

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS T
REGULADORAS EM CÃES ACOMETIDOS POR
LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO
PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO CHOP ASSOCIADO
OU NÃO A UM FIROCOXIB**

Letícia Abrahão Anai

Médica Veterinária

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUANTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS T
REGULADORAS EM CÃES ACOMETIDOS POR
LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO
PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO CHOP ASSOCIADO
OU NÃO A UM FIROCOXIB**

Letícia Abrahão Anai

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Co-orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

A532q Anai, Letícia Abrahão
Quantificação imunofenotípica de células T reguladoras em cães acometidos por linfoma multicêntrico submetidos ao protocolo quimioterápico chop associado ou não a um firocoxib / Letícia Abrahão Anai. – – Jaboticabal, 2014
xiii, 51 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Aureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Maura Rosane Valério Ikoma, Felipe Augusto Ruiz Sueiro, Marcia Ferreira da Rosa Sobreira, Sabryna Gouveia Calazans
Bibliografia

1. Treg. 2. Canino. 3. Citometria de fluxo 4. Foxp3. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006.6:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: QUANTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS T REGULADORAS EM CÃES ACOMETIDOS POR LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO CHOP ASSOCIADO OU NÃO A UM FIROCOXIB

AUTORA: LETÍCIA ABRAHÃO ANAI

ORIENTADOR: Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

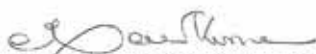
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

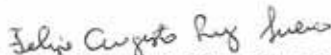


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



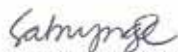
Profa. Dra. MAURA ROSANE VALÉRIO IKOMA
Hospital Amaral Carvalho / Jaú/SP



Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO
Centro Universitário de Rio Preto / São José do Rio Preto/SP



Profa. Dra. MARCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA
Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP



Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS
Universidade de Franca / Franca/SP

Data da realização: 05 de dezembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LETÍCIA ABRAHÃO ANAI – nasceu em São José do Rio Preto, no dia 15 de fevereiro de 1982. Filha de Gilberto Kenichi Anai e Luisa Maria Abrahão Anai. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2005, pela Universidade Camilo Castelo Branco – Unicastelo, Fernandópolis. Participou do Programa de Aprimoramento do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” no laboratório de Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, no ano de 2006 e 2007. Ingressou no curso de mestrado do programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV-Unesp em março de 2009, sob a orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2011, com a dissertação intitulada "Evolução da expressão de CD45⁺ e do leucograma de cães linfomatosos durante quimioterapia com o protocolo de Madison-Wisconsin. Atualmente, doutoranda do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, da mesma faculdade. Participou ativamente no atendimento voluntário do Serviço de Oncologia Veterinária do HV desta Instituição durante todo o curso. Participação em congressos nacionais e internacionais (Veterinary Cancer Society Conference 2012, 2013, ESVONC Annual Congress 2013 e WSAVA Congress 2014). Realizou estágio de pesquisa no exterior pela Mississippi State University durante três meses sob a supervisão do Prof. Dr. Camilo Bulla, onde trabalhou com cultivo celular de osteossarcoma e neoplasias mamárias caninas com o apoio financeiro da FAPESP.

" Todo efeito tem uma causa. Todo efeito inteligente tem uma causa inteligente. O poder da causa inteligente está na razão da grandeza do efeito"

Allan Kardec

DEDICO

Aos meus pais Gilberto e Luisa Maria, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando e ao meu irmão Gustavo.

A toda minha família, principalmente a minha avó Tide e minha tias Nezita e Lois, que foram como mães para mim.

Aos meus queridos amigos, Erika Terra, Kalina Simplício, Ana Paula R. Alves, Andressa Nogueira, Paulo Jark, Mônica Chaves, Michelle Avante, Mariana Kihara, Felipe Kunz, Ana Paula Gering, Thuanny Lopes, Sabryna Calazans, Nicole Zanetti, Ana Paula Tristão, Pedro Teles, Raquel Chaves, Felipe Barros, Thiago Munhoz, Camila Fernandes, que tornaram meus dias mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Mestre Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, meu orientador e amigo, pelo apoio e companheirismo ao longo desses anos, sempre acreditando em mim.

Ao Eugênio, por toda a sua paciência e sabedoria.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Clínica, Matheus e Douglas.

Aos professores Sabryna G. Calazans, Márcia Sobreira, Hélio Montassier e Andriago Barbosa De Nardi, pela composição da banca de qualificação e pela contribuição com suas considerações.

À prof^a Mirela T. Costa e aos pós-graduandos do Serviço de Oncologia Veterinária, que ajudaram intensamente neste trabalho.

Ao grupo "Linfoma", Thiago, Livia e Paulo.

Aos docentes, funcionários, residentes e estagiários do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", que cooperaram na execução deste.

Ao Felipe Sueiro (VetPat) pela colaboração no projeto.

À prof^a Renne Amorin e Carlos Eduardo Fonseca, Unesp-Botucatu, pela colaboração no projeto.

À Denise Fonseca, pós-doutoranda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pelo apoio na confecção desse trabalho.

À Merial pela doação do Previcox, utilizado nesse trabalho.

Aos cães com linfoma e seus proprietários.

À Denise Ferraz, responsável pela Citometria de Fluxo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela disposição na realização das análises.

Ao Centro Avançado em Veterinária (CAVET) - Ribeirão Preto - SP, por compartilhar os casos de linfoma, sob a supervisão da Profa. Dra. Sabryna Calazans.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) e ao Programa de Pós-Graduação ter me concedido a oportunidade de realizar este doutorado.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho. Processo FAPESP: 2010/19425-3 (bolsa) e 2011/12870-4 (auxílio).

SUMÁRIO

	Página
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	Viii
Resumo	Ix
Abstract	X
Lista de Tabelas	Xi
Lista de Quadros	Xii
Lista de Figuras	Xiii
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Linfoma canino.....	2
2.2. Células T Reguladoras (Tregs).....	5
2.3. O uso de inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2).....	9
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo Geral.....	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
4. Material e Métodos	13
4.1. Distribuição dos pacientes e protocolo quimioterápico.....	13
4.2. Classificação histopatológica e imuno-histoquímica do linfoma.....	15
4.3. Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T.....	16
4.4. Análise estatística dos resultados.....	19
5. Resultados e Discussão	20
5.1. Quantificação das populações de células T no sangue periférico.....	20
5.1.1. Porcentagem de Tregs em cães controle x pacientes do grupo linfoma.....	20
5.1.2. Quantificação de Tregs circulante durante a quimioterapia.....	22
5.1.3. Quantificação das células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ durante a quimioterapia..	25
5. 1. 4 Avaliação da relação Treg/CD8 ⁺ dos cães controle x pacientes com linfoma.....	29
5.2. Avaliação da expressão de COX-2 no linfonodo de cães com linfoma.....	31
6. Conclusões	33
7. Referências	34
Apêndices	43



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 027665/10 do trabalho de pesquisa intitulado "**Quantificação imunofenotípica de células T regulatórias em cães portadores de linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin associado a um inibidor de cox-2**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 17 de dezembro de 2010.

Jaboticabal, 20 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

QUANTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS T REGULADORAS EM CÃES ACOMETIDOS POR LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO CHOP ASSOCIADO OU NÃO A UM FIROCOXIB

RESUMO – Em Medicina Veterinária o linfoma é uma neoplasia caracterizada por proliferação clonal de linfócitos malignos, sendo uma das mais comuns em cães. Há evidências que as Tregs inibem a função efetora contra tumores, resultando em disfunção de células T em humanos e cães com câncer. O aumento da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) pelas células do tumor e células inflamatórias locais, estimula o desenvolvimento das Tregs. Deste modo, o tratamento com inibidores de COX-2, como os anti-inflamatórios não esteroidais é mais uma estratégia para a supressão das Tregs. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar quantitativamente, por intermédio da citometria de fluxo, as Tregs em cães com linfoma, submetidos ao protocolo quimioterápico CHOP, associado ou não a um inibidor de COX-2 (Firocoxib). Foram utilizados 12 cães controles (hígidos), 12 cães com linfoma tratados com o protocolo CHOP e 12 cães com linfoma, tratados com o CHOP+Firocoxib. As Tregs foram avaliadas por citometria de fluxo, no momento do diagnóstico, após a indução da quimioterapia (5ª semana) e ao término do protocolo (20ª semana). Os resultados mostraram que os cães com linfoma apresentaram porcentagens maiores de Tregs ($17,08 \pm 1,62$) quando comparados ao grupo controle ($5,67 \pm 1,62$) ($p < 0,0001$). Além disso, no grupo linfoma teve uma diminuição das porcentagens de Tregs ao final do protocolo quimioterápico, nos grupos tratados com o protocolo CHOP tradicional (GT1) ($8,648 \pm 1,736$) e no grupo tratado com CHOP associado a um firocoxib (GT2) ($5,903 \pm 1,126$) ($p < 0,0001$). E que entre os grupos, GT1 ($20,66 \pm 2,487$) e GT2 ($12,79 \pm 0,7673$), apenas no momento do diagnóstico (M0), foi estatisticamente diferente ($p < 0,0114$). Conclui-se que cães com linfoma multicêntrico possui um aumento das Tregs, e durante o protocolo quimioterápico, associado ou não a um firocoxib, essas células diminuem significativamente.

Palavras chaves: Treg, canino, linfoma, citometria de fluxo, Foxp3, neoplasia.

IMUNOPHENOTYPIC QUANTIFICATION OF REGULATORY T CELLS IN DOGS WITH MULTICENTRIC LYMPHOMA SUBMITTED TO CHOP CHEMOTHERAPY PROTOCOL ASSOCIATED OR NOT TO FIROCOXIB

ABSTRACT – In Veterinary Medicine lymphoma is a neoplasm characterized by clonal proliferation of malignant lymphocytes, one of the most common in dogs. There is evidence that Treg inhibit the effector function against tumors, resulting in T cell dysfunction in humans and dogs with cancer. Increased expression of cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2) by tumor cells and local inflammatory cells, stimulates the development of Treg. Thus, treatment with COX-2 inhibitors such as nonsteroidal anti-inflammatory is a further strategy for the removal of Tregs. In this context, this work aimed to evaluate quantitatively, through flow cytometry, Tregs in dogs with lymphoma undergoing chemotherapy protocol CHOP, with or without a COX-2 inhibitor (Firocoxib). 12 dogs were used controls (healthy), 12 dogs with lymphoma treated with CHOP protocol and 12 dogs with lymphoma treated with CHOP + Firocoxib. Tregs form assessed by flow cytometry at diagnosis after induction chemotherapy (Week 5) and the protocol termination (20 weeks). The results showed that dogs with lymphoma had higher percentages of Tregs (17.08 ± 1.62) compared with the control group (5.67 ± 1.62) ($p < 0.0001$). Moreover, in the lymphoma group had a decrease of Treg percentages at the end of chemotherapy protocol, the groups treated with the traditional CHOP protocol (GT1) (8.648 ± 1.736) and in the CHOP arm associated with a firocoxib (GT2) (5.903 ± 1.126) ($p < 0.0001$). And that between the groups, GT1 (20.66 ± 2.487), and GT2 (12.79 ± 0.7673) only at the time of diagnosis (M0), was statistically different ($p < 0.0114$). It was concluded that dogs with multicentric lymphoma has increased Tregs, and during the chemotherapy protocol, with or without a firocoxib, these cells decrease significantly.

Keywords: Treg, canine, lymphoma, flow cytometry, Foxp3, neoplasia.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação Clínica do Linfoma segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS.....	4
Tabela 2. Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em linfomas caninos.....	16
Tabela 3. Relação de isotipos controle e anticorpos utilizados à citometria de fluxo, com seus respectivos fluorocromos e volumes utilizados.....	18

LISTA DE QUADROS

	Páginas
Quadro 1. Protocolo quimioterápico de CHOP-19 adotado para os animais do grupo GT1.....	14
Quadro 2. Protocolo quimioterápico de CHOP-19 modificado adotado para os animais do GT2.....	14

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Fluxograma representativo da sequência de seleção de <i>gates</i> de linfócitos: linfócitos- linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (Treg), de um cão com linfoma.....	18
Figura 2. Valores percentuais obtidos de células T reguladoras no sangue periférico de cães saudáveis (controle) e cães portadores de linfoma.....	20
Figura 3. Valores percentuais obtidos para Tregs no sangue periférico de cães controle e com linfoma (GT1), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20).....	22
Figura 4. Valores percentuais obtidos para Tregs no sangue periférico de cães controle e acometidos por linfoma (GT2), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20).....	23
Figura 5. Comparação entre os valores percentuais obtidos para Tregs no sangue periférico de cães acometidos por linfoma (GT1 e GT2), nos momentos M0, M5 e M20 do protocolo quimioterápico.....	24
Figura 6. Valores percentuais obtidos para células CD4 ⁺ no sangue periférico de cães controle e acometidos por linfoma (GT1 e GT2), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20).....	25
Figura 7. Comparação da porcentagem das células CD4 ⁺ do sangue periférico de cães com linfoma do GT1 e GT2, nos momentos, M0, M5 e M20 do protocolo quimioterápico.....	26
Figura 8. Valores percentuais das células CD8 ⁺ no sangue periférico de cães controle e acometidos por linfoma (GT1 e GT2), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20).....	27
Figura 9. Valores percentuais células CD8 ⁺ do sangue periférico de cães com linfoma do GT1 e GT2, nos momentos M0, M5 e M20 do protocolo quimioterápico.....	28
Figura 10. Valores da relação Treg/CD8 ⁺ no sangue periférico de cães saudáveis (controle) e cães portadores de linfoma, no momento do diagnóstico.....	30
Figura 11. Valores da relação Tregs/CD8 ⁺ no sangue periférico do grupo controle, GT1 e GT2, no momento do diagnóstico.....	30

1. INTRODUÇÃO

O linfoma é a neoplasia hematopoética que mais comumente afeta os cães. É frequentemente proposta como modelo experimental para o estudo da etiologia e tratamento de linfomas não-Hodgkin's em seres humanos. Seu diagnóstico definitivo está fundamentado no exame de preparações citoscópicas obtidas a partir de citologia aspirativa de linfonodos ou nódulos, bem como no exame histopatológico dos mesmos. O tratamento do linfoma canino é a poliquimioterapia sendo o aumento do tempo de sobrevida dos pacientes com qualidade de vida, seu grande desafio.

As células T reguladoras possuem a função de regular negativamente as respostas imunes, garantindo a manutenção de mecanismos ativos de tal supressão. Em seres humanos há evidências que as Tregs regulam de maneira negativa a função efetora contra tumores, resultando na disfunção de células T efectoras, o que parece também ocorrer nos cães.

Relatos na literatura médica demonstram a existência de fortes indícios de aumento na porcentagem de Tregs em sangue periférico, linfonodos sentinelas e no sítio tumoral de pacientes com câncer, quase sempre relacionados com um prognóstico desfavorável. Por outro lado, são poucos os relatos disponíveis referentes ao verdadeiro papel das Tregs em cães acometidos por carcinoma, linfoma, melanoma e osteossarcoma, dentre outros. Porém, neste momento, há um grande foco na pesquisa médico-veterinária, concentrado ao estudo do papel das referidas Tregs, em animais acometidos por várias classes tumorais.

Estudos recentes têm demonstrado que alguns fármacos tem ação de extinguir ou suprimir as funções das Tregs, inclusive os anti-inflamatórios não esteroidais e a ciclofosfamida em regime metronômico, o que as tornam um potencial um alvo terapêutico, com a finalidade de aumentar a resposta antitumoral.

Diante disso, esse ensaio teve como objetivo avaliar, quantitativamente, por intermédio da citometria de fluxo, as Tregs em cães com linfoma, submetidos ao protocolo quimioterápico CHOP, associado ou não a um inibidor de Cox-2 (Firocoxib).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Linfoma canino

O linfoma é uma neoplasia caracterizada por proliferação clonal de linfócitos malignos e pode originar-se na medula óssea, timo, baço, fígado e linfonodos. Na realidade, pode desenvolver-se em praticamente qualquer órgão, pela contínua migração dos linfócitos pelos diferentes tecidos do organismo (FIGUERA et al., 2002; VAIL & YOUNG, 2007; DALECK et al., 2008).

É uma das neoplasias mais comuns em cães, representando de 8,5 a 9% de todos os tumores caninos (DOBSON et al., 2001). Acomete principalmente animais de meia-idade ou idosos (GREENLEE et al., 1990; MOULTON & HARVEY, 1990), não há predileção sexual (VAIL & OGILVIE, 1998) e corresponde a aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hematopoético nos cães (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; MORRISON, 1998; FAN & LORIMIER, 2005). Em um levantamento realizado em 2002, em diferentes localidades dos Estados Unidos e por diferentes grupos de pesquisadores, de uma população estimada de 60,7 milhões de cães, encontraram-se de 3342 a 18210 casos de linfoma canino, naquele ano (MORRISON, 2005).

A etiologia do linfoma canino é multifatorial, sendo que fatores ambientais e genéticos estão bem incriminados. Em seres humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas, está bem documentada a etiologia viral, em alguns tipos de linfoma. Porém, no caso do linfoma em cães, não tem sido comprovado tal componente viral (GREENLEE et al., 1990; VALLI, 1993; JONES et al., 1997; MORRISON, 2005).

Aparentemente, não há predisposição sexual (TESKE, 1994) e os animais adultos e idosos são os mais acometidos. Dados da literatura internacional apontam o Boxer, Rottweiler, Poodle, Chow Chow, Beagle, Basset Hound, Pastor Alemão, São Bernardo, Scottish Terrier, Airedale Terrier e Bulldog como as raças que apresentam maior incidência de linfoma (MORRISON, 1998; VAIL & YOUNG, 2007).

No Brasil, poucos são os levantamentos feitos sobre a incidência de linfoma em cães. Fráguas (2008) registrou, entre 2003 e 2006, no Hospital Veterinário da FCAV UNESP/Jaboticabal, 108 cães acometidos, com

predominância de cães sem raça definida (SRD), adultos jovens, sem predisposição entre os sexos. Resultados semelhantes também foram obtidos em estudos retrospectivos de cães com linfoma realizados na região de Botucatu – SP (CARDOSO et al., 2003) e na Região Norte do Paraná (MORENO & BRACARENSE, 2007).

Tradicionalmente o linfoma canino é classificado em multicêntrico, alimentar, mediastinal, cutâneo e extranodular, conforme sua distribuição anatômica (VAIL & OGILVIE, 1998). Em estudo retrospectivo realizado na região de Botucatu (SP) por SEQUEIRA et al. (1999), 91,2% dos animais acometidos por linfoma apresentavam a forma multicêntrica.

Quanto à citomorfologia, as neoplasias linfomatosas podem ser classificadas como sendo de alto, médio ou de baixo grau. De acordo com o esquema de classificação histológica (Kiel ou *National Cancer Institute*), 80% dos linfomas caninos são similares aos linfomas não-Hodgkin humanos de médio e alto grau. E, quanto a imunofenotipagem, podem ser classificados em linfomas T, linfomas B, bem como mistos (B e T) (MOULTON & HARVEY, 1990; JONEST et al., 1997; DE MOURA et al., 1999; SEQUEIRA et al., 1999; VAIL, 2000).

A classificação histológica da OMS abrange os seguintes subtipos de linfoma, como: pouco diferenciado; linfoblástico; linfocítico e prolinfocítico; e histiocítico, histioblástico e histiolinfocítico (RALLIS et al., 1992).

Os sinais clínicos do linfoma variam de acordo com a sua apresentação anatômica e histológica (NELSON & COUTO, 2006). No linfoma multicêntrico normalmente ocorre linfadenopatia bilateral dos linfonodos superficiais (DOBSON & GORMAN, 1993), podendo estar associada à hepatomegalia e esplenomegalia decorrentes da infiltração neoplásica (VAIL, 2000). Além disso, sinais clínicos tais como intolerância ao exercício, taquipneia, dispneia, regurgitação e anorexia, também são descritos em decorrência da compressão provocada pela linfadenopatia mediastínica (CARDOSO et al., 2004).

O diagnóstico está fundamentado no exame físico e nas avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e exames de imagem. Porém, o diagnóstico definitivo só poderá ser firmado pela avaliação citológica e/ou histológica do órgão afetado (FAN & KITCHELL, 2002; NELSON & COUTO, 2006).

O prognóstico do linfoma canino varia muito e depende de certos fatores, tais como: localização e extensão da doença, gravidade dos sinais clínicos, grau histológico, imunofenótipo, exposição prévia à quimioterapia ou a corticóides, desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas, índice de proliferação do tumor e presença de outros problemas médicos, ou condições paraneoplásicas (VAIL et. al., 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o linfoma, em cães, pode ser classificado em diferentes estadios clínicos, que servem como guia para o seu prognóstico e tratamento (tabela 1).

Tabela 1. Classificação Clínica do Linfoma segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (1980).

Estágio I	Envolvimento limitado a um linfonodo
Estágio II	Envolvimento de linfonodos regionais
Estágio III	Aumento generalizado dos linfonodos
Estágio IV	Envolvimento do fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia
Estágio V	Envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos

a: sem sinais sistêmicos; b: com sinais sistêmicos

O tratamento está fundamentado em protocolos quimioterápicos antineoplásicos, já que o linfoma é a neoplasia que melhor responde a essa modalidade de tratamento (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; OGILVIE & MOORE, 1995). Segundo MACEWEN & YOUNG, 1996, sem o tratamento, muitos cães vão a óbito em quatro a seis semanas.

O protocolo quimioterápico mais utilizado no tratamento do linfoma canino é o de Madison-Wisconsin (MW), que compreende a associação das drogas L-asparaginase, sulfato de vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorrubicina, com duração de 24 semanas. Outro protocolo muito utilizado é o CHOP, que utiliza os mesmos fármacos, com exceção da L-asparaginase (SUSAN & ETTINGER, 2003). Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e o maior tempo de sobrevida para cães com linfoma (MORRISON, 2005). O protocolo MW-19 é uma versão condensada, com duração de 19 semanas (HOSOYA et al., 2007). Dentre vários tumores, os linfomas frequentemente recidivam após uma resposta

inicial à quimioterapia e se tornam resistentes a um amplo espectro de fármacos (GERARDI, 2008).

Embora o linfoma canino raramente seja curável (menos que 10% dos casos), períodos prolongados de remissão são comuns, com boa qualidade de vida (VAIL et. al., 2013). Estudos sobre os linfomas em cães têm relacionado sua ocorrência a disfunções imunes. Aparentemente, a imunossupressão predispõe ao estabelecimento e manutenção da malignidade. Em humanos imunossuprimidos, a prevalência aumentada de infecções virais, bacterianas ou por protozoários foi associada ao linfoma de células B e, de forma menos comum, ao linfoma de células T. A proliferação de linfócitos causada por qualquer agente infeccioso pode aumentar o risco da transformação neoplásica (BRUNKER & HOOVER, 2007).

2.2. Células T Reguladoras (Tregs)

As células T reguladoras (Tregs) têm sido alvo de intensas pesquisas relacionadas à sua função como reguladoras das respostas imunes tanto em condições fisiológicas como em diversas enfermidades infecciosas, alérgicas, neoplásicas, autoimunes, bem como no domínio da imunologia dos transplantes (COOLS et al., 2007). São oriundas do timo normal como uma população distinta e madura de células T com amplo repertório de receptores específicos de células T auto-reativos. A ausência destas células está implicada diretamente no surgimento de doenças autoimunes, além de potencializar a resposta imune contra aloantígenos e tumores (SAKAGUCHI et al., 2001; SHEVACH, 2002). A principal função das Tregs é regular negativamente as respostas imunes, garantindo a manutenção de mecanismos ativos de supressão (CRUVINEL et al., 2008).

Uma das primeiras citações sobre as Tregs foi feita por Sakaguchi et al. (1995) que as descreveram como linfócitos T $CD4^{+}$ que expressavam constitutivamente a cadeia α do receptor da interleucina IL-2 (CD25) e eram responsáveis pela supressão do desenvolvimento de doenças auto-imunes em camundongos. Em 2005, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que essas células T $CD4^{+}CD25^{+}$ representavam aproximadamente 10% das células $CD4^{+}$ periféricas em indivíduos saudáveis (SAKAGUCHI et al., 2005).

As Tregs podem ser classificadas como naturais ou induzidas. As naturais constituem uma população de células produzidas continuamente no timo, através do estímulo de receptores de células T (TCR) (PICCIRILLO et al., 2002). Em indivíduos saudáveis, as Tregs naturais são responsáveis pela manutenção da tolerância periférica e da homeostase do sistema imune (BEACHER-ALLAN et al., 2001; WHITESIDE, 2014). As Tregs induzidas são antígeno-específicas, diferenciadas a partir de células T CD4⁺, após exposição a antígenos (SHEVACH, 2002). Elas inibem células T efetoras por contato célula-célula e por secreção de mediadores solúveis, como TGF- β e IL-10 (NAKAMURA et al., 2001; SAKAGUCHI, 2001). Em situações patológicas, Tregs naturais podem ser substituídas por Tregs induzidas, que se desenvolvem em resposta a estímulos no microambiente e regulam vários tipos de respostas durante a inflamação (WHITESIDE, 2014).

Cada vez mais se acumulam evidências de que o sistema imunitário é constituído por uma rede complexa e articulada de inúmeros componentes integrados. Citam-se, por exemplo, células e seus receptores, mediadores secretados, moléculas expressas, vias bioquímicas entre outros que, em conjunto, dotam o organismo da capacidade de interagir com os diferentes estímulos antigênicos. Diretamente vinculada à resposta aos diferentes antígenos encontra-se a habilidade de regulação, mecanismo responsável por assegurar que as respostas não atinjam amplitudes patológicas e por impedir que o sistema seja ativado indevidamente contra antígenos próprios, gerando desordens auto-imunes (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

É possível que as enfermidades auto-imunes estejam associadas a falhas na eliminação ou na inativação de clones de células auto-reativas de alta afinidade, podendo também haver ou não falha do sistema imune em controlar clones auto-reativos de afinidade intermediária. Nesse contexto, as células com função regulatória são fundamentais, sendo importantes, também, na modulação de processos de eliminação de patógenos e antígenos tumorais (CRUVINEL et al., 2008).

O papel das citocinas no efeito imunorregulador mediado pelas Tregs permanece incerto. Enquanto o contato célula-célula é importante para a supressão mediada por Tregs em ensaios *in vitro*, o significado fisiológico deste contato *in vivo* não foi estabelecido e as citocinas podem ser mais importantes.

Alguns resultados de estudos têm mostrado a produção de IL-10 e/ou TGF- β , em resposta a uma variedade de estímulos, enquanto que em outros, a produção dessas citocinas por Tregs, pelo menos em seres humanos tem sido falha (KOSMACZEWSKA et al., 2008). O que parece mais provável é que tal população celular (Tregs) exerça supressão das mais variadas formas, visto que, na impossibilidade de atuação de uma das vias, ou face a um defeito qualquer, as Tregs se utilizam de uma via distinta e o efeito final seria o mesmo, ou seja, supressão imune. O meio no qual estão inseridas também é determinante, pois define como vão exercer a imunossupressão, uma vez que nem todas as células imunes são susceptíveis a sua ação.

Recentemente, estudos demonstram que a IL-17 está envolvida em processos inflamatórios, doenças autoimunes, e também é considerada um fator ativo no processo pro e anti-tumoral. Possui a capacidade de promover o desenvolvimento de células cancerígenas e de iniciação da supressão de células CD8⁺ (YANG et al., 2011; MA & DONG, 2011). Experimentalmente Cantini et al. (2011) demonstraram uma inter-relação entre Tregs e IL-17, sugerindo que IL-17 pode ser induzida por Tregs e que em células de gliomas, o crescimento tumoral depende da citocinas produzidas localmente.

Do ponto de vista molecular, demonstrou-se que o fator de transcrição FOXP3 é predominantemente expresso nas Tregs tímicas e periféricas. Células T *naïve* transfectadas com o mRNA para o gene Foxp3 adquirem características de células regulatórias tornando-se anérgicas e supressoras *in vitro*, além da expressão fenotípica e produção de citocinas e outras moléculas relacionadas às Tregs. Desta forma, Foxp3 parece ser um gene de grande importância no desenvolvimento e na função destas células (SAKAGUCHI, 2005; CRUVINEL et al., 2008). Embora o Foxp3 seja transitoriamente expresso em algumas células T humanas ativadas, ele tornou-se o melhor marcador protéico com o qual se identificam as Tregs. Em cães, tais Tregs foram identificadas utilizando-se de anticorpos específicos anti-CD4 canino e Foxp3 murino (BILLER et al., 2007; KEPPEL et al., 2008; BANHAM et al., 2009; HORIUCHI et al., 2009 ; O'NEILL et al., 2009).

O'Neill et al. (2009) observaram aumento significativo das Tregs em cães com câncer em relação aos do grupo controle. As maiores porcentagens de Tregs foram observadas em cães com carcinoma, seguidas de sarcoma,

linfoma e mastocitoma. Outros ensaios mostraram que as células Tregs apresentaram-se numericamente aumentadas no sangue periférico de cães com metástases quando comparados àqueles sem metástases, sendo que nos pacientes com tumores em estágios mais avançados, também ocorreu aumento das células T. Tal achado sugere que as Tregs são capazes de promover imunotolerância às células tumorais por suprimirem a imunidade tipo 1, o que poderia favorecer o aparecimento de metástases (HORIUCHI et al., 2009).

No linfoma Hodgkin humano, o microambiente tumoral é dominado por células Th2 e por Tregs. O número elevado de células Th2 está associado com significativo aumento no tempo de remissão da doença e, ademais, que a alta razão Tregs/células Th2 tem resultado numa redução significativa no tempo de recidiva. Este fato leva a crer que as Tregs exerçam efeitos inibitórios na resposta imune antitumoral mediada por células Th2 e que estas últimas podem ter um papel, além do esperado, na imunidade antitumoral (SCHRECK et al., 2009).

Munhoz (2013) realizou um estudo com cães com linfoma multicêntrico, encontrou um aumento da porcentagem de Tregs em cães com linfoma quando comparado ao grupo controle. Também notou uma diminuição significativa das Tregs, após a quinta semana de tratamento quimioterápico com o protocolo de Madison-Wisconsin.

Pinheiro et al., (2014) demonstraram que o aumento das Tregs em cães acometidos com linfoma multicêntrico de células B (BCL), está associado com um pior prognóstico. Sugeriram também que os cães com BCL, em comum com pacientes humanos com Linfoma Não-Hodgkin, abrigam um amplo espectro de Tregs nos linfonodos acometidos, incluindo Tregs tímicas.

Tominaga et al. (2010) observaram que cães portadores de melanoma em cavidade oral apresentavam uma maior porcentagem de Tregs no sangue periférico comparados aos animais controle, e uma porcentagem maior ainda de Tregs no sítio tumoral. Estes achados os levaram a sugerir que a presença das células tumorais poderia induzir a proliferação local ou a migração seletiva de Tregs para o sítio da neoplasia, via sinalização por citocinas, como TGF- β ou prostaglandina E2 (PGE2).

Pesquisas realizadas em pacientes humanos com câncer demonstraram uma associação entre o grau de infiltração de Tregs nos tumores e a supressão da resposta de células CD8⁺ (SATO et al., 2007). Em mulheres com câncer de mama, avançado, foi identificada alta expressão de Foxp3 em linfonodos sentinelas, um achado que corrobora estudos feitos com outros tipos de neoplasias (MANDSFIELD et al., 2009).

KIM et al. (2012), demonstraram que a presença de grande quantidade de células Tregs no tecido de cadelas com carcinoma mamário, está associado com o alto grau histológico, invasão linfática e necrose. Estes resultados sugerem que as células Tregs podem desempenhar um papel essencial na progressão do tumor através da supressão antitumoral do sistema imune.

Em cães com câncer, quanto maior a razão Tregs/CD8⁺ no sangue periférico, pior o prognóstico, possivelmente pela redução nas células CD8⁺ em relação ao aumento das Tregs, favorecendo a imunossupressão (O'NEILL et al., 2009). Biller et al. (2010), avaliando cães acometidos por osteossarcoma, concluíram que animais com uma baixa proporção CD8⁺/Tregs, durante o pré-tratamento, apresentaram um tempo de sobrevida menor quando comparados com animais com proporções mais elevadas. Resultados semelhantes foram obtidos em pacientes humanos portadores de câncer gástrico e alta proporção Tregs/CD4⁺, os quais apresentavam menor tempo de sobrevida e maior índice de recidiva do tumor (KIM et al., 2011).

Recentemente, Burton et al. (2011) utilizando-se de ciclofosfamida em regime metronômico, na dose de 15 mg/m²/dia, conseguiram diminuir o número e a porcentagem de Tregs a partir do 28º dia de tratamento, além de inibir a angiogênese em cães com sarcoma de tecidos moles. Estudos como este realçam a importância de se procurar reduzir a população de células Tregs e a participação destas células na patogenia do câncer em humanos e animais.

2.3. O uso de inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2)

As prostaglandinas (PGE) possuem forte atividade imunomoduladora dentro do sistema imunológico e podem exercer efeitos autócrino e parácrino. A prostaglandina E₂ (PGE₂) se liga aos receptores EP₂ e EP₄ ligados a proteína G e efetivamente suprimem a resposta imune das células T (NATARAJ et al., 2001; VANG et al., 2003). No sistema imune a ciclooxygenase 2 é induzida

durante as reações inflamatórias e é responsável pela produção de prostaglandina e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. A COX-2 é primariamente expressa em monócitos ativados e macrófagos, embora sua expressão também seja induzida em células T ativadas (SIMMON et al., 2004).

Existem duas isoformas da COX, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é expressa em vários tipos de células e tecidos, e sua atividade enzimática é importante para a função renal, integridade da mucosa gástrica e agregação plaquetária. Em contraste, a expressão da COX-2 está normalmente ausente em muitas células e tecidos, mas é induzida em resposta às citocinas inflamatórias (DUBOIS et al., 1998).

O aumento da PGE_2 promove o desenvolvimento neoplásico devido estimulação do receptor cognato (EP), com subsequente aumento da proliferação celular, promovendo a angiogênese, inibindo a apoptose, estimulando a invasão tumoral, e suprimindo a resposta imune anti-tumoral (WANG & DUBOIS, 2006).

Shimizu et al. (2010), demonstraram que o número de Tregs infiltradas no tumor está correlacionada positivamente com a expressão de COX-2 intra-tumoral em paciente com câncer de pulmão de não pequenas células e que a expressão de COX-2 pode suprimir a atividade anti-tumoral por infiltração das Tregs. Concluíram que a utilização de um inibidor de COX-2 pode ser benéfico para o tratamento de pacientes com aumento da expressão de COX-2.

Machic et al. (2006), demonstraram in vitro, que a COX-2 depende da produção de PGE_2 , representando o mecanismo imunossupressor para Tregs, e que o Foxp3 é induzido de uma maneira autócrina por PGE_2 . Estes resultados demonstraram um novo mecanismo de imunossupressão pelas Tregs.

Estudos recentes sugerem que alguns fármacos são usados para extinguir ou suprimir as funções das Tregs. O aumento da expressão da enzima COX-2, pela ação das células tumorais e inflamatórias locais, estimula o desenvolvimento das Tregs. Deste modo, o tratamento com inibidores de COX, como os anti-inflamatórios não esteroidais é mais uma estratégia para a supressão das Tregs (YAQUB et al., 2008).

Em um estudo realizado por LEE et al., (2009), quando utilizado um inibidor de COX-2 (celecoxib) no tratamento de tumores em camundongos o

acúmulo das Tregs diminuiu, utilizando a dose de 10mg/Kg e observaram uma maior diminuição na dose de 100mg/Kg. Este achado sugere que o efeito antitumoral do inibidor de COX-2 tem relação com a diminuição das células Tregs. O resultado do estudo mostrou que os níveis de PGE₂ estavam aumentados no carcinoma pulmonar de Lewis nos camundongos controles, e este aumento, diminui com o tratamento com inibidor de COX-2 e também mostrou que a expressão do Foxp3 estava aumentada no grupo controle e diminuída no grupo tratado com celecoxib. Além disso, o número de metástases reduziu significativamente nos camundongos tratados com celecoxib.

Segundo YAQUB et al., (2008), a utilização de inibidores da COX-2 preveniu o desenvolvimento do câncer colorretal por algum tipo de mecanismo que afeta a PGE₂. Este mecanismo evita a proliferação, migração e a angiogênese celular e melhora a função imune antitumoral pela inibição das Tregs. Desta forma, este mecanismo parece benéfico na utilização de inibidores de COX-2.

Portanto, torna-se importante o estudo das Tregs em cães com linfoma multicêntrico, procurando entender sua participação no microambiente tumoral, como fator prognóstico e futuramente, desenvolver novos tipos de terapias específicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Objetivou-se neste estudo avaliar quantitativamente, por intermédio da citometria de fluxo, as Tregs em cães com linfoma, submetidos ao protocolo quimioterápico CHOP, associado ou não a um firocoxib.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da quimioterapia antineoplásica sobre o número de células T reguladoras, no momento do diagnóstico, após a indução da quimioterapia (M5) e ao final do tratamento (M20);
- Quantificar as células $CD4^+$ e $CD8^+$, durante o tratamento quimioterápico; no momento do diagnóstico, após a indução da quimioterapia (M5) e ao final do tratamento (M20);
- Avaliar a relação Treg/ $CD8^+$ entre o grupo controle e o grupo com linfoma no momento do diagnóstico;
- Avaliar a expressão de COX-2 em linfonodos de cães acometidos por linfoma multicêntrico;

4. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste experimento foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, sob o número 027665/10.

4.1. Distribuição dos pacientes e protocolo quimioterápico

Nesse trabalho foram incluídos 36 cães adultos, machos ou fêmeas, atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e distribuídos em três grupos experimentais, como a seguir:

Grupo Controle (GC): 12 cães considerados hígidos com base em exames clínicos e laboratoriais, sendo que a idade variou entre dois a 14 anos; seis macho e seis fêmeas; nove cães sem raça definida, um Doberman, um Beagle e um Labrador (Apêndice A).

Grupo Tratado 1 (GT1): 12 cães acometidos por linfoma multicêntrico tratados com o protocolo quimioterápico CHOP de 19 semanas (Quadro 1). Sendo que a idade variou entre cinco a 11 anos; quatro machos e oito fêmeas; cinco Rottweiler, um Beagle, dois Poodle, um Dog Alemão, dois sem raça definida e um Pinscher; dez com imunofenótipo B e dois com imunofenótipo T (Apêndice B).

Grupo Tratado 2 (GT2): 12 cães acometidos por linfoma multicêntrico tratados com o protocolo quimioterápico CHOP modificado (utilizando Firocoxib) (Quadro 2). A idade variou entre quatro a 13 anos; quatro machos e oito fêmeas; um Rottweiler, três sem raça definida, dois PitBull, um Poodle, um Basset Hound, dois Maltês, um Boxer e um Fox Terrier; onze com imunofenótipo B e um com imunofenótipo T (Apêndice C).

Para o estadiamento clínico do linfoma, segundo a Organização Mundial de Saúde, foram realizados exames de imagem (exame radiográfico de tórax e ultrassom abdominal) e punção de medula óssea. Antes de cada sessão de quimioterapia, os pacientes do grupo GT1 e GT2 foram avaliados clinicamente e adicionalmente, amostras de sangue dos animais foram coletadas para realização de hemograma e dosagem de alanina aminotransferase (ALT),

creatinina, proteína e albumina, como parte dos procedimentos adotados pelo Serviço de Oncologia Veterinária do referido Hospital.

Quadro 1. Protocolo quimioterápico CHOP-19 adotado para os animais do grupo GT1.

	Semanas																			
CHOP-19	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Vincristina (0,75 mg/m ² , IV)	•		•			•		•			•		•			•		•		
Ciclofosfamida (250 mg/m ² , VO)		•					•					•					•			
Doxorrubicina (30 mg/m ² , IV)				•					•					•					•	
Análise das Tregs	•				•															•
Prednisona*	•	•	•	•																

* 2 mg/kg, VO, q24h, 7 dias; 1,5 mg/kg, VO, q24h, 7 dias; 1 mg/kg, VO, q24h, 7 dias; 0,5 mg/kg, VO, q24h, 7 dias.

Quadro 2. Protocolo quimioterápico de CHOP-19 modificado adotado para os animais do grupo GT2.

	Semanas																			
CHOP-19	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Vincristina (0,75 mg/m ² , IV)	•		•			•		•			•		•			•		•		
Ciclofosfamida (250 mg/m ² , VO)		•					•					•					•			
Doxorrubicina (30 mg/m ² , IV)				•					•					•					•	
Análise das Tregs	•				•															•
Firocoxib*	•	•	•	•																

* Previcox, Merial, Brasil: 5 mg/Kg, VO, q 24h, 28 dias.

4.2. Classificação histopatológica e imuno-histoquímica do linfoma

Casos suspeitos de linfoma foram submetidos ao exame citológico, obtidos através da punção aspirativa por agulha fina. Após confirmação do diagnóstico, foi realizada biópsia do linfonodo poplíteo para coleta das amostras, estas foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado (pH 7,6). Após o processamento histológico de rotina (HE), o diagnóstico e o imunofenótipo dos linfomas, foram realizados no Laboratório VetPat, sob responsabilidade do Prof. Dr. Felipe A. Ruiz Sueiro que adota os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (VALLI et. al., 2011).

Para a realização da imunofenotipagem dos linfomas, foram utilizados os anticorpos primários anti-CD3 (linfócitos T) e anti-CD79 α (linfócitos B), ambos contra antígenos humanos, produzidos pela DAKO®. E para a expressão de COX-2 foi utilizado clone cx-294 – Dako, Tabela 2.

Tabela 2. Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em linfomas caninos.

Anticorpos	Clones	Diluições	Conservação do tecido
Anti-CD3* (LinfócitosT)	F.7.2.38	1:200	Parafinado
Anti-CD79 α ** (Linfócitos B)	HM57	1:150	Parafinado
Anti-Cox-2	CX-294	1:300	Parafinado

* camundongo anti-humano (monoclonal)

** coelho anti-humano (policlonal)

O método de imuno-histoquímica empregado foi pelo polímero *horseradish peroxidase* (HRP) e *3,3' diaminobenzidine tetrachloride* (DAB). Resumidamente, os cortes de tecido (4 μ) foram distendidos em lâminas carregadas e permaneceram em estufa a 57 °C por 24 horas e, posteriormente, foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes.

Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando uma solução de citrato pH 6,0 em panela de pressão (Pascal®; Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 segundos à, 128°C, aproximadamente. Após essa etapa, ao atingirem a temperatura ambiente, as lâminas contendo os cortes foram lavadas em água deionizada. A seguir foram incubadas em

dois banhos de 10 minutos cada em peróxido de hidrogênio 3% (10V) para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água deionizada por cinco minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi conduzido com solução bloqueadora de reação inespecífica (*protein block serum-free* – catálogo nº X0909 – DAKO Corp.).

As lâminas contendo os cortes foram incubadas com o anticorpo primário na diluição padronizada (Quadro 2) e, então, incubados a 4°C *overnight* (18 horas). Depois, foram novamente lavados em solução tampão de TRIS (Tris-HCl - 0,05M, NaCl – 0,15M; pH=7,6). Em seguida foram incubadas com polímero Envision (Dako, Carpinteria, CA, USA) e posteriormente lavadas com TRIS por três vezes. A coloração foi obtida utilizando-se o DAB (DakoCytomation, Carpinteria, USA) e a contracoloração pela hematoxilina Harrys, seguida da desidratação em concentrações crescentes de álcool e xilol. As lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Linfonodos de cães hígidos foram empregados como controle negativo, além de amostras de linfonodos com linfoma. Ambos receberam tratamento com o *Universal Negative Control Mouse* (Dako® N1698-1). Os mesmos linfonodos foram também empregados como controle positivo das reações.

4.3. Imunofenotipagem de Subpopulações de Linfócitos T

Os animais acometidos por linfoma multicêntrico foram avaliados quanto a porcentagem de células Tregs presentes no sangue periférico, por citometria de fluxo, no momento do diagnóstico (M0), após o primeiro ciclo de quimioterapia (M5) e após a última semana de quimioterapia (M20). Os animais do grupo controle foram submetidos à avaliação das Tregs em um único momento. A técnica empregada foi a de Biller et al.(2007), descrita a seguir.

As células mononucleares foram isoladas a partir de 15 mL de sangue, obtidos por punção venosa e acondicionados em tubos heparinizados. A seguir, o sangue coletado foi diluído (volume:volume) em solução PBS estéril e separado em gradiente de Ficoll-Hypaque, com densidade 1.077g/L (Ficoll-Paque PLUS, Amersham Biosciences, Suécia). Após centrifugação a 720xg por 30 minutos, o anel de células mononucleares foi coletado e ressuspenso em PBS e centrifugado a 720xg por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o anel de leucócitos foi ressuspenso em 2mL de tampão de lise para hemácias

ACK (NH_4Cl - 0,15mM, KHCO_3 - 10mM, EDTA - 0,1mM; pH=7,3), por 5 minutos, e novamente centrifugado. As células lavadas, foram ressuspensas em 1mL de PBS e posteriormente, diluídas (1:20) em azul de tripan 0,5% e contadas em câmara de Neubauer.

As células foram divididas em seis tubos para cada animal, sendo: tubo 1 – somente células sem marcação; tubo 2 – células marcadas com os isotipos controles; tubo 3 – células marcadas com os anticorpos anti-CD4:FITC, PanT APC e anti-CD8:PE; tubo 4 – somente células sem marcação; tubo 5 – células marcadas com os isotipos controles; tubo 6 – células marcadas com os anticorpos anti-CD4:FITC, PanT APC e anti-Foxp3 PE. Os isotipos controle e os anticorpos utilizados acham-se listados na Tabela 3. Nos tubos 1, 2 e 3 foram utilizadas 1×10^6 células, e os tubos 4, 5 e 6, utilizaram-se 2×10^6 células. As células dos tubos 4, 5 e 6 passaram pelo processo de permeabilização de membrana, utilizando-se soluções de permeabilização/fixação e de permeabilização (eBioscience®, ref 00-5521-00), de acordo com as recomendações do fabricante. Antes de cada marcação, de membrana e intracitoplasmática, 5 μL de soro autólogo (previamente incubado em banho-maria a 56°C por 30 minutos), eram acrescentados em cada tubo para bloqueio de reações inespecíficas, e incubados por 30 e 15 minutos, respectivamente. Ao final do processo eram adicionados, 100 μL de solução PBS-formol 1%, para conservação das células.

Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a coleta do sangue. As preparações celulares foram adquiridas em FACSCanto II (BD®), no Laboratório de Imunoparasitologia, de responsabilidade do Prof. Dr. João Santana da Silva, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. No mínimo, cinquenta mil eventos na *gate* de linfócitos foram coletados por tubo e analisados no programa FlowJo. Um fluxograma representando a escolha dos *gates* pode ser observado na Figura 1.

Tabela 3. Relação de isotipos controle e anticorpos utilizados à citometria de fluxo, com seus respectivos fluorocromos e volumes utilizados.

Isotipos controle	Marca	Volume	
Mouse IgG1-Negative Control FITC	AbD Serotec	1µL	
Rat IgG2a Iso Control PE	EBioscience	1µL	
APC Mouse IgG1k Isotype Control	BD Pharmingen™	1µL	
Anticorpos	Marca	Clone	Volume
Rat anti dog CD4:FITC	AbD Serotec	YKIX302.9	1µL
Rat anti dog CD8:RPE	AbD Serotec	YCATE55.9	1µL
APC mouse anti dog PanT cell marker	BD Pharmingen™	FJK-16s	1µL
Anti mouse/rat Foxp3 PE	EBioscience	LSM 8.358	2µL

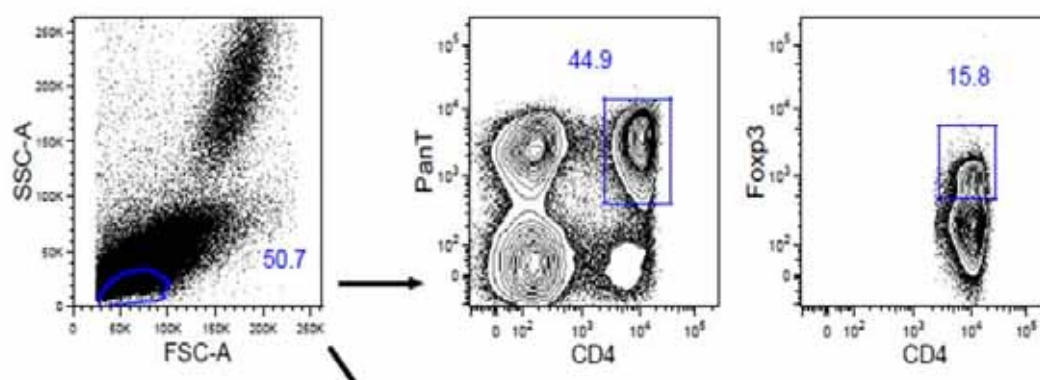


Figura 1. Fluxograma representativo das *gate* de linfócitos; a partir dela a *gate* de linfócitos T CD4⁺ e , a partir desta, a *gate* de linfócitos CD4⁺Foxp3⁺ (Treg), de um cão com linfoma.

Os valores da relação Treg/CD8⁺ foram obtidos através da razão entre a porcentagem de Treg (*gate* de linfócitos T) e a porcentagem de células CD8⁺ (*gate* de linfócitos T).

4.4. Análise estatística

Quando comparadas duas variáveis, utilizou-se o teste T de amostras independentes, quando estas atendiam as suposições de normalidade e homogeneidade. Quando não, utilizou-se o teste Mann Whitney. Quando foram comparadas 3 variáveis e essas atendiam as suposições de normalidade e homogeneidade, aplicou-se o teste F da análise de variância. A comparação das médias aos pares foi feita pelo teste de Tukey. Já para as variáveis que

não atendiam as suposições de normalidade e homogeneidade, foi feita uma análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) e a comparação aos pares pelo teste de Dunn. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo (ZAR, 1999). GraphPad Prism 5 (*GraphPad Prim5 software package*, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) foi o programa utilizado.

Para a avaliação da expressão de COX-2, a coloração foi avaliada pela pontuação de acordo com a distribuição de células positivas (escala de 1: <25% de células positivas 2: 26% a 50% 3: 51% a 75%, e 4:> 75%). O qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram usados para determinar a associação entre as variáveis categóricas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação das populações de células T no sangue periférico

5.1.1. Porcentagem de Tregs em cães controle x pacientes do grupo linfoma

No presente estudo, os cães com linfoma apresentaram a média de porcentagens maiores de Tregs ($17,08 \pm 1,62$) comparados aos do grupo controle (cães saudáveis) ($5,67 \pm 1,62$) ($p < 0,0001$). As médias dos grupos, estão apresentadas na Figura 2. Foi observado que a quantidade de células Tregs revelou-se aproximadamente três vezes maior no grupo linfoma comparado ao controle; esse resultado corrobora com os estudos realizados em cães com diversas neoplasias (BILLER et al., 2007; HORIUCHI et al., 2009; O'NEILL et al., 2009; MITCHELL et al., 2012; MUNHOZ, 2013; CHAVES, 2014).

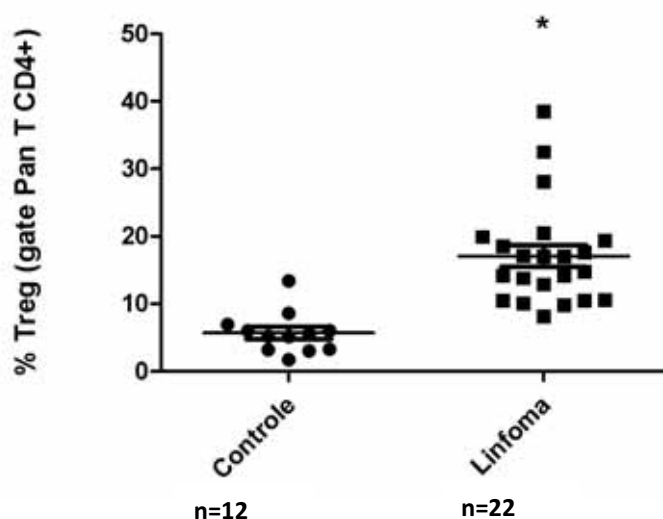


Figura 2. Valores percentuais obtidos de células T reguladoras no sangue periférico de cães saudáveis (controle) e cães portadores de linfoma. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, * $p < 0,0001$.

O'Neill et al. (2009), observaram aumento significativo das Tregs em cães com câncer em relação ao grupo controle; e as maiores porcentagens foram observadas em cães com carcinoma, seguidas de sarcoma, linfoma e mastocitoma. Tominaga et al. (2010) também observaram que cães acometidos de melanoma em cavidade oral apresentavam maior porcentagem de Tregs no sangue periférico comparados aos animais controle. Esses resultados também foram observados em cães com mastocitoma (CHAVES,

2014). Munhoz (2013) observou um aumento da porcentagem das Tregs em cães com linfoma multicêntrico comparado aos controles. Os resultados supracitados concordam com aqueles aqui obtidos.

Existem poucos estudos que enfocam os fatores envolvidos no aumento da porcentagem de Tregs em cães acometidos por neoplasias. Porém, o papel da imunossupressão que as Tregs desempenham, favorecendo o desenvolvimento do câncer, já está bem estabelecido. Elas atuam na redução da imunidade anti-tumoral arquitetada pelas células $CD4^+$ e $CD8^+$, via produção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10, promovendo a expansão ou a conversão das células T convencionais ($CD4^+$) em Tregs (ZOU, 2006; STRAUSS et al., 2007).

Biller et al. (2007), demonstraram que ocorre um aumento na expressão de mRNA de Foxp3 em linfócitos ativados, em cães com câncer, quando colocados em cultivo com IL-2 e TGF- β . E esse resultado foi comprovado pelo aumento da expressão de mRNA de IL-10 e TGF- β em células Tregs adequadamente ativadas.

Outra hipótese foi aventada por Tominaga et al. (2010), que asseveraram que cães com melanoma apresentaram um aumento das Tregs devido ao aumento da expressão de TGF- β , de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e de prostaglandina E2 produzida pelo tumor, o que levaria a atração e proliferação local das células Tregs, além da conversão *in situ* de células $CD4^+$ em Tregs.

O aumento numérico das referidas Tregs imunossupressoras tem sido associado a um pior prognóstico. Hourichi et al. (2009) observaram o aumento das Tregs em cães com metástases, sugerindo que tais células induzem a supressão da vigilância tumoral, via resposta imunológica do Tipo I, e favorecem a metástase do tumor. A presença aumentada de Tregs no sítio tumoral também pode significar um importante fator prognóstico para o carcinoma mamário em cadelas (KIM et al., 2012). Pinheiro et. al. (2014), também apresentaram evidências que as Tregs têm um impacto negativo no prognóstico de cães com linfoma multicêntrico de grandes células B.

5.1.2. Quantificação de Tregs circulante durante a quimioterapia

Avaliando as porcentagens de Tregs do GT1 durante o protocolo quimioterápico, notou-se diferença estatística entre o grupo controle ($5,672 \pm 0,8938$) e M0 ($20,66 \pm 2,487$), entre o M0 ($20,66 \pm 2,487$) e M5 ($8,697 \pm 1,299$) e M0 e M20 ($8,648 \pm 1,736$) ($p < 0,0001$), conforme observado na Figura 3.

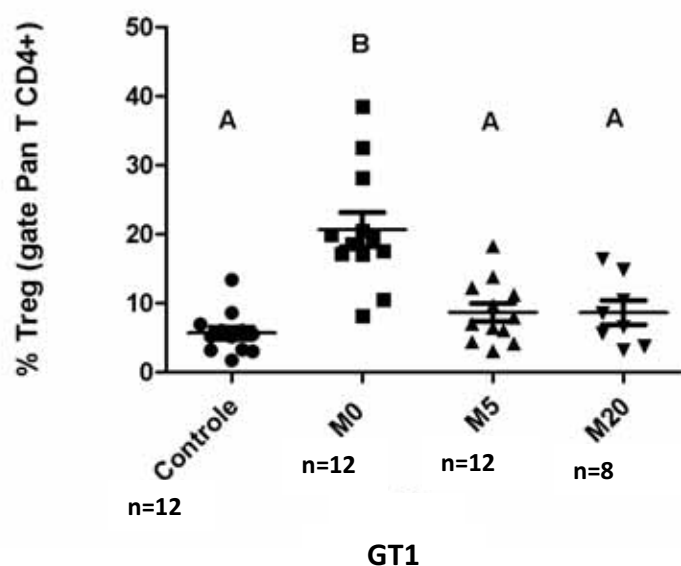


Figura 3. Valores percentuais obtidos para Tregs no sangue periférico de cães controle e com linfoma (GT1), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, ^A $p < 0,0001$, ^B $p > 0,0001$.

As porcentagens de Tregs do GT2, durante o protocolo quimioterápico, apresentaram comportamento diverso daquele do GT1, verificando-se diferença estatística entre o controle ($5,672 \pm 0,8938$) e M0 ($12,79 \pm 0,7673$) e M0 ($12,79 \pm 0,7673$) e M20 ($5,903 \pm 1,126$) ($p < 0,0001$), mas não foi observada diferença estatística entre o grupo controle e M5 ($8,138 \pm 0,7391$) e M0 ($12,79 \pm 0,7673$) e M5 ($8,138 \pm 0,7391$), conforme ilustrado na Figura 4.

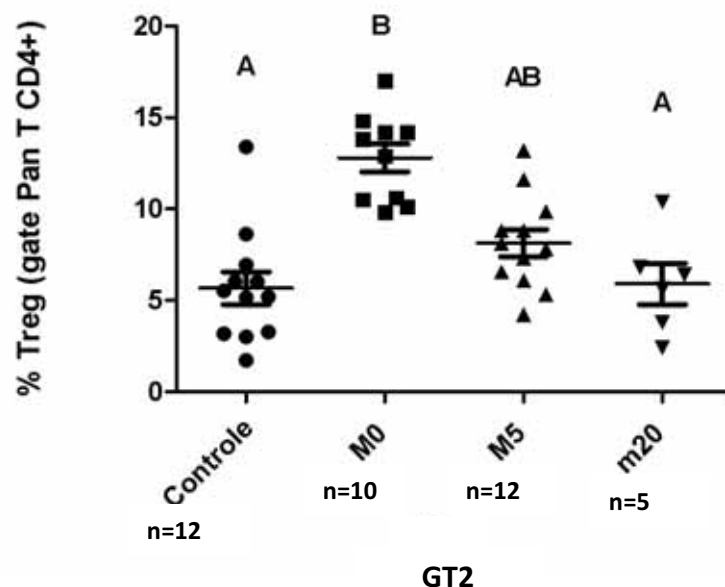


Figura 4. Valores percentuais obtidos para Tregs no sangue periférico de cães controle e acometidos por linfoma (GT2), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para significâncias de ^A $p < 0,0001$, ^B $p > 0,0001$.

Neste trabalho observou-se que o GT1 apresentou uma diminuição brusca de Tregs, porém, no GT2 a diminuição foi mais lenta. Avaliando-se as porcentagens do grupo controle e após o início da quimioterapia dos pacientes com linfoma do GT1, notou-se que no M5, as Tregs assumiram valores próximos aos dos animais controles ($p < 0,0001$). Já no GT2, no M5, a diminuição da Tregs foi menor. Uma das justificativas para a diminuição das Tregs no GT1 seria que a prednisona induz os linfócitos normais a apoptose e citólise de linfócitos neoplásicos (LANORE & DELPRAT, 2004; FAN & LORIMIER, 2005). Tal hormônio esteroide, também atua em receptores celulares específicos, levando a uma cisão do DNA, impedindo a divisão celular (RODASKI & DE NARDI, 2008).

Munhoz (2013), analisando as Tregs em cães com linfoma durante o protocolo quimioterápico MW, também observou uma diminuição significativa das Tregs após a indução da quimioterapia, o que corrobora os achados aqui encontrados para animais do GT1. Mitchell et al. (2012), estudando cães com linfoma tratados apenas com doxorubicina, também encontraram redução significativa das Tregs. Independentemente do tipo de quimioterapia, nos

estudos reportados acima, foi obtida diminuição significativa das Tregs, fato que vem ao encontro dos resultados aqui alcançados.

Quando foram comparados os dois grupos (GT1 e GT2), no M0, os valores percentuais obtidos para as Tregs diferiram estatisticamente GT1 ($20,66 \pm 2,487$) e GT2 ($12,79 \pm 0,7673$) ($p < 0,0114$), como pode ser observado na Figura 5. Tal diferença estatística pode ser atribuída ao fato de que no momento do diagnóstico foram incluídos três pacientes em estágio V, no grupo GT1 e, de outra parte, nenhum paciente apresentava-se no estágio V, dentre aqueles do grupo GT2. Provavelmente o estadiamento dos pacientes pode interferir na porcentagem de Tregs.

Já, no M5, as porcentagens de Tregs não foram estatisticamente significativas, GT1 ($8,697 \pm 1,299$) e GT2 ($8,138 \pm 0,7391$) ($p = 0,7123$). O mesmo fato revela-se patente, quando são comparados os grupos GT1 ($8,648 \pm 1,735$) e GT2 ($5,903 \pm 1,126$) ($p = 0,2445$), no momento M20. Tais resultados podem ser visibilizados, igualmente, na Figura 5.

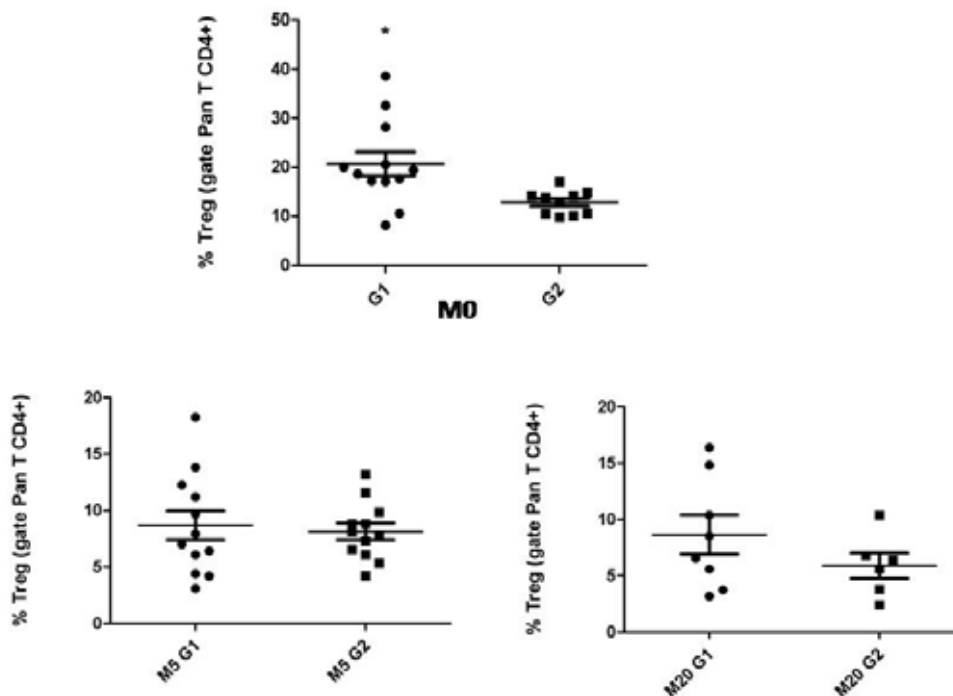


Figura 5. Comparação entre os valores percentuais obtidos para Tregs no sangue periférico de cães acometidos por linfoma (GT1 e GT2), nos momentos M0, M5 e M20 do protocolo quimioterápico. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, * $p < 0,0114$.

Rasmussen et al., (2014), quantificaram as Tregs em cães com neoplasias, sendo que um grupo tratado apenas com doxorubicina e outro com doxorubicina e ciclofosfamida em regime metronômico. Os autores não observaram diferença significativa nos números, relativo e absoluto, das Tregs quando compararam os grupos, mas verificaram diminuição significativa das Tregs após o tratamento. Eles concluíram que a diferença nos números de Tregs, provavelmente, deveu-se à depleção de linfócitos provocada pelo uso da doxorubicina sozinha. Já, neste estudo, observou-se que em ambos os grupos houve diminuição das Tregs, e que, em cujo grupo GT1 a referida queda mostrou-se mais brusca, talvez, pela associação da prednisona.

5.1.3. Quantificação das células CD4⁺ e CD8⁺ durante a quimioterapia

As células CD4⁺ foram avaliadas no sangue periférico durante o protocolo quimioterápico no GT1. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias dos animais controle ($51,01 \pm 4,917$) e tratados do grupo GT1, nos diferentes momentos de avaliação, sejam eles, M0 ($45,52 \pm 4,661$), M5 ($51,61 \pm 3,450$) e M20 ($59,50 \pm 4,479$) ($p=0,2330$). Os valores médios percentuais e respectivos erros padrões das médias, estão apresentados na Figura 6.

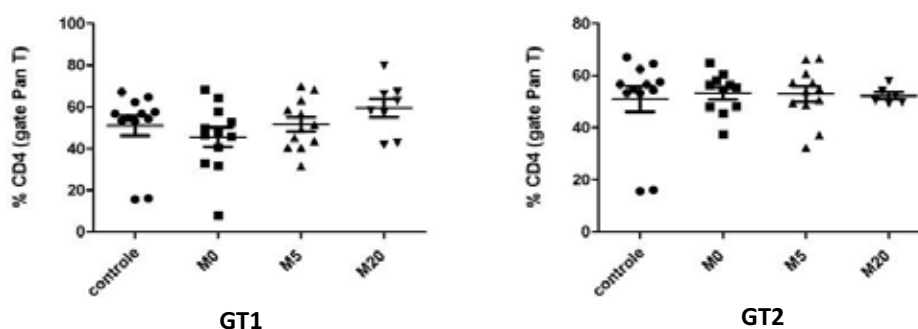


Figura 6. Valores percentuais obtidos para células CD4⁺ no sangue periférico de cães controle e acometidos por linfoma (GT1 e GT2), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

As células CD4⁺ também foram avaliadas no sangue periférico durante o protocolo quimioterápico no GT2. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias dos animais controle ($51,01 \pm 4,917$) e tratados no grupo GT2,

nos diferentes momentos de avaliação, M0 ($53,27 \pm 2,34$), M5 ($52,96 \pm 2,973$) e M20 ($52,35 \pm 1,336$) ($p=0,7689$). As médias, juntamente com o erro padrão das médias, estão apresentadas na Figura 6.

Já quando comparado os dois grupos (GT1 e GT2), no M0 as porcentagens de $CD4^+$ não foram estatisticamente significativa GT1 ($45,52 \pm 4,661$), GT2 ($53,27 \pm 2,340$) ($p=0,1632$). No M5, também não foi observada diferença estatística entre GT1 ($51,61 \pm 3,450$) e GT2 ($52,96 \pm 2,973$) ($p=0,7693$). O mesmo ocorre, quando comparamos os grupos o M20, GT1 ($59,50 \pm 4,479$) e GT2 ($52,35 \pm 1,336$) ($p=0,2061$). Esse dados podem ser observado na Figura 7.

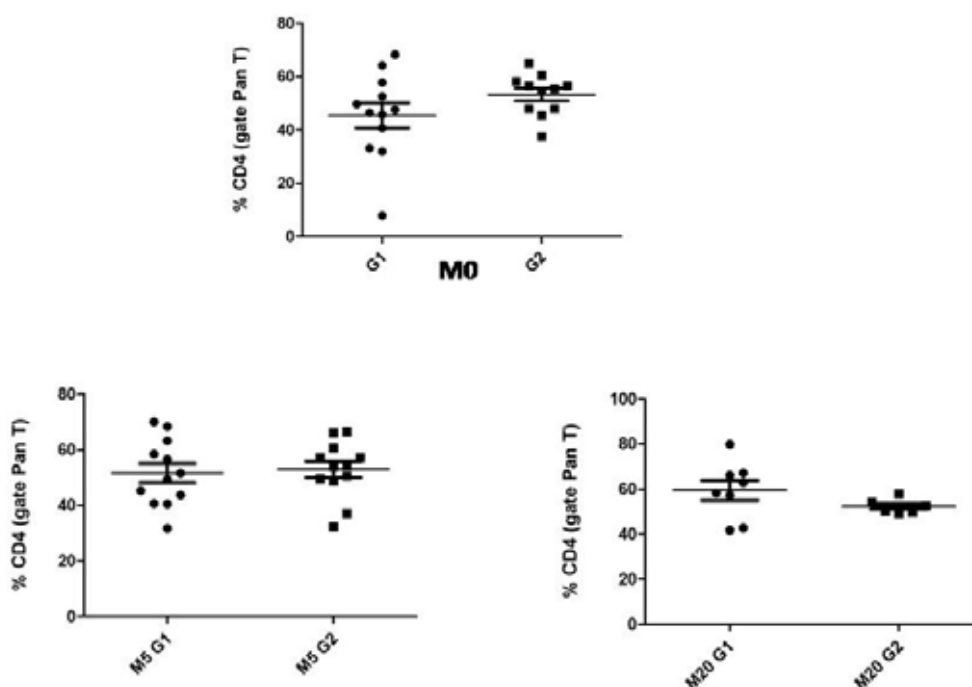


Figura 7. Comparação da porcentagem das células $CD4^+$ do sangue periférico de cães com linfoma do GT1 e GT2, nos momentos, M0, M5 e M20 do protocolo quimioterápico. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

Quando as células $CD8^+$ foram avaliadas no sangue periférico durante o protocolo quimioterápico no GT1. Não foram observadas diferenças estatísticas entre animais controle ($31,78 \pm 5,655$) e tratados no grupo GT1, nos diferentes momentos de avaliação, sejam eles, M0 ($25,87 \pm 4,394$), M5 ($25,86 \pm 3,874$) e

M20 ($20,73 \pm 2,164$) ($p=0,4142$). As médias, juntamente com o erro padrão das médias, estão apresentadas na Figura 8.

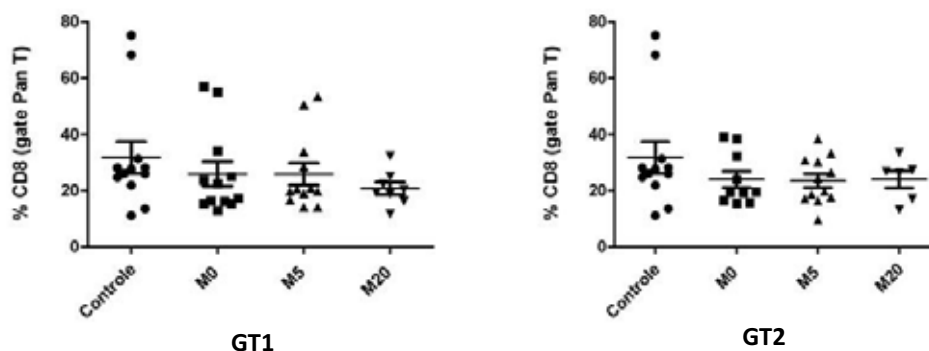


Figura 8. Valores percentuais das células CD8⁺ no sangue periférico de cães controle e acometidos por linfoma (GT1 e GT2), durante o protocolo quimioterápico (M0, M5 e M20). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

As células CD8⁺ também foram avaliadas no sangue periférico durante o protocolo quimioterápico no GT2. Não foi observada diferença estatística entre animais do grupo controle ($31,78 \pm 5,655$) e tratados, nos diferentes momentos de avaliação, sejam eles, M0 ($23,91 \pm 2,906$), M5 ($23,51 \pm 2,432$) e M20 ($23,98 \pm 3,041$) ($p=0,7684$). As médias, juntamente com o erro padrão das médias, estão apresentadas na Figura 8.

Quando comparamos os dois grupos (GT1 e GT2), no M0, as porcentagens de CD8⁺ não diferem estatisticamente, GT1 ($25,87 \pm 4,394$) e GT2 ($23,91 \pm 2,906$) ($p=0,7262$). No M5, também não foi observado diferença estatística, GT1 ($25,86 \pm 3,874$) e GT2 ($23,51 \pm 2,432$) ($p=0,6126$). O mesmo ocorre, quando comparamos os grupos o M20, GT1 ($20,73 \pm 2,164$) e GT2 ($23,98 \pm 3,041$) ($p=0,3860$). Esse dados podem ser observado na Figura 9.

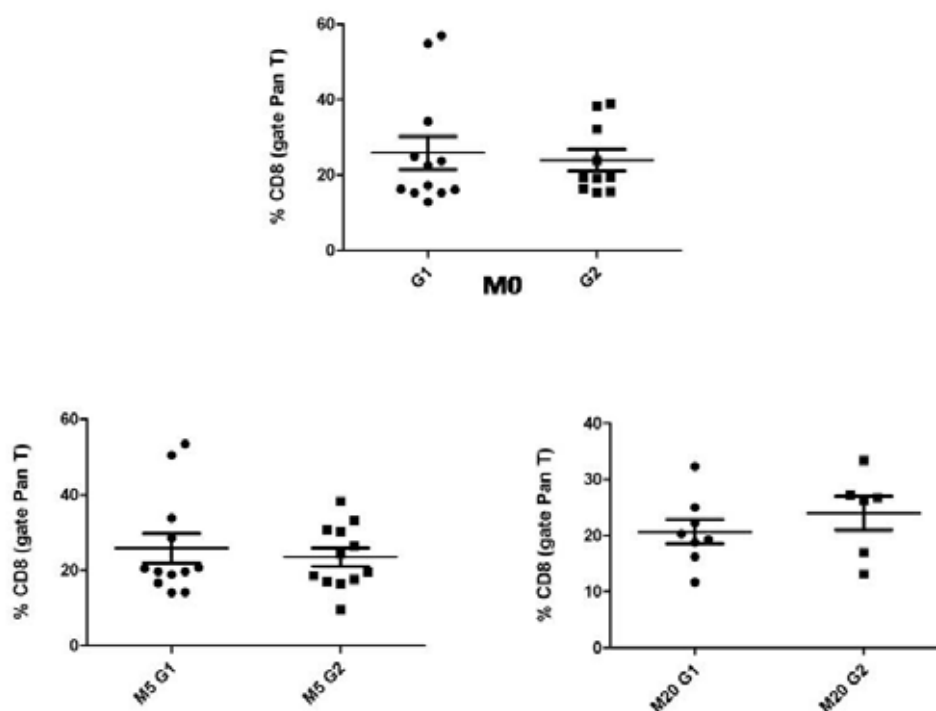


Figura 9. Valores percentuais células CD8⁺ do sangue periférico de cães com linfoma do GT1 e GT2, nos momentos M0, M5 e M20 do protocolo quimioterápico. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

As células CD4⁺ e CD8⁺ possuem um potencial citotóxico para as células tumorais e estão presentes em vários tipos de neoplasias em humanos e murinos (GERDEMANN et al., 2009; MERLO et al., 2010). A infiltração das Tregs nos tumores, inibem diretamente as funções anti-tumor das células CD4⁺ e CD8⁺, um efeito que ocorre primeiramente através da secreção de citocinas imunossupressoras pelas Tregs, como a IL-10 e TGF- β (CURIEL, 2007).

Como pode ser observado neste estudo, as células CD4⁺ e CD8⁺ não apresentaram alterações numéricas em nenhum momento do protocolo quimioterápico e nem na comparação dos tratamentos o que corrobora os achados de outras pesquisas em cães com câncer (WINNICKA et al., 2002; WALTER et al., 2006; COLETA, 2009; MITCHELL et al., 2012; MUNHOZ, 2013; CHAVES, 2014).

O'Neill et al. (2009), obtiveram uma diminuição absoluta de células CD8⁺ em cães com câncer quando comparado ao grupo controle e também observou

uma diminuição de células CD4⁺ em cães com carcinoma comparada ao grupo controle. Também foi observado uma diminuição das células CD8⁺ em cães com osteossarcoma quando comparado ao grupo controle (BILLER et al., 2010), fato não observado neste estudo.

Walter et al. (2006) estudando as células CD4⁺ e CD8⁺ em cães com linfoma, e osteossarcoma, verificaram que a função das referidas células permanecia inalterada após tratamento quimioterápico, comprovando que os cães possuem capacidade de montarem uma resposta IgG específica contra o antígeno KLH (*keyhole limpet hemocyanin*).

Em pacientes humanos acometidos por linfoma Não-Hodgkin (NHL) de células B, em regime de quimioterapia padrão, aquele que detinham maior quantidade de infiltrado de células CD4⁺, no momento do diagnóstico, apresentavam tempo de sobrevida mais longa do que aqueles com menores infiltrados de CD4⁺ (ANSELL et. al, 2001; Xu et al., 2001).

Mitchell et al. (2012) investigaram a função das células CD4⁺ e CD8⁺ em cães com linfoma difuso de grande células B, tratados com doxorrubicina, e concluíram que a administração repetida de doxorrubicina teve pouco efeito sobre o desenvolvimento da resposta imune humoral ou subconjuntos de linfócitos T circulante.

5.1.4. Avaliação da relação Treg/CD8⁺ dos cães controles x pacientes com linfoma

Neste estudo, a comparação da relação Treg/CD8⁺ entre pacientes acometidos por linfoma, no momento do diagnóstico ($0,2606 \pm 0,03964$) e animais controle ($0,1703 \pm 0,05928$), não revelou diferenças significativas ($p=0,1996$), como pode ser observado na Figura 10. Da mesma forma a comparação da relação Treg/CD8⁺ entre os grupos controle ($0,1703 \pm 0,05928$), GT1 ($0,2825 \pm 0,0655$) e GT2 ($0,2313 \pm 0,0334$) ($p=0,0735$), não mostrou diferenças significativas ($p=0,0735$), dados que podem ser apreciados na Figura 11.

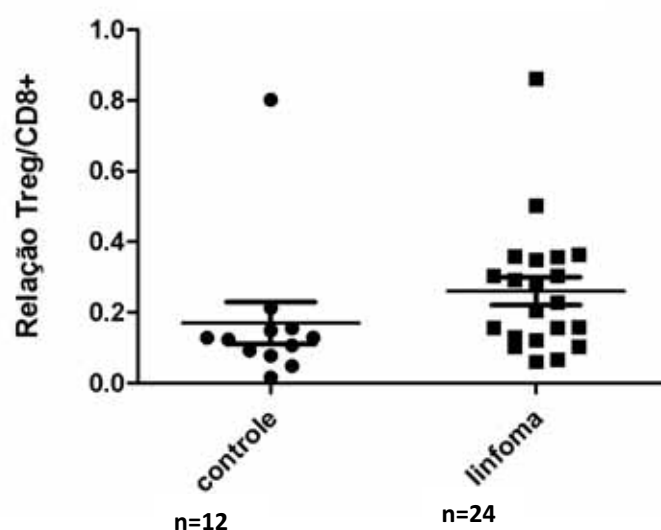


Figura 10. Valores da relação Treg/CD8⁺ no sangue periférico de cães saudáveis (controle) e cães portadores de linfoma, no momento do diagnóstico. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

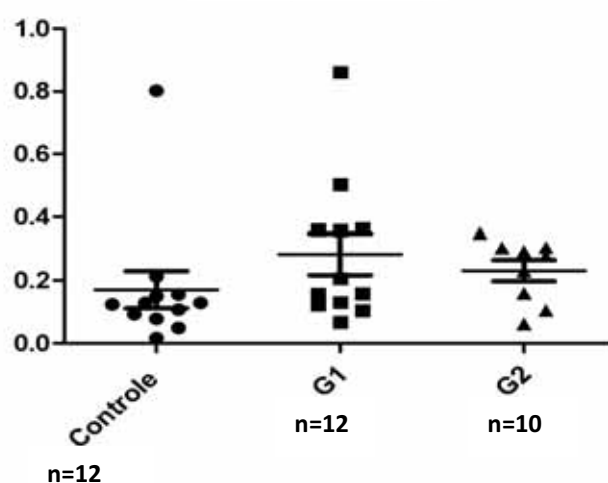


Figura 11. Valores da relação Tregs/CD8⁺ no sangue periférico do grupo controle, GT1 e GT2, no momento do diagnóstico. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

O'Neill et. al., (2009), observaram aumento da relação Tregs/CD8⁺ em cães com câncer, especialmente em cães com linfoma, Biller et al. (2010) também verificaram tal aumento em cães com osteossarcoma e Chaves (2014) em cães com mastocitoma. Além disso, os estudos retromencionados evidenciaram que quanto maior a relação Treg/CD8⁺ pior o prognóstico dos

estados neoplásicos. A discordância entre os resultados obtidos por estes autores e aqueles alcançados na pesquisa em tela, pode ser devida ao fato que Biller et al. (2010) trabalharam com um número pequeno de cães ($n=12$) acometidos por osteossarcoma; O'Neill et al. (2009), sete cães com linfoma e Chaves (2014) dezesseis cães com mastocitoma (oito cães com mastocitoma de baixo grau e oito de alto grau). Já, em nosso estudo foram ensaiados 24 cães com linfoma. Entretanto, nossos dados corroboram aqueles de Munhoz (2013), que avaliou a relação Treg/CD8⁺ em 20 cães, com linfoma multicêntrico, em diferentes momentos da resposta ao tratamento quimioterápico.

O'Neill et al. (2009) e Biller et al. (2010), observaram uma diminuição das células CD8⁺, sugerindo que o aumento das Tregs em cães, está associado a alguns tipos de câncer e talvez associada com a porcentagem de supressão das CD8⁺ circulantes, por isso tiveram um aumento da relação Tregs/CD8⁺, fato não observado neste estudo.

Também devem ser levados em consideração os tipos de neoplasias que foram analisados e os aspectos imunofenotípicos dos linfomas, pois sabemos que os linfomas de células T são mais agressivos. Neste estudo foram incluídos apenas três cães com linfoma de células T (Apêndice B e C).

Uma estratégia para melhor verificar essa relação Treg/CD8⁺, seria acompanhar por um período maior os pacientes, já que os linfomas recidivam frequentemente. Adicionalmente, aumentar o número de cães acometidos por linfoma de células B e células T, separadamente.

5.2. Avaliação da expressão de COX-2 no linfonodo de cães com linfoma

Dos animais do presente estudo apenas três apresentaram imunofenótipo T. Dentre esses animais 66,65% (2/3) não apresentaram marcação para COX-2 e 33,35% (1/3) apresentaram expressão baixa de COX-2 (escore 1). Vinte e três animais apresentaram Imunofenótipo B e dentre eles 38% (8/21) não apresentaram marcação para a COX-2 e 62% (13/21) apresentaram positividade para a COX-2.

Um fato interessante observado neste estudo é que das amostras totais, 58,35% (14/24) foram positivas para a proteína COX-2. E das amostras positivas 42,8% (6/14) apresentam marcação forte para a proteína COX-2 (marcação 3 ou 4). Esse achado indica que os animais com linfoma podem se

beneficiar com a utilização de inibidores da COX-2. Isso também foi demonstrado por Asproni et. al., (2014), que obtiveram um resultado semelhante ao deste ensaio, demonstrando que o linfoma canino expressa COX-2 e que a falta de expressão de COX-2, em tecidos linfóides normais e hiperplásicos, sugere a utilização de inibidores da COX-2 como um recurso potencial em favor da ação terapêutica contra o linfoma canino. Esses resultados também corroboram os de Bernard et.al., (2009), que observaram a expressão de COX-2 em linfoma não-Hodgkin no homem. Já Mohammedet et. al, (1999) e Rodrigues et. al, (2011), não encontraram expressão de COX-2 em linfoma canino e tampouco em linfonodos normais.

Estudos recentes evidenciaram que 57% dos pacientes com linfoma não-Hodgkin apresentaram expressão da COX-2 por células tumorais e cujos pacientes foram mais propensos a ter um crescimento mais agressivo do tumor (HASAR et. al., 2004; O'BARISIK et. al., 2010). Além disso, a expressão elevada de COX-2 foi detectada em linfomas de Burkitt (WUN et. al., 2004) e não-Hodgkin, que foram tratados com celecoxib e obtiveram uma redução da proliferação e indução da apoptose em mais de 85% das células do linfoma de Burkitt (KARDOSH et. al., 2005).

6. CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste ensaio e em função dos resultados aqui encontrados, conclui-se que:

- ✓ Cães acometidos por linfoma apresentam aumento na porcentagem de Tregs, no sangue periférico, quando comparados com cães saudáveis;
- ✓ O protocolo poliquimioterápico CHOP (GT1), assim como CHOP + Firocoxib (GT2), diminuem significativamente a quantidade de células Tregs, no sangue de cães acometidos por linfoma;
- ✓ Os cães acometidos por linfoma e tratados com o protocolo CHOP (GT1) experimentaram diminuição mais brusca de células Tregs, na 5ª semana de tratamento, comparados àqueles do GT2, tratados com CHOP+Firocoxib;
- ✓ A relação Treg/CD8⁺, dentro das limitações deste estudo, não apresentou diferença na comparação entre os grupos;
- ✓ Cães acometidos por linfoma expressam COX-2;
- ✓ Inibidores de COX-2 pode significar uma nova ferramenta no auxílio à quimioterapia de cães acometidos por linfoma multicêntrico;
- ✓ A utilização de inibidor de COX-2 pode ser uma estratégia terapêutica para paciente que não podem utilizar a prednisona;

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 576 p., 2005.
- ANSELL, S. M. et al. CD4⁺ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J. Clin. Oncol.* 19, p. 720 - 726, 2001.
- ASPRONI, P. et al. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal, hyperplastic and neoplastic canine lymphoid tissues. **J. Comp. Path.**, v. 10, p. 1 -7, 2014
- BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25+ regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1245-53, 2001.
- BANHAM, A.H. et al. Monoclonal antibodies raised to the human FOXP3 protein can be used effectively for detecting Foxp3⁺ T cells in other mammalian species. **Vet. Immun. Immunopathol.**, v. 127, p. 376-81, 2009.
- BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 875-88, 2007.
- BERNARD, M. P. et al. Targeting cyclooxygenase-2 in hematological malignancies: rationale and promise. **Current Pharmaceutical Design**, 14, p. 2051-2060, 2009.
- BILLER, B.J. et al. Use of Foxp3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 116, p. 69-78, 2007.
- BILLER, B.J. et al. Decreased ratio of CD8⁺ T cells to regulatory T cells associated with decreased survival in dogs with osteosarcoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 24, p. 1118-23, 2010.
- BRUNKER, J.D.; HOOVER, J.P. B-cell lymphoma in a dog with ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) and systemic histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*). **Can. Vet. J.**, v. 48, p. 292-95, 2007.
- BURTON, J.H., et al. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 25, p. 920-6, 2011.
- BYRNE, K. M. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes.

Veterinary Immunology and Immunopathology, Netherlands, v.73, n.2, p.167-182, 2000.

CANTINI, G.; PISATI, F.; MASTROPIETRO A. et al. A critical role for regulatoru T cells in driving cytokine profiles of Th17 cells and their modulation of glioma microenvironment, **Cancer Immunol Immunother**, 60(12):1739-1750, 2011.

CARDOSO, M.J.L. et al. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. **Biosci. J.**, v. 19, n. 3, p. 131-142, 2003.

CARDOSO, M.J.L. et al. Linfoma canino-achados clínico-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.25-29, 2004.

CHAVES, M. R. S. **Células T reguladoras em sangue periférico de cães portadores de mastocitoma cutâneo**. 40f. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

CHUN. R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? **Topics in Companion Animal Medicine.**, v. 24, n. 3, p. 157-62, 2009.

COOLS, N. et al. Regulatory T cells and human disease. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2 p. 1-11, 2007.

COLETA, F. E. D. **Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma**. 96 f. 2009. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 561-569, 1994.

CRUVINEL, W.M. et al. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n. 6, p. 342-55, 2008.

CURIEL, T. J. Regulatory T-cell development: is Foxp3 the decider? **Nat. Med.** 13, p. 250-253, 2007.

DE MOURA, V. M. B. D. et al. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.

DIECKMANN, D. et al. Human CD4+CD25+ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 247-53, 2002.

- DOBSON, J.M., GORMAN, N.T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response to two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 1993.
- DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.** v. 12, p. 1063-1073, 1998.
- FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v.82, n.1-2, p.23-37, 2001.
- FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, January. 2002.
- FAN, T.M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**. p.285-294, 2005.
- FRÁGUAS, M.S. **Estudo de casos de linfoma canino ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006 junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV-UNESP-Jaboticabal**. 2008. 64 f. Trabalho de iniciação científica (modalidade bacharelado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- GERARDI, D.G. Mecanismos de resistência aos quimioterápicos. In: DALECK, C.R.; De NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1. ed., São Paulo: Roca, 2008. p. 180-93.
- GERDERMANN, U. et. al. Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. **Molecular Therapy**, v.19, p. 2258-2268, 2011.
- GREENLEE, P.G. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, Philadelphia, v.66, p.480-490, 1990.
- GRINDEM, C.B. Blood cell markers. The **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, United States, v.26, n.5, p.1043-1065, 1996.
- GTOWALA-KOSINKA, M. et al. Association of circulation regulatory T cell number with the incidence and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. **European Journal of Haematology**., v. 91, p 122-128, 2013.
- HAZAR, B. et. al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in lymphomas. **Leukemia and Lymphoma**, 45, p. 1395-1399, 2004.
- HORIUCHI, Y. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. **Microbiol. Immunol.**, v. 53, p. 468-74, 2009.

- HOSOYA, K., et al. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 21, p. 1355-63, 2007.
- JENNINGS, C.D., FOON, K.A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. **Blood**, United States, v.90, n.8, p. 2863-2892, 1997.
- JONES, C.J., HUNT, R.D., KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997.
- KARDOSH, A. et al. Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potentially mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro. **Cancer Biology and Therapy**, 4, p. 571-582, 2005.
- KEPPEL, K.E. et al. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 123, p. 337-44, 2008.
- KEREN, D.F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D.F., HANSON, C.A., HARTUBISE, P.E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, p.1, 1994.
- KIM, H.I. et al. The ratio of intra-tumoral regulatory T cells (FoxP3+)/helper T cells (CD4+) is a prognostic factor and associated with recurrence pattern in gastric cardia cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 104, p. 728-33, 2011.
- KIM, J. H. et al. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 222-227, 2012.
- KOSMACZEWSKA, A. et al. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 56, p. 181-91, 2008.
- LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. 191p.
- LEE, S. Y. et al. The Immune Tolerance of Cancer is Mediated by IDO That is Inhibited by COX-2 Inhibitors Through Regulatory T Cells. **J. Immunother**, v. 32, n. 1, p. 22-28, 2009.
- MA, C.; DONG, X. Colorectal cancer-derived Foxp3 (+) IL-17 (+) T cells suppress tumor-specific CD8+ T cells, **Scand J Immunol.**, 74(1): 47-51, 2011.

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**, 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. cap. 28 B, p. 451-479, 1996.

MANDSFIELD, A. et al. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1-10, 2009.

MERLO, A. et. al. Virus-specific cytotoxic CD4⁺ T cells for the treatment of EBV-related tumors. **J. Immunol.** 184, p. 5895-5901, 2010.

MITCHELL, L. et al. Induction of remission results in spontaneous enhancement of anti-tumor cytotoxic T-lymphocyte activity in dogs with B cell lymphoma. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 145, p. 597-603, 2012.

MOHAMMED, S.I. et. al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. **Cancer Research**, 59, p. 5647-5650, 1999.

MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 44, p. 46-52, 2007.

MORRISON, W. B. Commonly used protocols: Canine lymphoproliferative neoplasms: Doxorubicin. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer Chemotherapy - A Veterinary Handbook**. Malvern: Williams & Wilkins. p. 156, 1998.

MORRISON, W.B. Lymphoma in dogs and cats. Texas: Teton New Media, 2005. MOULTON, J.E. & HARVEY, J.W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press. p. 231, 1990.

MORRISON, W.B. Lymphoma in dogs and cats. Texas: Teton New Media, 2005.

MUNHOZ, T. D. **Células T reguladoras em cães com linfoma multicêntrico: quantificação, em sangue periférico, no momento diagnóstico e após a etapa inicial do tratamento quimioterápico**. 2013. 57 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

- NAKAGE et. al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n.4, p.966-973, 2005.
- NATARAJ, C. et al. Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. **J. Clin. Invest.** v. 108, p. 1229-1235, 2001.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1087-1096, 2006.
- O'BARISIK, N.O. et. al. Expression and prognostic significance of cox-2 and p-53 in Hodgkin lymphomas: a retrospective study. **Diagnostic Pathology**, 5, p. 19-26, 2010.
- OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In: **Managing the Veterinary Cancer Patient**. Trenton: Veterinary Learning System. p. 228-259, 1995.
- O'NEILL, K. et al. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 23, p. 875-81, 2009.
- PICCIRILLO et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta 1 production and responsiveness. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 237-46, 2002.
- PINHEIRO et al. Dissecting the regulatory microenvironment of a large animal model of Non-Hodgkin lymphoma: Evidence of a negative prognostic impact of Foxp3⁺ T cells in canine B cell lymphoma. **Plos One**, v. 9, p. 1-15, 2014.
- RALLIS, T., KOUTINAS, A., LEKKAS, S. et al. C. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma), in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, p. 590-596, 1992.
- RASKIN, R.E.; KRENBIEL, J.D. Prevalence of leukaemia blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Association**, Schaumburg, v.194, n.10, p.1427-1429, 1989.
- RASNUSSEN, R. et al. Phase I lead-in and subsequent randomized trial assessing safety and modulation of regulatory T cell numbers following a maximally tolerated dose doxorubicin and metronomic dose cyclophosphamide combination chemotherapy protocol in tumor-bearing dogs. In: Veterinary Cancer Society, 2014, St. Louis. Proceedings: VCS, 2014, p.40.
- RODASK, S.; DE NARDI, A. B. **Quimioterapia Antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008.

RODRIGUES L.C.S. et al. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in canine multicentric lymphoma. **Anales de Veterinaria (Murcia)**, 27, p. 43-49, 2011.

ROSENTHAL, C.R.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, United States, v. 196, n. 5, p. 774-781, 1990.

SATO et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 116, p. 69-78, 2007.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25) breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-64, 1995.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self tolerance maintained bt T-cell-mediated control of self-reactive T cells: implications for autoimmunity and tumor immunity. **Microbes Infect.** v. 3, n. 11, p. 911-8, 2001.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory t cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 345-52, 2005.

SCHRECK, S. et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. **Hemat. Oncol.**, v. 27, p. 31-9, 2009.

SEQUEIRA, J.L., FRANCO,M., BANDARRA, E.P. et al. Características anatoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.3, p.1-11, 1999.

SHEVACH, E. M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more question than answers. **Nat. Rev. Immunol.** v. 2, n. 6, p. 389-400, 2002.

SHIMIZU et al. Tumor-infiltrating Foxp3⁺ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resectes non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 5, p. 585-590, 2010.

SIMMONS, D. L. et al. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition, **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 387-437, 2004.

- SUSAN, N.; ETTIGER, D.V.M. Principles of treatment of canine lymphoma, *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 18, p. 92-97, 2003.
- STRAUSS, L.; BERGMANN, C.; SZCZEPANSKI, M.; GOODING, W.; JOHNSON, J. T.; WHITESIDE, T. L. A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor- β 1 mediates suppression in the tumor microenvironment. **Clinical Cancer Research**, v.13, n. 15, p.4345-4354, 2007.
- TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Vet. Q.**, v. 16, p. 209-19, 1994.
- TOMINAGA, M. et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 22, p. 438-41, 2010.
- YANG S, WANG B, GUAN C, et al. Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer, *J Leukoc Biol*, 89 (1): 85-91, 2011.
- YAQUB, S. et al. Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 57, p. 813-821, 2008.
- VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfóides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, cap. 6, p. 218-225, 1998.
- VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 91, p. 620-625, 2000.
- VAIL, D.M.; PINKERTON, M. E.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small animal clinical oncology**. 5. ed., Missouri: Saunders, 2013. p. 621-692.
- VALLI, V.E.O. The hematopoietic system. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. (Ed) **Pathology of domestic animals**, 6.ed. New York: Academic, v.3, p.149-153, 1993.
- VALLI, V.E. et.al. Classification of canine malignant lymphoma according to the World Health Organization criteria. **Vet Pathol**, 48, p. 198-211, 2011.
- VANG, T. et al. Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein Kinase A inhibits T cell receptor signaling. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 2003.

- WALTER, C. U. et al. Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 20, p. 342-47, 2006.
- WANG, D.; DOBOIS, R.N. Prostaglandins and cancer. **GUT**, v. 55, p.115-122, 2006.
- WINNICKA, A. et al. Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. **J. Vet. Med. A**, v. 49, p. 303-6, 2002.
- WUN, T.; MCKNIGHT, H.; TUSCANO, J. M. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. **Leukemia Research**, 28, p. 179-190, 2004.
- XU, Y. et. al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in the diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. **Br. J. Haematol.** 112, p. 945-949, 2001.
- ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p.295-307, 2006.

Apêndices

Apêndice A

Tabela A. Dados referentes aos animais do grupo controle, em relação à raça, sexo e idade. Jaboticabal, 2014.

Animal	Raça	Sexo	Idade
C1	Sem raça definida	Macho	4 anos
C2	Doberman	Fêmea	5 anos
C3	Beagle	Fêmea	8 anos
C4	Sem raça definida	Macho	6 anos
C5	Sem raça definida	Macho	4 anos
C6	Sem raça definida	Fêmea	4 anos
C7	Sem raça definida	Macho	12 anos
C8	Sem raça definida	Fêmea	6 anos
C9	Sem raça definida	Fêmea	14 anos
C10	Labrador	Macho	2 anos
C11	Sem raça definida	Macho	7 anos
C12	Sem raça definida	Fêmea	8 anos

Apêndice B

Tabela B. Dados referentes aos animais do grupo tratado 1 (GT1 – Protocolo CHOP), em relação à idade, sexo, raça, histopatológico, imunofenótipo e estadiamento. Jaboticabal, 2014.

Animal	Idade	Sexo	Raça	Tipo histológico	Imunofenótipo	Estadiamento
1	5 anos	M	Rottweiler	Grandes Células Imunoblástico	B	IIIb
2	7 anos	F	Beagle	Plasmocitóide	T	IVa
3	9 anos	F	Poodle	BurkittLike	B	Vb
4	7 anos	F	Dog Alemão	Difuso de Grandes Células	T	Ia
5	5 anos	F	Rottweiler	Difuso de Grandes Células	B	IIIb
6	6 anos	M	Rottweiler	Linfoblástico	B	IVb
7	5 anos	M	SRD	Difuso de Grandes Células	B	IVa
8	8 anos	F	Pinscher	Difuso de Grandes Células	B	Vb
9	11 anos	F	Rottweiler	Difuso de Grandes Células	B	IVb
10	5 anos	F	Rottweiler	Difuso de Grandes Células	B	Va
11	11 anos	F	Poodle	Difuso de Grandes Células	B	IVb
12	7 anos	M	SRD	Difuso de Grandes Células	B	IVa

Apêndice C

Tabela C. Dados referentes aos animais do grupo tratado 2 (GT2 – Protocolo CHOP + Firocoxib), em relação à idade, sexo, raça, histopatológico, imunofenótipo e estadiamento. Jaboticabal, 2014.

Animal	Idade	Sexo	Raça	Tipo histológico	Imunofenótipo	Estadiamento
1	8 anos	F	Rottweiler	Difuso de Grandes Células	B	IVa
2	12 anos	F	SRD	Difuso de Grandes Células	B	IVb
3	13 anos	F	PitBull	Difuso de Grandes Células	B	IVa
4	7 anos	F	Poodle	Linfoblástico	T	IVa
5	6 anos	F	Basset Hound	Difuso de Grandes Células	B	IVb
6	9 anos	M	SRD	Folicular grau III	B	IVa
7	4 anos	M	Maltês	Difuso de Grandes Células	B	IIIa
8	13 anos	F	Boxer	Difuso de Grandes Células	B	IVa
9	12 anos	M	SRD	Difuso de Grandes Células	B	IVa
10	7 anos	F	Fox Terrier	Difuso de Grandes Células	B	IVb
11	9 anos	F	PitBull	Difuso de Grandes Células	B	IVa
12	4 anos	M	Maltês	Difuso de Grandes Células	B	IVa

Apêndice D

Tabela D. Porcentagens individuais referentes às subpopulações celulares CD4⁺, CD8⁺, Treg e Treg/CD8⁺, do grupo controle. Jaboticabal, 2014.

	%Treg (gate CD4)	%CD4 (gate linf T)	%CD8 (gate linf T)	Treg/CD8 (gate linf T)
Animais				
1	5,16	64,64	31,3	0,1067
2	5,2	56,64	21,81	0,1288
3	8,62	53,21	27,66	0,2126
4	3,28	15,56	68,14	0,0166
5	6,03	54,33	25,98	0,1236
6	6,95	53,35	24,65	0,1493
7	5,52	16,08	75,09	0,0932
8	3,17	56,6	28	0,0775
9	6	57,5	28	0,1286
10	3	67,1	13,5	0,1555
11	1,73	54,75	26,1	0,0490
12	13,4	62,4	11,1	0,8018

Apêndice E

Tabela E. Porcentagem individuais referentes às populações de Treg e relação Treg/CD8⁺, antes (M0) e após o tratamento quimioterápico (M5 e M20), dos animais com linfoma do GT1. Jaboticabal, 2014.

GT1	Treg (gate CD4)			Treg/CD8 (gate linf T)
	M0	M5	M20	M0
1	19,39	7,01	-	0,5028
2	19,93	7,93	6,56	0,1572
3	28,16	6,07	-	0,2061
4	35,5	3,1	3,17	0,1037
5	10,5	4,2	3,74	0,1579
6	17	9,7	8,52	0,0667
7	17,6	11,2	10,4	0,3644
8	8,15	4,4	5,59	0,3594
9	20,5	6,43	16,5	0,8613
10	32,5	13,8	-	0,1304
11	17,13	18,25	-	0,3581
12	18,55	12,27	14,8	0,1224

* M0= momento do diagnóstico; M5= após o primeiro ciclo da quimioterapia; M20= após a última semana de quimioterapia.

Apêndice F

Tabela F. Porcentagem individuais referentes às populações de Treg e relação Treg/CD8⁺, antes (M0) e após o tratamento quimioterápico (M5 e M20), dos animais com linfoma do GT2. Jaboticabal, 2014.

GT2	Treg (gate CD4)			Treg/CD8 (gate linf T)
	M0	M5	M20	M0
1	10,1	4,22	3,8	0,2781
2	14,2	6,56	5,62	-
3	14,8	13,2	-	0,3043
4	10,6	8,1	-	0,0615
5	12,9	7,3	6,8	0,3041
6	10,5	8,8	-	0,2917
7	13,8	7,8	-	0,3487
8	9,8	8,8	-	0,1046
9	14,2	5,33	-	0,2293
10	-	11,6	6,4	-
11	-	9,85	10,4	-
12	17	6,1	-	0,1592

* M0= momento do diagnóstico; M5= após o primeiro ciclo da quimioterapia; M20= após a última semana de quimioterapia.

Apêndice G

Tabela G. Porcentagem individuais referentes às populações de células CD4⁺ e CD8⁺, antes (M0) e após o tratamento quimioterápico (M5 e M20), dos animais com linfoma do GT1 (CHOP). Jaboticabal, 2014.

GT1	%CD4 (gate linf T)			%CD8 (gate linf T)		
	M0	M5	M20	M0	M5	M20
1	49,7	40,61	-	24,96	16,64	-
2	33,18	40,48	79,8	54,89	50,47	11,7
3	31,9	31,74	-	56,97	53,44	-
4	40,8	45,3	-	16,3	33,8	-
5	52,6	68,3	67,1	34,2	20,5	20,3
6	7,9	49,3	42,8	15,33	19,6	32,3
7	46,5	58,5	41,8	22,5	18,9	22,2
8	64,2	63,2	58,2	12,8	14,1	16,2
9	68,3	56,6	57,3	17,3	20,8	25
10	57,8	70	62,9	16,1	14	18,8
11	47,66	43,68	-	23,71	28,51	-
12	45,7	51,56	66,1	15,33	19,6	19,3

* M0= momento do diagnóstico; M5= após o primeiro ciclo da quimioterapia; M20= após a última semana de quimioterapia.

Apêndice H

Tabela H. Porcentagem individuais referentes às populações de células CD4⁺ e CD8⁺, antes (M0) e após o tratamento quimioterápico (M5 e M20), dos animais com linfoma do GT2 (CHOP + Firocoxib). Jaboticabal, 2014.

GT2	%CD4 (gate linf T)			%CD8 (gate linf T)		
	M0	M5	M20	M0	M5	M20
1	56,5	50,7	54,1	15,5	9,56	17
2	58,2	48,8	49,3	-	17,1	13,2
3	56,5	66,6	-	32,2	19,6	-
4	37,6	32,4	-	39	33,2	-
5	60,5	60,7	50,4	19,4	16,4	26,8
6	65	54,9	-	19,2	24,3	-
7	54,6	57,2	-	19,5	26,4	-
8	48,1	37,2	-	23,9	38,3	-
9	55,5	57,2	-	15,7	18,6	-
10	-	66,2	57,9	-	17,6	26,3
11	45,5	49,6	49,8	16,4	30,8	33,4
12	48	54	-	38,3	30,2	-

* M0= momento do diagnóstico; M5= após o primeiro ciclo da quimioterapia; M20= após a última semana de quimioterapia.