

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 03/08/2017.

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

**CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO  
CANINO**

**Livia Maria Souza Semolin**

Médica Veterinária

**2017**

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

**CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO  
CANINO**

**Livia Maria Souza Semolin**

**Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**

**Co-orientadora: Dra. Letícia Abrahão Anai**

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 Cirurgia Veterinária.

**2017**

Semolin, Livia Maria Souza

S471c Células T reguladoras no linfoma cutâneo canino / Livia Maria Souza Semolin. -- Jaboticabal, 2017

x, 60 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Banca examinadora: Sabryna Gouveia Calazans, Thiago Demarchi Munhoz, Felipe Augusto Ruiz Sueiro, Andriago Barboza De Nardi.

Bibliografia

1. Cão. 2. Citometria de fluxo. 3. Foxp3. 4. Neoplasia. 5. Treg. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

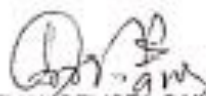
CDU 619:616-006:636.7

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

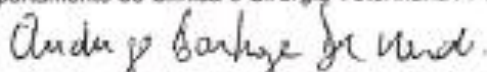
TÍTULO DA TESE: CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO CANINO

AUTORA: LIVIA MARIA SOUZA SEMOLIN  
 ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA  
 COORIENTADORA: LETÍCIA ABRAHÃO ANAI

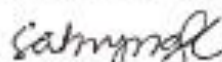
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



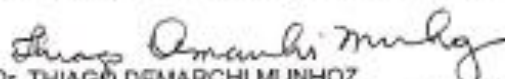
Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA  
 Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



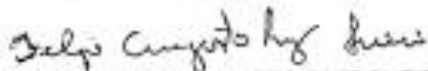
Prof. Dr. ANDRÍAGO BARBOZA DE NARDI  
 Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS  
 Departamento de Ciência Animal / UNIFRAN - Franca/SP



Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ  
 Departamento de Clínica Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto, SP



Pesquisador Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO  
 VETPAT - Patologia e Biologia Molecular Veterinária / Campinas, SP

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Livia Maria Souza Semolin** – nasceu em Guariba/SP, no dia 09 de julho de 1986, filha de Luiz Carlos Semolin e Alba Lucia Souza Semolin. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2008 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Participou do Programa de Aprimoramento do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” na área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, da Universidade de Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto/SP, nos anos de 2009 a 2011, onde também concluiu pós graduação Lato Sensu em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais. Ingressou no curso de mestrado do programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV-Unesp em março de 2011, sob a orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2013, com a dissertação intitulada "Expressão das metaloproteinases de matriz 2 e 9 em cães com linfoma: associação com fatores prognósticos". Durante os anos de 2011 a 2013 cursou pós graduação Lato Sensu em Oncologia Veterinária no Instituto Bioethicus, Botucatu/SP. Atualmente, doutoranda do Curso de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, da mesma faculdade. Participou ativamente no atendimento voluntário do Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário desta Instituição durante o curso. Realizou estágio no Hospital Veterinário da Universidade de Madison-Wisconsin, nos setores de oncologia clínica e radioterapia, durante dois meses de 2016, sob a supervisão da Dra. Cecilia Robot.

## DEDICO

Aos meus pais, Alba e Luiz Carlos, por terem me dado a vida, pelo apoio, por acreditarem em cada escolha minha e sempre terem feito o melhor por mim. Obrigada por toda a luta diária, por se preocuparem com a educação e caráter de suas filhas, por dedicarem suas vidas às nossas.

Às minhas irmãs, Viviane e Mara, por serem minhas melhores amigas, companheiras, pela certeza de ter sempre um apoio quando eu precisar. Por terem me dado duas sobrinhas lindas, Maria Clara e Maria Fernanda, e cunhados, Vanderlei e Lucas, também parte da família.

Ao Ivan, meu companheiro durante estes anos de doutorado, por todo o amor e carinho.

Amo todos vocês.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar presente em minha vida, guiando meus passos, permitindo que este sonho tenha se tornado realidade.

Ao Prof. Aureo, pelo apoio e orientação desde minha graduação, por acreditar em mim e sempre compartilhar seus conhecimentos. Pelo homem e professor exemplar a quem me orgulho muito de ter feito parte de sua história.

À Letícia, que aceitou ser minha co-orientadora, realizou as análises no citômetro de fluxo, esclareceu todas as minhas dúvidas e se tornou uma amiga muito importante para mim, sempre disposta a ajudar em todas as situações.

Ao “Grupo Linfoma”, que veio desde o experimento do mestrado com Linfoma multicêntrico, foi se modelando, ajustando e colaborou com este experimento: Letícia, Thiago, Paulo, Giovanni.....

À equipe do serviço de Oncologia Veterinária, incluindo os professores Andriago e Mirela, que permitiram a utilização dos animais da rotina para as coletas, e aos pós-graduandos. À mesma equipe, que foi se modificando ao longo dos anos, com os quais discuti casos, protocolos, adquiri grande conhecimento e acima de tudo, ganhei grandes amigos.

À equipe do laboratório de Patologia Clínica, Matheus, Nathan, Fernanda, Amanda, Helena, Luísa, Letícia e Ana e todos os estagiários, pela ajuda na realização dos exames.

Aos meus amigos (as) Rosana, Marcela, Marília, Giovanna, Talita, Érika, Letícia, Paulo, Michelli, Rafaela, Igor, Oscar, Fabricio e outros, pelo apoio e por tornarem mais felizes estes quatro anos.

A todos os pós graduandos, funcionários, residentes, estagiários e alunos que direta ou indiretamente ajudaram na conclusão deste experimento.

À CAPES e FAPESP pelo financiamento da pesquisa.

Ao pessoal do laboratório de imuno-histoquímica de Botucatu, em especial ao Carlos Eduardo e professora Renee, pela ajuda na técnica e leitura das lâminas.

À Dra. Pamela Reina pela classificação histopatológica dos linfomas.

Ao Dr. Felipe Sueiro, do laboratório VetPat de Campinas, por ceder alguns blocos parafinados dos animais com linfoma cutâneo.

Ao Thiago Munhoz e Carlos Eduardo Fonseca pela ajuda na estatística.

À minha banca de qualificação e defesa, professora Mirella, Helio, Sabryna, Thiago, Andriago e Felipe, pela leitura criteriosa e ajuda na melhoria deste projeto.

**À todos os cães que participaram deste estudo, por serem a principal parte deste experimento.**



## SUMÁRIO

	Página
<b>Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Linfoma canino.....	2
2.2 Células T Reguladoras (Tregs).....	5
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	10
3.1 Objetivo Geral.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
4.1 Grupos experimentais.....	11
4.2 Avaliação das parcelas experimentais.....	11
4.3 Obtenção das amostras.....	12
4.4 Classificação histopatológica e imuno-histoquímica.....	13
4.4.1 Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas.....	13
4.4.2 Imunofenotipagem e expressão tecidual de Foxp3.....	14
4.5 Imunofenotipagem de Subpopulações de Linfócitos T, no sangue periférico, por citometria de fluxo.....	17
4.6 Análise dos resultados.....	20
<b>5 RESULTADOS</b> .....	21
5.1 Classificação histopatológica.....	21
5.2 Avaliação da sobrevida dos paciente.....	21
5.3 Expressão tecidual de células Foxp3 <sup>+</sup> .....	23
5.4 Quantificação das Subpopulações de Linfócitos T no sangue periférico.....	25
5.4.1 Quantificação no GC X GLC.....	25
5.4.2 Quantificação nos diferentes tipos histopatológicos de acordo com o epiteliotropismo.....	26
5.4.3 Correlação da porcentagem de Tregs e da relação Treg/CD8 <sup>+</sup> , com a sobrevida.....	28
5.5 Correlação entre os valores de Tregs no sangue periférico e no tecido neoplásico.....	28
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	36
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	37
<b>APÊNDICES</b> .....	43

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Células T reguladoras no linfoma cutâneo canino**”, protocolo nº 10.207/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	11/07/2016 a 10/02/2017
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	25 animais
Peso / Idade	Todas
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Serviço de Oncologia Veterinária e canil com animais saudáveis do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" – FCAV/UNESP/Jaboticabal.

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.

  
**Profª Drª Lizandra Amoroso**  
Coordenadora – CEUA

## CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO CANINO

**RESUMO** - O linfoma pode ser caracterizado pela proliferação clonal de linfócitos malignos nos órgãos linfóides, podendo, porém, atingir diversos tecidos entre os quais a pele, denominado linfoma cutâneo. No cão, o linfoma cutâneo pode apresentar-se clinicamente por lesões localizadas ou generalizadas, podendo evoluir para lesões em placas e nódulos, muitas vezes edemaciados, ulcerados e hemorrágicos. Segundo avaliação histopatológica, podem ser classificados em epiteliotrópico ou não epiteliotrópico, com linhagem imunofenotípica T ou B, sendo o T mais comum. Células T reguladoras são linfócitos com capacidade imunossupressora, com papel importante na manutenção de processos fisiológicos, impedindo respostas de autoimunidade. Além disto, estudos demonstraram a influência das mesmas na supressão de respostas anti-tumorais, permitindo o escape das células neoplásicas dos mecanismos de defesa. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a presença das células T reguladoras em 12 cães com linfoma cutâneo T e 12 animais saudáveis, no sangue periférico e pele, através das técnicas de citometria de fluxo, avaliando porcentagens de Tregs, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e imuno-histoquímica, com a expressão tecidual de Foxp3. Observou-se maior número de Tregs no sangue periférico de cães com linfoma cutâneo ( $10,84 \pm 1,18$ ) em relação aos animais saudáveis ( $5,67 \pm 0,89$ ), sem diferença quanto às porcentagens de células CD4<sup>+</sup> ( $48,26 \pm 4,54$ ;  $51,01 \pm 4,92$ , respectivamente) e CD8<sup>+</sup> ( $30,32 \pm 4,82$ ;  $31,78 \pm 5,65$ , respectivamente). Não houve diferença nos valores celulares entre os animais com linfoma epiteliotrópico e não epiteliotrópico. Quanto à expressão tecidual de Foxp3 não foram observadas células imunomarcadas nos fragmentos cutâneos saudáveis, apenas nos linfomas cutâneos, com média de 8% ( $\pm 5$ ) de células positivas, demonstrando a presença de Tregs no tecido neoplásico, sem diferença entre os tipos histopatológicos. Não foi observada associação entre o número de Tregs e relação Treg/CD8, com a sobrevida dos pacientes. Não houve correlação entre os valores teciduais e sanguíneos das células T reguladoras nos animais com linfoma cutâneo. Desta forma, pode-se concluir que há estímulo para diferenciação e/ou proliferação de Tregs no ambiente tumoral de cães com linfoma cutâneo e aumento das mesmas na circulação, porém, não foi possível estabelecer exato valor prognóstico destas células.

**Palavras-chave:** cão, citometria de fluxo, Foxp3, neoplasia, Treg.

## REGULATORY T CELLS IN CUTANEOUS CANINE LYMPHOMA

**ABSTRACT** - Lymphoma can be characterized by clonal proliferation of malignant lymphocytes in the lymphoid organs, but may reach several tissues including the skin, called cutaneous lymphoma. In dogs, the cutaneous lymphoma may present clinically as localized or generalized lesions, which may progress to plaque and nodules, often swollen, ulcerated and bleeding. Histologically, they can be classified as epitheliotropic or non-epitheliotropic, with immunophenotypic line T or B. Regulatory T cells are lymphocytes with immunosuppressive capacity, with a significant role in the maintenance of physiological processes, preventing autoimmunity responses. Furthermore, studies have demonstrated their influence in the suppression of anti-tumor responses, allowing the escape of neoplastic cells from the defense mechanisms. Thus, the present study aimed to evaluate the presence of regulatory T cells in 12 dogs with cutaneous T cell lymphoma and 12 healthy animals in peripheral blood and skin, through flow cytometry techniques, assessing blood concentration of Tregs, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, and immunohistochemical, through tissue expression of Foxp3. A higher number of Tregs in the peripheral blood of dogs with cutaneous lymphoma ( $10,84 \pm 1,18$ ) was observed in relation to the healthy animals ( $5,67 \pm 0,89$ ), with no difference in the percentages of CD4<sup>+</sup> ( $48,26 \pm 4,54$ ;  $51,01 \pm 4,92$ , respectively) and CD8<sup>+</sup> ( $30,32 \pm 4,82$ ;  $31,78 \pm 5,65$ , respectively) cells. There was no difference in cellular values between the animals with epitheliotropic and non-epitheliotropic lymphoma. Regarding the tissue expression of Foxp3, we did not observe marked cells in healthy cutaneous fragments, only in cutaneous lymphomas ( $8\% \pm 5$ ), demonstrating the presence of Tregs in the neoplastic tissue, with no difference between histopathological types. No association was observed between the number of Tregs and the Treg/CD8 ratio, with the patients' survival. There was no correlation between tissue and blood values of regulatory T cells in animals with cutaneous lymphoma. In this way, it can be concluded that there is stimulus for differentiation and / or proliferation of Tregs in the tumor environment of dogs with cutaneous lymphoma, leading to their accumulation in the neoplastic tissue and consequently increase in circulation, but it was not possible to establish an exact value prognosis.

**Keywords:** dog, flow cytometry, Foxp3, neoplasia, Treg.

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Relação de isotipos controle e anticorpos utilizados na citometria de fluxo, com seus respectivos fluorocromos e volumes utilizados. Jaboticabal, 2017.....	18
<b>Tabela 2.</b> Dados referentes à sobrevida e causa de óbito dos animais do Grupo Linfoma Cutâneo. Jaboticabal, 2017.....	22
<b>Tabela 3.</b> Dados referentes à sobrevida de acordo com a classificação histopatológica dos animais do Grupo Linfoma Cutâneo. Jaboticabal, 2017.	22
<b>Tabela 4.</b> Valores percentuais de células com expressão nuclear de Foxp3 (Células T reguladoras), em fragmentos de linfoma cutâneo (LC), pela técnica imuno-histoquímica. Jaboticabal, 2017.....	23

**LISTA DE QUADROS**

	Página
<b>Quadro 1.</b> Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em fragmentos cutâneos caninos, em cortes parafinados, com os respectivos clones e diluições. Jaboticabal, 2017.....	13

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias evidenciando imunofenotipagem de linfoma cutâneo canino. A. Marcação imuno-histoquímica positiva para anticorpo anti-CD3; B. Marcação imuno-histoquímica negativa para anticorpo anti-CD79 $\alpha$ , caracterizando imunofenótipo T. Aumento de 40X. Jaboticabal, 2017.....	16
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografia evidenciando marcação imuno-histoquímica nuclear de anticorpo anti-Foxp3 (seta) em fragmento de linfoma cutâneo canino. Aumento de 40X. Jaboticabal, 2017.....	16
<b>Figura 3.</b> Fluxograma representativo da <i>gate</i> de linfócitos (P1); a partir dela a <i>gate</i> de linfócitos T (P2) e, a partir desta, a <i>gate</i> de linfócitos CD4 <sup>+</sup> (Q4) e CD8 <sup>+</sup> (Q1), de um cão com linfoma cutâneo. Jaboticabal, 2017.....	19
<b>Figura 4.</b> Fluxograma representativo da <i>gate</i> de linfócitos (A); a partir dela a <i>gate</i> de linfócitos T (B) e, a partir desta, a <i>gate</i> de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> (Treg) (C), de um cão com linfoma cutâneo. Jaboticabal, 2017.....	19
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografias representativas de análise histopatológica de linfomas cutâneos em cães, após coloração com Hematoxilina de Harris, em aumento de 20X. A - Linfoma cutâneo epiteliotrópico, com invasão de linfócitos neoplásicas na epiderme; B - Linfoma cutâneo não epiteliotrópico, com epiderme livre de células neoplásicas. Jaboticabal, 2017.....	21
<b>Figura 6.</b> Valores percentuais obtidos de expressão tecidual de Foxp3 na pele de cães saudáveis (GC) e cães portadores de linfoma cutâneo (GLC). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, * p=0,0007 (n= 12 para o GC e 11 para o GLC). Jaboticabal, 2017.....	23
<b>Figura 7.</b> Valores percentuais obtidos de expressão tecidual de Foxp3 na pele de cães saudáveis (GC) e cães portadores de linfoma cutâneo epiteliotrópico (GLC Ep.) e não epiteliotrópico (GLC NEp.). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (n= 12 para o GC, 4 para o GLC Ep. e 7 para o GLC NEp.). Letras iguais não diferem estatisticamente, p= 0,0011. Jaboticabal, 2017.....	24
<b>Figura 8.</b> Curva de sobrevivência dos animais com linfoma cutâneo e porcentagem baixa e alta de células positivas para o anticorpo anti-Foxp3 no tecido neoplásico, através de técnica imuno-histoquímica. Jaboticabal, 2017.....	25
<b>Figura 9.</b> Avaliação das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico de cães saudáveis (GC) e cães portadores de linfoma cutâneo (GLC). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (n= 12 para o GC e 12 para o GLC). A. Valores percentuais obtidos de células T reguladoras (Treg), * p=0,0021. B. Valores percentuais obtidos de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> . C. Valores percentuais obtidos de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> . Jaboticabal, 2017.....	26

<b>Figura 10.</b> Avaliação das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico de cães sadios (GC) e cães portadores de linfoma cutâneo epiteliotrópico (GLC Ep.) e não epiteliotrópico (GLC NEp.). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (n= 12 para o GC, 5 para o GLC Ep. e 7 para o GLC NEp.). Letras iguais não diferem estatisticamente. A. Valores percentuais obtidos de células T reguladoras (Treg). B. Valores percentuais obtidos de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> . C. Valores percentuais obtidos de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> . Jaboticabal, 2017.....	27
<b>Figura 11.</b> Curva de sobrevida dos animais com linfoma cutâneo e porcentagem baixa e alta de células Treg no sangue periférico (A) e baixa e alta relação Treg/CD8 <sup>+</sup> . Jaboticabal, 2017.....	28
<b>Figura 12.</b> Correlação entre valores obtidos de Tregs no sangue periférico, através de técnica de citometria de fluxo, e Tregs tecidual, obtidas a partir de técnica imuno-histoquímica, em cães com linfoma cutâneo. Jaboticabal, 2017.....	29



## 1 INTRODUÇÃO

O linfoma é uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas no cão e corresponde a mais de 80% das neoplasias hematopoiéticas nesta espécie, sendo caracterizado pela proliferação de células originadas do tecido linfóide, histiócitos, seus precursores e derivados (ROSENTHAL; MACEWEN, 1990; OGILVIE; MOORE, 1995; DHALIWAL et al., 2003), podendo atingir diversos tecidos, entre os quais a pele, caracterizando-se anatomicamente como linfoma cutâneo (CALAZANS et al., 2016), forma mundialmente rara desta neoplasia, entretanto com casuística elevada na região de nossa pesquisa, localizada na cidade de Jaboticabal, São Paulo.

As células T reguladoras (Tregs) são descritas como linfócitos T CD4<sup>+</sup> que expressam constitutivamente a cadeia  $\alpha$  do receptor da interleucina (IL) 2 (CD25) e o fator de transcrição Foxp3 (BANHAM et al., 2009). Acredita-se que as Tregs regulem as respostas imunes fisiológicas, através de propriedades imunossupressoras úteis para o impedimento de respostas de autoimunidade, suprimindo células T efetoras, acarretando no comprometimento da resposta imune (COOLS et al., 2007).

Há evidências de que as Tregs regulam negativamente a função efetora do sistema imune contra tumores, resultando em disfunção de células T em humanos e cães com câncer (HORIUCHI et al., 2009; SCHRECK et al., 2009). Estudos com as células Tregs em humanos têm encorajado pesquisas semelhantes na Medicina Veterinária e, apesar do número crescente de trabalhos com Tregs em cães, poucos foram realizados com linfoma, principalmente na sua apresentação cutânea e, portanto, poucos resultados estão disponíveis.

Desta forma, revela-se bastante alvissareiro o estudo da expressão das células T reguladoras no linfoma cutâneo canino, assim como suas implicações no prognóstico do linfoma como epiteliotropismo e sobrevida, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos que levam à progressão tumoral, podendo assim, levar à identificação de possíveis alvos terapêuticos, visto que alguns fármacos podem ser utilizadas para extinguir ou suprimir as funções das células Tregs.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições deste ensaio e diante dos resultados obtidos, analisados e interpretados pode-se concluir que:

- O linfoma cutâneo canino T apresenta classificação histopatológica epiteliotrópica e não epiteliotrópica, com pouca diferença numérica entre subtipos, e sobrevida média de 71 dias ( $\pm 63,9$ )
- O ambiente tumoral apresenta aumento de Tregs no linfoma cutâneo canino;
- Cães com linfoma cutâneo apresentam aumento na porcentagem de Tregs no sangue periférico em relação aos animais saudáveis, sem diferença quanto às porcentagens de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>;
- Não há associação entre valores de Tregs e Treg/CD8<sup>+</sup> com a sobrevida dos cães com linfoma cutâneo;
- Não há correlação entre os valores encontrados de Tregs no sangue periférico, através de citometria de fluxo, e no tecido, através de imunohistoquímica, nos animais com linfoma cutâneo.

## 8 REFERÊNCIAS

- ANAI, L. A. **Quantificação imunofenotípica de células T reguladoras em cães acometidos por linfoma multicêntrico submetidos ao protocolo quimioterápico CHOP associado ou não a um Firocoxib.** 2014. 66f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal/SP. 2014.
- ATHERTON, M. J.; MORRIS, J. S.; MCDERMOTT, M. R.; LICHTY, B. D. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 169, p. 15–26, 2016.
- BANHAM, A.H. et al. Monoclonal antibodies raised to the human FOXP3 protein can be used effectively for detecting Foxp3<sup>+</sup> T cells in other mammalian species. **Veterinary Immunology Immunopathology,** v. 127, p. 376-81, 2009.
- BELKAID, Y.; ROUSE, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nature Immunology.** v.6, n.4, p. 353-360, 2005.
- BEYER, M.; SCHULTZE, J.L. Regulatory T cells in cancer. **Blood.** v. 108, p. 804-811, 2006.
- BHANG, D.H.; CHOI, U.S.; KIM, M.K. et al. Epitheliotropic cutaneous lymphoma (Mycosis fungoides) in a dog. **Journal of Veterinary Science.** v.7, p.97-99, 2006.
- BILLER, B.J. et al. Use of Foxp3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology Immunopathology.,** v. 116, p. 69-78, 2007.
- BILLER, B.J. et al. Decreased ratio of CD8<sup>+</sup> T cells to regulatory T cells associated with decreased survival in dogs with osteosarcoma. **Journal Veterinary Internal Medicine.,** v. 24, p. 1118-23, 2010.
- BURTON, J.H. et al. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. **Journal Veterinary Internal Medicine,** v. 25, p. 920-6, 2011.
- CALAZANS, S.G.; DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B. Linfomas. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B. **Oncologia em cães e gatos.** Roca. 2ed. Cap 49. p.633-648, 2016.
- CHAVES, M. R. S. **Células t reguladoras em sangue periférico de cães portadores de mastocitoma cutâneo.** 2014. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal/SP. 2014.
- COOLS, N. et al. Regulatory T cells and human disease. **Clinical and Developmental Immunology,** v. 2 p. 1-11, 2007.

- COUTO, C. G. Oncologia: princípios de tratamento do câncer. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 78, p. 864-869, 2001.
- CRUVINEL, W.M. et al. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 342-55, 2008.
- CURIEL, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 5, 2007.
- CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**. v.30, n.5, p.626-635, 2009.
- DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA E. P. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.
- DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; AMORIM, R. L.; BANDARRA E. P. Classificação citohistológica dos linfomas caninos. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 4, n. 2, p. 53-59, 2001.
- DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.8, p.573-581, 2003.
- DOBSON, J.M.; GORMAN, N.T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response tottwo chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 1994.
- FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphossarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, January. 2002.
- FAN, T.M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p.285-294, apr. 2005.
- FIGHERA, R.A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria : O autor, 2001. 214p. Cap.7: Anemias por insuficiência medular: p.145-158.
- FONTENOT,J.D.;GAVIN,M.A.;RUDENSKY,A.Y.Foxp3 programs the developmentan dfunc- tionofCD4+CD25+ regulatoryT cells. **Nature Immunology**. v. 4, p. 330-336, 2003.
- FONTAINE, J.; HEIMANN, M.; DAY, M. J. Canine cutaneous epitheliotropic T cell lymphoma: a review of 30 cases. **Veterinary Dermatology**. v. 21, p. 267-275, 2010.
- FOSTER, A.P.; EVANS, E.; KERLIN, R.L. et al. Cutaneous T cell lymphoma with Sé zary Syndrome ina dog. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 26, p.188-192, 1997.
- GERSHON, R.K.; KONDO,K.. Cell interactions in the induction of tolerance:the role of thymic lymphocytes. **Immunology**. v.18, p.723-737, 1970

- GREENLEE, P.G., FILIPPA, D.A., QUIMBY, F.W. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**. v.66, p.480-490, 1990.
- HORIUCHI, Y. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. **Microbiology Immunology**. v. 53, p. 468-74, 2009.
- HORIUCHI, Y. et al. Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Microbiology Immunology**. v. 54, p. 152-159, 2010.
- JONES, C.J., HUNT, R.D., KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997.
- 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. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 123, p. 337-44, 2008.
- 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. **Journal of Surgical Oncology**, 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. **Veterinary Journal**. v. 193, n. 1, p. 222-227, 2012.
- LEIFER, C.E.; MATUS, R.E. Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-1984). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.189, n.2, p.214-217, 1986.
- LORIMIER, L. P. Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practic**, v. 36, p. 213-28, 2006.
- MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M; VAIL, D.M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3. ed Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. p. 558-590.
- MITCHELL, L.; THAMM, D.H.; BILLER, B.J. Clinical and Immunomodulatory Effects of Toceranib Combined with Low-Dose Cyclophosphamide in Dogs with Cancer. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 26, p. 355-362, 2012.
- MOORE, P. F.; AFFOLTER, V. K.; KELLER, S. M. Canine inflamed nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: a diagnostic conundrum. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 204-211, 2013.
- MOORE, P. F.; OLIVRY, T.; NAYDANT, D. Canine Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma (Mycosis Fungoides) Is a Proliferative Disorder of CD8+ T Cells. **American Journal of Pathology**, v. 144, n. 2, p. 421-429, 1994.
- MOORE, P. F.; OLIVRY, T. Cutaneous Lymphomas in Companion Animals. **Clinics in Dermatology**. v.12 p. 499-505, 1994.

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. California: University of California. p.240-244, 1990.

MUCHA, J.; RYBICKA, A.; DOLKA, I.; SZYMAN´SKA, J.; MANUALI, E.; PARZENIECKA-JAWORSKA, M.; KLUCIN´SKI, W.; KRO´L, L. Immunosuppression in Dogs During Mammary Cancer Development. **Veterinary Pathology OnlineFirst**. April 22, p. 1-7, 2016.

MUNHOZ, T.D. et al. Regulatory T cells in dogs with multicentric lymphoma: peripheral blood quantification at diagnosis and after initial stage chemotherapy. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.68, n.1, p.1-9, 2016.

NARENDRA, B. L.; REDDY, K. E.; SHANTIKUMAR, S.; RAMAKRISHNA, S. Immune system: a double-edged sword in cancer. **Inflammation Research**, v. 62, p. 823 - 834, 2013.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1087-1096, 2006.

NORTH, S.; BANKS, T. Tumors of the haemolymphatic system. In: **Introduction to Small Animal Oncology**. 2009. 1 ed. London: Saunders, Elsevier, p. 225-236.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In: **Managing the Veterinary Cancer Patient**. Trenton: Veterinary Learning Systems. p. 228-259, 1995.

O´NEILL, K. et al. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 875-81, 2009.

OWEN, L. **TNM classification of tumors in domestic animals**. World Health Organization, p.46-47, 1980.

PAVELIC, S. K.; SEDIC, M.; BOSNJAK, H.; SPAVENTI, S.; PAVELIC, K. Metastasis: new perspectives on an old problem. **Molecular Cancer**. v. 10, n. 22, 2011.

PINHEIRO, D.;CHANG, Y.; BRYANT, H. 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, n. 8, 2014.

RASKIN, R.E.; KRENBIEL, J.D. Prevalence of leukaemia blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.194, n.10, p.1427-1429, 1989.

- RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003.
- REGAN, D.; GUTH, A.; COY, J.; DOW, S. Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. **The Veterinary Journal**. v. 207, p. 20–28, 2016.
- RISBON, R.E.; DE LORIMIER, L.P.; SKORUPSKI, K. et al. Response of Canine Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma to Lomustine (CCNU): A Retrospective Study of 46 Cases (1999–2004). **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 20, p.1389-1397, 2006.
- ROSENTHAL, C.R.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 5, p. 774-781, 1990.
- RUBIN, E. The blood and the lymphoid organs. In: RUBIN, E. & FARBER, J.L. **Pathology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Company. cap. 20, 1994.
- SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal Immunology**. v.155, p. 1151-1164, 1995.
- SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self tolerance maintained by 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.
- SANTORO, D.; MARSALLA, R.; HERNANDEZ, J. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study . **Veterinary Dermatology**. v. 18, p. 101-106, 2007.
- SAVAGE, P.A.; MALCHOW, S.; LEVENTHAL, D. Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. **Trends in Immunology**. v. 34, n. 1, p. 33-40, 2012.
- SCHRECK, S. et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. **Hematology Oncology**, 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**, v.51, n.3, p.1-11, 1999.
- SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more question than answers. **Nature Reviews Immunology**. v. 2, n. 6, p. 389-400, 2002.
- TOMINAGA, M. et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 438-41, 2010.
- TESKE, E.; HEERDE P.V.; RUTTERMAN, G. R.; KURZMAN I. D.; MOORE, P. F.; MACEWEN E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs.

**Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994.

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. Saunders. cap. 32, p.608-638, 2013.

VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfoides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. Sao Paulo: Roca. cap. 25, p. 227-236, 2003.

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.

VEIGA-PAIGA, T. Regulatory T Cells and Their Role in Animal Disease. **Veterinary Pathology**. p. 1-9, 2016.