



# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
Departamento de Medicina Veterinária  
Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional  
(LOCT)



## EXPRESSÃO DO LIGANTE PD-L1 NAS CÉLULAS TUMORAIS EM AMOSTRAS DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS DE CÃES.

Projeto de pesquisa apresentado à agência de fomento FAPESP para participação no Programa de Bolsas de Iniciação Científica.

---

Discente: Bruna Eugenio Bispo

Docente: Prof. Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi

MARÇO, 2018

PIRASSUNUGA

## **Projeto de pesquisa apresentado á agência de fomento FAPESP para participação no Programa de Bolsas de Iniciação Científica.**

### **1. Resumo**

O mastocitoma é um dos tumores cutâneos mais comumente diagnosticado na clínica de pequenos animais sendo mais comum em cães e menos frequente em gatos. É caracterizado pela modificação e proliferação anormal dos mastócitos. Apesar da etiologia ser desconhecida, as raças mais predisponentes são as braquicefálicas como Boxer e Boston terriers, e os animais idosos com idade entre oito e nove anos. O diagnóstico definitivo é a citologia e/ou histopatologia, associado com os sinais clínicos, porém devido características bastante variáveis e comportamento biológico imprevisível, nem sempre o protocolo ideal de tratamento e prognóstico são confiáveis. Logo, os mastocitomas têm causado insucesso das ações terapêuticas padronizadas, e por esse motivo intensificou-se a necessidade de estabelecer novos indicadores prognósticos para esse tumor. A constatação da expressão do ligante PD-L1 nas células tumorais em amostras de mastocitomas cutâneos de cães caracteriza-se um importante passo para compreender os mecanismos de crescimento e desenvolvimentos dessa neoplasia, uma vez que, a expressão dessa proteína é responsável, entre outras funções, pela inibição da ativação dos linfócitos T citotóxicos principal mecanismo de morte das células tumorais.

### **2. SUMMARY**

*Cutaneous mast cell tumours (MCTs) are the most common skin tumours in small animals, more common in dogs and less frequent in cats. It is characterized by abnormal proliferation and modification of mast cells. The aetiology is unknown, but the most predisposed breeds was reported for the brachycephalics, as Boxer, Boston Terriers and the older animals from eight to nine years old. The definitive diagnosis is the cytology and / or histopathology, associated with clinical signs. However the highly variable characteristics and unpredictable biological behavior make the treatment protocol and the clinical prognosis difficult. Therefore, cutaneous mast cell tumours causes failures of standardized therapeutic and for this reason the need to establish new prognostic indicators for this tumor was intensified. The finding of PD-L1 ligand expression in canine cutaneous mast cell tumor characterizes an important step to understand the mechanisms of growth and development of this tumor, since, the expression of this protein is responsible, among other functions, for the inhibition of the activation of cytotoxic T lymphocytes main mechanism of death of tumor cells.*

### **3. JUSTIFICATIVA**

Os mastocitomas são o tipo mais comum de neoplasias cutâneas em cães e gatos e comumente apresentam comportamento variado, sendo esse o principal desafio enfrentado pelos métodos terapêuticos usuais. Logo são necessárias novas pesquisas para aprimorar o conhecimento sobre o microambiente tumoral, que permite o crescimento e desenvolvimento do mastocitoma. O atual setor de pesquisa é a Imunovigilância.

### **4. OBJETIVO**

O objetivo desse trabalho é identificar a expressão do ligante PD-L1 nas células tumorais em amostras de mastocitomas cutâneos de cães, para fins de avaliação prognostica entre a relação da expressão do PD-L1 e a graduação histopatológica do tumor.

### **5. INTRODUÇÃO**

Os mastocitomas cutâneos é uma modificação neoplásica que ocasiona a proliferação anormal de mastócito e os pequenos animais são os mais acometidos por essa neoplasia. Os cães apresentam um risco de 7 a 25% sendo, portanto, o tipo mais comum de tumor analisado e diagnosticado na Medicina Veterinária. (WELLE et. al, 2008) Para os felinos, os mastocitomas cutâneos é a segunda neoplasia mais comum seguida pelo tumor de células basais, principalmente em animais com idade a partir de oito anos. Apesar da etiologia ser desconhecida, e ser considerada uma doença multifatorial, algumas raças caninas apresentam maior predisposição: Boxers, Boston terriers, Labrador e Golden retriever. As raças Boxer e Boston terriers representam 50% dos casos de mastocitomas relatados e a faixa etária de risco encontra-se entre 7,5 a 9 anos. Em cães as áreas comumente relatadas são tronco 50 a 60%, seguido pelas extremidades do corpo do animal 25 a 40%, pescoço e cabeça 10%). (WELLE et. al, 2008), (LITSTER, A. L.; SORENMO, K. U, 2006), (WITHROW, S. J.; MACEWEN, G, 2007), (MacEWEN, E.G., 2001), (PALMA, H. E. et al., 2009).

Nos gatos as áreas preferencias são cabeça 54%, incluindo olhos e bases das orelhas, pescoço 14%, tronco e membros anteriores 11%. (MILLER, M. A. et al.). A forma visceral primária atinge mais a espécie felina do que a canina, sendo geralmente ocorrência aos mastocitomas secundários, devido a metástase. (NORTH. et al.,2009),(WELLE et. al, 2008), (STREFEZZI, R. F.,2009).

A aparência macroscópica dessa neoplasia possui perfis variados, logo pode reproduzir características de outros tumores cutâneos, dificultando o diagnóstico precoce.

Como ocorrem com os mastocitomas subcutâneos carnudos de aparência macia durante a apalpação, que constantemente são grosseiramente diagnosticados como lipomas. Entretanto o mastocitoma típico é descrito como uma lesão dermoepidérmica, sem cápsula, de formato nodular alopecica e eritematosa, de tamanho variável. (WELLE et. al, 2008), (PATNAIK, A. K. et al.,1984).

Devido a essas variações macroscópicas, o diagnóstico definitivo é a citologia e/ou histopatologia, associado com a descrição clínica do tumor e sintomas paraneoplásicos. (WELLE et. al, 2008), (STREFEZZI, R. F.,2009). O diagnóstico precoce não é fácil, pois os mastocitomas podem apresentar características bastante variáveis e seu comportamento biológico nem sempre é previsível. Logo, estabelecer o protocolo ideal de tratamento e prognóstico confiável nem sempre é possível. (NORTH. et al.,2009).

As análises citopatológicas e histopatológicas são utilizadas para classificar o grau do mastocitoma, para isso algumas características são analisadas: formato e arranjo celular, relação citoplasma – núcleo, quantidade e coloração dos grânulos intracitoplasmáticos, condensamento da cromatina, índice mitótico, figuras mitóticas aberrantes e invasão da lâmina basal. (PATNAIK, A. K. et al.,1984).

De acordo com Sischo et al, 1989 os tumores de pele são a segunda condição dermatológica mais diagnosticada nos hospitais veterinários norte-americanos. E dentre as especialidades veterinárias que atualmente se destacam a oncologia é umas das mais importantes. (PALMA, H. E. et al., 2009). Um estudo retrospectivo, realizado no laboratório de Patologia Veterinária da faculdade Federal de Santa Maria LPV-UFSM, 2005, analisou os arquivos de biopsia dos cães no período de 1964 a dezembro de 2003 (39 anos), foram encontrados 703 protocolos de biópsia de tumores cutâneos. (HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.,2000). Intensificando assim a necessidade do médico veterinário em compreender os mecanismos de transformação e progressão tumoral, para tratar e garantir maior expectativa de vida para seus pacientes, principalmente para aqueles em estágios avançados da doença.

O insucesso das ações terapêuticas padronizadas, tais como a quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica, associada à variação de comportamento biológico e os elevados índices de ocorrência dos mastocitomas, acarretou nos últimos anos o interesse científico sobre o papel do sistema imunológico na carcinogênese. (HANAHAN, D.; WEINBERG,2011), (TORREZINI, T.), (ISHIDA, Y. et al.1992). Em 1909, Paul Ehrlich sugeriu a importância do sistema imune no controle do crescimento neoplásico e Burnet e Thomas em 1960-1970 oficializaram a hipótese da imunovigilância, no qual, o controle do crescimento neoplásico seria a principal vantagem evolutiva da imunidade celular nos organismos

multicelulares. O conceito de imunovigilância foi originalmente proposto como a capacidade do sistema imune de reconhecer e inibir o processo neoplásico. Recentemente a capacidade de produzir anticorpos recombinantes que inibem receptores específicos do sistema imune, permitiram uma descrição específica da função de cada componente do sistema imunológico. Acrescentando assim o conceito complementar da imunoeedição. (ISHIDA, Y. et al.1992), (SHINOHARA T. et al.1994)

A imunoeedição é constituído por três fases, sendo conhecidos como “O três Es da imunoeedição”. A primeira é a fase da eliminação, as células transformadas são reconhecidas e há o recrutamento das moléculas pró-inflamatórias. Na etapa seguinte há o surgimento de algumas células tumorais selecionadas, que geram variantes mais resistentes devido as mutações adaptativas. Inicia-se então a segunda fase, na qual há o equilíbrio com o sistema imune, neste momento no microambiente tumoral coexistem: as células de baixa imunogenicidade que compõem o tumor e as células e moléculas responsáveis pelo controle do crescimento das mesmas. A terceira é a fase de escape, as células tumorais acumulam mutações suficientes para escapar da vigilância imunológica, levando ao crescimento do tumor até ser clinicamente detectável. (BLANK C. et al. 2004), (BLANK, C.2007).

A resposta adaptativa às células tumorais depende da apresentação de epítomos destes antígenos no sítio de ligação de moléculas do MHC (Complexo maior de histocompatibilidade) de classe I. Os linfócitos TCD8+ citotóxicos reconhecem os antígenos apresentados pelo MHC de classe I, e são ativados, atuam assim como o principal mecanismo de morte das células tumorais. Logo mutações ou instabilidade genética que levem a perda da expressão de alguns genes do MHC ou de qualquer outro componente envolvido nas fases de processamento de antígenos e transporte de epítomos imunogênicos para a membrana plasmática são potenciais mecanismos de evasão imune. (BLANK, C.2007), (FREEMAN G. J. et al.2000). O recrutamento de células T reguladoras, interleucinas e de citocinas como o TGF-  $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta) inibem a ativação dos linfócitos T citotóxicos e diminui o desenvolvimento de células dendríticas, sendo, também importantes mecanismos para driblar o sistema imunitário. (BLANK, C.2007), (FREEMAN G. J. et al.2000), (HINO et al.2010), (BENNETT, F. et al. 2003).

Os primeiros estudos relacionando tumores e o sistema imunológico foi realizado no século XIX, quando o William Coley injetou resíduos bacterianos em alguns sítios tumorais e observou a regressão de um sarcoma. Desde então, conseqüentemente novas interações entre as estruturas imunológicas e a carcinogênese tem sido estudas, como por exemplo, a PD-1 (Programmed Cell-Death 1) e seus ligantes PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) e PD-

L2 (Programmed Death-Ligand 2). (PALMA, H. E. et al.2009), (HINO et al.2010), (BENNETT, F. et al. 2003).

A PD-1 é uma proteína de membrana do tipo I, reguladora de células T, também conhecida como CD279, constituída por 268 aminoácidos e codificada pelo gene PDCD1, inicialmente descrita em 1992. (HINO et al.2010), (BENNETT, F. et al.2003). Essa proteína é constituída por dois sítios de fosforilação e expressa na superfície das células mielóides, linfócitos B e células T ativas. (LOKE, P 2003), (CHEN, D.2013), . Seus ligantes PD-L1(B7-H1) e PD-L2(B7-DC), descobertos anos depois, são expressos por células T em repouso, células B, células dendríticas, parenquimatosas, incluindo as endoteliais vasculares, macrófagos e células tumorais.

A expressão do PD-L1 em células tumorais foi reportada em melanomas, linfomas, cânceres de pulmão, ovários, rim, pâncreas, esôfago e bexiga. (SHARMA, P.2015). A citocina IFN- $\gamma$  (Interferon Gama) induz a expressão de PD-L1, enquanto a IL-4 (Inter leucinas 4) induz o PD-L2. (PARDOLL, D. 2012.), (MAEKAWA, N. et al. 2016),

Um estudo realizado pelo Departamento de Dermatologia da University of Occupational and Environmental Health (Kitakyushu, Japão), em um período de sete anos, analisou amostras de melanomas em diferentes estágios de malignidade, com o objetivo de associar a expressão do ligante PD-L1 nas células tumorais do melanoma maligno com o prognóstico do paciente. De maneira geral, as amostras dos pacientes que apresentavam grau 5 de malignidade tiveram maior expressão do PD-L1 e a taxa de sobrevivência foi significativamente menor quando comparada ao grupo de pacientes que apresentavam menor expressão desse ligante. (SHARMA, P.2015)

A interação entre PD-1 e PD-L1/PD-L2 tem como resultado a inibição da atividade proliferativa dos linfócitos T, além da inibição da secreção de citocinas inflamatórias. Comumente nas células tumorais há a super expressão da proteína PDL1, que consequentemente ocupa o receptor PD-1 na superfície do linfócito T citotóxico impedindo sua ativação, intensificando a suposição da atuação imunossupressora da proteína PD-L1 no microambiente tumoral, permitindo assim o desenvolvimento do tumor. (KIUPEL, M. et al. 2011), (PULZ, L.et al.2019).

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1. Origem dos materiais:**

Os mastocitomas cutâneos caninos utilizados no projeto serão provenientes do Hospital Veterinário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEAUSP). As análises clínicas realizadas pelos médicos veterinários e informações provenientes do relato dos proprietários serão utilizados para obter melhor prognóstico e classificação do grau do mastocitoma.

#### 6.2. Processamento e Graduação histopatológica:

As amostras neste estudo serão processadas histologicamente conforme as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Cortes de aproximadamente 4µm de espessura corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina para diagnóstico e graduação histológica das lesões segundo Patnaik et. al. (1984) e Kiupel et al. (2001).

#### 6.3. Procedimentos imuno-histoquímico:

A coloração imunohistoquímica para PD-L1 será alcançada utilizando um anticorpo monoclonal (MoAb) capaz de detectar essa proteína, em amostras fixadas em formalina, imersos em parafina. As amostras cortadas em 4µm de espessura serão desparafinadas em xilol 100% (3 vezes por 10 minutos cada) e desidratadas utilizando álcoois de maneira gradual (99%, 99% e 70%) para a concentração de água. Os antígenos serão recuperados após fervura em tampão citrato, pH, 6,0, utilizando o micro-ondas. Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, todas as amostras cortadas serão tratadas com metanol 100%, contendo 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 minutos. A ligação não específica da imunoglobulina G será bloqueada utilizando soro de coelho normal. As amostras serão incubadas com MoAbs anti-PD-L1 durante a noite a 4°C. Em seguida serão incubados com anticorpo secundário e depois novamente em uma solução constituída de estreptavidina-biotina conjugada com a enzima horseradish peroxidase (HRP) durante 30 minutos. O substrato cromogênico que será utilizado para visualizar as áreas coradas com anticorpos secundários conjugados com HRP será o 3- amino-9-etil carbazole. Para finalizar as amostras serão coradas com hematoxilina. (CALLEA, M. et al. 2015), (LISBETH, A. et al.2019).

## 7. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

A bolsista tem o dever de participar das etapas de processamentos histológico e imuno-histoquímico (confecção e coloração das lâminas), realizar as análises morfométricas das imunomarcações e estatística analítica com base nos resultados obtidos e pela redação e elaboração dos relatórios parcial e final. O projeto deverá ser realizado obedecendo ao cronograma de atividades programadas abaixo:

Tabela 1: Cronograma e Trabalho

MÊS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Padronização das reações imuno-histoquímicas</b>	X	X										
<b>Processamento histopatológico</b>	X	X	X	X	X		X	X	X			
<b>Processamento imuno-histoquímico das amostras</b>		X	X	X	X		X	X	X	X		
<b>Análise morfométrica</b>				X	X				X	X		
<b>Análise estatística</b>					X						X	
<b>Redação de relatórios</b>						X						X

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WELLE, M. M. et. al. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n.6, p. 321- 339, 2008.
- [2] LITSTER, A. L.; SORENMO, K. U. Characterization of the Signalment, Clinical and Survival Characteristics of 41 Cats with Mast Cell Neoplasia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 177-183, 2006.
- [3] WITHROW, S. J.; MACEWEN, G. Small Animal Clinical Oncology. St. Louis: **Elsevier**, 2007.
- [4] MacEWEN, E.G. Tumors miscellaneous. In: WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. Small animal clinical oncology. 3.ed. **Philadephia: Saunders**. Cap.29, p. 2001.
- [5] PALMA, H. E. et al. Mastocitoma cutâneo canino – **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, 7(23); 523528, 2009.
- [6] MILLER, M. A. et al. Cutaneous Neoplasia in 340 Cats. **Veterinary Pathology**, Missouri v.28, p.389-395,1991.
- [7] NORTH. et al. Introduction to Small Animal Oncology. Londres, **Elsevier**, Cap. 19, p. 191-193, 2009.
- [8] STREFEZZI, R. F. et al. Prognostic indicators for mast cell tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 2(2), 110 – 121, 2009.
- [9] PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 469-474, 1984.



- [10] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**,100(1):57-70, 2000.
- [11] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5):646-74, 2011.
- [12] TORREZINI, T.; ATHANAZIO D. A. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 54(1): 63-77, 2008.
- [13] ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO Journal**, 11(11):3887-95, 1992.
- [14] SHINOHARA T. et al. Structure and chromosomal localization of the human PD1 gene (PDCD1). **Genomics**, 23(3):704-6, 1994.
- [15] BLANK C. et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. **Cancer Research**, 64(3):11405, 2004.
- [16] BLANK, C.; MACKENSEN, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to Tcell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunol Immunother**, 56(5):739-45, 2007.
- [17] FREEMAN G. J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, 192(7):1027-34, 2000.
- [18] HINO et al. PD-L1 Expression in Malignant Melanoma. **Cancer**, 2010.
- [19] BENNETT, F. et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. **Journal of Immunol**, 170(2):711- 8, 2003.
- [20] LOKE, P.; ALLISON, J. P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. **Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**, 100(9):5336-41, 2003.
- [21] CHEN, D.; MELLMAN, I. **Oncology Meets Immunology: The Cancer Immunity Cycle**. **Immunity**, 39, 2013.
- [22] PARDOLL, D. **The Blockade Of Immune Checkpoints In Cancer Immunotherapy**. **Nature Reviews Cancer**, 12, 2012.
- [23] SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. **Science**, 348(6230): p. 56-61, 2015.

- [24] MAEKAWA, N. et al. Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. **PLOS One**, e0157176, 2016.
- [25] KIUPEL, M. et al. Proposal of a 2-Tier histologic grading system for canine cutaneous cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147 – 155, 2011.
- [26] PULZ, L. et al. Identification of two molecular subtypes in canine mast cell tumors through gene expression. **Profiling. PLoS One**, e.0217343. 2019.
- [27] KERR, K, et al. **Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art?** **Journal Thorac Oncol**, 10(7):985-9, 2015
- [28] CALLEA, M. et al. **Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma.** 10.1158/2326-6066.CIR-15-0043, 2015.
- [29] LISBETH, A. et al. Quantification and prognostic value of programmed cell death ligand-1 expression in dogs with diffuse large B-cell lymphoma. **American Journal of Veterinary Research**, vol. 79, no. 6, p.643 – 649, 2018.