às classes mais representativas para prognóstico baseado em graduação até a atualidade de Patnaik e colaboradores (1984). Esse sistema de classificação, além de critérios subjetivos é confuso quanto ao escore de graduação, que é o inverso do padrão utilizado nos sistemas usuais, onde o Grau I deveria corresponder a neoplasias mais bem diferenciadas.

Quadro 1. Resumo da graduação histológica de MCCs proposta por Bostock (1973).

| Grau Histológico | Características |
|--|--|
| III Bem diferenciado | Limite citoplasmático bem definido, núcleo esférico, proporção núcleo:citoplasma inferior a 0,55; rariíssimas figuras de mitose, baixo pleomorfismo e menor quantidade de células por unidade de área. |
| II Moderadamente diferenciado | Células com citoplasma indistinto, proporção núcleo:citoplasma entre 0,55 e 0,7; baixa frequência de figuras mitóticas, pleomorfismo celular frequente, núcleo tende a ser irregular, mas menos basofílico que grau 1. |
| I Pouco diferenciado | Alta celularidade, limites citoplasmáticos indistintos, núcleo basofílico, contorno nuclear irregular, proporção núcleo:citoplasma 0,7 ou maior, presença de figuras mitóticas, alto grau de pleomorfismo celular, eventualmente presença de células gigantes multinucleadas e presença de inclusão intranuclear eosinofílica. |

O estudo para o SP foi baseado no acompanhamento clínico de 83 cães e assim como Bostock (1973), também foi proposto um sistema de graduação em três níveis, porém com uma lógica de correlação ente grau/diferenciação mais condizente com a atualidade: Grau 1 (bem diferenciado), grau 2 (moderadamente diferenciado) e grau 3 (pouco diferenciado). Os critérios histológicos que foram levados em consideração para o SP são abrangentes, e envolve a morfologia, densidade, distribuição celular/tecidual, contagem de mitoses e modificações no estroma, deste modo os critérios de graduação anteriores ainda possuíam lacunas de subjetividade (Quadro 2). Na pesquisa que estabeleceu esse sistema, 30/83 (36%) dos casos foram classificados como grau I, 36/83 (43%) como grau II e 17/83 (20%) como grau III e o grau histológico apresentou correlação significativa com o tempo de sobrevivência dos animais, sobretudo os graus I e III (Patnaik *et al.*, 1984).

Quadro 2. Resumo da graduação histológica de MCC proposta por Patnaik e colaboradores (1984).

| Graduação | Características |
|------------------|--|
| Grau I | Células neoplásicas bem diferenciadas, separadas por fibras colágenas, arranjadas em fileiras ou pequenos grupos confinados à derme e espaços interfoliculares, baixo pleomorfismo, citoplasma amplo, limites citoplasmáticos distintos e grânulos intracitoplasmáticos de tamanho médio, núcleos redondos com cromatina condensada, ausência de figuras mitóticas. Necrose e edema mínimos. |
| Grau II | Celularidade moderada a alta, organizada em grupos que infiltram a derme profunda e subcutâneo, podendo alcançar tecidos mais profundos; o estroma fibrovascular é fino com áreas de hialinização de fibras colágenas, edema e necrose; pleomorfismo moderado com esparsas células gigantes ou fusiformes, maioria das células com limites citoplasmáticos distintos com fina granulação, algumas células podem apresentar grânulos grandes e hiper cromáticos. Núcleos esféricos a indentados com cromatina esparsa e nucléolo único, ocasionalmente duplo. Raras mitoses, variando de 0 a 2 por campo de grande aumento. |
| Grau III | Celularidade alta que se estende ao subcutâneo e tecidos profundos. Pleomorfismo com células redondas, ovoides ou fusiformes arranjadas em pacotes. Citoplasma de limites indistintos com granulação fina ou dificilmente visível. Núcleos vesiculares de contorno irregular a redondos com um ou mais nucléolos. Células binucleadas são frequentes, muitas células multinucleadas e gigantes dispersas. Figuras de mitose de 3 a 6 por campo de grande aumento. Edema, hemorragia e necrose são frequentes. |

Kiupel e colaboradores (2011) demonstraram a elevada variação interobservador para graduação de MCCs no SP devido a critérios com pontos de cortes pouco objetivos. Associado à variância interobservador naquele modelo, outro problema apontado pelo sistema de graduação em três níveis foi o baixo valor preditivo para o comportamento dos MCCs grau II, uma vez que na prática, a maior parte dos casos de MCCs são graduados nesse nível no SP e,

estimou-se que casos de MCC grau II possuem 56% de chances de menor sobrevida e 44% de maior sobrevida, que demonstra o baixo valor prognóstico desse grau, que representa a maioria dos casos (Patnaik *et al.*, 1984; Kiupel *et al.*, 2011).

Para solucionar a variação interobservador e a incerteza prognóstica do grau II do SP, Kiupel e colaboradores (2011) propuseram um sistema de graduação em dois níveis, o sistema Kiupel (SK) com critérios objetivos (Quadro 3). Nesse sistema, a taxa de sobrevida média foi inferior a 4 meses para MCC de alto grau e superior a 2 anos para MCC de baixo grau.

Quadro 3. Resumo da graduação histológica de MCCs proposta por Kiupel e colaboradores (2011).

| Grau | Características |
|-------|--|
| Alto | Presença de qualquer um dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 7 figuras mitóticas em 10 campos de grande aumento; • ≥ 3 células multinucleadas (3 ou mais núcleos) em 10 campos de grande aumento; • ≥ 3 núcleos bizarros em 10 campos de grande aumento; • Cariomegalia (10% ou mais das células neoplásicas com núcleo ao menos 2x o diâmetro do normal) |
| Baixo | Ausência dos critérios para alto grau. |

Em estudo binacional com 137 MCCs oriundos de laboratórios do Reino Unido e da Itália, demonstrou-se que cerca de 60,6% das amostras são classificadas como grau II, e que não houve diferença estatística relevante entre MCCs grau I e II quanto à sobrevida dos animais. Por outro lado, esse mesmo estudo atestou que o sistema de classificação de MCCs em 2 níveis teve um alto valor prognóstico e foi capaz de prever corretamente o prognóstico desfavorável de alguns, mas não todos MCCs de grau II, desse modo, se reconhece que nenhuma graduação histológica pode prever o comportamento biológico de todos os MCCs e métodos complementares como avaliação da atividade proliferativa e pesquisa de mutação do c-Kit são recomendados para se obter um prognóstico mais preciso (Sabattini *et al.*, 2015).

Além das graduações histológicas para MCCs, um sistema com critérios de classificação de metástases nodais de MCCs foi proposto com intuito de estabelecer e padronizar o diagnóstico de metástase interobservador e possibilitar estudos prognósticos mais acurados envolvendo MCCs com metástases em linfonodos. O sistema proposto varia de HN0 – ausência de metástase a HN3 – metástase evidente. Os critérios de cada classe encontram-se discriminados no Quadro 4 (Weishaar *et al.*, 2014).

Quadro 4. Sistema de classificação para a avaliação microscópica de metástases linfonodais em casos de MCCs proposto por Weishaar e colaboradores (2014).

| Classificação | Critério Histopatológico | Interpretação |
|---------------|--|--------------------------|
| HN0 | Nenhum ou raros (0 a 3) mastócitos dispersos e individualizados (isolados) nos seios (subcapsulares, paracorticais ou medulares) e/ou parênquima por campo de maior aumento. | Não metastático |
| HN1 | Mais que três mastócitos individualizados (isolados) nos seios (subcapsulares, paracorticais ou medulares) e/ou parênquima em um mínimo de quatro campos de maior aumento. | Pré-metastático |
| HN2 | Aglomerados de mastócitos (≥ 3 células associadas) nos seios (subcapsulares, paracorticais ou medulares) e/ou no parênquima, ou camadas sinusoidais de mastócitos." | Metástase inicial |
| HN3 | Interrupção ou substituição da arquitetura nodal normal por focos discretos, nódulos, camadas ou massas evidentes compostas por mastócitos. | Metástase evidente/óbvia |

2.1.3 Imuno-histoquímica para KIT/CD117

O proto-oncogene c-Kit codifica um receptor transmembrana denominado KIT ou KITr que recebeu o cluster de diferenciação 117 (CD117); esse receptor pertence à família tirosina quinase e seu ligante é o fator de crescimento de células tronco, também denominado de fator de crescimento de mastócitos. Essa proteína transmembrana que atua como receptor de fator de crescimento é expressa constitutivamente em células tronco hematopoiéticas, mastócitos, linfócitos intraepiteliais, células germinativas, melanócitos, células de Cajal do trato gastrointestinal e está relacionada à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Sures *et al.*, 1992; Arber *et al.*, 1998; Gibson; Cooper, 2002).

Em humanos, a contraparte neoplásica de células normais que expressam constitutivamente o KIT, geralmente, também expressam essa proteína. Outras células não neoplásicas que expressam o KIT são epitélios em anexos da pele, mama e subconjuntos de neurônios cerebelares. A positividade do KIT foi relatada de forma variável em sarcomas, como angiossarcoma e sarcoma de Ewing em humanos. Além disso, o KIT é expresso em carcinomas pulmonares e outros carcinomas de pequenas células, carcinoma adenoide cístico, carcinoma cromóforo renal, tímico, alguns carcinomas de ovário e poucos de mama (Miettinen; Lasota, 2005).

Em cães, a expressão do KIT já foi demonstrada em mastócitos normais e neoplásicos (London *et al.*, 1996; Reguera *et al.*, 2000) e em tumores do estroma gastrointestinal (GISTs) (Frost *et al.*, 2003). Um estudo avaliou o padrão de distribuição do CD117 através de IHQ em diversas amostras de tecidos normais e neoplásicos de cães e gatos, dentre estes, 33 eram amostras de MCCs caninos, em que foram observados 3 padrões distintos de marcação: membranoso, citoplasmático focal/paranuclear e citoplasmático difuso. O método utilizado na reação de IHQ foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase. No mesmo estudo relatou-se como observação pessoal do autor, que o padrão paranuclear podia estar associado a um pior prognóstico (Morini *et al.*, 2004).

No intuito de melhorar a acurácia prognóstica de MCCs, um estudo com IHQ de 98 amostras de MCCs também utilizando o método estreptavidina-biotina-peroxidase identificou três padrões de marcação para o KIT: padrão I (membranoso); padrão II (citoplasmático focal) e padrão III (citoplasmático difuso). Essa investigação demonstrou que o padrão I não está associado à recorrência ou a diminuição no tempo de sobrevivência, mas que os padrões II e III estão associados a um aumento da taxa de recorrência e/ou a uma diminuição tempo de sobrevida (Kiupel *et al.*, 2004).

Com o objetivo investigar o significado prognóstico das mutações do c-KIT e sua associação à localização do KIT nos compartimentos celulares e os níveis de expressão do KIT em MCCs caninos, foram avaliadas 60 amostras de MCCs através de métodos moleculares (PCR), imunofluorescência (IF) e IHQ, esta última, através do método estreptavidina-biotina-peroxidase. O estudo constatou que MCCs com mutações no c-KIT foram significativamente associados a um pior prognóstico e com uma localização aberrante da proteína (padrão KIT II e III) porém, o nível de expressão do KIT, não teve correlação com a mutação do c-KIT, nem com localização aberrante da proteína. Nesse estudo, DIT no c-KIT foram encontradas em 15% dos casos examinados (Webster *et al.*, 2006).

2.1.4 Parâmetros de avaliação de proliferação celular em MCCs

Na Medicina Veterinária, os métodos mais comumente usados para avaliar a proliferação celular incluem imuno-histoquímica (IHQ) para antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e Ki67 e coloração histoquímica para região organizadora nucleolar argirofílica (AgNOR). O PCNA é a subunidade auxiliar da DNA polimerase delta e está envolvido em vários processos que ocorrem no núcleo, principalmente no reparo do DNA. Embora o PCNA tenha uma meia-vida longa e esteja envolvido em múltiplas funções nucleares, a expressão

máxima de PCNA é comumente observada na fase de síntese de DNA (fase S) do ciclo celular (é um indicador de índice de fase S). Por outro lado, o Ki67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, mas não é expressa em células não cíclicas. AgNORs são subestruturas nucleolares envolvidas na transcrição do RNA ribossômico. As AgNORs podem ser identificadas em cortes histológicos como focos nucleolares pretos discretos com um método de coloração à base de prata, devido à afinidade pela prata das proteínas associadas. Foi demonstrado que a quantidade de AgNORs por núcleo está correlacionada com a taxa de proliferação celular ou com o tempo de duplicação celular *in vitro* e com a taxa de crescimento tumoral *in vivo* (tempo de geração é diretamente inverso à sua quantidade) (Revisado por Webster *et al.*, 2007).

A contagem mitótica (CM) e o índice Ki67 são os dois parâmetros de proliferação mais investigados em MCCs (Cino *et al.*, 2023); a primeira, refere-se à contagem de figuras mitóticas em lâminas histológicas convencionais em uma área de 2,37 mm² (Meuten; Moore; George, 2016), e o índice mitótico (IM) é obtido através de IHQ para detecção do antígeno Ki67 que é expresso no núcleo em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas não em células em G0, deste modo o índice mitótico é um marcador para determinar a fração de crescimento de uma determinada população celular (Scholzen, Gerdes, 2000).

Um estudo com metodologia molecular e IHQ, confirmou que a CM e o índice Ki67 possuem valor prognóstico para MCCs; nesse estudo, uma CM >5 estava associada à menor sobrevida e maiores taxas de mortalidade do que uma CM ≤ 5 e, cães com MCCs com índice Ki67 ≥ 10,6 (média de células positivas a cada 100 células, numa contagem total de 500 células), tiveram uma probabilidade 8 vezes maior de óbito em 12 meses. Entretanto, essa pesquisa reforçou que nenhum marcador pode prever com precisão o comportamento biológico dos MCCs e discute o significado figurativo/simbólico do prognóstico de MCCs baseado na expressão da proteína Ki67, tendo em vista que há diferentes valores de corte propostos em diversos estudos, além de diferentes métodos para contar a fração de células positivas para Ki67 nos diferentes estudos. Além disso, não houve forte correlação entre a proteína Ki67 e a sua expressão gênica (mensurada em RNAm), bem como, não foi observada associação entre a expressão gênica do Ki67 e o sistema de classificação Patnaik e Kiupel; assim a avaliação da expressão gênica do Ki67 também não teve correlação prognóstica (Vascellari *et al.*, 2013).

Um estudo verificou o valor preditivo do Ki67 para o comportamento de MCCs em uma amostragem de 39 MCCs grau II/baixo grau com metástase nodal HN2 tratados apenas com excisão cirúrgica e constatou que nenhum dos casos apresentou recidiva ou metástase à distância; a mediana da CM nas amostras estudadas foi 1 (0-2) e do índice Ki67 foi 3,5 (0,7-14,3). Essa investigação relatou que a CM e o índice Ki67 não tiveram correlação significativa e que o índice Ki67 não teve valor prognóstico (Cino *et al.*, 2023).

Com intuito de avaliar o valor prognóstico para MCCs, foi investigado o uso de três marcadores indicadores de proliferação celular: Ki67, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e região organizadora nucleolar argirofílica (AgNOR) em 56 amostras de MCCs; este último método é histoquímico e não IHQ. O estudo revelou que um índice de Ki67 (> 23 células/área) e AgNOR (> 54) estavam associados a uma diminuição significativa da sobrevida e que a contagem de PCNA de maneira isolada não teve nenhum valor prognóstico. O estudo ressalta que o resultado da investigação da proliferação celular, baseado nesses métodos não é um fator prognóstico independente de outros fatores como grau histológico, mutações no c-KIT e localização aberrante do KIT (Webster *et al.*, 2007).

2.1.5 Mutações no c-KIT

A deficiência do KIT devido a mutações hereditárias leva à interrupção de funções dependentes desse receptor, como eritropoiese, pigmentação da pele, fertilidade e motilidade gastrointestinal. Por outro lado, a ativação patológica do KIT através de mutações de ganho de

função leva à neoplasia de tipos de células dependentes do KIT e positivas para KIT, pelo menos em três sistemas diferentes - hematopoiético: mastocitose, leucemia mieloide aguda; reprodutor/células germinativas: seminoma e tumores estromais gastrointestinais de células Cajal (GISTs) (Miettinen, Lasota, 2005).

O proto-oncogene *c-KIT* codifica o receptor tirosina quinase KIT que recebeu o número de cluster CD117 durante a quinta conferência internacional de tipagem de leucócitos em Boston em novembro de 1993 (Kitamura; Hirota, 2004). O KIT é um receptor de membrana com atividade tirosina quinase para fator de crescimento de células tronco (FCCT) também denominado como fator de crescimento de mastócitos, que estimula o crescimento de mastócitos. Em 1999, dois estudos descreveram a presença de mutações no *c-KIT* em MCTs caninos, após observação de um DIT. A proteína KIT é composta por um domínio extracelular (codificado pelos éxons 1–9), uma porção transmembrana (éxon 10), justamembrana (éxons 11 e 12), citoplasmática (éxon 13) e lóbulos de fosfotransferase (éxon 17). Mutações em domínios extracelulares são chamadas de mutações do tipo regulatório, enquanto mutações nos domínios intracelulares (éxons 13–21) são chamadas de mutações do tipo enzimático. Quando o FCCT se liga ao KIT, a porção citoplasmática do receptor sofre autofosforilação. Na presença de DIT no éxon 11, o receptor é fosforilado, independentemente de FCCT, ou seja, há uma auto-ativação, portanto, a presença dessa mutação é diretamente responsável pela proliferação descontrolada do tumor, que, neste caso, apresenta pior prognóstico (revisado por De Nardi *et al.*, 2022).

Mutações do KIT foram identificadas no domínio justamembrana, principalmente no éxon 11 e 12 e extracelulares (éxons 8 e 9), de MCCs e consistem em DITs e deleções (London *et al.*, 1999; Reguera; Ferrer; Rabanal, 2002; Webster *et al.*, 2006; 2007). Um estudo identificou DITs em 9% dos MCCs com base em uma amostragem de 88 casos selecionados aleatoriamente (Zemke *et al.*, 2002), entretanto outro estudo relata que essas mutações podem ocorrer de 30% a 50% de todos os MCCs de grau II a III (Downing *et al.*, 2002).

DITs localizadas no éxon 11 representam 60-74% de todas as mutações detectadas em MCCs e foram associados a um pior prognóstico (Zemke *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2007; Horta *et al.*, 2018; Tamlin *et al.*, 2020; Brocks *et al.*, 2021). Por outro lado, MCCs com DITs no éxon 8 estão associados a um prognóstico favorável segundo um estudo que investigou mutações do KIT em 221 amostras de MCCs. Essa pesquisa detectou DIT do éxon 11 em 45% das amostras e do éxon 8 em 33% das amostras e, nenhum dos animais com mutação detectada no éxon 8 morreu em decorrência do MCC, mas 23% dos animais com mutação no éxon 11 morreram devido a causa relacionada com o MCC; com base nesses resultados, os autores indicam que a triagem de mutações DIT no éxon 8 em MCCs pode ser útil para identificar casos menos agressivos e utilizada como um teste prognóstico complementar (Brocks *et al.*, 2021).

2.2 Interleucina 3 (IL-3) e Seu Receptor (IL-3R)

2.2.1 Produção de IL-3

A IL-3 é produzida por células T (Niemeyer *et al.*, 1989) e em menor extensão pelos mastócitos (Lorentz *et al.*, 2000), eosinófilos (Kita *et al.*, 1991) e células B ativadoras da resposta imune inata (Weber *et al.*, 2015), basófilos (Schroeder *et al.*, 2009), neurônios e células microgliais (Appel *et al.*, 1995; Gebicke-Haerter *et al.*, 1994). Recentemente, um estudo demonstrou a produção de IL-3 por um subconjunto de astrócitos no encéfalo de camundongos (McAlpine *et al.*, 2021).

2.2.2 Funções e considerações gerais da IL-3

A IL-3 é uma citocina pleiotrópica, regula a função e produção de células hematopoiéticas e imunológicas. Esta citocina foi originalmente denominada fator estimulador

de múltiplas colônias por sua propriedade de estimular o desenvolvimento de uma ampla gama de células hematopoiéticas, incluindo basófilos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células eritroides, megacariócitos e células dendríticas (Rothenberg *et al.*, 1988; Lantz *et al.*, 1998).

A IL-3 é um fator de crescimento hematopoiético, pertence à família das citocinas hematopoiéticas com 4 hélices α curtas onde também estão inclusos nesta família o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (FEC-GM) e a IL-5. Em humanos, todas as três citocinas ligam-se a subunidades α específicas correspondentes do seu receptor, mas a subunidade β é comum ao receptor destas três citocinas. A subunidade β do receptor é essencial para transdução de sinal na presença do ligante, através da via Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT) (Broughton *et al.*, 2012). Por outro lado, ratos tem dois genes intimamente relacionados homólogos ao do receptor β humano, sendo que um gene (AICA2) codifica a subunidade β do IL3-R e o outro gene (AIC2B) codifica a subunidade β compartilhada entre FEC-GM-R e IL-5R murinos (Gorman *et al.*, 1990; Itoh *et al.*, 1990; Yonehara *et al.*, 1990; Kitamura; Miyajima, 1992).

A IL-3 é uma citocina que tem sido implicada em doenças inflamatórias e autoimunes (Mindur; Swirski, 2019). Ela induz a ativação e/ou aumenta a sobrevivência de várias células-alvo, inclusive mastócitos, basófilos, monócitos, células dendríticas, células B, células T e células endoteliais (Lantz *et al.*, 1998). A IL-3 modula positivamente a inflamação ao elevar a liberação de monócitos e neutrófilos da medula óssea e ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias por essas células. Ação antiapoptótica em vários leucócitos e ativação de células endoteliais com regulação positiva de E- e P-selectina também são efeitos que podem estar associados a IL-3 (Palacios *et al.*, 1984; Palacios; Garland, 1984; Elliott *et al.*, 1990; Lantz *et al.*, 1998; Kuribara *et al.*, 1999; Storozynsky *et al.*, 1999; Denzel *et al.*, 2008; Didichenko *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2015).

A IL-3 parece amplificar a inflamação aguda na sepse, alimentando a tempestade de citocinas; nesse cenário, nível elevado de IL-3 é um fator preditivo de morte (Weber *et al.*, 2015). Também foi demonstrado experimentalmente, que a IL-3 induz encefalite autoimune em camundongos, e promove a migração de leucócitos para o encéfalo (Renner *et al.*, 2016). Por outro lado, notou-se que a IL-3 está relacionada à redução da gravidade da artrite induzida por colágeno através da modulação do desenvolvimento de células T reguladoras Foxp3 (Srivastava *et al.*, 2011).

A IL-3 é crucial na imunidade antiviral e, no contexto atual, relatou-se que a IL-3 é um marcador prognóstico independente para casos de infecções graves por SARS-CoV-2, tendo em vista que níveis baixos de IL-3 no plasma estão associados ao aumento da gravidade da doença, bem como ao aumento da carga viral e da mortalidade em pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Bénard *et al.*, 2021).

Um experimento com infecção pulmonar induzida por Herpesvirus simplex 1 em camundongos tratados com IL-3 recombinante, demonstrou a diminuição da mortalidade, da carga viral e da perda de peso nos animais. Esse mesmo estudo verificou que houve uma correlação positiva entre níveis plasmáticos de IL-3 com interferon α (IFN α) e interferon gama (IFN λ) e que os níveis plasmáticos de IFN α correlacionaram-se com o número de células dendríticas plasmocitoides (CDPs) circulantes (Bénard *et al.*, 2021).

Outro estudo demonstrou que a IL-3 é produzida constitutivamente por subgrupos de astrócitos, e é essencial para a ativação da micróglia que eleva a expressão da cadeia α do IL3-R (CD123) para se tornar responsiva à IL-3 e mediar uma resposta imune aguda para desfazer agregados de proteína β amiloide e tau, o que faz melhorar o declínio cognitivo na Doença de Alzheimer (McAlpine *et al.*, 2021).

2.2.3 IL3 e mastócitos

A diferenciação e sobrevivência dos mastócitos murinos são essencialmente controladas por duas citocinas: o fator de células tronco/mastócitos ligante do KIT e a IL-3 (Eklund *et al.*, 1994). Embora a falta do KIT resulte em deficiência de mastócitos murinos *in vivo*, a IL-3 não é necessária para a homeostase dos mastócitos, entretanto, em camundongos deficientes em IL-3 os mastócitos não conseguem proliferar após estímulos patogênicos (Lantz *et al.*, 1998).

A IL-3 é capaz de induzir *in vitro* a diferenciação de células tronco murinas obtidas da medula óssea em mastócitos e monócitos; essa citocina foi capaz de induzir a produção de fator de necrose tumoral (TNF) em monócitos, mas não em mastócitos e, parece haver uma ação sinérgica entre TNF e IL-3 para o estímulo de sobrevivência de mastócitos humanos e murinos *in vitro*, uma vez que a sobrevivência dos mastócitos foi drasticamente comprometida com a retirada do TNF do meio de cultivo (Wright *et al.*, 2006).

Tanto o fator de células tronco ligante do KIT quanto a IL-3 ativam JAK2, um membro da família JAK, composta por quatro membros (JAK1 a 3 e Tyk2). O estímulo do fator de células tronco ligante do KIT resulta na ativação a jusante de STAT5 e STAT6, já a IL-3 a ativa preferencialmente STAT3 e STAT5. Recentemente foi relatado o papel da IL-3 como indutora *in vitro* da expressão do IL-4R α (CD124) em mastócitos de ratos que se tornam suscetíveis à ação moduladora da IL-4 para produção de IL-6 e IL-13 na presença da IL-33 (Drube *et al.*, 2023).

“Nos mamíferos, a via JAK/STAT é o principal mecanismo de sinalização para uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento. A ativação de JAK estimula a proliferação celular, diferenciação, migração celular e apoptose. A ativação de JAK é mediada pela interação do ligante ao receptor e, uma vez ativado, a JAK subsequentemente fosforila alvos adicionais, incluindo tanto os receptores quanto os principais substratos, STATs. STATs são fatores de transcrição latentes que residem no citoplasma até serem ativados. Os sete STATs de mamíferos possuem um resíduo de tirosina conservado próximo ao terminal C que é fosforilado por JAKs. Esta fosfotirosina permite a dimerização de STATs através da interação com um domínio SH2 conservado. Os STATs fosforilados entram no núcleo por um mecanismo que depende da importação de α -5 (também chamada de interator de nucleoproteína 1) e da via de importação nuclear Ran-GTP. Uma vez no núcleo, os STATs dimerizados ligam-se a sequências reguladoras específicas para ativar ou reprimir a transcrição de genes alvo. Assim, a cascata JAK/STAT fornece um mecanismo direto para traduzir um sinal extracelular em uma resposta transcricional.” (Revisado por Rawlings *et al.*, 2004).

“Após a ligação de IL-3 ao CD123, a heterodimerização de IL-3R promove ligação de alta afinidade e montagem estável do complexo IL-3/IL-3R, que leva à ativação de Janus quinase (JAK)/transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT)” (Patnaik *et al.*, 2021) (Figura 1).

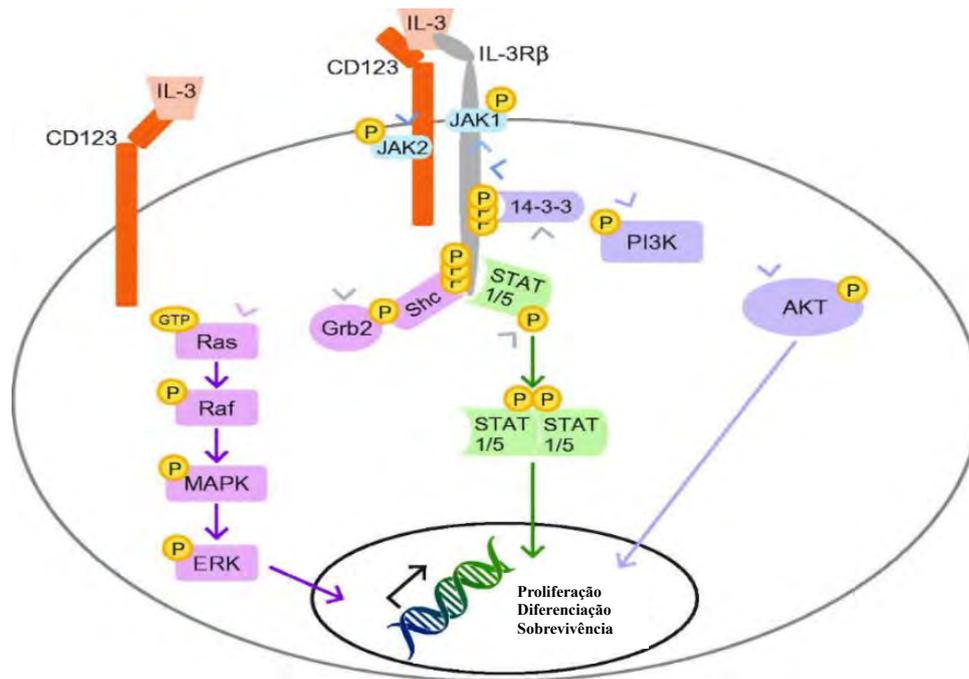


Figura 1. Vias de sinalização do sistema IL-3R adaptado de Patnaik e colaboradores (2021). IL-3: interleucina 3; IL-3R: receptor de interleucina 3; JAK: Janus quinase; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; P: fosfato; PI3K: fosfoinositol 3-quinase; GTP: guanosina-5'-trifosfato; Shc: proteína transformadora contendo domínio de homologia 2 de Src; Grb2: proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento; STAT: transdutores de sinal e ativadores de transcrição. AKT: proteína quinase B; ERK: quinases reguladas por sinal extracelular; Dados de Martinez-Moczygemba e Huston (2003).

2.2.4 Cadeia α do IL3-R (CD123)

A cadeia α do receptor de interleucina 3 (CD123) compõe parte do receptor de IL3 (IL3-R) (Moretti *et al.*, 2001). O IL3-R é um heterodímero constituído de uma cadeia α específica e de baixa afinidade (CD123) e uma cadeia β (CD131) que é comum ao receptor de interleucina 5 (IL5-R) e ao receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos em humanos (FEC-GM-R) (Miyajima *et al.*, 1993).

A ligação a um receptor de superfície celular (IL-3R) é o evento inicial na expressão da atividade proliferativa da IL-3 numa célula alvo (Tavernier *et al.*, 1991). A IL-3 liga-se ao CD123 com baixa afinidade e não tem afinidade detectável para CD131 na ausência do CD123; a ligação de alta afinidade requer a presença de ambas as cadeias. Após a formação do complexo IL-3/IL-3R de elevada afinidade, a transdução de sinal é mediada pela cadeia β (CD131) (Klein *et al.*, 1997).

2.2.5 Expressão celular do CD123

Um estudo verificou através de citometria de fluxo que existem três subconjuntos de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ definidos pelos níveis de CD123, a partir de amostras humanas obtidas de fígado e medula óssea fetal, sangue de cordão umbilical, sangue e medula óssea de adultos. Essa pesquisa concluiu que altos níveis de CD123 foram expressos em progenitores linfoides B e mieloides; os progenitores eritroides iniciais tinham pouco ou nenhum CD123 de superfície e os progenitores hematopoiéticos primitivos tiveram como característica a não expressão ou baixa expressão de CD123 (Huang *et al.*, 1999).

Estudo *in vitro* com cultivo de células tronco hematopoiéticas demonstrou evidências de que o CD123 é expresso na maioria dos progenitores CD34⁺ e sua expressão é rapidamente

perdida durante a diferenciação eritroide e megacariocítica, moderadamente diminuída durante a diferenciação monocítica, mas é sustentada na linhagem granulocítica (Testa *et al.*, 1996).

O CD123 foi de fundamental importância para a identificação e o estudo de uma linhagem distinta de célula dendrítica, a célula dendrítica plasmocitoide (CDP), que foi identificada em áreas timo dependentes de órgãos humanos, devido à sua característica de superexpressão de CD123 (Olweus *et al.*, 1997). Foi demonstrado que as células dendríticas plasmocitoides humanas e de camundongos correspondem a uma população celular especializada que produz grandes quantidades de interferons tipo I em resposta a infecções virais (Colonna *et al.*, 2004).

Em 2017 um estudo que utilizou transcriptômica em citometria por tempo de voo (“Cytometry by time of flight, or CyTOF”) revelou a ocorrência de um processo contínuo de diferenciação que começa na medula óssea a partir de um precursor comum de células dendríticas que diverge no ponto de emergência do potencial pré-célula dendrítica comum e célula dendrítica plasmocitoide, entretanto subconjuntos de precursores comprometidos com a linhagem de células dendríticas comuns expressam CD123 (See *et al.*, 2017).

O CD123 continua sendo utilizado como marcador para células dendríticas plasmocitoides e suas transformações malignas, porém a classificação e ontogenia dessas células parece permanecer incerta, e foi recentemente proposto que as CDP devem ser classificadas em um subcategoria de linfócitos inatos, pois são derivadas de progenitores linfóides comuns e não de progenitores mielóides e parecem compartilhar uma trajetória linfóide com as células B, além de não possuírem uma capacidade eficiente de apresentação de antígeno e migrarem essencialmente para os tecidos linfóides pelo sangue e não pela via linfática (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2023).

2.2.6 CD123 e mastocitoses humanas

O CD123 é expresso em uma variedade de neoplasias hematológicas humanas como a neoplasia de células dendríticas plasmocitóides blásticas, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crônica, linfoma de Hodgkin e leucemia de células cabeludas (Testa *et al.*, 2014) e em mastocitoses humanas (Pardani *et al.*, 2016).

Em seres humanos, usa-se o termo mastocitose para designar um grupo heterogêneo de doenças mastocitárias que podem ser primárias de pele ou não. A mastocitose é uma neoplasia hematológica caracterizada pela expansão e acúmulo focal de mastócitos neoplásicos em diversos órgãos, inclusive pele, medula óssea, baço, fígado e trato gastrointestinal. A classificação da Organização Mundial da Saúde divide a doença em variantes prognosticamente distintas de mastocitose cutânea e mastocitose sistêmica (Valent *et al.*, 2021).

Estão inclusos no escopo das mastocitoses: urticária pigmentosa, mastocitose cutânea, mastocitose cutânea difusa e eritrodérmica, telangiectasia macularis eruptiva perstans, mastocitoma cutâneo, mastocitoma extracutâneo, mastocitose sistêmica indolente, mastocitose sistêmica com distúrbio hematológico clonal associado, mastocitose sistêmica agressiva, leucemia de mastócitos e sarcoma de mastócitos (Rosai, 2011).

Um estudo avaliou a detecção do CD123 em 58 casos de mastocitoses sistêmicas, subclassificadas em 23 casos de mastocitose sistêmica indolente, 10 casos de mastocitose sistêmica agressiva, 23 casos de mastocitose sistêmica com neoplasia hematológica associada e 2 casos com leucemia mastocitária. O CD123 foi detectado em 37 (64%) dos casos e as taxas de expressão foram de 100% das mastocitoses sistêmicas agressivas, 61% das mastocitoses sistêmicas indolentes, 57% nas mastocitoses sistêmicas com neoplasia hematológica associada e 0% nas leucemias mastocitárias. O estudo concluiu que a expressão de CD123 e sua intensidade de coloração tiveram valor prognóstico em pacientes com leucemia mielomonocítica crônica e mastocitose sistêmica não indolente e há possibilidade de um direcionamento terapêutico voltado para o CD123 nas mastocitoses sistêmicas, dada a sua

expressão ausente em mastócitos normais/reactivos e expressão aberrante em mastócitos neoplásicos (Pardanani *et al.*, 2016).

Em humanos, há relativamente poucos casos relatados de sarcoma de mastócitos, pois é uma forma extremamente rara de mastocitose caracterizada por crescimento invasivo de mastócitos malignos e potencial metastático. Os sítios mais comuns para sarcoma mastocitário são ossos e trato digestivo. Um estudo com relatos de 10 casos próprios de sarcoma de mastócito, associado a casos de revisão de literatura, demonstrou uma estimativa de imunodeteção do CD123 em 50% dos casos (Matsumoto *et al.*, 2022).

2.3 CD123 Como Alvo Terapêutico

O CD123 é superexpresso em múltiplas neoplasias hematolinfoides, inclusive leucemia mieloide aguda, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia de células pilosas e mastocitose sistêmica (El chiA *et al.*, 2020). Dada a expressão mais elevada em células leucêmicas, em comparação com as suas contrapartes normais e a sua expressão baixa/ausente em células tronco hematopoiéticas, essa proteína é um potencial alvo terapêutico promissor, por isso, o aumento da compreensão da expressão do CD123 no câncer e seu papel no desenvolvimento e/ou manutenção da doença é essencial para fornecer uma estratégia potencial para o tratamento de pacientes em potencial (Patnaik *et al.*, 2021). Atualmente diversos ensaios clínicos estão em andamento com diferentes agentes terapêuticos voltados para o CD123 em pacientes com neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas e leucemia mieloide aguda (Pelosi *et al.*, 2023).

2.3.1 Conjugado ligante-toxina

O Tagraxofusp (Elzonris®) foi aprovado para o tratamento de neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas em adultos e pacientes pediátricos a partir de 2 anos de idade. Tagraxofusp é uma proteína de fusão recombinante que consiste em IL3 fundida com uma carga de toxina diftérica truncada/incompleta. Esse composto se liga ao receptor de IL3, que consiste numa cadeia α (CD123) e numa cadeia β (CD1231) e ao ser internalizado catalisa a ribosilação de ADP de um resíduo de histidina modificado, denominado diftamida, no fator de alongamento 2. O fator de alongamento 2 ribosilado com ADP inibe a síntese protéica, o que causa a morte celular. Algumas células podem ser resistentes a esse medicamento, não pela ausência de expressão do receptor de IL3, mas devido ao silenciamento dos genes de síntese da diftamida mediado pela metilação do DNA, o que impede a ação da toxina truncada (Luskin; Lane, 2023).

2.3.2 Anticorpo monoclonal

O CSL362 (talacotuzumab), um anticorpo monoclonal humanizado neutralizante (clone 7G3) anti-CD123, e manipulado ao nível do domínio Fc para potencializar a sua capacidade de indução de citotoxicidade contra células de leucemia mieloide aguda, chegou a ser testado em alguns estudos de ensaio clínico de nível I em pacientes com LMA. No entanto, após resultados que não demonstraram benefícios significativos, o programa de desenvolvimento clínico do talacotuzumab foi descontinuado pela Johnson and Johnson Company, New Brunswick, New Jersey, EUA (revisado por Pelosi *et al.*, 2023).

2.3.3 Conjugados anticorpo-droga

O IMGMN632 é um anticorpo monoclonal de alta afinidade ao CD123 conjugado a uma nova classe de alquilante de DNA que mostrou boa efetividade citotóxica *in vitro* em linhagens celulares de LMA sem efeito negativo em progenitores mieloides normais na dosagem testada e, em estudos clínicos de fase I em uma amostragem de 67 pacientes com LMA refratária/recidivante, 20% obtiveram remissão completa com recuperação de contagem

incompleta. Outro estudo clínico de fase I com uma amostra de 23 pacientes com neoplasia de células dentríticas plasmocitoides blásticas obteve como resultado 22% de remissão completa com recuperação de contagem incompleta e 8% de remissão parcial (revisado por Pelosi *et al.*, 2023).

2.3.4 Anticorpos biespecíficos

O anticorpo biespecífico liga-se a um antígeno específico do tumor e, a receptores de células imunes como CD3, CD16, CD64 e CD89, com o objetivo de estimular respostas imunes celulares contra células tumorais. Estudos iniciais relataram a geração de anticorpos biespecíficos com especificidades para o domínio extracelular do CD3 e para o domínio N-extracelular do CD123. Os anticorpos induziram a ativação *in vitro* e *in vivo* de linfócitos T e a morte de blastos leucêmicos CD123⁺ (Al Hussaini *et al.*, 2013)

O MGD 066 (flotetuzumabe) desenvolvido pela MacroGenics (Rockville, MD, EUA) é uma proteína com redirecionamento de dupla afinidade CD3xCD123, composta por CD123Fv anti-humano e CD3 anti-humano de camundongo humanizado; esta molécula exerceu uma potente atividade antileucêmica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Al-Hussaini *et al.*, 2016). Estudo clínico de fase I com 30 pacientes com LMA refratária/recidivante, obteve evidências de atividade antileucêmica em 67% dos pacientes, com 19% de respostas completas (31% entre pacientes com doença refratária, mas 0% em pacientes com doença recidivante) (Uy *et al.*, 2018). No estudo de fase I e II com 88 pacientes com LMA refratária/recidivante tratados com flotetuzumabe, 26,7% apresentaram remissão completa, com recuperação hematológica parcial; a sobrevida global desses pacientes foi de 10,2 meses (Uy *et al.*, 2021). Estudos em andamento verificam a eficácia e segurança do flotetuzumabena LMA pediátrica (Lamble *et al.*, 2022).

O MGD024 também desenvolvido pela MacroGenics (Rockville, MD, EUA) é uma molécula DART CD123xCD3 com a porção Fc projetada para meia-vida circulante prolongada e disponibilidade intermitente, além disso a molécula possui uma mutação para promover redução de afinidade ao epítipo CD3, no intuito de diminuir a indução de liberação de citocinas em comparação com o flotetuzumabe. Em modelos pré-clínicos, MGD024 demonstrou-se potência reduzida *in vitro* e *in vivo* em comparação com flotetuzumad, entretanto em modelo animal de LMA a coadministração de MGD024 com citarabina ou venetoclax ou azacitidina demonstrou-se eliminação completa ou quase completa de células tumorais (Alderson *et al.*, 2021).

Diversos outros anticorpos monoclonais bifuncionais CD3-CD123 foram desenvolvidos e estão em avaliação em ensaios pré-clínicos ou clínicos para LMA, como o XmAb14045/vibecotamab (Ravandi *et al.*, 2020), APV0436 (Uckun *et al.*, 2021), JNJ-63709178 (Boyiadzis *et al.*, 2023), IGM-2537(Liu *et al.*, 2022) e também um anticorpo trifuncional, CD123 - CD16a e NKp46 (células NK) – com nome/código do produto em teste SAR443579 (Stein *et al.*, 2022; Kang *et al.*, 2023).

2.3.5 Terapia com células T do receptor de antígeno quimérico CD123 (CARs-T)

As células T do receptor de antígeno quimérico (CARs) são células geneticamente modificadas para expressarem receptores a antígenos alvo específicos expressos na superfície de células neoplásicas. As células CAR-T possuem capacidade de reconhecer antígenos tumorais específicos e induzir citotoxicidade contra células malignas, com base na expressão de tais antígenos (Wei *et al.*, 2022). Estudos com diversas gerações de células CAR-T com alvo em malignidades humanas que expressam o CD123 foram realizados ou estão em fase de teste e parecem bastante promissores, sobretudo com métodos de última geração (Pelosi *et al.*, 2023).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Levantamento de Casos de MCCs

Foi realizado levantamento de laudos com resultados de MCCs no sistema de 3 laboratórios de patologia. A partir do arquivo de tecidos incluídos em blocos de parafina e lâminas histológicas desses laboratórios (Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/SAP-UFRRJ e de dois laboratórios privados de Patologia Veterinária do Rio de Janeiro), foram revisados e selecionados 63 casos de MCCs. Após revisão em lâminas coradas em H.E., as amostras foram graduadas de acordo com os critérios de Patnaik e colaboradores (1984) e Kiupel e colaboradores (2011); os critérios apontados para cada graduação foram registrados em planilha do Excel, assim como dados de raça, sexo, idade e local da lesão quando disponíveis nas requisições dos exames revisados.

3.2 Amostras Selecionadas e Analisadas na Coloração de Hematoxina e Eosina (H.E.)

Para coloração em H.E as amostras foram rotineiramente processadas: as seções de tecidos com 3µm obtidas em micrótomo manual foram armazenadas em estufa a 60°C por 2h, banhadas em duas cubas de xilol por 5 minutos cada, reidratadas em quatro banhos de álcool etílico P.A. (2 minutos em cada), coradas pela hematoxilina durante 5 minutos, lavadas em água corrente, coradas pela eosina por 1 minuto e 30 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas em quatro banhos de álcool etílico P.A. e posteriormente imersas em 2 banhos de xilol por 5 minutos cada, e montadas com lamínula em meio de montagem.

3.3 Seleção de Órgãos Diversos Para Pesquisa de Marcação do CD123 e Comparação com a Literatura.

No intuito de investigar a expressão do CD123 em tecidos de cães, foram selecionadas amostras de órgãos com registro de coleta com menos de 1 hora entre o óbito e a necropsia. As lâminas coradas em H.E. dos casos foram revisadas e foram selecionadas: 2 amostras de intestino delgado, 2 amostras de intestino grosso, 2 amostras de estômago (região do fundo), 2 amostras de fígado, 2 amostras de pulmão, 2 amostras de pâncreas, 2 amostras de rim, 2 amostras de cerebelo, 2 amostras de hipocampo e córtex cerebral, 2 amostras de tonsilas palatinas e uma amostra de adrenal. Além dessas amostras obtidas de necropsia, foram selecionados 2 espécimes de hiperplasia lobular mamária e 2 de linfonodos obtidos da rotina de encaminhamento de biópsias. Todos esses espécimes pertenciam ao arquivo de blocos de tecidos incluídos em parafina do SAP-UFRRJ (Quadro 5).

Quadro 5. Órgãos selecionados para análise da imunodeteção do CD123 e respectivos registros das amostras.

| Órgão | ID da amostra |
|------------------------------------|---------------|
| Intestino delgado | 40503j |
| Intestino delgado | 37732d |
| Intestino grosso | 40503j |
| Intestino grosso | 37732d |
| Estômago (fundo) | 40503j |
| Estômago (fundo) | 37732d |
| Pâncreas | 40503j |
| Pâncreas | 41097d |
| Rim | 40503g |
| Rim | 37732b |
| Fígado | 40503g |
| Fígado | 37732b |
| Pulmão | 41097g |
| Pulmão | 37732 |
| Linfonodo | 39222 |
| Linfonodo | 37198C |
| Tonsila palatina | 41097 |
| Tonsila palatina | * |
| Hipocampo e córtex | 37732r |
| Hipocampo e córtex | 41097m |
| Cerebelo | 37732r |
| Cerebelo | 41097m |
| Hiperplasia lobular mamária + pele | 40685C |
| Hiperplasia lobular mamária + pele | 40878A |
| Adrenal | 41097d |

3.4 Controles Humanos Para o CD123

O Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Central do Exército do RJ, cedeu ao SAP-UFRRJ, amostras de tonsilas palatinas hiperplásicas, incluídas em blocos de parafina (Quadro 6). Essas amostras foram utilizadas como controle positivo do CD123 e para comparação da imunomarcagem com os tecidos linfóides caninos.

Quadro 6. Amostras de tonsilas palatinas humanas e respectivo registro utilizadas como controle positivo para reação de IHQ com anticorpos anti-CD123 mono e policlonal.

| Órgão | ID |
|------------------|-----------|
| Tonsila palatina | 22-2252-3 |
| Tonsila palatina | 23-4851-3 |

3.5 Neoplasias em Microarranjo de Tecidos (TMA) Para Investigação da Imunodeteção do CD123

Com o intuito de investigar a detecção do CD123 em outras neoplasias, foi utilizado uma lâmina de TMA confeccionada para outro estudo, com amostras já caracterizadas morfológicamente e imunofenotipicamente com diversos antígenos (MUM1, CD79a, CD3, Iba1, cadeias leves λ e k de Ig), contendo cores de 2mm de 39 plasmocitomas cutâneos caninos, 25 histiocitomas cutâneos caninos, 2 sarcomas histiocíticos caninos e 1 mieloma múltiplo.

3.6 Imuno-histoquímica

3.6.1 Padronização da diluição do anticorpo anti-CD123

Inicialmente, foram estabelecidas as diluições ótimas para dois anticorpos anti-CD123 nas amostras de tonsilas palatinas humanas com 3 sistemas de detecção diferentes. Os anticorpos testados foram:

- I. CD123 Monoclonal (6H6) Ig de camundongo da eBioscience®, código 14-1239-82, lote 2661854.
- II. CD123 policlonal Ig de coelho da invitrogen®, código PA585146, lote YC3876241E.

Três sistemas de detecção foram testados com o CD123 monoclonal, e dois sistemas (I e III) foram testados com o CD123 policlonal devido à incompatibilidade do sistema II (EnVision Flex + Mouse Linker – Dako®) com anticorpos primários de coelho. Os sistemas testados foram:

- I. Novolink Polymer Detection System - Leica®, código RE7140-K, lote 6092682.
(duas etapas)
- II. EnVision Flex + Mouse Linker – Dako®, código K8002, lote 41522633.
(duas etapas)
- III. Envision+ Dual Link System-HRP – Dako®, código K4061, lote 11240666.
(uma etapa)

As diluições testadas para ambos os anticorpos e para os três sistemas de detecção nas tonsilas humanas variaram de 1:25 a 1:1000 (monoclonal) e 1:100 a 1:6000 (policlonal). A diluição ótima (marcação nítida sem reação de fundo) estabelecida para o CD123 monoclonal foi 1:400 no sistema de detecção I e II – métodos de duas etapas; ambos demonstraram a mesma qualidade de imunomarcção. Não houve marcação eficiente com o sistema III – método de uma etapa, nas diluições testadas para esse anticorpo, logo, todas as reações de IHQ com o CD123 monoclonal se basearam no método de duas etapas, sendo escolhido o Novolink Polymer Detection System - Leica® por maior praticidade na execução do trabalho manual.

Para o CD123 policlonal, a diluição ótima e utilizada nesse estudo foi de 1:500 e, apenas o sistema de detecção III (Envision+ Dual Link System-HRP – Dako®) proporcionou uma visibilidade adequada da reação devido à menor intensidade de marcação de fundo. Mas esse anticorpo apresentou reatividade em uma diluição de até 1:4000.

3.6.2 Padronização da diluição do anticorpo anti-KIT (CD117)

Em amostras de MCCs testou-se, em diluição seriada o anticorpo: anti-CD117/c-KIT policlonal Dako Ig de coelho, código A4502, lote 11253060, nas diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 e 1:1600. Houve imunomarcção aceitável no controle utilizado até 1:1000, porém a diluição ótima foi 1:300 utilizando-se o sistema de detecção em uma etapa Envision+ Dual Link System-HRP – Dako®, código K4061, lote 11240666. Nesse estudo, utilizamos uma diluição desse anticorpo de 1:250 em todas as amostras, um pouco abaixo da diluição ótima na padronização, no intuito de minimizar a possibilidade de casos falso negativos em amostras com eventual baixa expressão ou outros problemas relacionados ao tempo de fixação que podem comprometer epítomos alvo da proteína.

3.6.3 Teste do método de detecção do CD123 em amostras de cães

Para estabelecer o método empregado na investigação da imunodeteção do CD123 em amostras caninas, comparamos a imunomarcção com os anticorpos CD123 monoclonal e policlonal com as amostras de tonsilas humanas em 2 amostras de linfonodos e 2 amostras de tonsilas palatinas caninas. Não houve detecção do CD123 monoclonal (6H6) eBioscience® nas

amostras de cães, portanto o método elegido para o presente estudo em amostras caninas, foi o com CD123 policlonal invitrogen® com sistema de detecção em uma etapa Envision+ Dual Link System-HRP – Dako.

3.6.4 Ensaio para imunodeteção do KIT (CD117) com dois sistemas de detecção distintos

Para investigar se o padrão de imunomarcção do KIT/CD117 pode ser alterado de acordo com o método baseado em polímero (1 ou 2 etapas), na premissa de que o método de duas etapas utiliza um amplificador de reação intermediário, foram selecionados 6 casos de MCCs padrão KIT I, 4 casos de MCCs padrão KIT II e 4 casos de MCCs padrão KIT III estabelecidos previamente com sistema de detecção em uma etapa (de acordo com o item 3.6.1). Essas amostras foram testadas na diluição de 1:600 do mesmo anticorpo (CD117/c-KIT policlonal Dako Ig de coelho) com o sistema de detecção Novolink Polymer Detection System – Leica® - duas etapas e posteriormente comparadas com o resultado obtido através do método com o sistema de uma etapa Envision+ Dual Link System-HRP – Dako® a uma diluição do anticorpo primário de 1:250.

3.6.5 Técnica geral para CD123 e CD117

Os blocos de todas as amostras selecionadas foram seccionados em micrótomo a uma espessura de 4µm, pescados em lâminas silanizadas, identificadas com o registro da amostra e posteriormente armazenadas em estufa a 60°C por 4h. Em seguida, as lâminas passaram em banho de parafina para preservar a antigenicidade da amostra conforme a demanda da realização de IHQ para cada dia de execução do método.

As lâminas parafinadas utilizadas, eram colocadas em estufa a 60°C por 20 minutos para retirar o excesso da película de parafina; posteriormente seguiam para 3 banhos em xilol de 10 minutos cada e reidratadas em quatro banhos de 5 minutos em álcool etílico P.A. e mais um banho de 5 minutos em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada em banho maria a 96°C por 20 minutos em tampão High pH – (Tris/EDTA buffer, pH 9) Dako®, com descanso de mais 20 minutos das lâminas no tampão após retirada do banho maria. Seguiu-se a lavagem das lâminas em PBS e o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e os cortes circulados com caneta hidrofóbica Dako-pen®. Seguiu-se a lavagem das lâminas com Wash Buffer – Dako® e o bloqueio de reações inespecíficas com Protein Block Novolink® – Leica por 10 minutos. As lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS e incubadas overnight em câmara úmida a 4°C por 14 horas com os anticorpos primários nas diluições de teste e, posteriormente nas diluições selecionadas: CD123 (6H6) 1:150, CD123 policlonal 1:500, c-KIT/CD117 1:250 (método de uma etapa - Envision+ Dual Link System-HRP – Dako®) e a 1:600 (método de duas etapas Novolink Polymer Detection System - Leica®).

Após a incubação seguiu-se a lavagem das lâminas por 2 vezes durante 10 minutos em tampão de lavagem Wash Buffer – Dako®, e a partir de então o método distinguiu-se para cada sistema de detecção:

Novolink Polymer Detection System - Leica®

- Incubação à temperatura ambiente com a solução Post Primary – Novolink Polymer Detection System - Leica® por 30 minutos.
- Duas lavagens de 10 minutos com Wash Buffer – Dako®
- Incubação à temperatura ambiente com a solução Novolink Polymer - Novolink Polymer Detection System - Leica® por 30 minutos.
- Duas lavagens de 10 minutos com Wash Buffer – Dako®.
- Incubação com cromógeno DAB+ Envision FLEX - Dako® a uma diluição de 1:20 por 5 minutos.

EnVision Flex + Mouse Linker – Dako®

- Incubação à temperatura ambiente com a solução Mouse (linker) por 15 minutos.
- Duas lavagens de 10 minutos com Wash Buffer – Dako®.
- Incubação à temperatura ambiente com a solução EnVision FLEX/HRP por 30 minutos.
- Duas lavagens de 10 minutos com Wash Buffer – Dako®.
- Incubação com cromógeno DAB+ Envision FLEX - Dako® a uma diluição de 1:20 por 5 minutos.

Envision+ Dual Link System-HRP – Dako®

- Incubação à temperatura ambiente com a Dako EnVision+ Dual Link System-HRP por 40 minutos.
- Duas lavagens de 10 minutos com Wash Buffer – Dako®
- Incubação com cromógeno DAB+ Envision FLEX - Dako® a uma diluição de 1:20 por 5 minutos para o anticorpo anti-c-KIT e 1:50 por 2 minutos para o anticorpo anti-CD123 policlonal.

Após a última etapa de cada sistema de detecção seguiu-se a lavagem das lâminas em água corrente, coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, desidratação em passagem de 1 minuto em 4 banhos sucessivos em álcool P.A. e dois banhos de xilol para prosseguir com a montagem da lâmina e lamínula utilizando-se um meio de montagem.

3.6.6 Controles positivo e negativo para reação do CD123 e KIT/CD117

Como controle positivo para o CD123 foram utilizadas as tonsilas humanas; o padrão, intensidade e distribuição da imunomarcção obtida com o CD123 monoclonal e com o CD123 policlonal foram comparados nas tonsilas humanas. Do mesmo modo, o padrão da imunomarcção do CD123 policlonal nas tonsilas humanas foi comparado com o padrão de marcação nas tonsilas palatinas e nos linfonodos caninos. O controle positivo para o KIT foi uma amostra de MCC com imunomarcção prévia conhecida. O controle negativo para todos os marcadores foi feito omitindo-se o anticorpo primário da reação, ou seja, apenas controle negativo para o anticorpo secundário.

3.7 Interpretação das Amostras Após Reação de IHQ

Para consideração de imunopositividade para o CD123 nos MCCs, esse estudo se baseou em interpretações para esse marcador em neoplasias linfohematopoiéticas humanas; desse modo, foram consideradas positivas amostras com pelo menos 30% de células neoplásicas com citoplasma e/ou membrana citoplasmática virtualmente imunocoradas (Suzuki *et al.*, 2017) ou, ao menos 10% de células com elevada atipia com imunomarcção citoplasmática e/ou membranosa (Arai *et al.*, 2019).

Para interpretação do padrão de marcação do KIT/CD117 nos MCCs esse estudo baseou-se nos parâmetros da literatura veterinária (Kiupel *et al.*, 2004; Morini *et al.*, 2004).

3.8 Análises de Dados

Em modelos de regressão logística, a variável dependente pode apresentar-se em duas ou mais categorias; quando dicotômica, caracteriza-se como regressão logística binária e, quando possui mais de duas categorias, regressão logística multinomial. O método a ser escolhido dependerá do número de categorias e das características da variável resposta (Gonzalez, 2018).

No primeiro ensaio, verificou-se a relação entre a marcação CD123 (presente e ausente) e o Grau de Kiupel (alto e baixo), nesse caso, através de regressão logística binária. Posteriormente foi aplicada uma análise de regressão multinomial para identificar a influência do Grau de Kiupel na intensidade de marcação por CD123 (fraca ou consistente), e consideradas marcações consistentes as de intensidade moderada, forte e muito forte.

Os dados foram analisados no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 29 para Windows, adotando-se uma confiança de 95%, e o teste qui-quadrado de Pearson e Long-Rank Mantel Cox para análises de modelos de regressão logística binária e multinomial.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação Comparada da Imunodeteccção dos Anticorpos Anti-CD123 Monoclonal (6H6) e Policlonal em Controles de Tonsilas Palatinas Humanas Utilizando Métodos de Detecção Baseados em Polímero de Uma e Duas Etapas.

Nas amostras de tonsilas humanas houve imunomarcação tanto com anticorpo monoclonal quanto com policlonal, entretanto, a imunodeteccção do antígeno CD123 com anticorpo monoclonal (6H6), só foi efetiva com o emprego de métodos de detecção baseados em polímero de duas etapas e na diluição estabelecida (1:400). Não houve diferença de resultados entre as duas marcas utilizadas (Novolink® Polymer Detection System e EnVision® Flex + Mouse Linker), que revelaram forte marcação membranosa-citoplasmática de grupos de células interfoliculares (presumivelmente células dendríticas plasmocitoides) e de vênulas do endotélio alto. Por outro lado, ao utilizar o método detecção com polímero baseado em uma etapa (Envision+® Dual Link System-HRP), não houve imunocoloração significativa nas amostras controles mesmo com uma baixa diluição de 1:20 (Figura 2 A e B).

O CD123 (clone 6H6) com sistema de detecção em duas etapas apresentou marcação membranosa/citoplasmática restrita a grupos de células em regiões interfoliculares (células dendríticas plasmocitoides) e vênulas do endotélio alto, com rara marcação de células intrafoliculares (Figura 3 A e B).

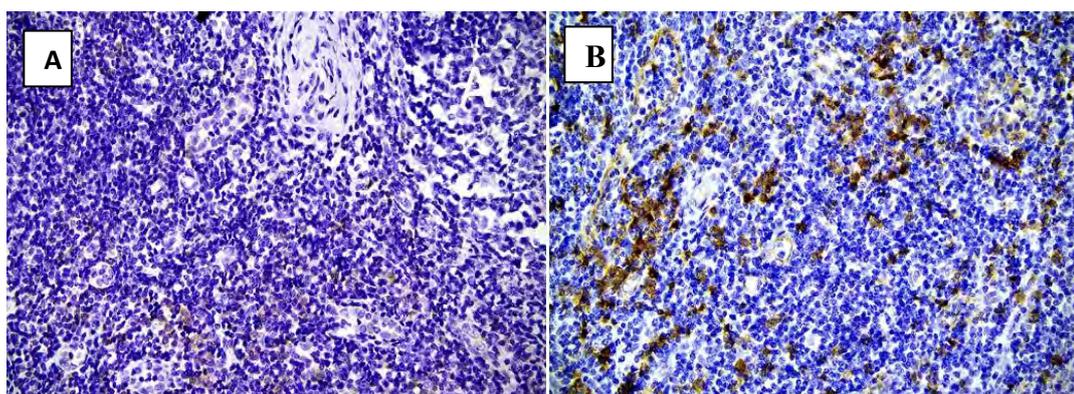


Figura 2. Comparação da imunocoloração com anticorpo anti-CD123 monoclonal com sistema de detecção baseado em polímero de uma e duas etapas em tonsila palatina humana. Figura A. Sistema de detecção baseado em polímero em reação de uma etapa. Imunocoloração com intensidade mínima de poucas células interfoliculares e ausência de detecção do antígeno em vênulas do endotélio alto, IHQ polímero em uma etapa, CD123 (6H6), obj.40. **Figura B.** Sistema de detecção baseado em polímero em reação de duas etapas. Observa-se forte imunocoloração membranosa-citoplasmática de grupos de células dendríticas plasmocitoides e de vênulas do endotélio alto. IHQ polímero em duas etapas, CD123 (6H6), obj.40.

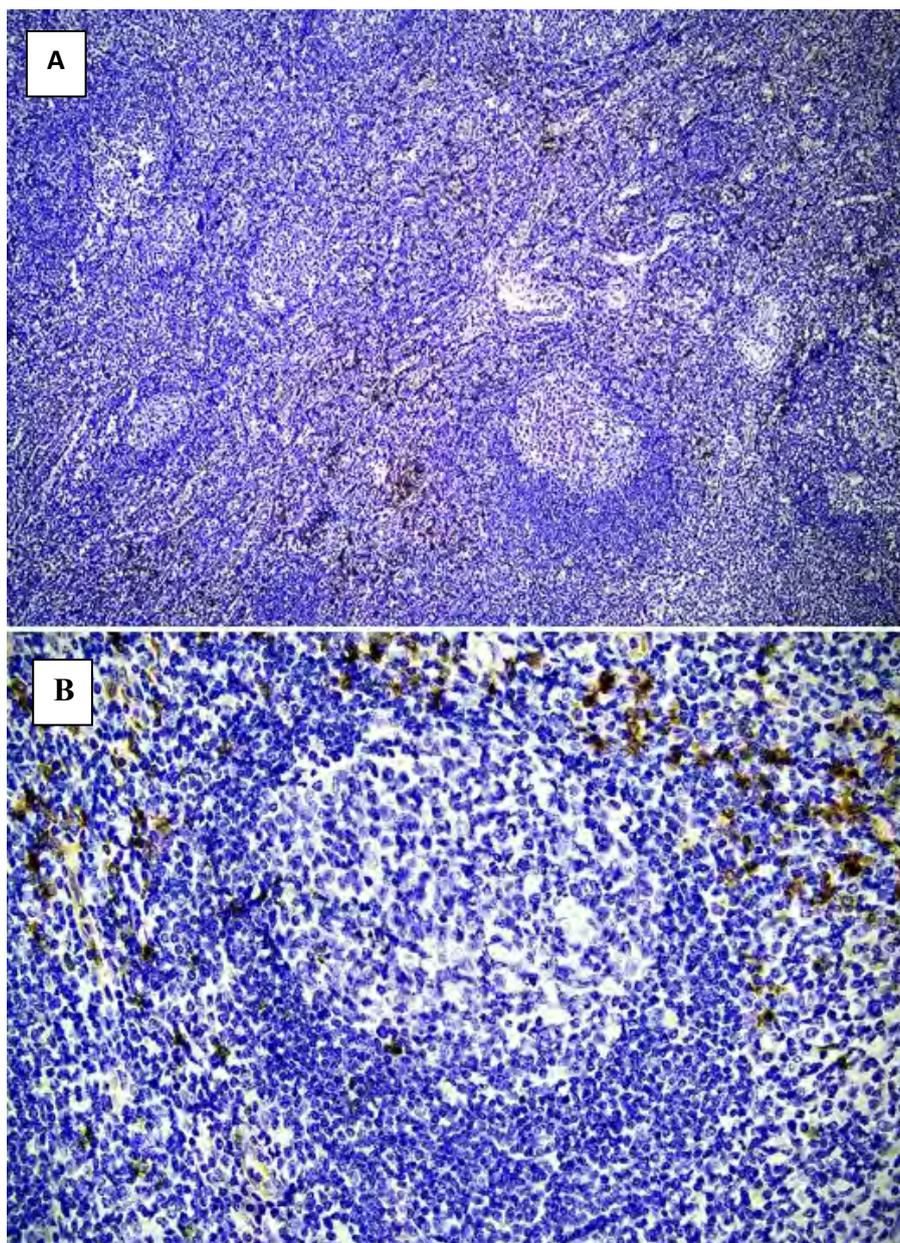


Figura 3. Distribuição da imunomarcção com anticorpo anti-CD123 monoclonal em tonsila palatina humana. Figura A. Padrão de distribuição de células imunocoradas dispostas em grupos interfolliculares, IHQ em duas etapas, CD123 (6H6), obj.10. **Figura B.** Marcação de células interfolliculares e raríssimas células intrafolliculares. IHQ em duas etapas, CD123 (6H6), obj.40.

O anticorpo policlonal anti-CD123 também marcou fortemente grupos de células interfolliculares (Figura 4 e 5) e vênulas do endotélio alto (Figura 6), e demonstrou um padrão de marcação consistente com o anticorpo monoclonal. Entretanto, o anticorpo policlonal demonstrou leve reação de fundo e marcação fraca de linfócitos e imunomarcção moderada em algumas células do estroma (fusiformes) e ductos salivares remanescentes nas amostras de tonsila palatina humana, mas não nos ácinos salivares (Figura 7).

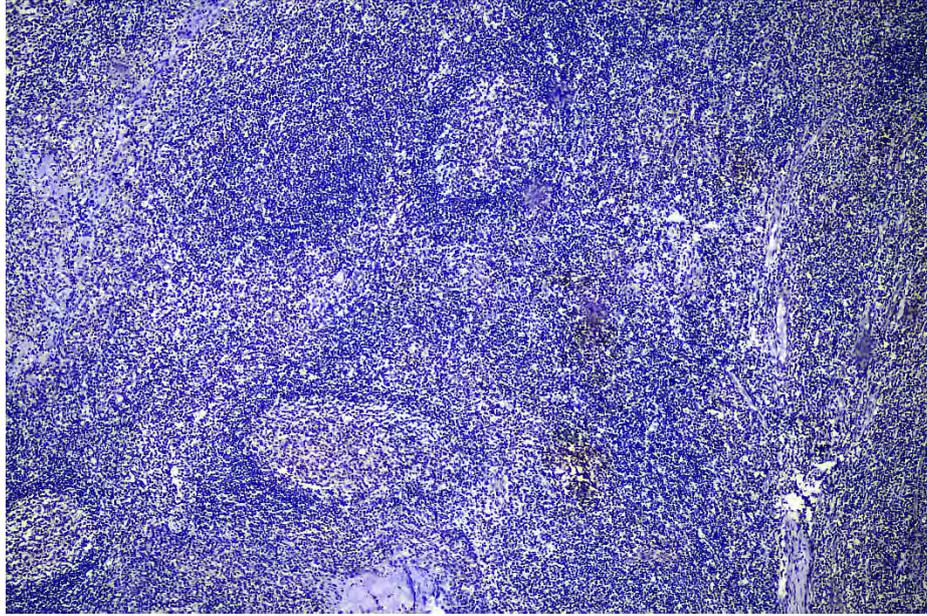


Figura 4. Distribuição da imomarcação com anticorpo policlonal anti-CD123 em tonsila palatina humana. Padrão de distribuição de células imunocoradas dispostas em grupos interfolliculares, semelhante ao padrão demonstrado com anticorpo monoclonal (6H6), IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.10.

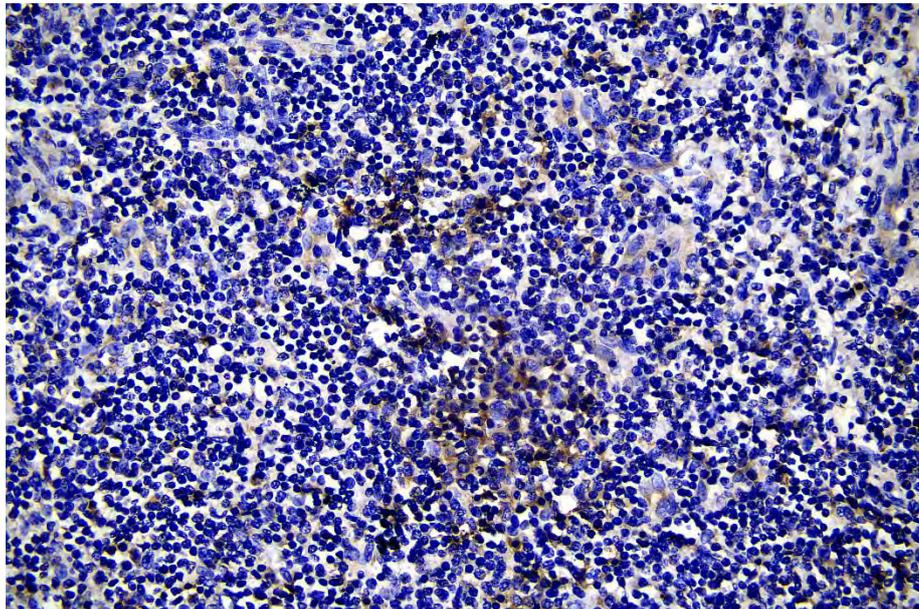


Figura 5. Grupos de células interfolliculares com forte marcação citoplasmática-membranosa com anticorpo policlonal anti-CD123 em tonsila palatina humana. O padrão de marcação é similar ao do anticorpo monoclonal (6H6). Marcação fraca de população linfoide, IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.

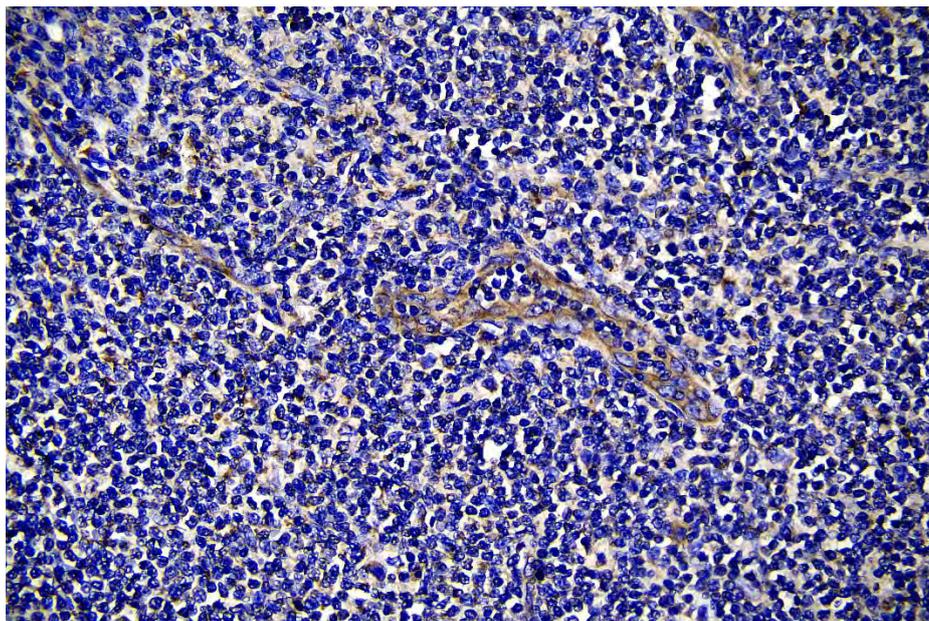


Figura 6. Tonsila palatina humana. Forte marcação citoplasmática-membranosa em vênula do endotélio alto. O padrão de marcação é similar e mais intenso do que o observado com o uso do anticorpo monoclonal(6H6); há marcação fraca de população linfoide, IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.

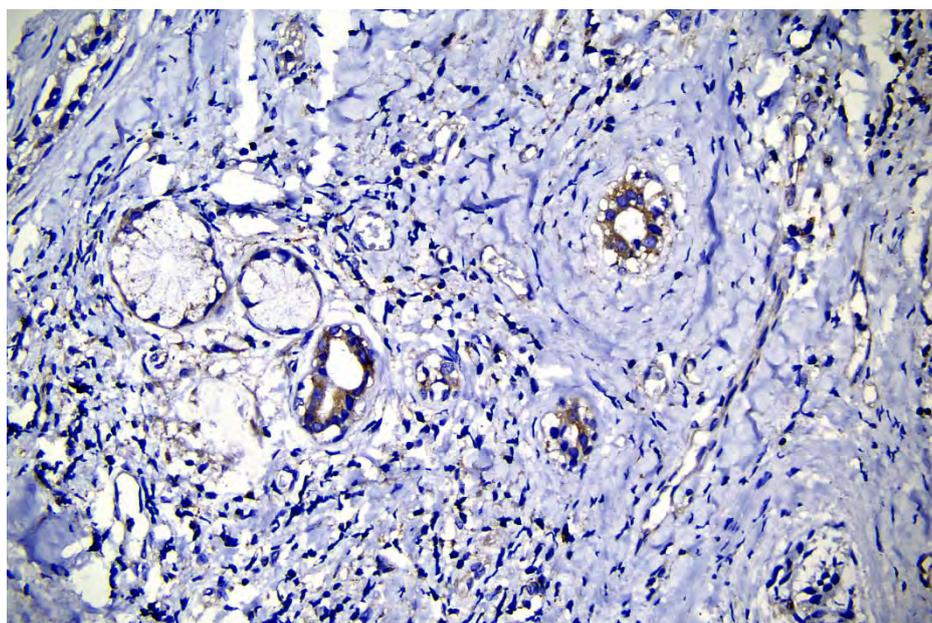


Figura 7. Glândulas salivares remanescentes nas margens de amostra de tonsila palatina humana. Forte imunomarcção membranosa-citoplasmática em ductos salivares e endotélio de alguns vasos, IHQ em uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.

4.2 Imunodeteccção do CD123 em Controles Linfoides (Tonsilas Palatinas e Linfonodos) Caninos.

Na padronização do melhor método de revelação da reação de IHQ, foi observado através de controles negativos, que os dois kits de polímero com sistema de deteccção em duas etapas apresentaram forte reação inespecífica nas tonsilas palatinas e linfonodos caninos, com marcação citoplasmática forte de plasmócitos e reação de fundo nos controles, realizados em

mais de 5 testes (Figura 8). Mesmo com essa inespecificidade, não se notou diferença de marcação ao utilizar o CD123 (6H6) nos controles caninos; como esperado, não houve qualquer indício de marcação, tendo em vista que esse antígeno não foi detectado mesmo em baixa diluição com sistema de detecção em uma etapa em controles humanos. Adicionalmente, um grupo de 5 MCCs que marcaram fortemente com o CD123 policlonal em sistema de uma etapa, foram testados para a marcação com o anticorpo anti-CD123 monoclonal em sistema de uma etapa, sem qualquer marcação.

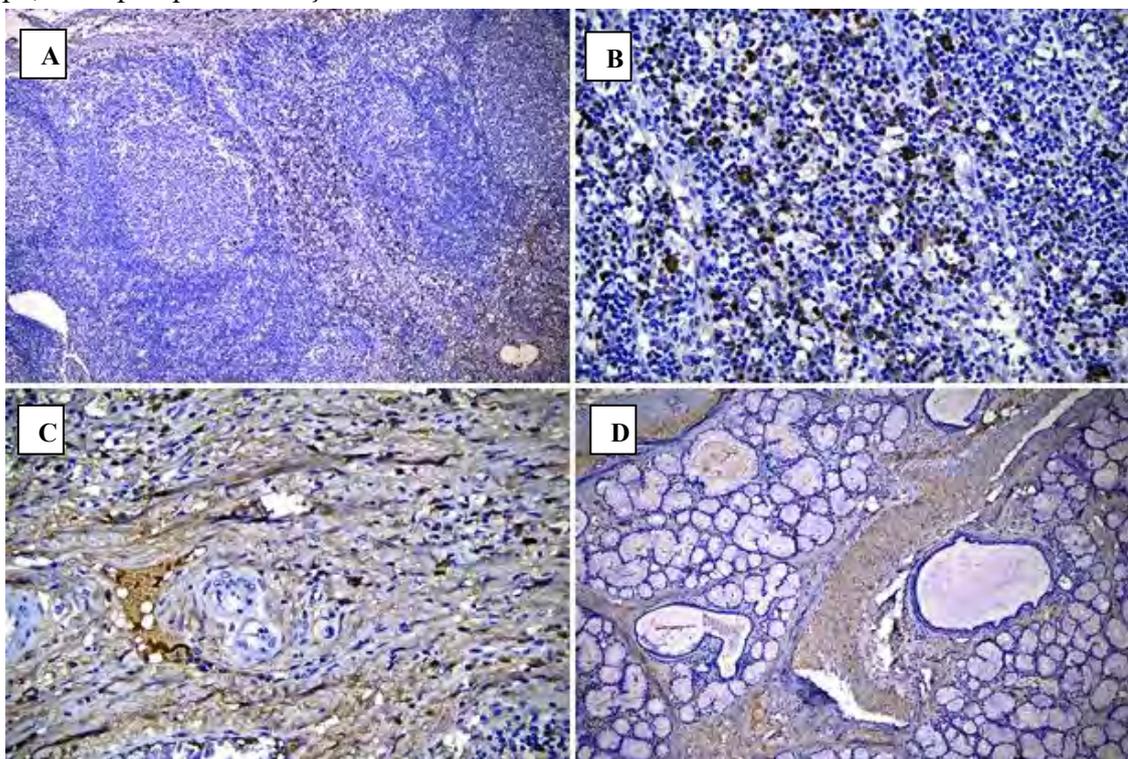


Figura 8. Controle negativo do polímero com sistema de detecção em duas etapas em linfonodo e tonsila palatina caninos. **A.** Linfonodo de cão sem tratamento com anticorpo primário. Imunocoloração forte em cápsula, células da região interfolicular e paracortical, obj.10. **B.** Linfonodo da imagem A aproximada; as células fortemente imunocoradas são morfologicamente indistinguíveis de plasmócitos, obj.40. **C.** Tonsila palatina de cão; o estroma, células fusiformes e plasma apresentam forte imunocoloração com ausência do anticorpo primário, obj.40. **D.** Glândulas salivares remanescentes nas adjacências da tonsila palatina de cão; há forte imunocoloração do estroma, plasma e fraca coloração na secreção de poucas glândulas com ausência de tratamento com anticorpo primário, obj.10.

Devido às reações inespecíficas detectadas no sistema baseado em polímero de duas etapas, de ambas as marcas testadas em tecidos linfoides de cães, optamos por trabalhar somente com o método de polímero baseado em uma etapa que não apresentou reação inespecífica nos controles negativos (Figura 9). Também trabalhamos nossas amostras apenas com o CD123 policlonal que demonstrou marcação com o referido sistema, em virtude do anticorpo anti-CD123 (6H6) ter sido detectado apenas com o uso do polímero com sistema de duas etapas em amostras humanas.

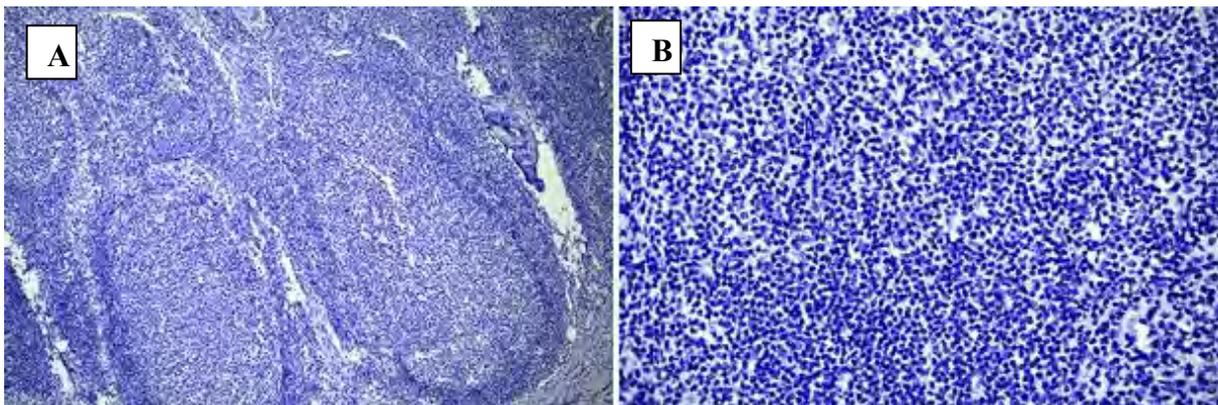


Figura 9. Controle negativo de linfonodo canino. Como esperado, não houve imunocoloração. **A.** obj.10. **B.** obj.40. IHQ utilizando sistema de detecção baseado em polímero de uma etapa com omissão do anticorpo primário.

O CD123 policlonal apresentou marcação de diversos tipos celulares nos controles linfoides, com marcação fraca de populações de linfócitos nos centros germinativos, zona do manto e zona marginal e forte marcação membranosa-citoplasmática em grupos escassos de células interfoliculares e paracorticais que se encontravam mais individualizadas em cordões medulares, em um padrão similar ao controle humano (Figura 10). Essas células tinham aspecto histiocítico com citoplasma amplo, núcleos grandes, vesiculares pleomórficos e menos frequentemente pequenos, redondos com cromatina condensada, um padrão morfológico também similar ao de células humanas fortemente imunomarcadas com o CD123 mono e policlonal (Figura 11). Em discordância com os controles humanos, não houve marcação de vênulas do endotélio alto nem nas tonsilas e nem nos linfonodos caninos (Figura 12).

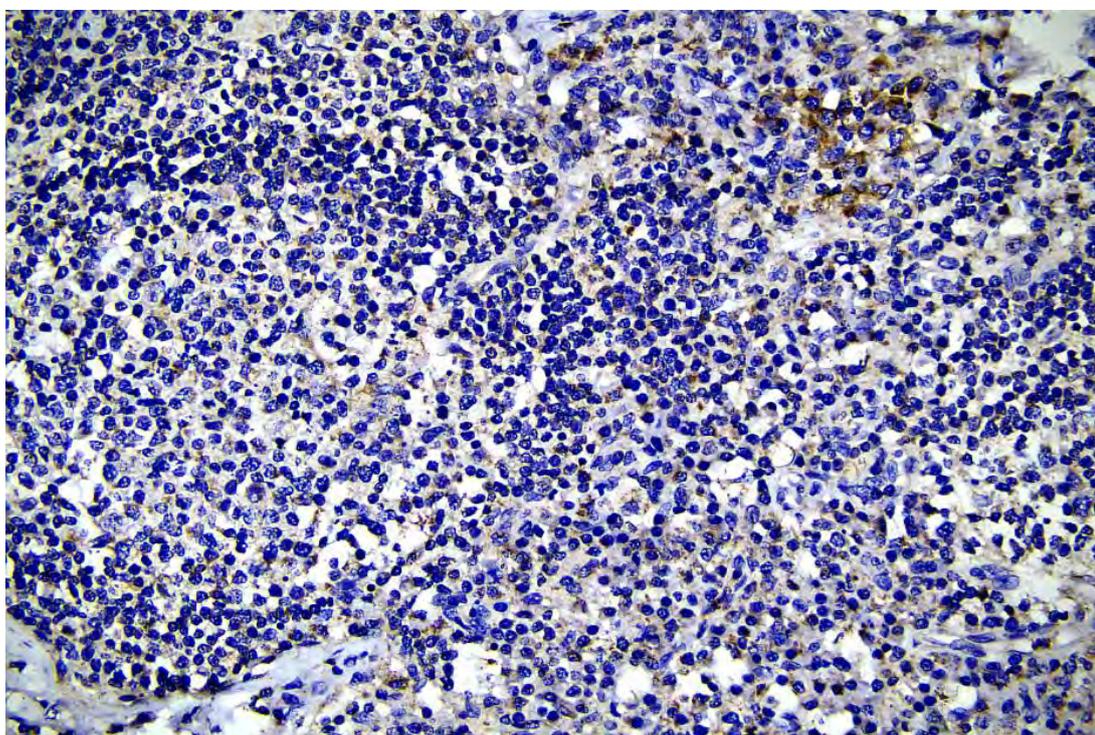


Figura 10. CórTEX linfonodo de cão. Agrupamento distinto de células fortemente imunocoradas à direita no canto superior da imagem, além de mínima intensidade de marcação de linfócitos. IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.

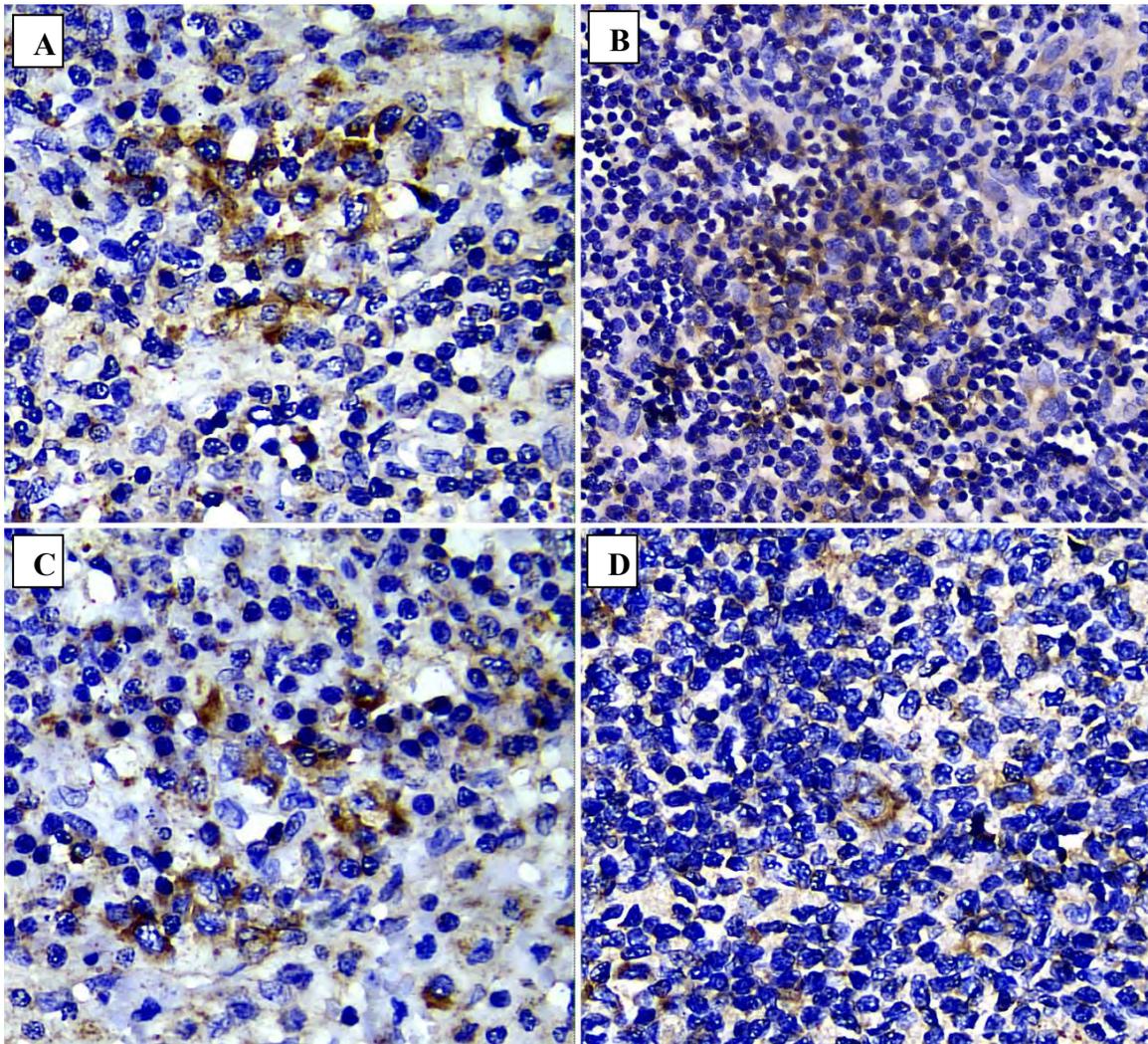


Figura 11. Comparação da imunodeteção do CD123 policlonal entre linfonodo de cão e tonsila palatina humana. A e C linfonodo de cão. Forte imunomarcacão de grupos de células com citoplasma amplo, núcleo grande, pleomófico com cromatina vesicular e menor número de células pequenas com núcleo hiper cromático, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. **B e D tonsila palatina humana.** Em B o agrupamento de células fortemente imunocorados apresenta citoplasma relativamente amplo, com células de núcleo pequeno e hiper cromático e células com núcleos grandes de cromatina esparsa. Em D, as células são grandes, individualizadas, com forte marcação membranosa-citoplasmática e núcleo grande, pleomórfico com cromatina vesicular e nucléolos evidentes, semelhantes às observadas em cães, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.

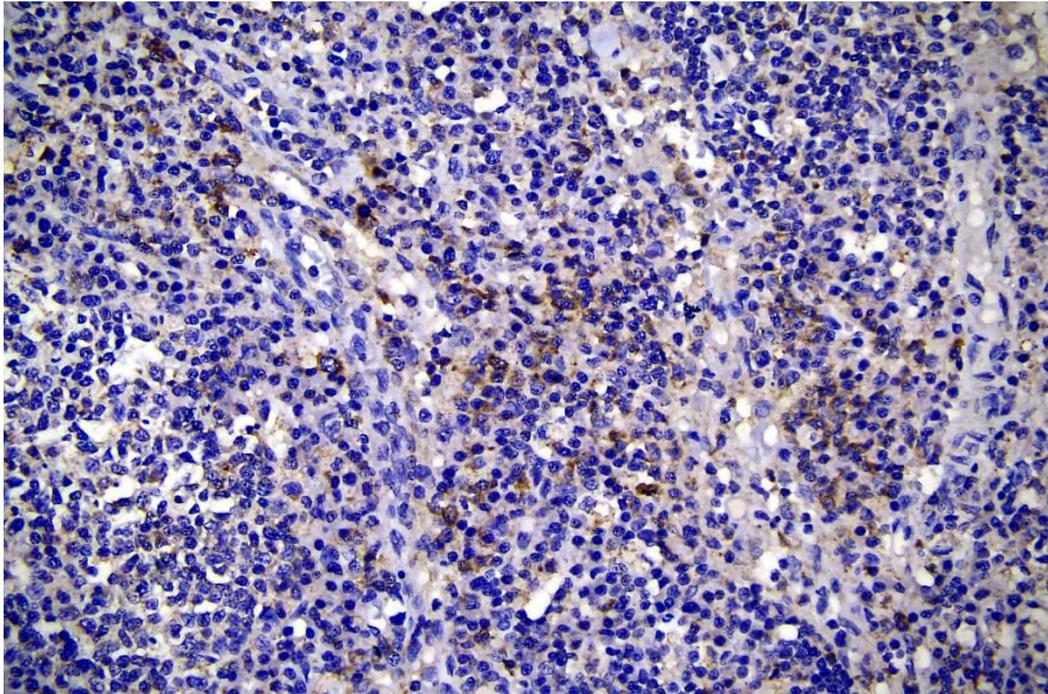


Figura 12. Linfonodo de cão. Forte imunomarcção membranosa-citoplasmática de células com citoplasma relativamente abundante e núcleo pequeno, em pequenos grupos, em um subarranjo linear em região interfolicular. Não há imunomarcção de vênulas, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.

Nas tonsilas palatinas de cães, além da ausência de imunomarcção de vênulas do endotélio alto, não foram visualizadas células interfoliculares em grupos fortemente marcadas, mas houve forte marcação membranosa-citoplasmática de células linfoides próximas à camada basal do epitélio escamoso ou intraepiteliais (Figura 13).

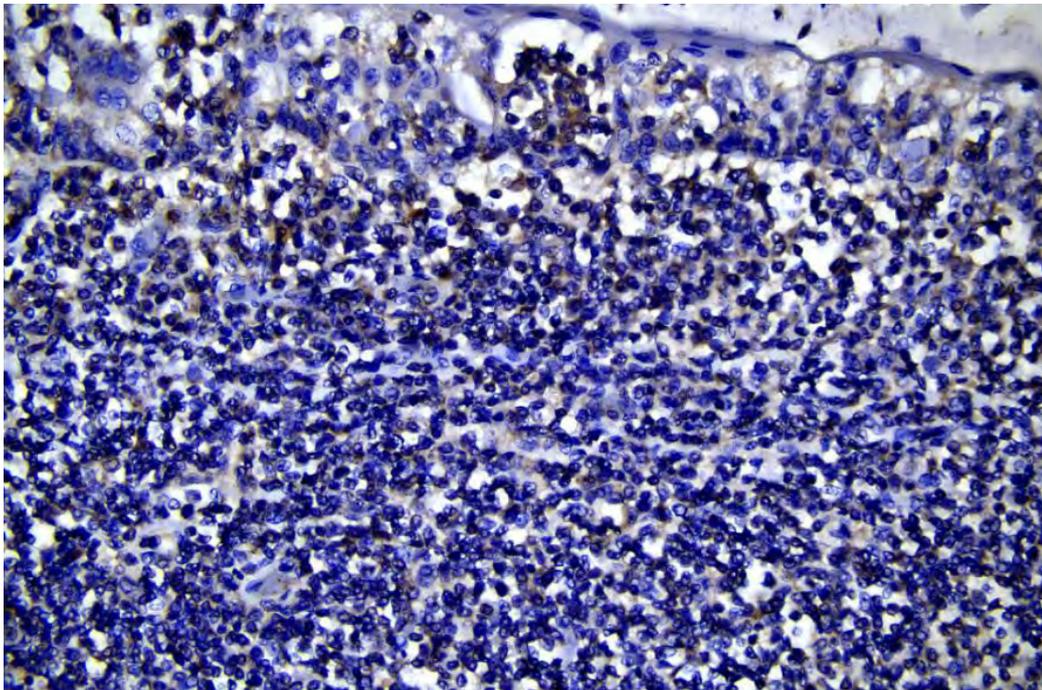


Figura 13. Tonsila palatina de cão. Forte imunomarcção membranosa-citoplasmática de células intraepiteliais, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40.

O anti-CD123 monoclonal não apresentou marcação de fundo nos controles humanos, além de marcação mais restrita que o policlonal nesses espécimes. Por outro lado, o anti-CD123 policlonal apresentou um padrão de distribuição de marcação similar, porém com leve marcação de fundo e marcação de populações celulares adicionais como mencionado anteriormente. Em comparação com os tecidos linfóides caninos, o padrão de marcação de grupos de células interfoliculares foi semelhante, porém sem marcação de vênulas do endotélio alto e com maior marcação de células intrafoliculares e leve reação de fundo.

4.3 Imunodectção do CD123 em Órgãos Não Linfóides Caninos

Houve forte imunomarcção em células da zona glomerulosa da adrenal, plexo nervoso mioentérico e submucoso do intestino e estômago, moderada imunomarcção das células das criptas intestinais (intestino delgado), ductos de glândulas salivares, pancreático (interlobular), ilhotas pancreáticas, ductos biliares e ductos de glândula mamária, além do epitélio brônquico e bronquiolar, células perivasculares, células parietais da mucosa gástrica, principais e menos intensamente mucosas do colo. Não houve marcação de alvéolos pulmonares, músculo liso do trato gastrointestinal, neurônios do hipocampo e cerebelo (Quadro 7). As figuras referentes a essas imunocolorações estão disponíveis no anexo A.

Quadro 7. Imunodectção do CD123 policlonal em células de diferentes tecidos de cães através de sistema baseado em polímero de uma etapa.

| Órgão | Marcação |
|------------------------------------|--|
| Intestino delgado | Plexo mioentérico e submucoso, criptas intestinais |
| Intestino delgado | Plexo mioentérico e submucoso, criptas intestinais |
| Intestino grosso | Plexo mioentérico e submucoso |
| Intestino grosso | Plexo mioentérico e submucoso |
| Estômago (fundo) | Plexo mioentérico e submucoso, células glandulares da mucosa |
| Estômago (fundo) | Plexo mioentérico e submucoso, células glandulares da mucosa |
| Pâncreas | Ilhotas pancreáticas e ductos interlobulares |
| Pâncreas | Ilhotas pancreáticas e ductos interlobulares |
| Rim | Túbulos corticais e medulares, exceto ductos coletores, células da matriz mesangial/capilar glomerular |
| Rim | Túbulos corticais e medulares, exceto ductos coletores, células da matriz mesangial/capilar glomerular |
| Fígado | Células de Kupffer e ductos biliares |
| Fígado | Células de Kupffer e ductos biliares |
| Pulmão | Epitélio brônquico e bronquiolar |
| Pulmão | Epitélio brônquico e bronquiolar |
| Hipocampo e córtex | Neurópilo |
| Hipocampo e córtex | Neurópilo |
| Cerebelo | Neurópilo da camada molecular |
| Cerebelo | Neurópilo da camada molecular |
| Hiperplasia lobular mamária + pele | Ductos mamários, células basaloides glandulares, ductos sudoríparos apócrinos, algumas células escamosas |
| Hiperplasia lobular mamária + pele | Ductos mamários, células basaloides glandulares, ductos sudoríparos apócrinos, algumas células escamosas |
| Adrenal | Células da zona glomerulosa |

4.3.1 Imunodectção do CD123 em amostras de neoplasias caninas em TMA.

Dos 39 plasmocitomas cutâneos caninos, 24 apresentaram marcação membranosa-citoplasmática consistente, dos 25 histiocitomas cutâneos caninos, 18 apresentaram marcação membranosa-citoplasmática consistente e, os dois sarcomas histiocíticos apresentaram marcação membranosa-citoplasmática muito forte, além da amostra de mieloma múltiplo, todas reações sem marcação de fundo. As figuras estão disponíveis no anexo B.

4.4 MCCs

4.4.1 Aspectos gerais das amostras analisadas

Das 63 amostras de MCCs, 30 foram classificadas como baixo grau e 33 como alto grau Kiupel. Os dados de raça, idade, sexo, região da lesão e avaliação dos linfonodos quando disponíveis nas fichas de requisição de exame histopatológico e após avaliações das amostras, foram tabulados. Esses dados podem ser consultados no Quadro 8 para MCCs classificados como baixo grau e no Quadro 9 para MCCs classificados como alto grau.

Quadro 8. Raça, sexo, idade, local anatômico e avaliação de linfonodos de 30 MCCs de baixo grau Kiupel.

| ID | Raça | Sexo | Idade | Local | Linfonodo |
|--------------------|-------------------|-------|---------|---------------------------------|-----------|
| 35920 ^a | SRD | Fêmea | 4 anos | Região mamária | HN3 |
| 40449 ^a | SRD | Macho | 10 anos | Abdômen | HN1 |
| 35986B | Pitbull | Fêmea | 9 anos | Face medial da coxa | HN2 |
| 35985B | NI | NI | NI | NI | NA |
| 38853J | SRD | Fêmea | 12 anos | Esterno | HN1 |
| 39528 ^a | Chow Chow | Macho | 6 anos | Bolsa escrotal | HN2 |
| 40080 ^a | Bulldogue Francês | Macho | 7 anos | Bolsa escrotal | HN0 |
| 2106/22 | Labrador | Macho | 9 anos | Bolsa escrotal | NA |
| 908/23 | Não informado | Macho | NI | NI | NA |
| MAS313/21 | Pitbull | Fêmea | 5 anos | Membro pélvico esquerdo | NA |
| 40780C | Golden Retriever | Fêmea | 10 anos | Tórax | NA |
| 40750I | Labrador | Fêmea | 11 anos | NI | HN1 |
| 40186 ^a | Labrador | Fêmea | 11 anos | Região mamária | HN0 |
| 40207 ^a | Basset Hound | Macho | 13 anos | Membro torácico esquerdo | NA |
| 40211F | Dachshund | Macho | 11 anos | Abdômen | NA |
| 40212 ^a | SRD | Fêmea | 6 anos | Flanco | HN3 |
| 38407C | SRD | Fêmea | 6 anos | Abdômen | NA |
| 40689 ^a | SRD | Macho | 12 anos | Região inguinal | HN2 |
| 40757 ^a | SRD | Macho | 7 anos | Abdômen | HN2 |
| 38491 ^a | Dálmata | Fêmea | 11 anos | Tronco | NA |
| 40768 ^a | Pinscher | Fêmea | 9 anos | Região mamária | HN2 |
| 40206C | SRD | Fêmea | NI | Axila esquerda | NA |
| 40352 ^a | Pitbull | Fêmea | 10 anos | Região inguinal | NA |
| 40426B | SRD | Macho | 8 anos | Região axilar | NA |
| 40366 ^a | SRD | Fêmea | NI | Região mamária | NA |
| 40562B | Golden Retriever | Macho | 9 anos | Região mamária | HN2 |
| 38439B | American Bully | Macho | 7 anos | Membro pélvico esquerdo e cauda | NA |
| 933/23 | Golden Retriever | Macho | 6 anos | Tórax e bolsa escrotal | HN2 |
| 40914 ^a | SRD | Fêmea | 6 anos | Flanco direito | HN0 |
| 41324E | SRD | Fêmea | NI | Tórax, orelha | HN0 |

SRD = sem raça definida NI = não informado NA = não avaliado

Quadro 9. Raça, sexo, idade, local anatômico e avaliação de linfonodos de 33 MCCs de alto grau Kiupel.

| ID | Raça | Sexo | Idade | Local | Linfonodo |
|----------------------|------------------|-------|---------|-----------------------------|-----------|
| 982/22 | Pinscher | Fêmea | 10 anos | Região inguinal | HN3 |
| 1772/22 | Dachshund | Macho | 10 anos | Bolsa escrotal | NA |
| 612/23 | Schanauser | Fêmea | 14 anos | Membro torácico esquerdo | HN1 |
| 671/23 | SRD | Macho | 10 anos | Bolsa escrotal | NA |
| MAS 33/22 | SRD | Macho | 5 anos | Bolsa escrotal | NA |
| 1644/22 | Labrador | Macho | 15 anos | SI | NA |
| 1285/22 | Não informado | Fêmea | NI | Região cervical | HN0 |
| 1438/22 ^a | Schnauzer | Macho | 15 anos | Membro pélvico direito | HN1 |
| 1083/22 | Bulldog Francês | Macho | 5 anos | NI | NA |
| MAS 53/21 | Labrador | Macho | 13 anos | Prepúcio | HN4 |
| MAS 171/21 | Labrador | Macho | 11 anos | Dígito, tronco, rostro | NA |
| MAS358/22 | SRD | Fêmea | NI | Membro torácico direito | NA |
| MAS115/21 | SRD | Fêmea | 4 anos | Região lombar | NA |
| MAS 385/21 | SRD | Macho | 13 anos | Região torácica | HN2 |
| 2007/22 | Golden Retriever | Fêmea | 9 anos | Membro torácico esquerdo | HN3 |
| 1032/23 | SRD | Macho | NI | Membro pélvico esquerdo | NA |
| 1460/22 | Não informado | Macho | NI | Bolsa escrotal | NA |
| 1410/22 | SRD | Fêmea | 15 anos | Mama | NA |
| 1080/22 | SRD | Fêmea | 7 anos | Região cervical | HN3 |
| 592/23 | Golden Retriever | Macho | NI | Pênis, face interna da coxa | HN3 |
| MAS336/22 | SRD | Macho | 11 anos | Bolsa escrotal | NA |
| 38303 ^a | Daschound | Macho | NI | Região axilar | HN0 |
| MAS90/21 | Buldogue Francês | Macho | 7 anos | Bolsa escrotal | NA |
| 39713 ^a | SRD | Fêmea | 10 anos | Região pré escapular | HN3 |
| 39473 ^a | Buldogue | Macho | 3 anos | Prepúcio | HN1 |
| 38497 ^a | SRD | Fêmea | 13 anos | Mandíbula | HN3 |
| MAS82/22 | Poodle | Fêmea | 15 anos | Região peitoral | NA |
| MAS398? | SRD | Fêmea | 16 anos | Abdômen | HN3 |
| MAS30/21 | Maltês | Macho | 7 anos | Região lombar | NA |
| 2007/22* | Golden Retriever | Fêmea | 9 anos | Membro torácico esquerdo | HN3 |
| 448/22 | Dachshund | Fêmea | 11 anos | Região inguinal | NA |
| MAS 237/21 | Labrador | Macho | 10 anos | Bolsa escrotal | NA |
| MAS 39/21 | Labrador | Macho | 10 anos | Focinho | NA |

SRD = sem raça definida NI = não informado NA = não avaliado

Dos MCCs classificados como baixo grau Kiupel, 2/30 foram classificados como grau I de Patnaik e 28/30 foram classificados como grau II; nenhum dos MCCs classificados como baixo grau Kiupel foi classificado como grau III Patnaik. Com relação aos mastocitomas de alto grau Kiupel, 8/33 foram classificados como grau III de Patnaik e 25/33 como grau II de Patnaik; não houve nenhuma amostra de alto grau de Kiupel classificada como grau I de Patnaik.

Nos 30 casos de MCCs classificados como baixo grau, 28 tinham informações de raças disponíveis nas fichas de requisição, as raças mais frequentes foram: sem raça definida (12/28), Pitbull (3/28), Labrador e Golden Retriever (3/28, cada). A informação de sexo estava

disponível para 29 das 30 amostras de baixo grau e 16/29 eram fêmeas e 13/29 eram machos. A média de idade foi de 8,6 anos com mediana de 9 anos e a moda foi 6 anos de idade.

Nos 33 casos classificados como alto grau, 31 tinham informações de raças disponíveis nas fichas de requisição, as raças mais frequentes foram: sem raça definida (13/31), Labrador (5/31), Golden Retriever (3/31), Bulldog Francês (3/31), Dachshund (3/31) e Schanauzer (2/31). A informação de sexo estava disponível para 33 das 33 amostras de alto grau e 14/33 eram fêmeas e 19/33 eram machos. A média de idade foi de 10,7 anos com mediana 10 anos e a moda foi 10 anos de idade.

Os critérios para graduação de cada amostra podem ser consultados no Quadro 10 para MCCs de baixo grau e no Quadro 11 para MCCs de alto grau.

Quadro 10. Critérios avaliados para graduação dos MCCs de baixo grau Kiupel e grau de Patnaik (continua).

| ID | Patnaik | | | | | | | Kiupel | | | | | eosinófilos | Pleomorfismo | Proporção núcleo:citoplasma |
|---------|---------------------------|-----------|----------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------|---------|----------------|------------------|--------------|-------|------------------|--------------|---|
| | Extensão | Densidade | Limites citop. | Granulação | Núcleo | Edema, hemorragia, necrose | Grau | Mitose* | Multinucleação | Núcleos bizarros | Cariomegalia | Grau | | | |
| 35920A | subcutâneo | moderada | distintos | finamente granular | redondo a oval, nucléolo evidente | edema ++ | II | 5 | 1 | não | < 10% | baixo | discreto difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 40449A | derme profunda sem margem | alta | distintos | finamente granular | redondo | edema ++ | II | 0 | 0 | 1 | não | baixo | moderado difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 35986B | subcutâneo | alta | distintos | finamente granular | redondo | edema ++, necrose4 ++ | II | 4 | 0 | não | não | baixo | discreto difuso | discreto | citoplasma discreto moderado a |
| 35985B | subcutâneo | alta | distintos | finamente granular | redondo, por vezes indentado | edema ++ | II | 0 | 1 | não | <10% | baixo | moderado difuso | discreto | citoplasma discreto moderado a |
| 38853J | subcutâneo | alta | distintos | finamente granular | redondo a oval, por vezes indentado | edema + | II | 2 | 0 | não | não | baixo | moderado difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 39528A | subcutâneo | moderada | distintos | granulação grosseira | redondo | edema ++ | II | 0 | 0 | não | não | baixo | acentuado difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 40080A | derme profunda | moderada | distintos | granulação variável | redondo | edema + | II | 4 | 2 | 1 | não | baixo | acentuado focos | discreto | citoplasma amplo |
| 2106/22 | subcutâneo | alta | variável | sem granulação evidente | redondo a ovalado, evidência nucléolo | não | II | 0 | 0 | não | <10% | baixo | discreto | moderado | variável, citoplasma majoritariamente amplo |

Quadro 10. Continuação.

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------------|----------|-----------|--------------------------------|----------------|----------|----|---|---|-----|------|-------|------------------|----------|---|
| 908/23 | subcutâneo | baixa | variável | sem granulação evidente | redondo a oval | edema ++ | II | 0 | 0 | 2 | <10% | baixo | acentuado difuso | moderado | variável, citoplasma majoritariamente amplo |
| MAS313/21 | subcutâneo | alta | variável | finamente granular | redondo a oval | edema++ | II | 0 | 0 | não | <10% | baixo | moderado difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 40780C | derme profunda | baixa | distintos | finamente granular | redondo | edema+ | I | 0 | 0 | não | não | baixo | discreto difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 40750I | derme profunda | alta | distintos | finamente granular | redondo a oval | edema+ | II | 0 | 0 | não | não | baixo | moderado difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 40186A | derme profunda | moderada | distintos | finamente granular | redondo a oval | edema+ | II | 0 | 0 | não | <10% | baixo | discreto difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 40207A | derme profunda | alta | variável | finamente granular | redondo a oval | edema+ | II | 1 | 0 | 1 | <10% | baixo | moderado difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 40211F | derme superficial | moderada | distintos | finamente granular | redondo | edema++ | I | 0 | 0 | não | não | baixo | discreto difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 40212A | derme profunda | alta | distintos | granulação grosseira | redondo a oval | edema++ | II | 1 | 0 | não | <10% | baixo | acentuado difuso | moderado | citoplasma variável |
| 38407C | derme profunda | alta | variável | pouco evidente | redondo | não | II | 2 | 0 | não | não | baixo | discreto difuso | moderado | citoplasma variável |
| 40689A | derme profunda | alta | distintos | finamente granular | redondo a oval | edema+ | II | 0 | 0 | 1 | <10% | baixo | discreto difuso | discreto | citoplasma variável |
| 40757A | derme profunda | moderada | distintos | finamente granular | redondo | edema+ | II | 0 | 0 | não | não | baixo | moderado difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 38491A | derme profunda | | distintos | granulação grosseira abundante | redondo a oval | edema+ | II | 0 | 0 | não | <10% | baixo | acentuado difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 40768A | derme profunda | alta | distintos | granulação grosseira | redondo a oval | edema+ | II | 2 | 1 | não | <10% | baixo | acentuado difuso | moderado | citoplasma amplo |

Quadro 10. Continuação.

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------|----------|-----------|------------------------------------|----------------|--------------------|----|---|---|-----|------|-------|------------------|----------|------------------|
| 40206C | derme profunda | alta | distintos | granulação grosseira abundante | redondo a oval | edema+ | II | 0 | 0 | não | <10% | baixo | moderado difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 40352A | derme profunda | alta | distintos | granulação grosseira abundante | redondo a oval | edema+ | II | 1 | 0 | não | <10% | baixo | moderado difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 40426B | subcutâneo | moderada | distintos | granulação grosseira abundante | redondo a oval | não | II | 0 | 0 | não | <10% | baixo | discreto difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 40366A | subcutâneo | moderada | distintos | granulação grosseira abundante | redondo a oval | edema+ | II | 0 | 0 | não | não | baixo | discreto difuso | discreto | citoplasma amplo |
| 40562B | derme profunda | moderada | distintos | granulação grosseira abundante | redondo a oval | edema+ | II | 0 | 0 | não | <10% | baixo | acentuado difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 38439B | derme profunda | alta | distintos | granulação grosseira evidentemente | redondo a oval | edema+ hemorragia+ | II | 3 | 0 | não | <10% | baixo | discreto difuso | moderado | citoplasma amplo |
| 933/23 | subcutâneo | moderada | distintos | granulação grosseira evidente | redondo a oval | edema++ | II | 0 | 0 | não | não | baixo | moderado difuso | discreto | citoplasma amplo |

Quadro 11. Critérios avaliados para graduação dos MCCs de alto grau Kiupel e grau de Patnaik (continua).

| RG | Patnaik | | | | | | | Kiupel | | | | | eosinófilos | Pleomorfismo | Proporção núcleo:citoplasma |
|-----------|----------------|----------------|-------------|---|---|----------------------------|------|---------|----------------|------------------|--------------|------|--------------------|--------------|-----------------------------|
| | Extensão | Densidade | Limites | Granulação | Núcleo | Edema, hemorragia, necrose | Grau | Mitose* | Multinucleação | Núcleos bizarros | Cariomegalia | Grau | | | |
| 982/22 | subcutâneo | alta | distintos | pouco evidente | redondo a recortado, vesicular | edema e necrose + | III | 12 | 3+ | 3+ | presente | alto | discreto | acentuado | variável com áreas de 1:1 |
| 1772/22 | derme profunda | moderada | variável | pouco evidente | redondo, acentuadamente pleomórfico, cromatina condensada | edema ++ | II | 2 | 1 | 10+ | presente | alto | moderado difuso | acentuado | variável com áreas de 1:1 |
| 612/23 | subcutâneo | moderada | variável | variável | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente | edema ++ | II | 0 | 6+ | 3+ | presente | alto | acentuado difuso | moderado | variável com áreas de 1:1 |
| 671/23 | subcutâneo | alta | variável | variável, grânulos finos a médios, às vezes imperceptível | redondo | edema+, hemorragia+ | II | 15 | não | não | não | alto | acentuado em áreas | acentuado | variável com áreas de 1:1 |
| MAS 33/22 | subcutâneo | alta | indistintos | imperceptível | grande, vesicular, nucleolo evidente | edema + | III | 45 | 4+ | 3+ | presente | alto | discreto | acentuado | variável com áreas de 1:1 |
| MAS80/21 | subcutâneo | baixa/moderada | distintos | muito evidente, média | redondo, vesicular | edema ++ | II | 0 | 0 | 0 | presente | alto | moderado difuso | discreto | variável com áreas de 1:1 |
| 1644/22 | subcutâneo | alta | variável | variável para imperceptível | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente | edema + | III | 16 | 2 | 3 | presente | alto | discreto | moderado | elevado 1:1 |
| 1285/22 | subcutâneo | alta | variável | variável para imperceptível | redondo | edema + | III | 7 | 6 | 2 | <10% | alto | moderado difuso | moderado | variável com áreas de 1:1 |

Quadro 11. Continuação

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|----------|-----------|----------------|---|------------------------------------|-----|----|-----|-----|----------|------|-------------------|-----------|-----------------------------------|
| 1438/22A | subcutâneo | moderada | distintos | variável | redondo a recortado, nucleolo evidente, vesicular | edema+ hemorragia + | III | 7 | 4 | 5 | presente | alto | discreto | moderado | variável com áreas de 1:1 |
| 1083/22 | subcutâneo | moderada | distintos | variável | redondo a recortado, nucleolo evidente, cromatina vesicular | edema ++ | II | 2 | 1 | 2 | presente | alto | moderado em áreas | moderado | variável com áreas de 1:1 |
| MAS 53/21 | subcutâneo | alta | distintos | variável | redondo | edema+ | II | 7 | não | não | não | alto | moderado em áreas | moderado | variável com áreas de 1:1 |
| MAS 171/21 | subcutâneo | moderada | distintos | pouco evidente | redonodo | edema + necrose ++ | II | 8 | não | não | presente | alto | acentuado | moderado | majoritariamente citoplasma amplo |
| MAS358/22 | subcutâneo | alta | distintos | variável | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente | | II | 0 | 6 | 10 | presente | alto | moderado em áreas | acentuado | variável com áreas de 1:1 |
| 115/21 | subcutâneo | alta | distintos | Fina | redonodo, por vezes vesicular | edema ++, necrose ++, hemorragia + | II | 8 | 0 | 0 | não | alto | discretos | discreto | baixo |
| MAS 385/21 | subcutâneo | alta | distintos | variável | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente | edema+, colagenólise + | III | 7 | 1 | 14 | presente | alto | acentuado difuso | acentuado | baixo |
| 2007/22 | subcutâneo | alta | distintos | variável | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente | edema++ | II | 6 | 1 | 12 | presente | alto | moderado difuso | acentuado | variável |
| 1032/23 | subcutâneo | alta | distintos | indistinta | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente | edema+ | II | 0 | 16 | 21 | presente | alto | moderado difuso | acentuado | variável |
| 1460/22 | subcutâneo | alta | distintos | pouco evidente | redondo | edema+ | II | 12 | não | não | presente | alto | discreto | discreto | elevado 1:1 |
| 1410/22 | subcutâneo | alta | distintos | pouco evidente | redondo, recortado | edema + | III | 10 | 18 | 14 | presente | alto | discreto | acentuado | elevado 1:1 |

Quadro 11. Continuação

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----------------|----------|-----------|-------------------------------|---|----------|-----|----|-----|-----|----------|------|-----------------|-----------|---|
| 1080/22 | subcutâneo | alta | distintos | imperceptível | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente , | edema+ | III | 14 | 3 | 6 | presente | alto | discreto | moderado | variável a 1:1 |
| 592/23 | subcutâneo | moderada | variável | variável | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente , | edema+ | II | 0 | 1 | 4 | presente | alto | discreto | moderado | variável a 1:1 |
| MAS336/22 | subcutâneo | alta | variável | imperceptível | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente , | edema+ | II | 2 | 6 | 8 | presente | alto | discreto | moderado | variável a 1:1 |
| MAS90/21 | derme profunda | alta | distintos | variável | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente , | edema+ | II | 2 | 14 | não | presente | alto | discreto | moderado | amplo citoplasma |
| 39713A | subcutâneo | alta | distintos | finamente granular | redondo, cromatina esparsa, nucleolos evidentes, endentação | edema++ | II | 1 | 0 | não | presente | alto | moderado difuso | moderado | amplo citoplasma |
| 39473A | subcutâneo | alta | variável | variável | redondo, recortado, vesicular, nucleolo evidente | edema+ | II | 2 | 7 | 4 | presente | alto | discreto | acentuado | variável, citoplasma majoritariamente amplo |
| 38497A | subcutâneo | alta | distintos | variável a finamente granular | redondo, cromatina esparsa, nucleolos evidentes, endentação | edema+ | II | 18 | não | 6 | presente | alto | discreto difuso | acentuado | variável a 1:1 |
| MAS82/22 | muscular | alta | variável | variável | redondo, oval | edema+ | II | 3 | não | 8 | presente | alto | discreto difuso | acentuado | variável a 1:1 |
| MAS398? | subcutâneo | alta | distintos | variável | redonodo | edema+ | II | 0 | 3 | 4 | presente | alto | moderado difuso | moderado | variável a 1:1 |
| MAS30/21 | subcutâneo | moderada | distintos | imperceptível a discreta | redondo | edema ++ | II | 12 | 0 | 4 | presente | alto | discreto difuso | moderado | variável a 1:1 |

Quadro 11. Continuação

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----------------|------|----------|---------------------------|---------------------|---------|----|---|-----|---|----------|------|-----------------|--------------------|----------------|
| 448/22 | derme profunda | alta | variável | pouco evidente a discreta | redondo a oval | edema+ | II | 4 | não | 0 | presente | alto | moderado difuso | moderado | variável a 1:1 |
| MAS 237/21 | subcutâneo | alta | variável | pouco evidente a discreta | redondo pleomórfico | edema++ | II | 1 | não | 3 | presente | alto | discreto difuso | moderado acentuado | variável a 1:1 |
| MAS 39/21 | derme profunda | | variável | pouco evidente a discreta | redondo a oval | edema++ | II | 3 | não | 1 | presente | alto | discreto difuso | moderado | variável a 1:2 |

4.5 Imunomarcção dos MCCs

4.5.1 CD123

Das 63 amostras de MCCs, 37 (58,7%) foram imunopositivas para CD123. Ao analisar a imunopositividade pela graduação, dos 30 MCCs de baixo grau, 13 (43,3%) foram positivos, dos quais 7 amostras apresentaram imunomarcção membranosa-citoplasmática fraca (Figura 14).

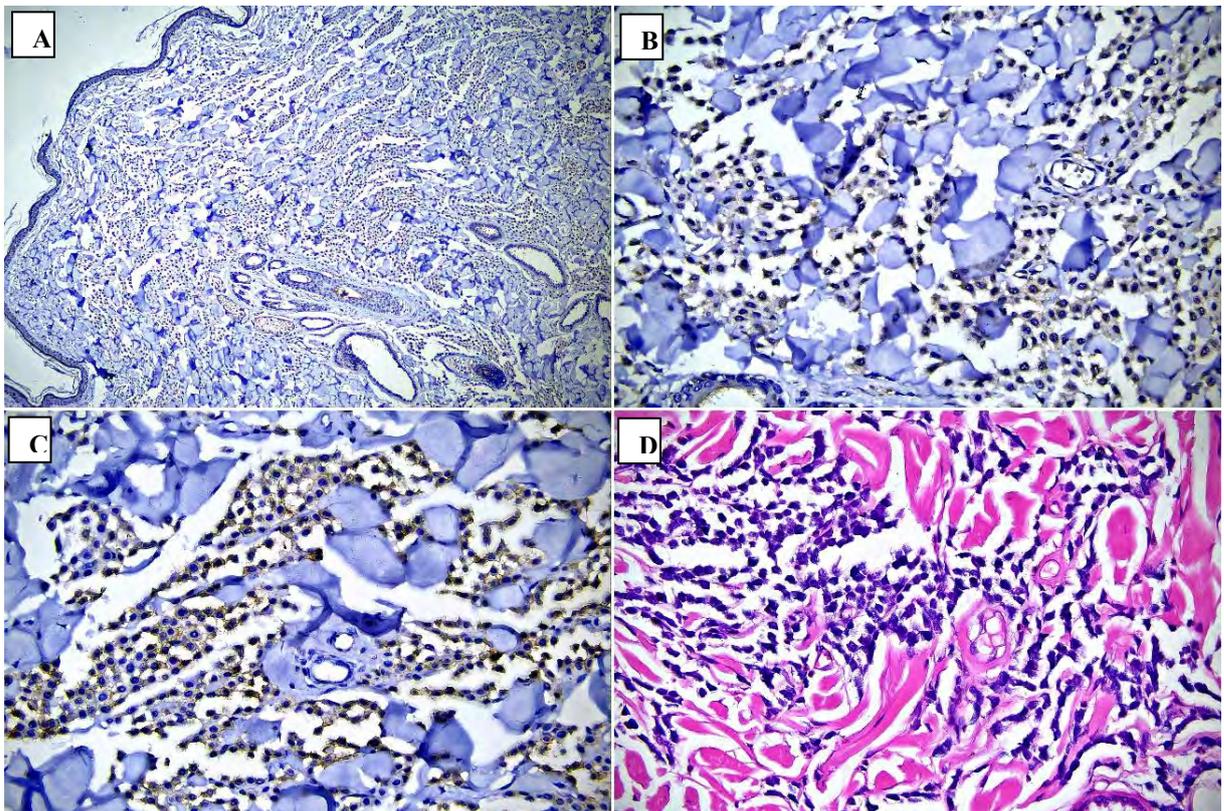


Figura 14. Imunomarcção de MCC de baixo grau. A. MCC com fraca marcação em células neoplásicas, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.10. **B.** Mesma amostra de A, revelando fraca imunocoloração membranosa-citoplasmática, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. **C.** Mesma amostra imunocorada com KIT, evidenciando um padrão de marcação de membrana (KIT I), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-KIT policlonal, obj.40. **D.** Coloração de hematoxilina e eosina na mesma amostra, H.E., obj.40.

A marcação membranosa-citoplasmática consistente (moderada, forte ou muito forte) esteve presente em 6 amostras de MCCs classificados como baixo grau (Figura 15).

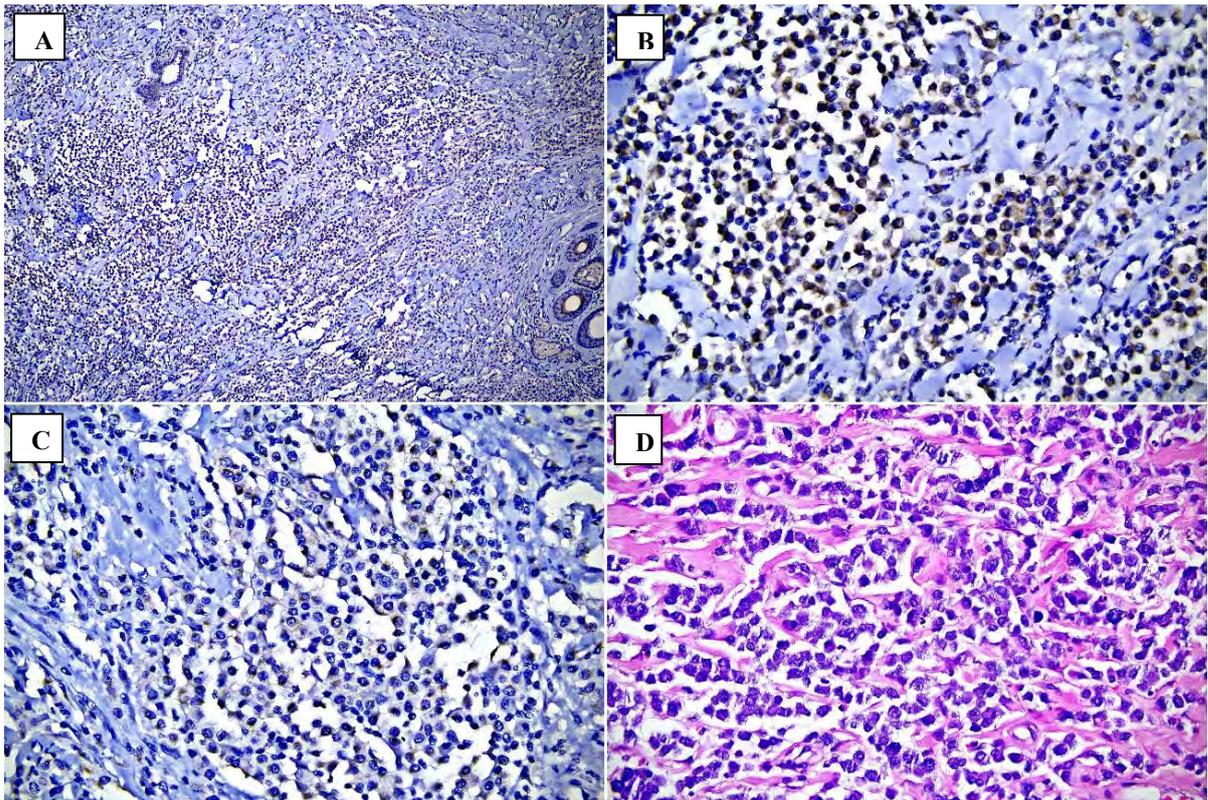


Figura 15. Imunomarcção de MCC de baixo grau. **A.** MCC com moderada a forte marcação em distribuição de células neoplásicas, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.10. **B.** Mesma amostra de A. com moderada a forte imunocoloração membranosas-citoplasmática em mastócitos neoplásicos, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. **C.** Mesma amostra imunocorada com KIT, evidenciando um padrão de marcação citoplasmático focal (KIT II), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-KIT policlonal, obj.40. **D.** Coloração de hematoxilina e eosina na mesma amostra, H.E., obj.40.

Com relação às 33 amostras de MCCs de alto grau, 24/33 (69,7%) amostras foram imunopositivas, sendo 23 enquadradas como consistentes e apenas 1 enquadrada como fraca (Figura 16).

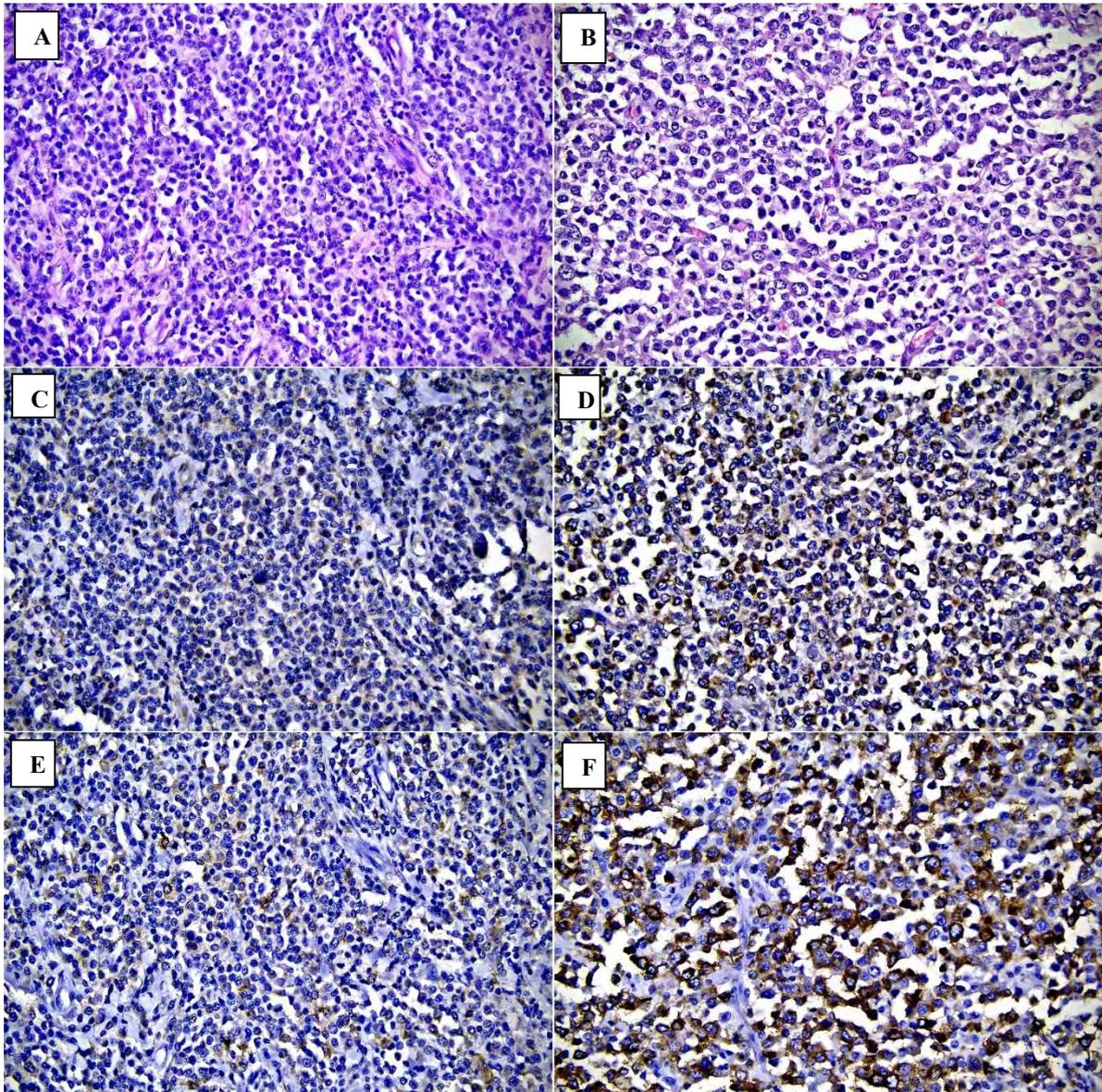


Figura 16. MCCs de alto grau comparação da intensidade de marcação do CD123 em duas amostras. Figuras A, C e E representam uma mesma amostra. A. Coloração H.E, obj.40; C. Fraca imunomarcção citoplasmática em mastócitos neoplásicos, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. E. Padrão de imunomarcção citoplasmático difuso (KIT III), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40. Figuras B, D e F representam uma mesma amostra. B. Coloração H.E, Obj.40. D. Imunomarcção citoplasmática muito forte em mastócitos neoplásicos, IHQ com polímero em reação de uma etapa, CD123 policlonal, obj.40. F. Padrão de imunomarcção citoplasmático difuso (KIT III), IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40.

No que se refere ao suporte estatístico para esse padrão de resultados, as regressões logísticas mostraram que a imunodeteção do CD123 foi positivamente relacionada com o alto Grau de Kiupel ($X^2(1) = 5,408$; $p = 0,020$; Figura 17). Em relação à intensidade de marcação (consistente ou fraca), a Tabela 1 apresenta um resumo da classificação dos dados, nos quais verificou-se que o alto Grau de Kiupel teve relação positiva com a intensidade de marcação ($X^2(1) = 18,054$; $p < 0,001$; Figura 18).

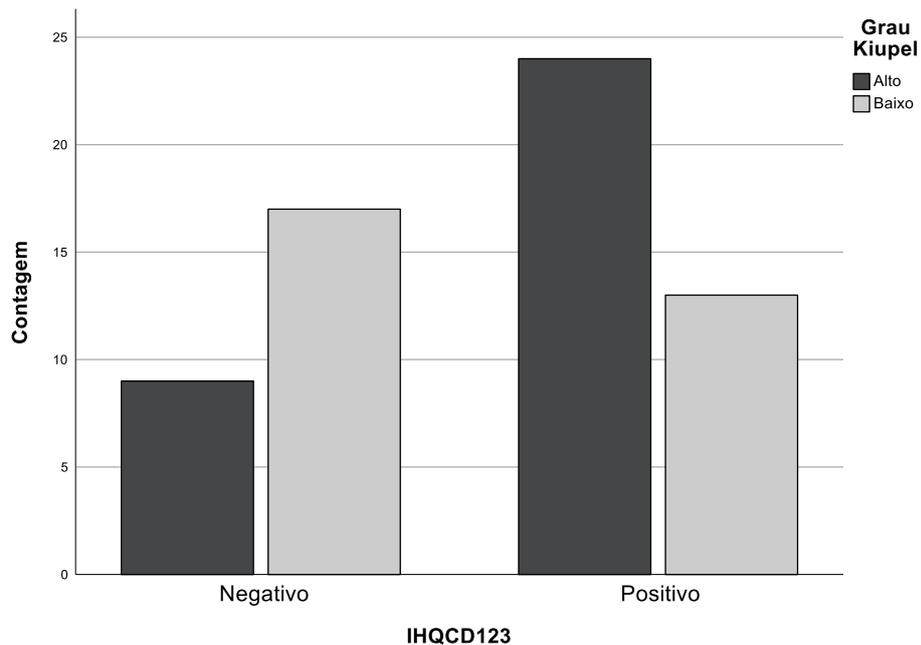


Figura 17. Contagem da imunodeteção do CD123 em relação ao Grau de Kiupel para MCCs. Uma análise de regressão logística binária verificou que a marcação por CD123 foi positivamente relacionada com o alto Grau de Kiupel ($X^2(1) = 5,408$; $p = 0,020$).

Tabela 1. Distribuição da frequência de marcação CD123 e Grau de Kiupel por categorias de classificação de intensidade (consistente e fraca) e de Grau (baixo e alto) para casos de MCCs.

| | | N | Porcentagem marginal |
|--------------|-------------|----|----------------------|
| IHQCD123 | Ausente | 26 | 41,3% |
| | Consistente | 29 | 46,0% |
| | Fraco | 8 | 12,7% |
| Grau Kiupel | Alto | 33 | 52,4% |
| | Baixo | 30 | 47,6% |
| Válido | | 63 | 100,0% |
| Omisso | | 0 | |
| Total | | 63 | |
| Subpopulação | | 2 | |

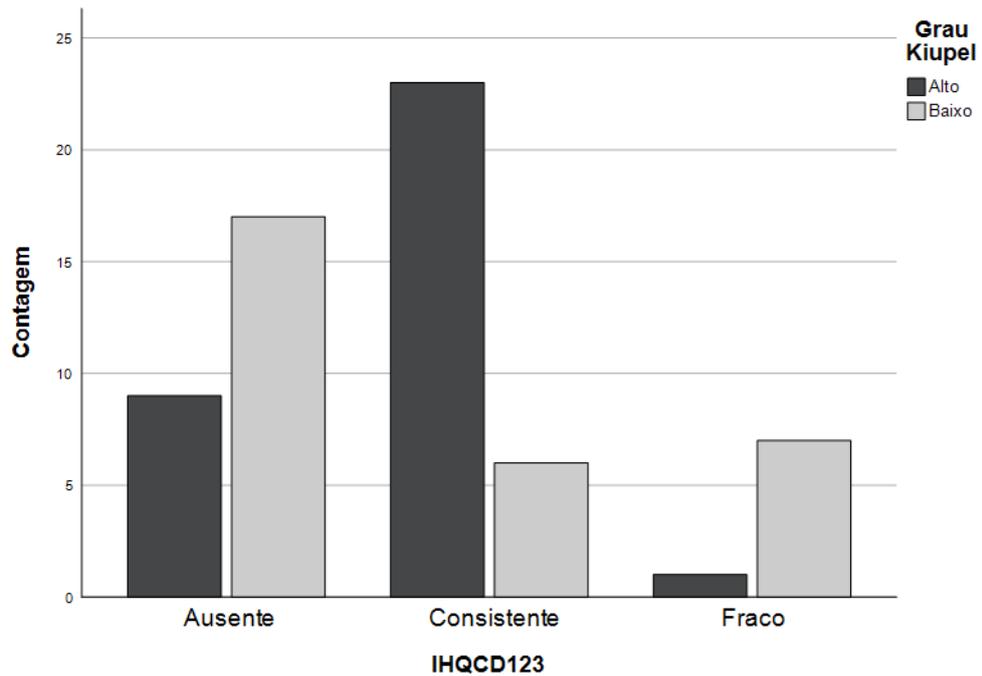


Figura 18. Contagem das imunomarcações por CD123 e Grau de Kiupel por categorias de classificação de intensidade (consistente e fraca) e de Grau (baixo e alto) para casos de MCCs. Uma análise de regressão logística multinomial verificou que a intensidade de marcação por CD123 foi positivamente relacionada com o alto Grau de Kiupel ($X^2(1) = 18,054$; $p < 0,001$).

4.5.2 KIT

Com relação ao padrão de marcação do KIT nos MCCs de baixo grau, 24/30 amostras apresentaram padrão I, 4/30 amostras apresentaram padrão II e 2/30 amostras apresentaram padrão III. Com relação ao padrão do KIT em MCCs de alto grau, 23/33 apresentaram padrão III, 9/33 apresentaram padrão II e 1/33 apresentou padrão I. As tabelas 2 e 3 mostram a relação das amostras com a marcação do KIT e do CD123 em MCCs classificados como baixo e alto grau, respectivamente.

Tabela 2. Relação de amostras de MCCs graduadas como baixo grau Kiupel com grau de Patnaik, padrão de marcação do KIT e imunodeteccção do CD123.

| ID | Grau Kiupel | Grau Patnaik | c-Kit | IHQ CD123 |
|-----------|-------------|--------------|-------|-------------|
| 35920A | Baixo | II | I | Ausente |
| 40449A | Baixo | II | I | Ausente |
| 35986B | Baixo | II | I | Ausente |
| 35985B | Baixo | II | I | Ausente |
| 38853J | Baixo | II | I | Ausente |
| 39528A | Baixo | II | I | Ausente |
| 40080A | Baixo | II | II | Consistente |
| 2106/22 | Baixo | II | I | Ausente |
| 908/23 | Baixo | II | III | Ausente |
| MAS313/21 | Baixo | II | II | Ausente |
| 40780C | Baixo | I | I | Ausente |
| 40750I | Baixo | II | II | Ausente |
| 40186A | Baixo | II | I | Fraco |
| 40207A | Baixo | II | II | Consistente |
| 40211F | Baixo | I | I | Consistente |
| 40212A | Baixo | II | III | Consistente |
| 38407C | Baixo | II | I | Ausente |
| 40689A | Baixo | II | I | Fraco |
| 40757A | Baixo | II | I | Fraco |
| 38491A | Baixo | II | I | Ausente |
| 40768A | Baixo | II | I | Fraco |
| 40206C | Baixo | II | I | Ausente |
| 40352A | Baixo | II | I | Fraco |
| 40426B | Baixo | II | I | Fraco |
| 40366A | Baixo | II | I | Fraco |
| 40562B | Baixo | II | I | Consistente |
| 38439B | Baixo | II | I | Consistente |
| 933/23 | Baixo | II | I | Ausente |
| 40914A | Baixo | II | I | Ausente |
| 41324E | Baixo | II | I | Ausente |

Tabela 3. Relação de amostras de MCCs graduadas como alto grau Kiupel com grau de Patnaik, padrão de marcação do KIT e imunodeteccção do CD123.

| ID | Grau Kiupel | Grau Patnaik | c-KIT | CD123 |
|------------|-------------|--------------|-------|-------------|
| 982/22 | Alto | III | III | Consistente |
| 1772/22 | Alto | II | II | Consistente |
| 612/23 | Alto | II | III | Consistente |
| 671/23 | Alto | II | III | Consistente |
| MAS 33/22 | Alto | III | III | Consistente |
| 1644/22 | Alto | III | II | Fraco |
| 1285/22 | Alto | III | III | Consistente |
| 1438/22A | Alto | III | III | Consistente |
| 1083/22 | Alto | II | III | Consistente |
| MAS 53/21 | Alto | II | III | Consistente |
| MAS 171/21 | Alto | II | II | Consistente |
| MAS358/22 | Alto | II | III | Ausente |
| MAS115/21 | Alto | II | II | Ausente |
| MAS 385/21 | Alto | III | III | Consistente |
| 2007/22 | Alto | II | II | Consistente |
| 1032/23 | Alto | II | II | Consistente |
| 1460/22 | Alto | II | III | Ausente |
| 1410/22 | Alto | III | III | Consistente |
| 1080/22 | Alto | III | III | Consistente |
| 592/23 | Alto | II | III | Ausente |
| MAS336/22 | Alto | II | III | Ausente |
| 38303A | Alto | II | II | Ausente |
| MAS90/21 | Alto | II | I | Ausente |
| 39713A | Alto | II | III | Consistente |
| 39473A | Alto | II | II | Consistente |
| 38497A | Alto | II | III | Consistente |
| MAS82/22 | Alto | II | III | Consistente |
| MAS398? | Alto | II | III | Ausente |
| MAS30/21 | Alto | II | III | Consistente |
| 2007/22* | Alto | II | II | Consistente |
| 448/22 | Alto | II | III | Consistente |
| MAS 237/21 | Alto | II | III | Ausente |
| MAS 39/21 | Alto | II | III | Consistente |

4.6 Diferenças de Resultados Obtidos nos Padrões do KIT por Métodos de Detecção Baseados em Polímero de Uma e Duas Etapas

Nas 6 amostras com padrão KIT I e nas 4 amostras com padrão KIT II previamente caracterizadas com sistema de detecção de polímero baseado em uma etapa, o resultado do padrão de marcação foi fortemente comprometido ao utilizar o método de detecção de duas etapas, o que favoreceu uma interpretação para o grau III dessas amostras. Nas amostras previamente caracterizadas como grau III o sistema de detecção baseado em duas etapas apenas acentuou a intensidade de marcação citoplasmática difusa, os dados dessas amostras estão discriminados no Quadro 12 e os resultados podem ser visualizados na Figura 19.

Quadro 12. Influência de métodos de detecção IHQ no padrão de visualização de imunomarcação do KIT.

| ID | KIT 1 etapa | KIT 2 etapas | KIT 2 etapas | Grau |
|----------|-------------|--------------|---|-------|
| 933/23 | I | III | Marcação de membrana com ruído citoplasmático considerável | baixo |
| 40757A | I | III | Marcação de membrana com ruído citoplasmático considerável | baixo |
| 40186A | I | III | Marcação de membrana com ruído citoplasmático considerável | baixo |
| 2106/22 | I | III | Marcação de membrana com ruído citoplasmático considerável | baixo |
| 40211F | I | III | Marcação de membrana com ruído citoplasmático considerável | baixo |
| 90/21 | I | III | Marcação de membrana com ruído citoplasmático considerável | alto |
| 1772/22 | II | III | Menor definição, marcação citoplasmática considerável com reforço da citoplasmática focal | alto |
| 2007/22 | II | III | Menor definição, marcação citoplasmática considerável com reforço da citoplasmática focal | alto |
| 40080A | II | III | Menor definição, marcação citoplasmática considerável com reforço da citoplasmática focal | baixo |
| 40207A | II | III | Menor definição, marcação citoplasmática considerável com reforço da citoplasmática focal | baixo |
| 1438/22A | III | III | Marcação citoplasmática difusa, demasiadamente forte | alto |
| 982/22 | III | III | Marcação citoplasmática difusa, demasiadamente forte | alto |
| 448/22 | III | III | Marcação citoplasmática difusa, demasiadamente forte | alto |
| 33/22 | III | III | Marcação citoplasmática difusa, demasiadamente forte | alto |

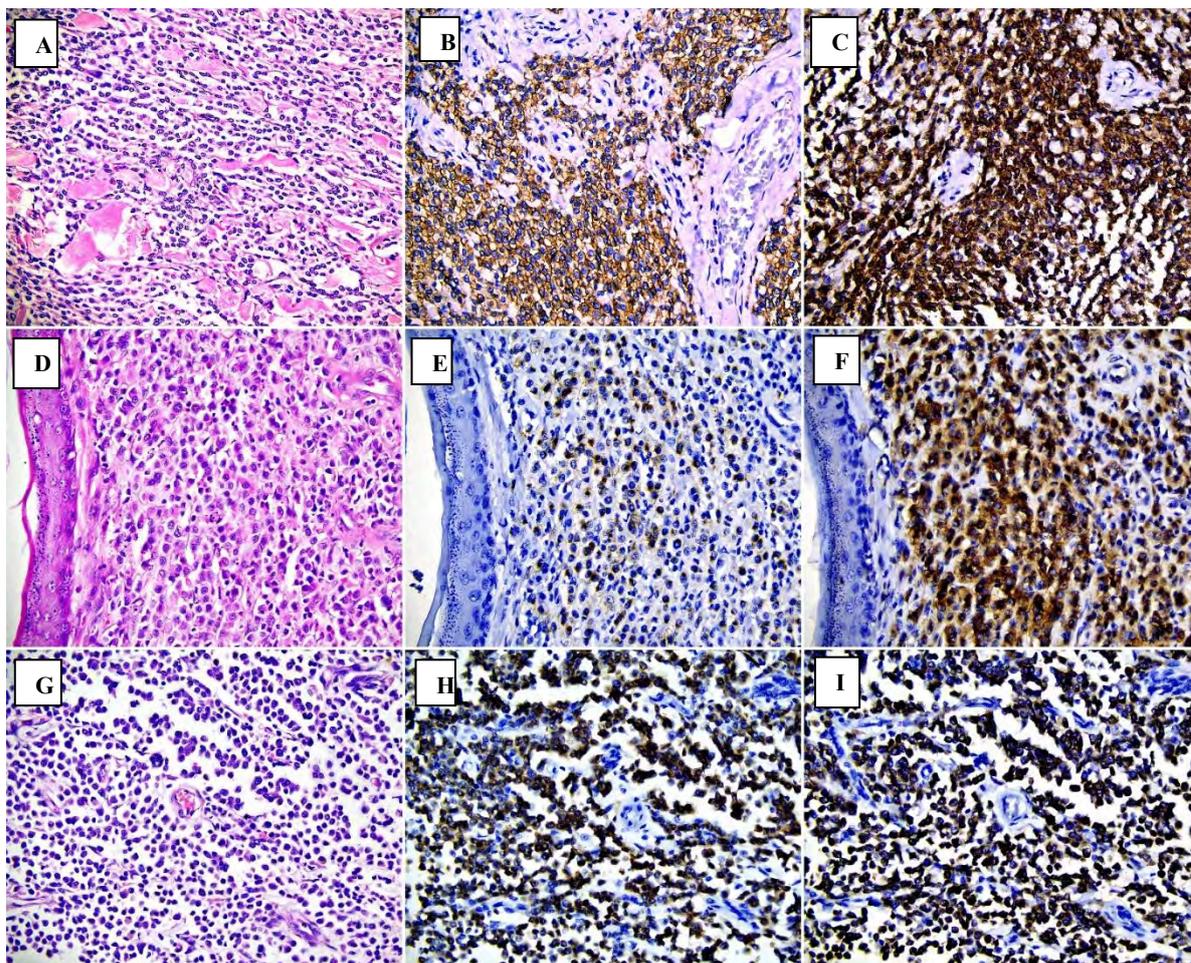


Figura 19. Padrão de imunodeteção do c-Kit baseado em sistemas de polímero de uma e duas etapas. A. MCC baixo grau, coloração H.E, obj.40 B. Mesma amostra com forte marcação membranosa, padrão Kit I, IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40. C. Mesma amostra com intensa marcação membranosa e citoplasmática difusa que pode ser interpretada como padrão KIT III, IHQ com polímero em reação de duas etapas, c-Kit policlonal, obj.40. D. MCC alto grau, coloração H.E, obj.40 E. Mesma amostra com marcação citoplasmática focal, padrão Kit II, IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40. F. Mesma amostra com intensa marcação citoplasmática difusa, com foco de marcação mais intensa, que pode ser interpretada como padrão KIT III, IHQ com polímero em reação de duas etapas, c-Kit policlonal, obj.40. G. MCC alto grau, coloração H.E, obj.40 H. Mesma amostra com forte marcação citoplasmática difusa, padrão Kit III, IHQ com polímero em reação de uma etapa, c-Kit policlonal, obj.40. I. Mesma amostra com marcação citoplasmática difusa mais intensa, padrão KIT III, IHQ com polímero em reação de duas etapas, c-Kit policlonal, obj.40.

5. DISCUSSÃO

A mediana da idade para os casos diagnosticados como MCCs de baixo e alto grau foram de 9 e 10 anos, respectivamente, e ao desconsiderar animais sem raça definida, as raças mais frequentemente acometidas foram Labrador, Golden Retriever e Pitbull para amostras graduadas como baixo grau e Labrador, Golden Retriever, Bulldog Francês, Dachshund e Schanauzer para amostras graduadas como alto grau, esses dados estão de acordo com a literatura na qual a maioria dos animais que apresentam MCCs estão na faixa etária dos 7-10 anos ou 11-16 anos, com MCCs de alto grau ocorrendo em animais de maior faixa etária. As raças mais frequentemente afetadas nesse estudo também foram as citadas na literatura (Warland; Dobson, 2013; Śmiech *et al.*, 2018), exceto a raça Pitbull, porém os artigos de referência têm seus dados amostrais na Polônia e Reino Unido, nesses países essa raça pode não ser tão popular como no Brasil. Essa raça também foi citada entre as mais frequentemente acometidas por MCCs na literatura nacional (De Nardi *et al.*, 2022), o que reforça a importância de estudos epidemiológicos nacionais.

Das 33 amostras graduadas como alto grau Kiupel, 25 foram graduadas como grau II e 8 como grau III Patnaik e, das 30 amostras graduadas como baixo grau Kiupel, foram graduadas 28 como grau II de Patnaik e apenas 2 foram graduadas como grau I (Patnaik *et al.*, 1984; Kiupel *et al.*, 2011). Esses dados estão de acordo com a literatura, e reforçam que o grau II de Patnaik representa a grande maioria dos casos, o que está relacionado a problemas com relevância prognóstica deste sistema de graduação em três níveis (Kiupel *et al.*, 2004) que justificou o surgimento do SK de graduação em apenas 2 níveis para diminuir o efeito dúbio do grau II Patnaik, além disso, o SK fornece critérios de graduação histológica objetivos (Kiupel *et al.*, 2011), o que justificou a escolha desse sistema de graduação para as correlações que envolveram graduação no presente estudo.

Das nossas 63 amostras, 25 (39,7%) apresentaram padrão KIT I de imunomarcção; destas, 24/30 eram de baixo grau e 1/33 de alto grau; igualmente, 25/63 (39,7%) amostras tiveram padrão de marcação KIT III, destas, 23/33 eram de alto grau e 2/30 de baixo grau e, uma menor parte dos MCC, 13/63 (20,6%) apresentaram padrão de imunomarcção com padrão KIT II, destes, 4/30 eram de baixo grau e 9/33 eram de alto grau. Nossos resultados divergem parcialmente dos verificados por Kiupel e colaboradores (2004) em um estudo com 98 casos de MCCs, no qual o padrão KIT II foi o mais comum 43/98 (43,9%) seguido praticamente na mesma proporção pelo padrão KIT I 42/98 (42,8%) e o padrão III, o menos frequente com 13/98 (13,3%) das amostras. Além da população amostral do estudo referenciado ser maior, possivelmente a população de MCCs era mais heterogênea em relação à graduação, tendo em vista que nossos casos foram selecionados de modo a representar a graduação porposta por

Kiupel e colaboradores (2011) e o estudo referenciado foi anterior à existência desse sistema de graduação.

Um outro trabalho que utilizou a mesma metodologia do estudo anterior para detecção do KIT, ou seja, o método LSAB, a partir de uma amostragem de 31 casos de MCCs, obteve uma maior proporção de casos padrão KIT III 17/31 (54,8%) (Preziosi *et al.*, 2004). É importante frisar, que apesar dos nossos resultados apresentarem uma proporção de padrão de imunomarcagem do KIT mais bem correlacionada ao esperado para MCCs de baixo e alto grau, nós utilizamos um sistema de detecção IHQ baseado em polímero de uma etapa, o que difere do método de detecção LSAB utilizado para as análises que validaram o padrão KIT como fator prognóstico complementar ao grau histológico para MCCs (Kiupel *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2006, 2007). Nesse sentido também é importante ressaltar que sete amostras que foram classificadas como padrão KIT III apresentaram uma padrão dúbio de marcação, tinham coloração citoplasmática focal forte sobreposta a uma marcação citoplasmática difusa; se esses casos fossem reclassificados para o padrão KIT II, este ainda não seria o padrão mais frequente em nossas amostras, seria o segundo mais frequente, com 20/63 (31,7%) e o padrão III seria o menos frequente com 18/63 (28,6%), com resultados mais próximos aos obtidos no estudo de referência (Kiupel *et al.*, 2004).

Considerando que à época em que o KIT foi associado ao prognóstico de MCCs, o método de detecção IHQ foi o LSAB, que a graduação de Kiupel ainda não estava disponível e que nossos casos foram selecionados com base na graduação de Kiupel e detectados com sistema de polímero, isso cria uma série de variáveis que podem influenciar nos resultados e impossibilitar a comparação entre estudos.

Um estudo com 49 amostras de MCCs de alto grau detectou o padrão KIT III na maioria das amostras 29/49 (59%) (Ribeiro *et al.*, 2022), resultado próximo ao nosso para MCCs classificados como alto grau em que 23/33 (69,7%) amostras apresentaram o padrão KIT III.

De modo geral, a literatura revela que em relação à imunodetecção do KIT os estudos utilizaram anticorpos diferentes, em concentrações diferentes e protocolos diferentes, o que torna difícil fazer comparações e que, considerando a importância e a frequência com que esse marcador é utilizado como fator prognóstico, é fortemente recomendada a padronização da técnica, de preferência, seguindo os critérios propostos por Kiupel e colaboradores (2004) (De Nardi *et al.*, 2022). Seria importante e necessário um estudo que verifique se há eventuais diferenças entre as técnicas de detecção IHQ LSAB e a baseada em polímero de uma etapa, visto que a técnica baseada em polímero é cada vez mais utilizada para pesquisa e diagnóstico atualmente. Por outro lado, a padronização universal da diluição de um anticorpo policlonal é pouco viável, uma vez que este tipo de anticorpo sofre variações inerentes à biologia do animal que o produz, interferindo na concentração, afinidade por epítopos distintos da proteína alvo e, por isso, deve ter sua padronização de diluição realizada a cada novo lote adquirido pelo laboratório (Lipman *et al.*, 2005; Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara *et al.*, 2008).

5.1 Padronização e Imunodetecção do CD123 em Tecidos Caninos

Na literatura Médico Veterinária, muito pouco ou nada há de consistente sobre a expressão e imunodetecção do CD123 em tecidos de animais domésticos. Esse fato se sustenta em menções na literatura, que apontam a necessidade de padronização de técnicas baseadas em imunodiagnóstico para detecção do CD123 em cães, onde a falta de um anticorpo anti-CD123 com reação documentada e comprovada na espécie, é apontada como um dos fatores limitantes para o diagnóstico mais acurado de subtipos de leucemias em cães (Stokol *et al.*, 2017) e também como um fator limitante a caracterização de subpopulações de células do sistema imunológico nessa espécie (Parys *et al.*, 2023).

O desenho do nosso protocolo de investigação com anticorpos anti-CD123 em tecidos controles caninos, comparados com controles correlatos humanos, envolveu etapas com

resultados que demonstraram maior segurança na imunomarcacão nesses controles, o que outros estudos negligenciaram ao investigar o CD123 em amostras caninas, tendo em vista que tal reacão antígeno-anticorpo ainda não foi validada em nenhum grau nessa espécie (Rebuzzi *et al.*, 2007; Rosolem *et al.*, 2015; Filley *et al.*, 2018). Independentemente dos resultados que esses estudos tiveram, sem uma caracterizacão de controles adequados para espécie canina, os dados obtidos podem não estar corretos ou serem irrelevantes, uma vez que, tanto a pretensa detecção ou não do antígeno, são resultados não suportados por um conhecimento comparativo em como esse antígeno se apresenta em populações celulares definidas na espécie.

Nesse sentido, ao utilizarmos dois sistemas de detecção IHQ distintos baseados em polímeros de duas etapas, ambos apresentaram reacão falso positiva nos linfonodos caninos, com forte coloração citoplasmática especificamente em grande número de plasmócitos, além do plasma sanguíneo e interstício. Isso sugere a hipótese de que o reagente utilizado como amplificador de detecção Mouse Link – Agilent® pode se ligar a anticorpos de cães. Quanto ao sistema de detecção Novolink – Leica® não temos uma hipótese para a reacão inespecífica, tendo em vista que, segundo a bula do produto, a primeira etapa do método pós anticorpo primário é baseada no uso de um anticorpo de coelho anti-camundongo somado e, a segunda etapa no uso de polímero conjugado com anticorpos anti-coelho e enzimas peroxidase (Leica Biosystems, 2015). Fato é, que ambos os kits de detecção baseados em 2 etapas produziram um resultado falso positivo com características de marcação inespecífica similares em plasmócitos, interstício e plasma, sugerindo ligacão inespecífica a antígenos caninos, presumidamente a imunoglobulinas.

Nossos resultados na avaliacaão da imunodetecção do CD123 em linfonodos caninos comparados com a marcação em controles linfoides humanos, demonstraram que o anticorpo anti-CD123 (6H6) não apresenta reatividade em tecidos caninos com o método de detecção baseado em polímero de uma etapa, entretanto, esse método de detecção também não foi capaz de detectar eficientemente o referido antígeno nos controles humanos, mesmo em baixa diluicão. Desse modo, inferimos que o CD123 é um antígeno de baixa expressão, ou que o epítopo alvo desse clone de anticorpo pode ser muito comprometido pelo processamento histológico que leva a possível desconfiguracão do epítopo alvo em grande quantidade e, por isso depende de métodos amplificadores fornecidos pelos polímeros de duas etapas, que não puderam ser utilizados em cães devido à reacão inespecífica nos controles. Por isso, é aconselhável que esse anticorpo monoclonal seja testado com outros kits de detecção baseado em polímeros ou micropolímeros que não apresentem reacões inespecíficas em amostras linfoides caninas, ou ainda com o método de detecção LSAB para confirmar se é um clone compatível ou não com o referido epítopo do CD123 em cães.

Um estudo que utilizou o mesmo clone de anticorpo (6H6) em amostras de sangue e gliomas caninos, relatou êxito na pretensa marcação de células dendríticas plasmocitoides por citometria de fluxo, entretanto, a própria bula do anticorpo referenciado no teste, informa que o antígeno alvo pode ser expresso por precursores mieloides, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, basófilos, megacariócitos e células dendríticas plasmocitoides humanas (Filley *et al.*, 2018). Esse estudo com citometria de fluxo, sem uma análise histológica da imunomarcacão com CD123, não necessariamente detectou as células alvo; em nossas amostras, com emprego de anticorpo CD123 policlonal, diversas células foram imunomarcadas, inclusive populações de eosinófilos.

É compreensível que o anticorpo monoclonal anti-CD123 (6H6) realmente não tenha reatividade com controles caninos (tonsilas palatinas e linfonodos) mesmo com o uso de outros métodos de detecção, uma vez que anticorpos monoclonais tem como alvo uma pequena sequência específica de aminoácidos (epítopo) da proteína alvo (Ramos-Vara, 2005). No que se refere ao CD123, o epítopo alvo do clone 6H6 para a proteína humana, pode estar fora da

identidade da proteína canina, tendo em vista que a homologia do gene que codifica o CD123 humano e canino é de 63% (Simpson, 2018).

A homologia do gene que codifica o CD123 canino está dentro do parâmetro mínimo para seleção e investigação de anticorpos para estudos translacionais que consideram um ponto de corte >60% de homologia com genes de camundongo correspondentes ao de humanos (Natalie; Simpson, 2018; Human Protein Atlas). No presente estudo, ao utilizar um anticorpo policlonal anti-CD123, detectamos imunocoloração de diferentes intensidades quase que ubíqua em uma variedade de órgãos normais e, em uma pequena variedade de neoplasias hematolinfoides caninas investigadas. Não encontramos na literatura trabalhos correlatos que demonstram essa ampla gama de tecidos humanos imunomarcados com CD123. Na literatura humana, o CD123 é relatado em progenitores linfóides B e mielóides, progenitores hematopoiéticos primitivos em geral, basófilos, eosinófilos, monócitos, algumas células endoteliais, osteoblastos e superexpresso por células dendríticas plasmocitoides (Testa *et al.*, 1996; Olweus *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999; Natalie; Simpson, 2018).

Por outro lado, o “The Human Protein Atlas” um programa sueco iniciado em 2003 com o objetivo de mapear o proteoma humano em células, tecidos e órgãos usando uma integração de várias tecnologias, detectou o CD123 através de imuno-histoquímica e RNAm em todos os 44 tecidos testados, caracterizando essa proteína como de baixa especificidade devido à expressão citoplasmática onipresente e a confiabilidade dos dados de IQH como incerta, necessitando de outros processos de validação (Human Protein Atlas). Nossos resultados demonstraram a imunocoloração de diversos tecidos caninos com o uso do anticorpo anti-CD123 policlonal, porém com padrão de marcação restrito a populações celulares, de modo compatível ao relatado no proteinatlas.org para humanos.

À semelhança de nossos resultados, o Human Protein Atlas registra a imunodeteção do CD123 a partir de dois anticorpos policlonais em encéfalo (mas não em hipocampo), mucosa do intestino delgado e plexo nervoso mioentérico, células glandulares do estômago, ductos biliares, células do brônquio (mas não as alveolares), células da zona glomerulosa da glândula adrenal, túbulos renais e células glomerulares, glândulas sudoríparas, ilhotas pancreáticas, vênulas do endotélio alto e fraca a moderada coloração do centro germinativo de linfonodos, esses resultados estão atrelados à verificação e detecção de RNAm para CD123 e são muito semelhantes ao que obtivemos nas amostras de tecidos caninos, exceto pela não detecção do antígeno em vênulas do endotélio alto de cães.

Curiosamente, o tagraxofusp-erz, um agente aprovado para o tratamento de neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas em adultos e em pacientes pediátricos com 2 anos ou mais, que foi projetado para ter efeito sobre células que expressam o CD123, possui efeitos adversos como distúrbios vasculares, gastrointestinais, sinais de hipersensibilidade respiratória, cutânea, oral e ocular, hepatotoxicidade, elevação dos níveis de glicose, queda nos níveis de sódio e cálcio séricos. Além disso, na fase de estudos pré-clínicos demonstrou-se neurotoxicidade e nefrotoxicidade com necrose e degeneração do plexo coroide e tubular cortical grave em macacos cynomolgus que receberam a dose 1.6 vezes maior que a estabelecida para uso humano (Stemline®, 2018). Esses efeitos locais ou sistêmicos, além de indiretos, ou seja, não relacionados à ação da droga em receptores de IL3, presumivelmente com base em nossos achados e no relatado no banco de dados do proteoma humano, poderiam estar associados à expressão de fato ubíqua do CD123. Fato que não desqualifica de forma alguma os resultados clínicos obtidos com o referido medicamento, que tem como alvo células malignas que superexpressam o receptor de IL3, mas que corrobora com nossos resultados e o reportado no banco de dados do atlas do proteoma humano (Human Protein Atlas), que divergem parcialmente do que está validado para o CD123 na literatura que menciona uma expressão mais restrita a certas linhagens celulares hematolinfoides (Moretti *et al.*, 2001; AL Hussaini *et al.*, 2013).

Das populações celulares imunomarcadas em órgãos caninos em nosso estudo, observamos que os plexos nervosos mioentérico e submucoso marcam intensamente com o CD123, porém neurônios do córtex cerebelar, hipocampo e córtex cerebral não demonstraram marcação. Caso essa imunomarcção seja específica para subunidade alvo que compõe o receptor de interleucina 3, isso pode ser investigado como mais um dos possíveis fatores envolvidos na regulação do sistema imune pelo sistema nervoso, especialmente o sistema nervoso gastrointestinal que parece ter uma complexa rede de interação com o sistema imune (Populin *et al.*, 2021).

Como demonstrado, houve marcações com intensidade diferente entre grupos celulares no mesmo órgão, por exemplo, no córtex adrenal, a zona glomerulosa teve uma imunomarcção membranosa citoplasmática muito forte e as zona fascicular e reticular marcaram fracamente ou tiveram células não imunocoradas, assim como ocorreu no linfonodo com forte marcação membranosa/citoplasmática de grupos de células interfoliculares, em zona paracortical e raras células em cordões medulares e, uma marcação fraca em outros grupos celulares e centrofolicular, num padrão semelhante ao controle humano. Inferimos que as células com imunomarcção forte de fato expressam o CD123 e que a fraca marcação citoplasmática pode ser um falso positivo, devido ao fato que anticorpos policlonais são heterogêneos e reconhecem uma série de epítomos antigênicos da proteína alvo, isso implica na maior probabilidade de alguns anticorpos reagirem com epítomos similares de outras proteínas, levando a reação de fundo ou falsos positivos (Ramos-Vara, 2005).

Com relação ao pequeno grupo de neoplasias que testamos em cores de TMA aproveitados de um estudo anterior, nossos resultados indicam que o CD123 policlonal parece marcar uma variedade de neoplasias de origem hematolinfóide, com marcação fraca a moderada na maioria dos plasmocitomas e histiocitomas caninos e supermarcação de MCCs de alto grau (1/2) e de sarcomas histiocíticos (2/2), o que vai de encontro com a literatura que relata superexpressão do CD123 em malignidades linfoematopoiéticas (Testa *et al.*, 2014; 2019; Pelosi *et al.*, 2023) inclusive parte dos casos de mastocitose humana (Pardani *et al.*, 2016; Matsumoto *et al.*, 2022), com potencial valor prognóstico e terapêutico (Pelosi *et al.*, 2023). Desse modo, outros estudos devem ser realizados com amostragens maiores para detecção do CD123 em neoplasias caninas, sobretudo, as malignas no intuito de verificar seu potencial uso como biomarcador útil ao prognóstico e até mesmo alvo terapêutico.

Infelizmente, são escassos os anticorpos especificamente desenvolvidos para animais de companhia, e por isso, é extremamente recorrente o uso de anticorpos anti-proteínas humanas na Medicina Veterinária. Desse modo, é natural e lógico que estudos iniciais em animais sejam realizados com anticorpos policlonais desenvolvidos para humanos (Ramos-Vara *et al.*, 2008).

Por fim, cabe ressaltar que esse estudo padroniza um protocolo para utilização de um anticorpo anti-CD123 policlonal em tecidos caninos após uma série de testes em controles linfóides humanos e de cães com a observação do padrão de distribuição de populações celulares compatíveis entre as espécies e apontando efeitos de falsos positivos associados a métodos de detecção em tecidos linfóides. Novos estudos são necessários para fortalecer que a imunomarcção do CD123 ocorreu de maneira específica, o que pode ser feito através da tentativa de imunomarcção com dois anticorpos monoclonais distintos demonstrando o mesmo padrão de marcação, RT-PCR para detecção de RNAm codificante pra CD123 como um método independente de anticorpo em amostras imunocoradas, Western Blot para verificar a compatibilidade do peso molecular de proteínas imunocoradas com o CD123 em amostras caninas e controles de absorção de antígeno. Quanto mais etapas de validação forem feitas, maior o grau de confiança da imunocoloração, pois cada uma dessas técnicas possui ressalvas para correlação com o resultado de IHQ. A carência de etapas de validação de anticorpos para diagnóstico também é um problema enfrentado até mesmo na Medicina Humana (Caswell *et al.*, 2018; Webster *et al.*, 2021).

5.2 Imunodeteção do CD123 em MCCs de Baixo e Alto Grau

Neste estudo, descreve-se a imunomarcção com anticorpo policlonal anti-CD123 em 37/63 (58,7%) MCCs. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de imunomarcção do CD123 em MCCs. Esse resultado é similar ao verificado para casos de mastocitoses humanas, em que 37/58 amostras (64%) foram imunopositivas para CD123 (Pardanani *et al.*, 2016), e de sarcomas de mastócitos, um subtipo de mastocitose muito raro em humanos, com imunomarcção de 50% dos casos com CD123 (Matsumoto *et al.*, 2022).

Nossa análise demonstrou que a imunodeteção do CD123 está associada ao alto grau Kiupel, e que o Grau Kiupel influencia na intensidade de marcação; amostras de alto grau foram significativamente relacionadas à imunomarcção consistente das células neoplásicas (intensidade de marcação moderada, forte ou muito forte). Nesse sentido é importante levar em consideração que o CD123 além de ser expresso em um variedade de células normais como progenitores mieloides e linfoides (Muñoz *et al.*, 2001), células dendríticas plasmocitoides e mieloides (Willmann; Dunne, 2000), basófilos (Han *et al.*, 2008), monócitos (Elliott *et al.*, 1989), eosinófilos (Sun *et al.*, 1996), algumas células endoteliais (Korpelainen *et al.*, 1995) e osteoblastos (Barhanpurkar *et al.*, 2012), ele é superexpresso em algumas malignidades linfematomoiéticas humanas, inclusive parte das mastocitoses (Testa *et al.*, 2014; Testa *et al.*, 2019; Pelosi *et al.*, 2023).

Por outro lado, apesar de termos feito estudos com controles caninos e humanos com resultados observacionais que indicou compatibilidade do padrão de imunomarcção entre as espécies a partir de anticorpos mono e policlonais (**item 5.1**), temos que levar em consideração que o resultado obtido nesse estudo com o anticorpo policlonal tem maiores chances de ter imunomarcções inespecíficas, devido à inerente presença de anticorpos com afinidades distintas que reconhecem múltiplos epítomos independentes e, portanto têm maiores chances de se ligarem a epítomos correlatos fora da proteína alvo (Lipman *et al.*, 2005), desse modo inferimos que as marcações consistentes são mais prováveis de serem verdadeiras e as marcações classificadas como fracas tem maiores chances de serem falso positivos, o que associaria ainda mais a imunomarcção com CD123 ao grau histológico mais elevado.

Apesar dos nossos resultados apontarem um possível fator prognóstico auxiliar a ser explorado para MCCs, com potencial para minimizar lacunas prognósticas associadas a um subconjunto dessas neoplasias que não se comporta como previsto, tendo em vista que nenhuma graduação histológica ou biomarcador atual pode prever com precisão o comportamento de todos os MCCs (Vascellari *et al.*, 2013; Sabattini *et al.*, 2015), esses resultados precisam ser validados em estudos com parâmetros de acompanhamento clínico ligados à sobrevida e/ou recidiva para serem melhor interpretados quanto ao valor prognóstico, tendo em vista que a imunomarcção consistente ocorreu em 6/30 (20%) MCCs de baixo grau e em 23/33 (69,7%) dos MCCs de alto grau.

Um estudo indicou que a IL3 exerce papel modulador em mastócitos murinos, na diferenciação e na sobrevivência dessas células, que são essencialmente controladas por duas citocinas: o fator de células tronco/mastócitos ligante do KIT e a IL3 (Eklund *et al.*, 1994). Por outro lado, outro estudo apontou que a falta do KIT resulta em deficiência de mastócitos murinos in vivo e que a IL3 não é necessária para a homeostase dos mastócitos, entretanto, camundongos deficientes em IL3 não conseguem proliferar mastócitos após estímulos patogênicos (Lantz *et al.*, 1998). Nesse sentido, também seria importante investigar se os casos positivos para CD123 estão correlacionados a maiores índices do Ki67, um biomarcador indicador de células em ciclo celular, visto que a IL3 pode ter um papel no estímulo a proliferação e sobrevivência celular (Webster *et al.*, 2007).

O resultado negativo do CD123 monoclonal (6H6) nas 5 amostras fortemente imunomarcadas com o antiorpo anti-CD123 policlonal não invalida o referido clone como compatível com o epítomo alvo em cães, tendo em vista que nos controles humanos ele só

mostrou imunomarcção com o método de detecção IHQ baseado em duas etapas, que não utilizamos em nossas amostras, devido aos resultados falsos positivos associados a esse método de detecção nos controles linfóides caninos. Há relato na literatura veterinária da detecção deste antígeno com o mesmo clone de anticorpo em amostras de sangue periférico canino através da citometria de fluxo (Filley *et al.*, 2018), um método sensível, que tem a vantagem de não comprometer o antígeno com processos agressivos de fixação e processamento histológico como ocorre na imuno-histoquímica. Anticorpos monoclonais têm como alvo um único epítipo e esses métodos mais agressivos podem mudar a conformação proteica comprometendo o epítipo alvo (Lipman *et al.*, 2005; Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara *et al.*, 2008; Ramos-Vara; Miller, 2014). Por outro lado, o impacto da mudança conformacional da proteína alvo é menos relevante quando se utilizam anticorpos policlonais, porque eles reconhecem múltiplos epítipos, e as alterações conformacionais associadas à fase pré-analítica podem não influenciar todos os epítipos no mesmo grau, garantindo a imunomarcção (Lipman *et al.*, 2005). Não obstante, outros dois anticorpos monoclonais anti-CD123 (7G3 e 9F5) não demonstraram reação numa amostragem de 18 mastocitomas caninos com o emprego de citometria de fluxo (Rebuzzi *et al.*, 2007).

No contexto dos nossos resultados, apesar de recomendar cautela na imunomarcção que deve ser validada com outros estudos e métodos, acreditamos que o CD123 pode ser um potencial marcador prognóstico para MCCs, além de potencial alvo terapêutico. Na medicina humana o CD123 vem sendo extensivamente estudado no desenvolvimento de diversos tipos de tratamento para neoplasias hematolinfóides que superexpressam esse antígeno (Patnaik *et al.*, 2021; Lambie *et al.*, 2022; Pelosi *et al.*, 2023). Um medicamento já aprovado pelo FDA nos EUA, o Tagraxofusp (Elzonris®), pode ser utilizado para o tratamento de neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas em adultos e pacientes pediátricos a partir de 2 anos de idade que expressem o CD123. O tagraxofusp é uma proteína de fusão recombinante que consiste em IL3 fundida com uma carga de toxina diftérica truncada/incompleta (Luskin, Lane, 2023). Todavia, como o grau de homologia entre os genes que codificam o CD123 humano e canino é de 63% e a IL3 humana não demonstrou atividade em ratos que possuem uma homologia de 65%. Infere-se que esse agente não pode ser usado na espécie canina (Natalie; Simpson, 2018), por isso faz-se necessário o desenvolvimento de experimentos voltados especificamente para cães no que tange os anticorpos anti-CD123 e IL3, uma vez que homem e animal podem beneficiar-se de descobertas correlatas voltadas ao tratamento direcionado a esse antígeno expresso em determinados cânceres.

5.3 Diferenças de Resultados Obtidos nos Padrões do KIT por Métodos de Detecção Baseados em Polímero de Uma e Duas Etapas

Assim como citado por Walker, 2006, acreditamos que a padronização de protocolos de imuno-histoquímica emerge como um imperativo incontornável na vanguarda da pesquisa e do diagnóstico, imbuída da essência da precisão e reprodutibilidade é a espinha dorsal sobre a qual repousam os avanços fundamentais em campos diversos da medicina, sobretudo diagnóstica e prognóstica e, mais recentemente para triagem de alvos terapêuticos.

Nesse sentido, demonstramos que a mudança no método de detecção IHQ baseado em polímero em uma etapa, para polímero baseado em duas etapas pós anticorpo primário, comprometeu muito o resultado do padrão de marcação do KIT ao transformar os 6 casos testados imunomarcados como padrão KIT I e os 4 casos imunomarcados como padrão KIT II para um padrão KIT III. Isso ocorreu mesmo com o aumento da diluição do anticorpo primário para o método de detecção em duas etapas. Esse fato é preocupante, tendo em vista que o KIT é um dos principais marcadores prognósticos auxiliares para MCCs e esta é a neoplasia de pele maligna de maior incidência em cães (De Nardi *et al.*, 2022).

O anticorpo anti-c-Kit utilizado nos trabalhos de validação prognóstica para MCCs foi o policlonal de coelho, o mesmo recomendado na literatura veterinária atual (De Nardi *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2022). Entretanto, o método de detecção utilizado nos trabalhos que validaram o padrão de imunomarcacão com esse anticorpo e que, portanto, validou seu significado prognóstico foi o LSAB (Kiupel *et al.*, 2004; Preziosi *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2007).

Nesse sentido, há incontestável necessidade de validação de anticorpos primários de uso na medicina veterinária (Ramos-Vara *et al.*, 2008), porém, a confiabilidade dos resultados obtidos através da IHQ é dependente da meticulosa harmonização de procedimentos, desde a seleção do anticorpo primário, qualidade da amostra, recuperação antigênica a sistemas de detecção (Walker, 2006; Lipman *et al.*, 2005; Ramos-Vara, 2005; Vara; Miller, 2014; Caswell *et al.*, 2018; Ramos- Sivertsson *et al.*, 2020). Não vimos na literatura veterinária a mesma preocupação quanto aos sistemas de detecção IHQ, que afinal, também são baseados no uso de anticorpos, mas isso se deva talvez pelo simples fato do controle negativo das amostras geralmente basear-se na omissão do anticorpo primário na maioria dos estudos. O que em tese representa o controle negativo do anticorpo secundário e, portanto, do sistema de detecção (Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara *et al.*, 2008; Ramos-Vara; Miller, 2014).

Cientes disso, utilizamos um sistema de detecção baseado em polímero de uma e duas etapas pós anticorpo primário, que destoa do protocolo original publicado com método LSAB (Kiupel *et al.*, 2004; Preziosi *et al.*, 2004). Ao utilizarmos o sistema de detecção baseado em polímero de uma etapa obtivemos resultados de padrão de imunomarcacão do KIT compatíveis com os relatados para a detecção com o método LSAB, que na literatura veterinária têm resultados diferentes de frequência, sobretudo entre os padrões II e III (Kiupel *et al.*, 2004; Preziosi *et al.*, 2004).

Concluimos que o sistema de detecção baseado em duas etapas, que é reconhecidamente mais sensível (Leica Biosystems, 2015; Agilent Dako, 2022), amplifica a reação de detecção antígeno-anticorpo ao ponto de obter-se imunomarcacão citoplasmática difusa em todas as amostras previamente classificadas como padrão I ou II com o método de detecção baseado em uma etapa. Nesse sentido é importante ressaltar que a imunodetecção do KIT em MCCs não carece de sensibilidade de detecção, pois normalmente todas as amostras testadas para a diluição do anticorpo primário, padronizada nos referidos estudos, foram imunocoradas (Kiupel *et al.*, 2004; Preziosi *et al.*, 2004) e, o que se almeja é o padrão de imunodetecção dessa proteína distribuída nos componentes/compartimentos celulares que está associado ao prognóstico, não a sua mera detecção.

Devido à inconstância entre lotes de anticorpos policlonais quanto à concentração, especificidade e afinidade (Lipman *et al.*, 2005; Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara *et al.*, 2008) somada a outras variáveis em protocolos, como estabelecimento da diluição ótima (que sempre deve ser realizada para cada lote de anticorpo policlonal), método de recuperação antigênica e outras etapas com suas soluções utilizadas (Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara *et al.*, 2008; Walker, 2006), demonstramos que o método de detecção pode influenciar o resultado do padrão de imunomarcacão do KIT.

O problema de padronização na IHQ do KIT já foi apontado em uma extensa revisão sobre MCCs, que verificou que os estudos utilizaram anticorpos diferentes, em concentrações diferentes e protocolos diferentes, que podem comprometer o valor prognóstico desse marcador. Dessa forma, é fortemente recomendada a padronização da técnica de preferência seguindo os critérios propostos por Kiupel e colaboradores (2004) (De Nardi *et al.*, 2022).

Devido essa soma de variáveis, recomendamos que para maior confiança com o que foi verificado como valor prognóstico para a imunodetecção do KIT em MCCs (Kiupel *et al.*, 2004; Preziosi *et al.*, 2004) e a prevalência de novos métodos de detecção, que esses sejam comparados com o método LSAB para validação e, a depender do resultado, se for 100%

compatível, que sejam validados mas, se apresentarem resultados distintos no padrão de imunodeteção, que haja um novo estudo abordando qual resultado está melhor associado ao prognóstico.

De antemão, o método de detecção baseado em polímero de uma etapa parece vantajoso para validação, visto que o método de duas etapas alterou todas as amostras testadas, mesmo com uma diluição maior do anticorpo primário. O aumento de sensibilidade promovido pelo método de detecção de duas etapas parece indesejável no caso da imunomarcação do padrão KIT com o emprego do anticorpo policlonal. Além disso, deve-se levar em consideração que o uso de anticorpo policlonal infere uma variável constante na diluição adequada entre lotes e, caso haja uma diluição adequada para sistema de duas etapas que não testamos (superior a 1:600) ela sempre deverá ser comparada em controles com padrões I e II testados por sistemas menos sensíveis, e, por ora, o mais indicado é o LSAB, devido a sua utilização nos trabalhos que validaram o referido padrão associado ao prognóstico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados de imunocoloração do CD123 policlonal com método de detecção baseado em polímero de uma etapa em controles caninos possuem uma compatibilidade parcial (devido a não imunodeteção do antígeno em vênulas do endotélio alto de cães) de distribuição de imunocoloração com os controles humanos imunocorados com CD123 mono e policlonal.

Esse protocolo de imunocoloração fornece uma evidência de marcação da proteína alvo em questão, mas dentre os critérios estabelecidos para validação de anticorpos é ainda insuficiente e depende de outros níveis de validação.

Não houve marcação com CD123 monoclonal (6H6) nas amostras controle de cães e, isso pode não ter significado relevante, tendo em vista que anticorpos monoclonais se ligam apenas a uma pequena porção de um epítopo alvo que pode estar modificado devido à fixação e processamento histológico ou simplesmente não estar na proteína canina, visto que o grau de homologia do gene que codifica o CD123 canino é de 63% com a do homem.

Novos estudos com outros métodos de validação para o CD123 em cães se fazem necessários e os resultados aqui apresentados com relação a esse biomarcador devem ser interpretados com cautela. Caso esses resultados sejam específicos, o CD123 tem grande potencial de relevância prognóstica, pois está significativamente associado ao grau histológico mais agressivo e é possível que ele consiga dar valor prognóstico para casos de baixo grau com comportamento agressivo.

O CD123 tem potencial de se tornar um marcador usado na medicina veterinária por unir quatro características de relevância: potencial marcador prognóstico para MCCs e outras malignidades, potencial marcador diagnóstico (leucemias), potencial alvo terapêutico com muitos estudos avançados já direcionados a esse biomarcador e conexão com a filosofia One Health, uma vez que homem e animal podem se beneficiar de descobertas correlatas voltadas ao tratamento direcionado a esse antígeno.

O uso de amplificador altera o padrão de marcação do KIT, transformando os padrões I e II em padrão III, por isso ou deve-se evitar o uso de amplificador ou estabelecer um protocolo de diluição ótimo a fim de evitar essa alteração indesejada na marcação de relevância prognóstica, porém como se trata de um anticorpo primário policlonal que está suscetível à variação de concentração e afinidade de acordo com lote, não é aconselhável incluir mais uma variável no método de IHQ para maior segurança de resultados entre laboratórios/pesquisas para esse marcador.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGILENT DAKO. **General Instructions For Immunohistochemical Staining**. Singapore : [s. n.], 2022.
- AL HUSSAINI, M. H. *et al.* Targeting CD123 In Leukemic Stem Cells Using Dual Affinity Re-Targeting Molecules (DARTs®). **Blood**, [s. l.], v. 122, n. 21, 2013.
- ALDERSON, R. F. *et al.* Combinatorial Anti-Tumor Activity in Animal Models of a Novel CD123 x CD3 Bispecific Dart® Molecule (MGD024) with Cytarabine, Venetoclax or Azacitidine Supports Combination Therapy in Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 138, n. Supplement 1, 2021.
- AL-HUSSAINI, M. *et al.* Targeting CD123 in acute myeloid leukemia using a T-cCell-Directed dual-Affinity retargeting platform. **Blood**, [s. l.], v. 127, n. 1, 2016.
- APPEL, K.; HONEGGER, P.; GEBICKE-HAERTER, P. J. Expression of interleukin-3 and tumor necrosis factor- β mRNAs in cultured microglia. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 60, n. 1–2, 1995.
- ARAI, N. *et al.* Impact of CD123 expression, analyzed by immunohistochemistry, on clinical outcomes in patients with acute myeloid leukemia. **International Journal of Hematology**, [s. l.], v. 109, n. 5, 2019.
- ARBER, D. A.; TAMAYO, R.; WEISS, L. M. Paraffin section detection of the c-kit gene product (cd117) in human tissues: Value in the diagnosis of mast cell disorders. **Human Pathology**, [s. l.], v. 29, n. 5, 1998.
- BARHANPURKAR, A. P. *et al.* IL-3 promotes osteoblast differentiation and bone formation in human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 418, n. 4, 2012.
- BELLAMY, E.; BERLATO, D. **Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours: a narrative review**. [S. l.: s. n.], 2022.
- BÉNARD, A. *et al.* Interleukin-3 is a predictive marker for severity and outcome during SARS-CoV-2 infections. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021.
- BERLATO, D. *et al.* **Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group**. [S. l.: s. n.], 2021.
- BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, [s. l.], v. 14, n. 1, 1973.
- BOYIADZIS, M. *et al.* First-in-human study of JNJ-63709178, a CD123/CD3 targeting antibody, in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. **Clinical and Translational Science**, [s. l.], v. 16, n. 3, 2023.

- BROCKS, B. A. W. *et al.* Internal Tandem Duplication of Exon 8 of c-kit Is Associated With Longer Total Survival in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 58, n. 2, 2021.
- BROUGHTON, S. E. *et al.* The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: From ligand recognition to initiation of signaling. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 250, n. 1, 2012.
- CASWELL, J. L. *et al.* **Observational Study Design in Veterinary Pathology, Part 2: Methodology**. [S. l.: s. n.], 2018.
- CINO, M. *et al.* Ki67 Index in Patnaik Grade 2/Kiupel Low-Grade Canine Cutaneous Mast Cell Tumors with Early Lymph Node Metastasis: A Descriptive Study. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2023.
- COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y. J. **Plasmacytoid dendritic cells in immunity**. [S. l.: s. n.], 2004.
- DE NARDI, A. B. *et al.* Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2022.
- DENZEL, A. *et al.* Basophils enhance immunological memory responses. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2008.
- DIDICHENKO, S. A. *et al.* IL-3 induces a Pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. **Blood**, [s. l.], v. 112, n. 10, 2008.
- DOWNING, S. *et al.* Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 63, n. 12, 2002.
- DRUBE, S. *et al.* Interleukin-3 stabilizes CD124/IL-4 α surface expression in mast cells via Tyk2 and STAT6. **Immunology**, [s. l.], v. 169, n. 1, 2023.
- EKLUND, K. K. *et al.* Mouse bone marrow-derived mast cells (mBMMC) obtained in vitro from mice that are mast cell-deficient in vivo express the same panel of granule proteases as mBMMC and serosal mast cells from their normal littermates. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 180, n. 1, 1994.
- EL ACHI, H. *et al.* CD123 as a biomarker in hematolymphoid malignancies: Principles of detection and targeted therapies. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 11, 2020.
- ELLIOTT, M. J. *et al.* IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate two distinct phases of adhesion in human monocytes. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 145, n. 1, 1990.
- ELLIOTT, M. J. *et al.* Recombinant human interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor show common biological effects and binding characteristics on human monocytes. **Blood**, [s. l.], v. 74, n. 7, 1989.
- FILLEY, A. *et al.* Immunologic and gene expression profiles of spontaneous canine oligodendrogliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 137, n. 3, 2018.

- FROST, D.; LASOTA, J.; MIETTINEN, M. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: A histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 1, 2003.
- GEBICKE-HAERTER, P. J. *et al.* Rat microglial interleukin-3. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 50, n. 2, 1994.
- GIBSON, P. C.; COOPER, K. CD117 (KIT): A diverse protein with selective applications in surgical pathology. **Advances in Anatomic Pathology**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2002.
- GONZALEZ, L. A. Regressão logística e suas aplicações. **TCC (Monografia)** – Curso de Graduação em Ciência da Computação, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Maranhão. São Luís, p. 45. 2018.
- GORMAN, D. M. *et al.* Cloning and expression of a gene encoding an interleukin 3 receptor-like protein: Identification of another member of the cytokine receptor gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 87, n. 14, 1990.
- HAN, X. *et al.* Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 132, n. 5, 2008.
- HORTA, R. S. *et al.* Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 55, n. 2, 2018.
- HUANG, S. *et al.* Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues. **Stem Cells**, [s. l.], v. 17, n. 5, 1999.
- ITOH, N. *et al.* Cloning of an interleukin-3 receptor gene: A member of a distinct receptor gene family. **Science**, [s. l.], v. 247, n. 4940, 1990.
- KANG, H. *et al.* Updated results from a phase 2 study of the oral vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) inhibitor rivoceranib for recurrent or metastatic (R/M) adenoid cystic carcinoma (ACC). **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 41, n. 16_suppl, 2023.
- KITA, H. *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 174, n. 3, 1991.
- KITAMURA, Y.; HIROTA, S. **Kit as a human oncogenic tyrosine kinase**. [S. l.: s. n.], 2004.
- KITAMURA, T.; MIYAJIMA, A. Functional reconstitution of the human interleukin-3 receptor. **Blood**, [s. l.], v. 80, n. 1, 1992.
- KIUPEL, M. *et al.* Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, 2011.
- KIUPEL, M. *et al.* The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 41, n. 4, 2004.

- KLEIN, B. K. *et al.* The receptor binding site of human interleukin-3 defined by mutagenesis and molecular modeling. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 272, n. 36, 1997.
- KORPELAINEN, E. I. *et al.* Interferon- γ upregulates interleukin-3 (IL-3) receptor expression in human endothelial cells and synergizes with IL-3 in stimulating major histocompatibility complex class II expression and cytokine production. **Blood**, [s. l.], v. 86, n. 1, 1995.
- KURIBARA, R. *et al.* Two Distinct Interleukin-3-Mediated Signal Pathways, Ras-NFIL3 (E4BP4) and Bcl-x L , Regulate the Survival of Murine Pro-B Lymphocytes . **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 19, n. 4, 1999.
- LAMBLE, A. J. *et al.* Safety and Activity of Flotetuzumab in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: Results from the COG PEPN1812 Phase 1 Trial. **Blood**, [s. l.], v. 140, n. Supplement 1, 2022.
- LANTZ, C. S. *et al.* Role for interleukin-3 in mast cell and basophil development and in immunity to parasites. **Nature**, [s. l.], v. 392, n. 6671, 1998.
- LEICA BIOSYSTEMS. **Novolink™ Polymer Detection Systems**. Newcastle: [s. n.], 2015.
- LETARD, S. *et al.* Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 6, n. 7, 2008.
- LIPMAN, N. S. *et al.* **Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources**. [S. l.: s. n.], 2005.
- LIU, L. *et al.* CD123 Directed IgM Antibody-based T-cell Engager, IGM-2537, Demonstrates Potent in vitro and in vivo Activity with Minimal Cytokine Release. **Blood**, [s. l.], v. 140, n. Supplement 1, 2022.
- LONDON, C. A. *et al.* Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 115, n. 4, 1996.
- LONDON, C. A. *et al.* Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 27, n. 4, 1999.
- LONDON, C. A.; SEGUIN, B. **Mast cell tumors in the dog**. [S. l.: s. n.], 2003.
- LORENTZ, A. *et al.* Human Intestinal Mast Cells Are Capable of Producing Different Cytokine Profiles: Role of IgE Receptor Cross-Linking and IL-4. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 164, n. 1, 2000.
- LUSKIN, M. R.; LANE, A. A. Tagraxofusp for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. **Haematologica**, [s. l.], 2023.
- MA, Y. *et al.* Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 112, n. 2, 1999.
- MATSUMOTO, N. P. *et al.* Mast cell sarcoma: clinicopathologic and molecular analysis of 10 new cases and review of literature. **Modern Pathology**, [s. l.], v. 35, n. 7, 2022.

- MCALPINE, C. S. *et al.* Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease. **Nature**, [s. l.], v. 595, n. 7869, 2021.
- MEUTEN, D. J.; MOORE, F. M.; GEORGE, J. W. **Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize**. [S. l.: s. n.], 2016.
- MIETTINEN, M.; LASOTA, J. **KIT (CD117): A review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation**. [S. l.: s. n.], 2005.
- MINDUR, J. E.; SWIRSKI, F. K. Growth factors as immunotherapeutic targets in cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 39, n. 7, 2019.
- MIYAJIMA, A. *et al.* **Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5**. [S. l.: s. n.], 1993.
- MOCHIZUKI, H. *et al.* Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 3, 2017.
- MORETTI, S. *et al.* CD123 (interleukin 3 receptor α chain). **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2001.
- MORINI, M. *et al.* C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [s. l.], v. 52, n. 5, 2004.
- MUÑOZ, L. *et al.* Interleukin-3 receptor α chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. **Haematologica**, [s. l.], v. 86, n. 12, 2001.
- NATALIE E SIMPSON. **PHARMACOLOGY/TOXICOLOGY BLA REVIEW AND EVALUATION**. Jersey City: [s. n.], 2018.
- NIEMEYER, C. M. *et al.* Expression of human interleukin-3 (multi-CSF) is restricted to human lymphocytes and T-cell tumor lines. **Blood**, [s. l.], v. 73, n. 4, 1989.
- OLWEUS, J. *et al.* Dendritic cell ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 94, n. 23, 1997.
- PALACIOS, R. *et al.* Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. **Nature**, [s. l.], v. 309, n. 5964, 1984.
- PALACIOS, R.; GARLAND, J. Distinct mechanisms may account for the growth-promoting activity of interleukin 3 on cells of lymphoid and myeloid origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 81, n. 4 I, 1984.
- PARDANANI, A. *et al.* CD123 immunostaining patterns in systemic mastocytosis: Differential expression in disease subgroups and potential prognostic value. **Leukemia**, [s. l.], v. 30, n. 4, 2016.
- PARYS, M. *et al.* Use of multi-color flow cytometry for canine immune cell characterization in cancer. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 18, n. 3 March, 2023.

- PATNAIK, M. M. *et al.* **Targeting CD123 in hematologic malignancies: identifying suitable patients for targeted therapy.** [*S. l.: s. n.*], 2021.
- PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. **Veterinary Pathology**, [*s. l.*], v. 21, n. 5, 1984.
- PELOSI, E.; CASTELLI, G.; TESTA, U. **CD123 a Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia and Blastic Plasmocytoid Dendritic Neoplasm.** [*S. l.: s. n.*], 2023.
- POPULIN, L.; STEBBING, M. J.; FURNESS, J. B. **Neuronal regulation of the gut immune system and neuromodulation for treating inflammatory bowel disease.** [*S. l.: s. n.*], 2021.
- PREZIOSI, R.; MORINI, M.; SARLI, G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [*s. l.*], v. 16, n. 6, 2004.
- RAMOS-VARA, J. A. *et al.* Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [*s. l.*], v. 20, n. 4, 2008.
- RAMOS-VARA, J. A. **Technical aspects of immunohistochemistry.** [*S. l.: s. n.*], 2005.
- RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. **When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique.** [*S. l.: s. n.*], 2014.
- RAVANDI, F. *et al.* Complete Responses in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients on a Weekly Dosing Schedule of Vibecotamab (XmAb14045), a CD123 x CD3 T Cell-Engaging Bispecific Antibody; Initial Results of a Phase 1 Study. **Blood**, [*s. l.*], v. 136, n. Supplement 1, 2020.
- RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, [*s. l.*], v. 117, n. 8, 2004.
- REBUZZI, L. *et al.* Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [*s. l.*], v. 115, n. 3–4, 2007.
- REGUERA, M. J. *et al.* Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **American Journal of Dermatopathology**, [*s. l.*], v. 22, n. 1, 2000.
- REGUERA, M. J.; FERRER, L.; RABANAL, R. M. Evaluation of an intron deletion in the c-kit gene of canine mast cell tumors. **American Journal of Veterinary Research**, [*s. l.*], v. 63, n. 9, 2002.
- RENNER, K. *et al.* IL-3 promotes the development of experimental autoimmune encephalitis. **JCI Insight**, [*s. l.*], v. 1, n. 16, 2016.
- RIBEIRO, P. R. *et al.* Pathological aspects of cutaneous mast cell tumors with metastases in 49 dogs. **Veterinary Pathology**, [*s. l.*], v. 59, n. 6, 2022.

ROMANSIK, E. M. *et al.* **Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors.** [*S. l.: s. n.*], 2007.

ROSAI, J. **Rosai and Ackerman's surgical pathology.** 10. ed. New York: [*s. n.*], 2011. v. 1–2

ROSOLEM, M. C. *et al.* Immunodetection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in mammary carcinomas of female dogs. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, [*s. l.*], v. 35, n. 11, 2015.

ROTHENBERG, M. E. *et al.* Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. **Journal of Clinical Investigation**, [*s. l.*], v. 81, n. 6, 1988.

SABATTINI, S. *et al.* Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3?. **Veterinary Pathology**, [*s. l.*], v. 52, n. 1, 2015.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. **The Ki-67 protein: From the known and the unknown.** [*S. l.: s. n.*], 2000.

SCHROEDER, J. T.; CHICHESTER, K. L.; BIENEMAN, A. P. Human Basophils Secrete IL-3: Evidence of Autocrine Priming for Phenotypic and Functional Responses in Allergic Disease. **The Journal of Immunology**, [*s. l.*], v. 182, n. 4, 2009.

SEE, P. *et al.* Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. **Science**, [*s. l.*], v. 356, n. 6342, 2017.

SIVERTSSON, Å. *et al.* Enhanced Validation of Antibodies Enables the Discovery of Missing Proteins. **Journal of Proteome Research**, [*s. l.*], v. 19, n. 12, 2020.

SLEDGE, D. G.; WEBSTER, J.; KIUPEL, M. **Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection.** [*S. l.: s. n.*], 2016.

ŞMIECH, A. *et al.* Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [*s. l.*], v. 60, n. 1, 2018.

SRIVASTAVA, R. K. *et al.* IL-3 Attenuates Collagen-Induced Arthritis by Modulating the Development of Foxp3+ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, [*s. l.*], v. 186, n. 4, 2011.

STEFANELLO, D. *et al.* Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [*s. l.*], v. 246, n. 7, 2015.

STEIN, A. S. *et al.* An Open-Label, First-in-Human, Dose-Escalation Study of SAR443579 Administered As Single Agent By Intravenous Infusion in Patients with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia (R/R AML), B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) or High-Risk Myelodysplasia (HR-MDS). **Blood**, [*s. l.*], v. 140, n. Supplement 1, 2022.

STEMLINE®. **ELZONRIS® (tagraxofusp-erzs)**. 9.631.006. Concessão: 31 ago. 2018.

STOKOL, T. *et al.* Dogs with acute myeloid leukemia have clonal rearrangements in T and B cell receptors. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 4, n. MAY, 2017.

STOROZYNSKY, E. *et al.* Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance the generation and function of dendritic cells. **Immunology**, [s. l.], v. 97, n. 1, 1999.

SUN, Q. *et al.* Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor α -chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist. **Blood**, [s. l.], v. 87, n. 1, 1996.

SURES, I.; ULLRICH, A.; BIGOTTI, A. Expression of c-kit Receptor in Normal and Transformed Human Nonlymphoid Tissues. **Cancer Research**, [s. l.], v. 52, n. 22, 1992.

SUZUKI, Y. *et al.* Clinicopathological analysis of 46 cases with CD4+ and/or CD56+ immature haematolymphoid malignancy: reappraisal of blastic plasmacytoid dendritic cell and related neoplasms. **Histopathology**, [s. l.], v. 71, n. 6, 2017.

TAMLIN, V. S.; BOTTEMA, C. D. K.; PEASTON, A. E. **Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment**. [S. l.: s. n.], 2020.

TAVERNIER, J. *et al.* A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF. **Cell**, [s. l.], v. 66, n. 6, 1991.

TESTA, U. *et al.* Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. **Blood**, [s. l.], v. 88, n. 9, 1996.

TESTA, U.; PELOSI, E.; CASTELLI, G. **CD123 as a therapeutic target in the treatment of hematological malignancies**. [S. l.: s. n.], 2019.

TESTA, U.; PELOSI, E.; FRANKEL, A. **CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies**. [S. l.: s. n.], 2014.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS. **IL3RA**. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185291-IL3RA/tissue>. Acesso em: 24 jan. 2023.

TURIN, L. *et al.* Expression of c-kit proto-oncogene in canine mastocytoma: A kinetic study using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 18, n. 4, 2006.

UCKUN, F. M. *et al.* A clinical phase 1b study of the cd3xcd123 bispecific antibody apvo436 in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 16, 2021.

UY, G. L. *et al.* Flotetuzumab as salvage immunotherapy for refractory acute myeloid leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 137, n. 6, 2021.

UY, G. L. *et al.* Phase 1 Cohort Expansion of Flotetuzumab, a CD123 \times CD3 Bispecific Dart[®] Protein in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). **Blood**, [s. l.], v. 132, n. Supplement 1, 2018.

- VALENT, P. *et al.* **Updated Diagnostic Criteria and Classification of Mast Cell Disorders: A Consensus Proposal.** [S. l.: s. n.], 2021.
- VASCELLARI, M. *et al.* Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 50, n. 1, 2013.
- VILLAMIL, J. A. *et al.* Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 239, n. 7, p. 960–965, 2011. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/239/7/javma.239.7.960.xml>. Acesso em: 14 dez. 2023.
- WALKER, R. A. **Quantification of immunohistochemistry - Issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I.** [S. l.: s. n.], 2006.
- WARLAND, J.; DOBSON, J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: A single centre experience in the United Kingdom. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 197, n. 2, 2013.
- WEBER, G. F. *et al.* Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. **Science**, [s. l.], v. 347, n. 6227, 2015.
- WEBSTER, J. D. *et al.* Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 44, n. 3, 2007.
- WEBSTER, J. D. *et al.* The role of c-KIT in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2006.
- WEBSTER, J. D.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 6, 2006.
- WEBSTER, J. D.; SOLON, M.; GIBSON-CORLEY, K. N. **Validating Immunohistochemistry Assay Specificity in Investigative Studies: Considerations for a Weight of Evidence Approach.** [S. l.: s. n.], 2021.
- WEI, W. *et al.* **Chimeric antigen receptor T-cell therapy for T-ALL and AML.** [S. l.: s. n.], 2022.
- WEISHAAR, K. M. *et al.* Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 151, n. 4, 2014.
- WEISS, D. J. A Retrospective Study of the Incidence and the Classification of Bone Marrow Disorders in the Dog at a Veterinary Teaching Hospital (1996–2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 4, 2006.
- WELLE, M. M. *et al.* Canine mast cell tumours: A review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, [s. l.], v. 19, n. 6, 2008.
- WILLMANN, M. *et al.* **Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal.** [S. l.: s. n.], 2021.

WILLMANN, K.; DUNNE, J. F. A flow cytometric immune function assay for human peripheral blood dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 67, n. 4, 2000.

WRIGHT, H. V. *et al.* IL-3-Mediated TNF Production Is Necessary for Mast Cell Development. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 176, n. 4, 2006.

YONEHARA, S. *et al.* Identification of a cell surface 105 kd protein (aic-2 antigen) which binds interleukin-3. **International Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 2, 1990.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 5, 2002.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* **Reclassifying plasmacytoid dendritic cells as innate lymphocytes.** [S. l.: s. n.], 2023.

ANEXOS

ANEXO A: imunomarcação do CD123 em diversos tecidos caninos.

ANEXO B: imunomarcação do CD123 em plasmocitoma cutâneo, histiocitoma cutâneo e sarcoma histiocítico caninos.

ANEXO C: padrão KIT I, marcação membranosa, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40

ANEXO D: padrão KIT II, marcação citoplasmática focal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40.

ANEXO E: padrão KIT III, marcação citoplasmática difusa, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40.

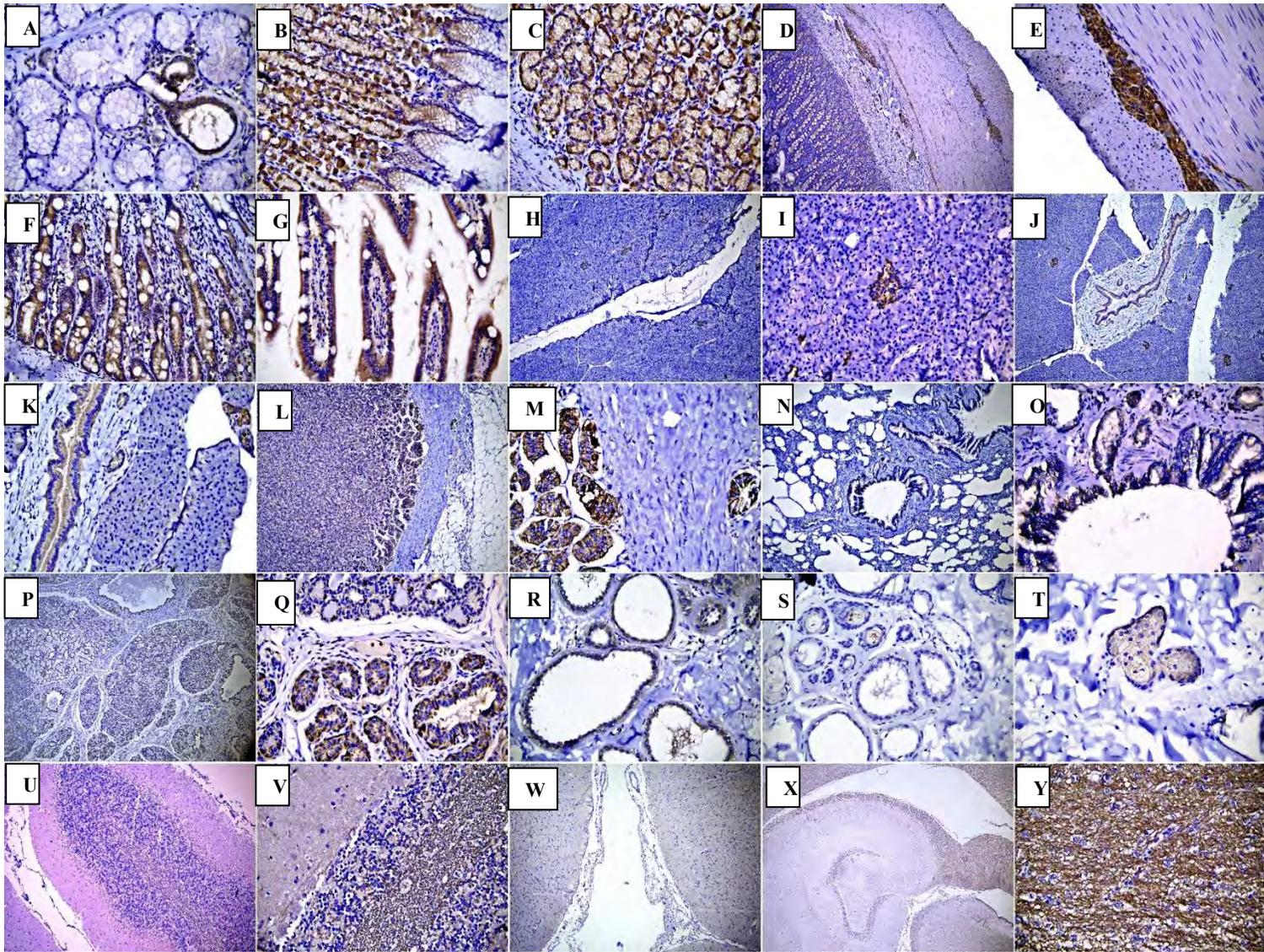
ANEXO F: padrão KIT dúbio classificado como III, marcação citoplasmática difusa de menor intensidade com forte intensidade de marcação citoplasmática focal sobreposta, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40.

ANEXO G: uma amostra de MCC de alto grau com padrão KIT I e negativo par CD123 policlonal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40.

ANEXO A

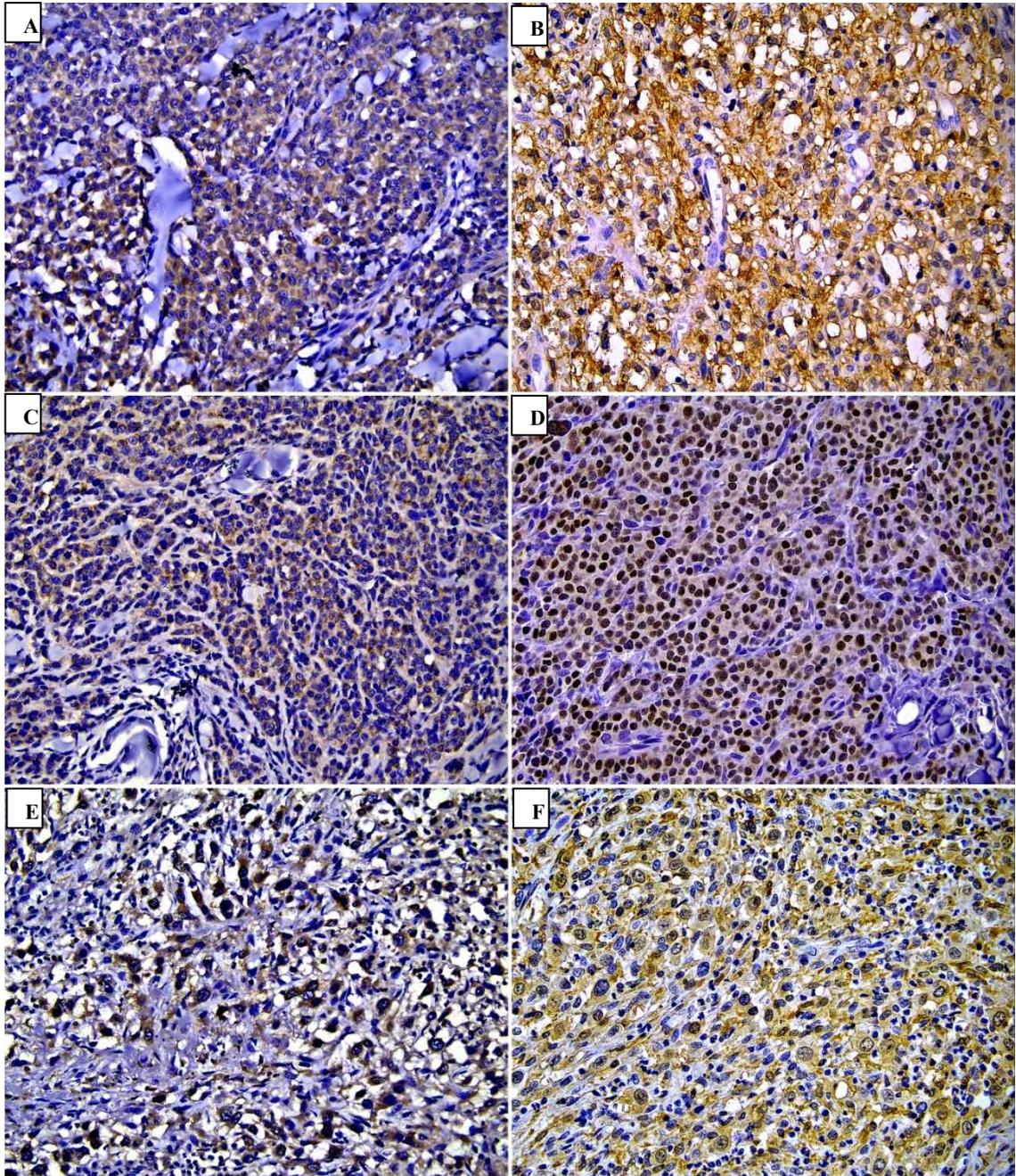
ANEXO A: imunomarcção do CD123 em diversos tecidos caninos.

A: glândula salivar, forte imunomarcção citoplasmática de ductos salivares, ácinos sem imunodeteção, obj. 40x. **B: fundo gástrico**, forte marcação membranosa e citoplasmáticas de glândulas muosas, obj. 40. **C: fundo gástrico**, forte marcação membranosa e citoplasmáticas de glândulas mucosas, obj. 40. **D: intestino delgado**, forte imunomarcção dos plexos nervosos submucoso e mioentérico, obj. 10x. **E: intestino delgado**, evidência da forte imunomarcção do plexo nervoso mioentérico, obj. 40. **F: intestino delgado**, forte imunomarcção de células da cripta, obj.40. **G: intestino delgado:** forte imunomarcção de enterócitos das vilosidades, obj. 40. **H: pâncreas**, marcação de ilhotas pancreáticas, obj.10. **I: pâncreas**, evidência de forte marcação de ilhota pancreática. **J: pâncreas**, forte marcação de ducto interlobular, obj.10. **K: pâncreas**, evidência de forte marcação do epitélio do ducto intrlobular, obj.40. **L: adrenal**, imunomarcção de zona glomerulosa, obj. 10. **M: adrenal**, evidência de forte marcação membranosa citoplasmática de células da zona glomerulosa, obj. 40. **N: pulmão**, marcação do epitélio bronquiolar, sem imunodeteção em células alveolares, obj.10. **O: pulmão**, evidência de forte imunomarcção do epitélio bronquiolar, obj.40. **P: glândula mamária**, obj. 10. **Q: glândula mamária**, evidência da forte imunomarcção de epitélio ductal, obj. 40. **R: derme**, imunomarcção de glândulas apócrinas, obj. 40. **S: derme**, ausência de marcação em células epiteliais de glândulas apócrinas, obj.40. **T: derme**, imunomarcção de células reserva/basaloides de glândula sebácea, obj. 40. **U: cerebelo**, córtex não imunocorado, obj. 10. **V: cerebelo**, neurópilo da medula (substância branca) fortemente imunocorado, obj. 40. **W: córtex cerebral**, não imunocorado, obj. 10. **X: hipocampo e substância branca periventricular**, ausência de marcação no hipocampo; forte marcação do neurópilo na substância branca, obj. 10. **Y: substância branca (óbex)**, forte imunomarcção do neurópilo, obj, 40.



ANEXO B

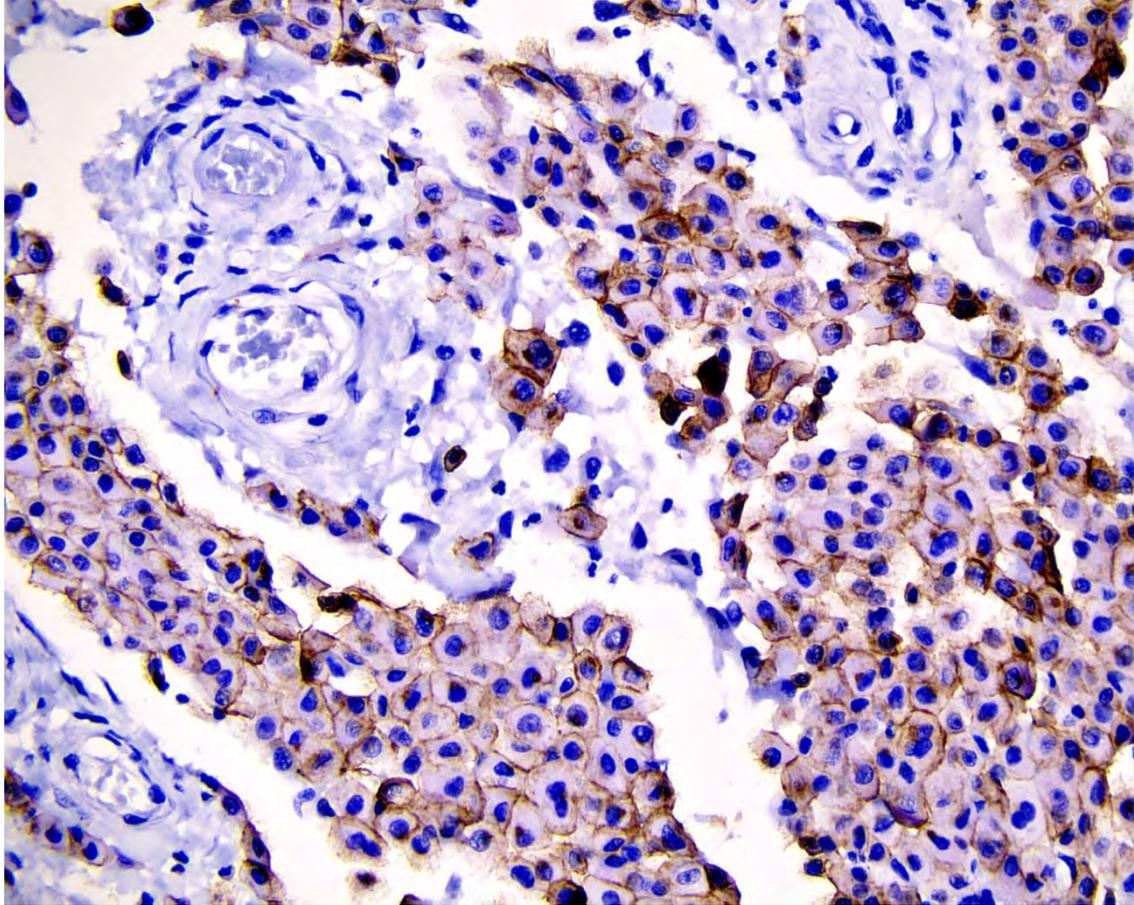
ANEXO B: imunomarcação do CD123 em plasmocitoma cutâneo, histiocitoma cutâneo e sarcoma histiocítico caninos.



Imunodetecc o do CD123 em histiocitoma cutâneo, plasmocitoma cutâneo e sarcoma histiocítico canino. **A.** Histiocitoma cutâneo canino fraca a moderada imunomarca o membranosa-citoplasmática, IHQ CD123 polímero baseado em uma etapa, obj. 40. **B.** Mesmo caso de histiocitoma cutâneo canino com forte imunomarca o com Iba1, IHQ Iba1, polímero baseado em uma etapa, obj. 40. **C.** Plasmocitoma cutâneo canino, fraca a moderada imunomarca o membranosa- citoplasmática com CD123, IHQ CD123 polímero baseado em uma etapa, obj. 40. **D.** Plasmocitoma cutâneo canino, forte imunomarca o nuclear para MUM1, IHQ MUM1p, micropol mero baseado em duas etapas, obj. 40. **E.** Sarcoma histiocítico canino com forte imunomarca o citoplasmática para CD123, IHQ CD123 polímero baseado em uma etapa, obj. 40. **F.** Sarcoma histiocítico canino com forte imunomarca o de membrana e citoplasma para Iba1, IHQ Iba1, polímero baseado em uma etapa, obj. 40.

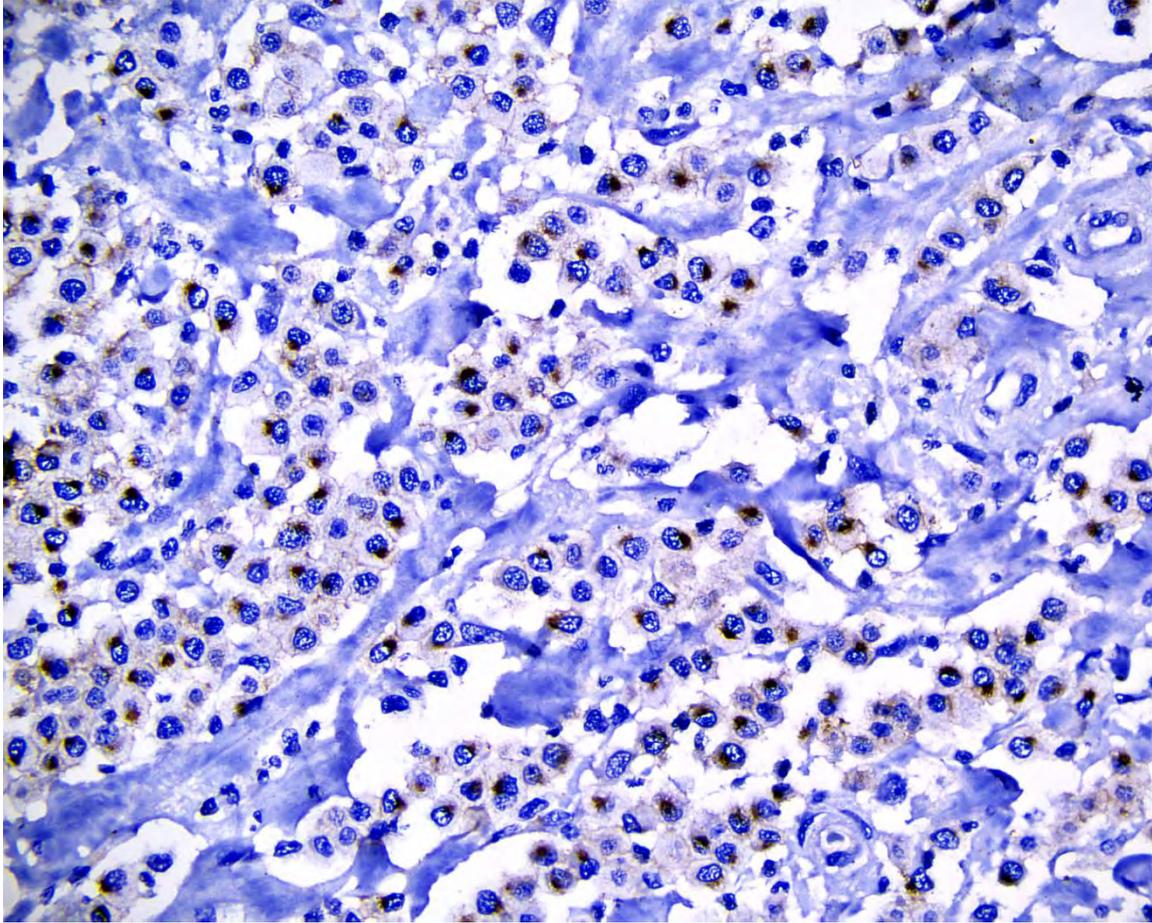
ANEXO C

ANEXO C: padrão KIT I, marcação membranosa, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x.



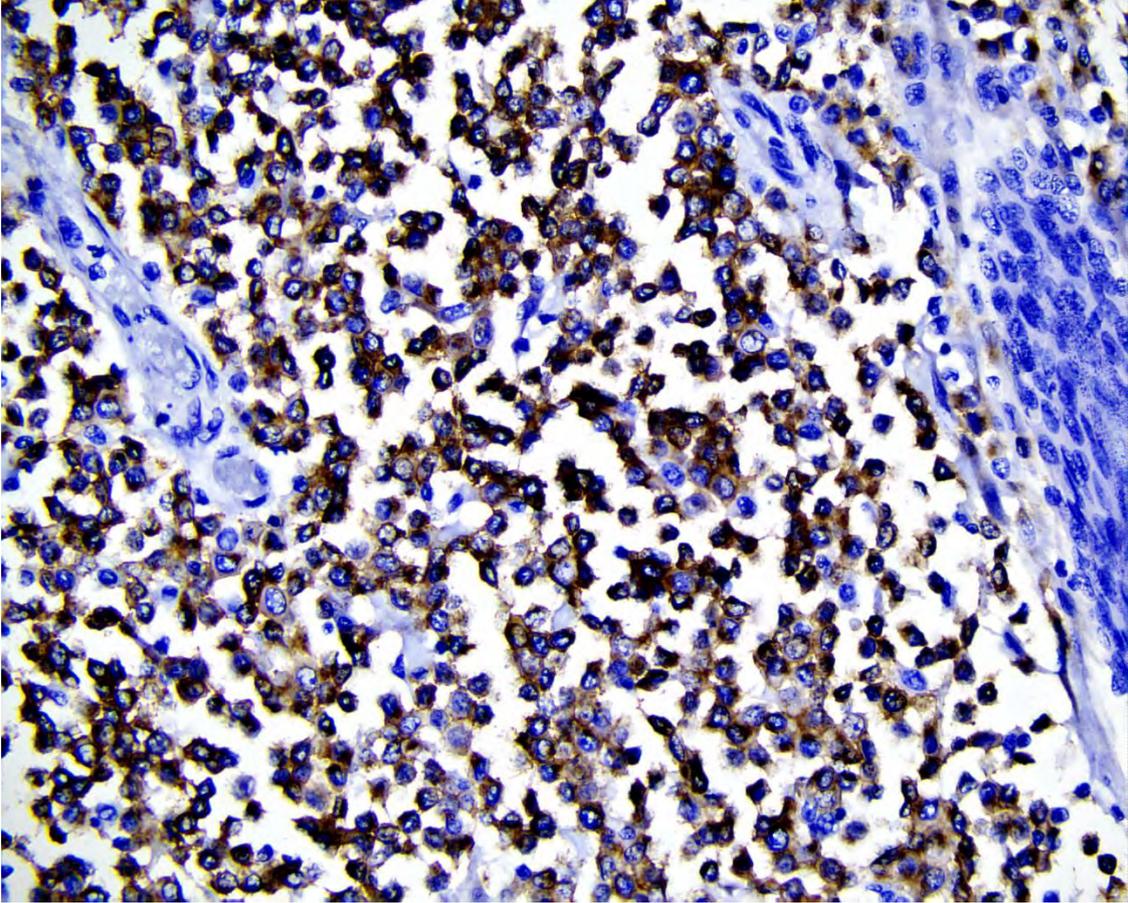
ANEXO D

ANEXO D: padrão KIT II, marcação citoplasmática focal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x.



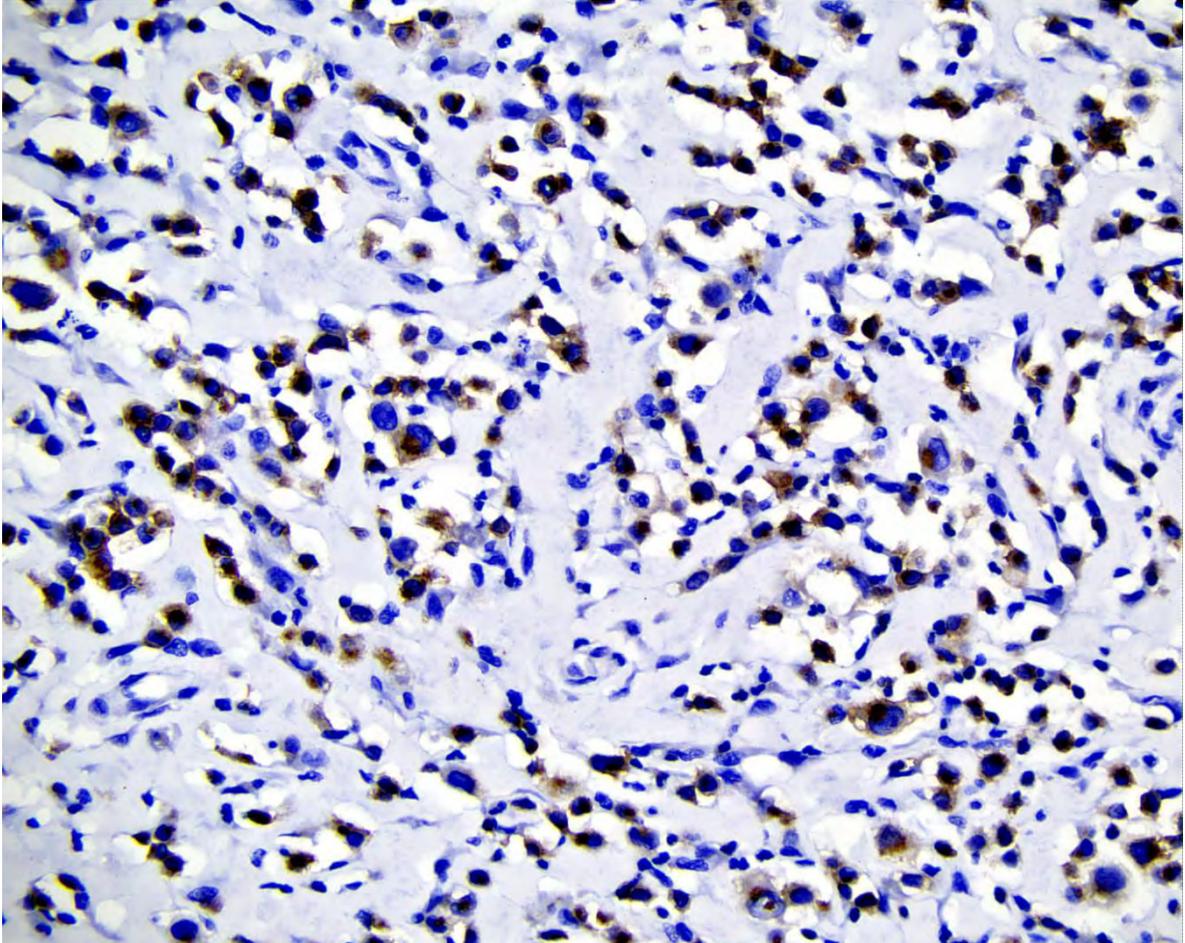
ANEXO E

ANEXO E: padrão KIT III, marcação citoplasmática difusa, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x.



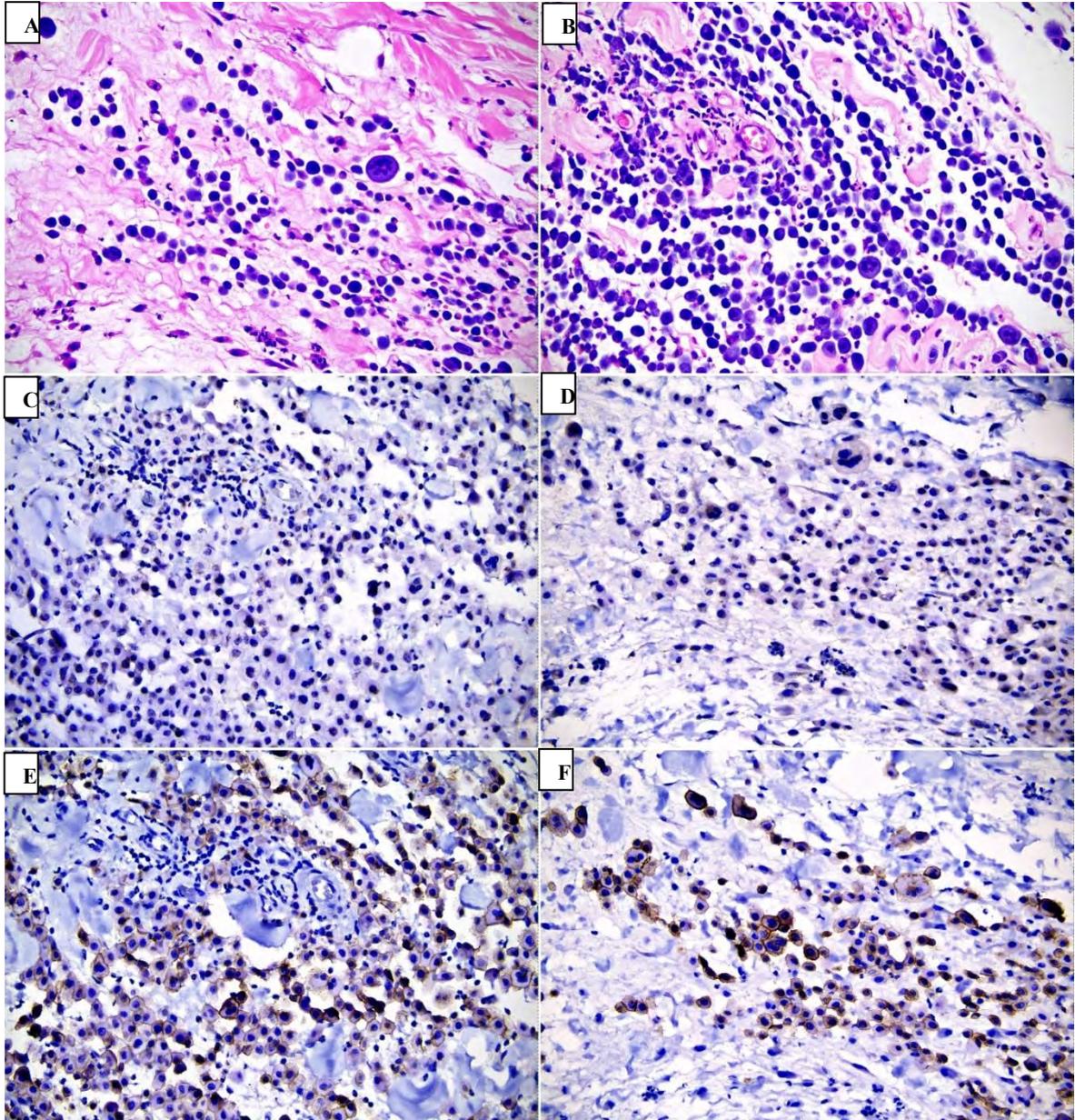
ANEXO F

ANEXO F: padrão KIT dúbio classificado como III, marcação citoplasmática difusa de menor intensidade com forte intensidade de marcação citoplasmática focal sobreposta, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40.



ANEXO G

ANEXO G: uma amostra de MCC de alto grau com padrão KIT I e negativo par CD123 policlonal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40x.



A e B: coloração H.E, obj. 40. **C e D:** mastócitos neoplásicos não foram imunocorados, CD123 policlonal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40. **E e F:** marcação membranosa, padrão KIT I, c-KIT policlonal, IHQ baseada em método de polímero de uma etapa, obj.40.