

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),  
o texto completo desta dissertação será disponibilizado  
somente a partir de 11/12/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO E DOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO  
CÂNCER NOS LINFOMAS CANINOS

MARIA CLAUDIA LOPES DA SILVA

BOTUCATU – SP  
DEZEMBRO, 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO E DOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO  
CÂNCER NOS LINFOMAS CANINOS

MARIA CLAUDIA LOPES DA SILVA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

BOTUCATU – SP  
DEZEMBRO, 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Maria Claudia Lopes da.

Distribuição do colágeno e dos fibroblastos associados  
ao câncer nos linfomas caninos / Maria Claudia Lopes da  
Silva. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Julio Lopes Sequeira  
Capes: 50503006

1. Cães - Doenças. 2. Linfoma. 3. Células Estromais. 4.  
Imunohistoquímica.

Palavras-chave: cão; estroma; imuno-histoquímica; linfoma.

Maria Claudia Lopes da Silva

Título: DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO E DOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO  
CÂNCER NOS LINFOMAS CANINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira  
Presidente e orientador  
Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

---

Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

---

Profa. Dra. Ana Paula Batista Masseno  
Membro  
FAEF – Garça/SP

---

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches  
Membro  
UNISA – São Paulo/SP

Data da defesa: 11 de dezembro de 2018.

ESTA PESQUISA FOI FINANCIADA PELAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICO...

À minha mãe **Maria Lucia Cordioli da Silva** e pai **Francisco Lopes da Silva** pelo apoio e confiança incondicionais, sempre acreditando que tenho capacidade de realizar qualquer coisa a que me proponho. Sem vocês nada disso seria possível.

## AGRADEÇO

Ao meu orientador **Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira**, por todo seu apoio, paciência e ensinamentos durante toda a jornada em Botucatu. Obrigada por ser essa pessoa excelente e professor admirável.

À **Profa. Dra. Renée Laufer Amorim** pelos conselhos inestimáveis, amizade e oportunidades que me proporcionou. Sem dúvida é uma das melhores pesquisadoras que já conheci.

Ao **Carlos Eduardo Fonseca Alves** pela amizade, constantes dicas e conselhos. Sem dúvida é a pessoa mais disponível e atenciosa que eu conheço, além de ser extremamente competente em tudo que faz. A pós-graduação certamente teria sido muito mais difícil sem você.

A todos meus **familiares** que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À **Maria Valéria Morales Dalanezi** pela pronta ajuda na parte técnica do projeto e pela amizade. Apesar de estar longe da família sabia que sempre tinha com quem contar.

À minha querida amiga **Juliana Bombardelli**. Mesmo fisicamente distante, seu apoio foi fundamental nessa jornada.

À **Sabryna Calazans** pela parceria desenvolvida durante o doutorado, sempre disponível e atenciosa.

À **Raquel Beneton Ferioli** pela amizade, paciência, conselhos e conhecimentos adquiridos nesses anos.



A todos os meus **amigos** em Botucatu, em especial **Tatiane Velalva de Paula, Gabriela Nascimento Dantas e Elena Carolina Serrano Recalde**. Sem vocês certamente o trajeto teria sido mais difícil.

À **Rafael Torres Neto** pela ajuda em solucionar dúvidas referentes à imuno-histoquímica, diversos aprendizados e contribuição para a realização do estudo.

A todos os **residentes** do Serviço de Patologia da FMVZ UNESP Botucatu nesses seis anos pela ajuda na obtenção de parte das amostras e é claro, pela amizade.

Ao **Maury Raul e Claudinei Domingues** por todo o auxílio desde os tempos da residência.

À **CAPES** pela bolsa concedida, a qual viabilizou a realização desse projeto.

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b> - Especificações dos anticorpos utilizados no projeto quanto a diluição, fabricante, clone, incubação e controle positivo.....	16
<b>TABELA 2</b> - Classificação dos linfomas de acordo com a classificação de Kiel atualizada (LENNERT, FELLER, 1992) de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	19
<b>TABELA 3</b> - Classificação dos linfomas de acordo com a Classificação dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da World Health Organization (VALLI et al., 2002) de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	20
<b>TABELA 4</b> - Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	21
<b>TABELA 5</b> - Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	21
<b>TABELA 6</b> - Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	21
<b>TABELA 7</b> - Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	27
<b>TABELA 8</b> - Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	27
<b>TABELA 9</b> - Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	27
<b>TABELA 10</b> - Valor absoluto e relativo da quantidade de imunomarcção para os colágenos tipo I e III no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	29
<b>TABELA 11</b> - Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	30
<b>TABELA 12</b> - Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	30
<b>TABELA 13</b> - Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	30

<b>TABELA 14</b> - Valor absoluto e relativo dos escores observados de imunomarcção das células linfoides neoplásicas pelo VEGF de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	31
<b>TABELA 15</b> - Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	32
<b>TABELA 16</b> - Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	32
<b>TABELA 17</b> - Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	32
<b>TABELA 18</b> - Mediana do escore de marcação de $\alpha$ -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	33
<b>TABELA 19</b> - Mediana do escore de marcação de $\alpha$ -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	33
<b>TABELA 20</b> - Mediana do escore de marcação de $\alpha$ -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	33
<b>TABELA 21</b> - Valores de r e P nas análises de correlação entre expressão de Ki-67, escore e porcentagem de marcação das fibras de colágeno com o método de Picrosirius Red, e de marcação das fibras de reticulina imunomarcção para $\alpha$ -SMA, VEGF, colágeno tipo I e tipo III nos linfomas caninos.....	37
<b>ANEXO 1</b> - Dados clínicos de todos os animais incluídos no projeto, com respectiva classificação histológica dos tumores.....	95
<b>ANEXO 2</b> - Valor absoluto e relativo de raça, sexo, forma anatômica, estadiamento clínico e estado reprodutivo dos animais que participaram do estudo.....	103

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Linfomas Caninos - Diferentes cores das fibras de colágeno observadas pela técnica de Picosirius Red sob luz polarizada. A) Nota-se fibras com arranjo concêntrico (circundando vasos sanguíneos) de coloração predominantemente vermelha. B) Fibras mais espessas com coloração rosa e as mais delgadas de coloração verde. C) Predomínio de fibras com coloração alaranjada. D) A maior parte das fibras exibe coloração verde a verde amarelado. Barra = 20  $\mu$ m. Fonte: elaboração dos autores.....23
- FIGURA 2** - Linfomas Caninos - variação dos escores de quantidade de colágeno observada. A) Escore 1 – nota-se poucas fibras delicadas de colágeno de coloração verde em feixes longitudinais. B) Escore 2 – há quantidade moderada de fibras em feixes longitudinais, delicadas de coloração verde e espessas de coloração vermelha. C) Escore 3 – fibras colágenas por vezes formando ilhas. D) Escore 4 – grande quantidade de fibras de colágeno com coloração verde a verde amarelado. Picosirius Red, sob luz polarizada. Barra = 20  $\mu$ m. Fonte: elaboração dos autores.....24
- FIGURA 3** - Linfomas caninos - Principais tipos de arranjo de colágeno observado no estroma dos linfomas estudados. A) Fibras colágenas arranjadas em feixes, predominantemente paralelos longitudinais. B) Nota-se fibras colágenas organizadas delimitando ilhas de células neoplásicas. Picosirius Red, sob luz polarizada. Barra = 20  $\mu$ m. Fonte: elaboração dos autores.....25
- FIGURA 4** - Linfomas Caninos - Características das fibras de reticulina observadas através do método de Reticulina. A) Arranjo das fibras em feixes. B) Arranjo das fibras predominantemente em feixes delimitando ilhas de células neoplásicas. C) Presença de fibras delgadas e espessas no estroma. D) Predomínio de fibras espessas no estroma. Aumento de 400X. Fonte: elaboração dos autores.....28
- FIGURA 5** - Linfomas Caninos - Diferentes escores de imunomarcção do anticorpo anti- $\alpha$ SMA. A) Escore 1. B) Escore 4. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Barra = 20  $\mu$ m. Fonte: elaboração dos autores.....34
- FIGURA 6** - Linfomas Caninos - Diferentes apresentações da imunomarcção de  $\alpha$ SMA no estroma dos linfomas caninos. A) Arranjo em feixes delimitando ilhas de células neoplásicas. B) Marcação em feixes. C) Fibroblasto individualizado. D) Arranjo concêntrico ao redor de

uma arteríola que exibe marcação positiva em sua camada muscular. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Barra A, B e D = 20  $\mu\text{m}$ ; C = 10  $\mu\text{m}$ . Fonte: elaboração dos autores.....35

**FIGURA 7** - Linfomas Caninos - Ilustração das avaliações realizadas no projeto. Linfoma Imunoblástico T/ Linfoma de Células T Periférico. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . A) Imunomarcação citoplasmática difusa para o anticorpo anti-CD3. Nota-se a invasão dos anexos cutâneos pelas células neoplásicas (epiteliotropismo). Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. B) Marcação das fibras de reticulina no estroma pelo método de Reticulina. C) Marcação das fibras de colágeno no estroma pelo método de Picrosirius Red sem polarização. D) Mesma área demonstrada em C, sob luz polarizada. E) Imunomarcação das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo I. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. F) Imunomarcação das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo III. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. G) Imunomarcação discreta para o anticorpo anti- $\alpha$ SMA no estroma. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. H) Imunomarcação citoplasmática intensa difusa nas células linfoides neoplásicas para o anticorpo anti-VEGF. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Fonte: elaboração dos autores.....38

**FIGURA 8** - Linfomas Caninos - Ilustração das avaliações realizadas no projeto. Linfoma Centrobástico/ Linfoma Difuso de Grandes Células B. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . A) Imunomarcação difusa para o anticorpo anti-CD20. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. B) Marcação das fibras de reticulina no estroma pelo método de Reticulina. C) Marcação das fibras de colágeno no estroma pelo método de Picrosirius Red sem polarização. D) Mesma área demonstrada em C, sob luz polarizada. E) Imunomarcação das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo I. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. F) Imunomarcação das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo III. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. G) Imunomarcação discreta para o anticorpo anti- $\alpha$ SMA no estroma. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. H) Imunomarcação citoplasmática discreta nas células linfoides neoplásicas para o anticorpo anti-VEGF. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Fonte: elaboração dos autores.....40

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivos gerais.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Amostras.....	13
4.2 Técnicas histoquímicas.....	14
4.3 Técnicas imuno-histoquímicas.....	15
4.4 Análise dos dados.....	16
4.5 Análise estatística.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1 Dados clínicos .....	18
5.2 Classificação dos tumores.....	18
5.3 Histoquímica.....	20
5.3.1 Picrosirius Red.....	20
5.3.2 Reticulina.....	25
5.4 Imuno-histoquímica.....	28
5.4.1 Colágenos.....	28
5.4.2 VEGF.....	31
5.4.3 $\alpha$ SMA.....	32
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES .....	48
8. BIBLIOGRAFIA.....	49
9. TRABALHO CIENTÍFICO 1.....	64
10. TRABALHO CIENTÍFICO 2.....	77

ANEXOS.....95

## RESUMO

SILVA, M. C. L. Distribuição do colágeno e dos fibroblastos associados ao câncer nos linfomas caninos. Botucatu, 2018. 104 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A interação entre células neoplásicas e estroma influencia na gênese, amplificação/ inibição tumoral e cinética das drogas antineoplásicas. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é uma citocina envolvida na angiogênese tumoral, relacionada a sobrevida dos pacientes. Dentre os componentes celulares, os fibroblastos associados ao câncer têm papel fundamental na progressão tumoral e secretam diversas citocinas, incluindo o VEGF. Assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a distribuição, arranjo e quantidade das fibras de colágeno e reticulina no estroma dos linfomas caninos através dos métodos de Picrosirius Red e reticulina, avaliação imuno-histoquímica dos colágenos tipo I e III, do VEGF e  $\alpha$ -SMA. Sessenta linfomas foram agrupados de acordo com o imunofenótipo e grau. O colágeno tipo III foi o predominante. As porcentagens e escores de marcação da reticulina, colágeno e VEGF foram diferentes entre os grupos e imunofenótipos, sendo que o linfoma T de alto grau exibiu os maiores níveis tanto de colágeno, reticulina e VEGF. Houve correlação entre expressão de VEGF e índice proliferativo. A expressão de  $\alpha$ -SMA foi semelhante entre os grupos, imunofenótipos e graus. Como conclusão, a maior densidade de componentes fibrosos e níveis de expressão de VEGF nos linfomas T poderia, ao menos em parte, contribuir para o pior prognóstico apresentado por pacientes com esse tipo de tumor. Ainda, o VEGF tem potencial como marcador prognóstico no linfoma canino e o uso de fármacos anti-angiogênicos deveria ser avaliado levando-se em consideração o imunofenótipo e grau e provavelmente seria mais eficaz em animais com linfomas T.

Palavras-chave: linfoma, cão, estroma, imuno-histoquímica



## ABSTRACT

SILVA, M. C. L. Collagen and cancer associated fibroblasts distribution on canine lymphoma. Botucatu, 2018. 104 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Neoplastic cells interaction with stroma influences tumorigenesis, amplification or inhibition of tumor progression and anticancer drugs kinetics. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a crucial cytokine implicated in tumoral angiogenesis and survival and among cellular components cancer associated fibroblasts play a role on tumour progression, secreting various cytokines, including VEGF. Therefore, the aim of this study was to characterize fibres distribution, arrangement and amount on stroma evaluated in Picrosirius Red and reticulin stained slides as well as in type I and III immunolabelled sections of canine lymphoma, in addition to the immunoexpression of VEGF and  $\alpha$ -SMA on neoplastic lymphoma cells and stroma, respectively. Sixty lymphomas were divided into four groups according to immunophenotype and grade. Type III was the preponderant collagen. Staining percentage and scores of reticulin and collagen, as well as scores of VEGF immunolabelling, were significantly different between groups and immunophenotypes, with high-grade T-cell lymphomas exhibiting the largest quantities. Additionally, VEGF was positively correlated with proliferation index. There was no difference regarding  $\alpha$ -SMA expression within groups, immunophenotypes or grades. In conclusion, the greater density of fibrous components on T-cell lymphomas, combined with bigger VEGF levels, could, at least partially, explain the poorer prognosis for patients presenting those tumours. Furthermore, VEGF has potential as a prognostic marker for canine lymphoma, and the use of anti-angiogenic drugs should be investigated taking into account immunophenotype and grade and animals with high-grade T-cell tumours would probably benefit more from its use.

Key words: lymphoma, dog, stroma, immunohistochemistry

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a importância do microambiente tumoral para o desenvolvimento e progressão do câncer é bem caracterizada. O microambiente tumoral inclui células como os fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais, bem como a matriz extracelular (MEC), proteases e citocinas. Estes elementos em conjunto participam de uma conversa complexa com as células neoplásicas, interação a qual afeta o crescimento, angiogênese e metástase (CHOU et al., 2013).

A MEC dá suporte para adesão de células e transmite sinais através de receptores de adesão celular de superfície. A MEC contém colágenos, glicoproteínas não colagenosas e proteoglicanas. Outros constituintes, como por exemplo, tenascina, fibronectina e isoformas de laminina, são encontrados na MEC dos tumores e podem estimular a progressão do câncer (EGEBLAD; WERB, 2002).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína que promove a proliferação e crescimento de células endoteliais. Ela é sintetizada por diversas células de forma fisiológica, tais como macrófagos, neutrófilos, linfócitos, entre outras, além de atuar na angiogênese tumoral, sendo produzida inclusive pelas próprias células tumorais (FERRARA et al., 1992; FERRARA, 1993; KIM et al., 1993; FUKUMURA et al., 1998). Já foi constatado que a determinação do VEGF pode auxiliar na avaliação da resposta à terapia. Ainda, o desenvolvimento de drogas antiangiogênicas pode contribuir para o tratamento de neoplasias (PLATT et al., 2006; ADELINGER et al., 2015).

Os fibroblastos presentes em uma neoplasia, denominados fibroblastos associados ao câncer (FAC), são um componente importante do estroma e têm um papel crucial na angiogênese, proliferação, invasividade e metástase do câncer (BHOWMICK et al., 2004; DONG et al., 2004; MURATA et al., 2011; HARPER; SAINSON, 2014). As células neoplásicas são instáveis e sofrem mutação com frequência, já os FAC são estáveis no microambiente tumoral, o que faz desses um alvo ideal para terapia contra o câncer (ISHII et al., 2016).

Os linfomas não-Hodgkin são as neoplasias hematopoiéticas mais comum nos cães e são semelhantes ao linfoma humano em muitos aspectos importantes, dentre eles, características biológicas e formas de tratamento. Dado ao grande número de cães

domiciliados e a alta incidência de linfoma, o cão representa um recurso pouco aproveitado para o avanço no entendimento e tratamento do linfoma humano, o que leva também a uma melhora no diagnóstico e tratamento do próprio cão (RICHARDS; SUTER, 2015).

Nesse contexto, a caracterização do estroma tumoral nos linfomas caninos pode auxiliar no entendimento do comportamento desta neoplasia. A determinação dos tipos de colágeno e a avaliação do VEGF, assim como a detecção da presença de FAC, podem contribuir para melhorar o conhecimento sobre o microambiente dos linfomas, principalmente quando relacionados aos diferentes subtipos dessa neoplasia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os linfomas não-Hodgkin (LNH) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães e são compostos por um grupo heterogêneo de tumores sendo os diferentes subtipos definidos com base em características morfológicas, patofisiológicas e comportamento clínico (ITO et al., 2014; RICHARDS; SUTER, 2015). O cão apresenta semelhanças importantes com os humanos em relação à essa doença, como incidência, frequência, biologia tumoral, influências ambientais, aberrações genéticas e tratamento (DOBSON, 2013; ITO et al., 2014; RICHARDS; SUTER, 2015). Por estas razões tem sido proposto como modelo de ocorrência espontânea para o estudo dos LNH humanos (PONCE et al., 2010; MARCONATO et al., 2013; COMAZZI et al., 2014; ITO et al., 2014; RICHARDS; SUTER, 2015).

As classificações utilizadas no estudo dos linfomas caninos têm seguido os esquemas daquelas propostas para os linfomas humanos (PONCE et al., 2010). Em 2002, foi publicada a *Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals* (VALLI et al., 2002), que se baseia na classificação da WHO para os linfomas humanos (JAFFE et al., 2001). Nesta classificação os linfomas dos animais, inclusive de cães, são subdivididos por imunofenótipos e graus, com a intenção de que haja correspondência entre os tipos descritos, o comportamento biológico e a resposta à terapia, assim como é observado nos tumores humanos (VALLI et al., 2002).

A classificação da WHO lista mais de 30 subtipos, e muitos deles se assemelham aos subtipos humanos. No entanto, o reconhecimento de entidades patológicas específicas com base em uma combinação de morfologia, imunofenotipagem, genética, molecular e as características clínicas ainda não está estabelecida em oncologia veterinária (COMAZZI et al., 2014).

Um estudo testou a aplicação do sistema da WHO para a classificação de linfomas caninos por veterinários experientes, mas não hematopatologistas. A taxa de consenso entre os patologistas foi de 83%, concluindo-se que, mesmo os não especialistas, podem alcançar um alto grau de acurácia na aplicação desta classificação (VALLI et al., 2011).

Por outro lado, um estudo realizado em 608 casos de linfoma em cães, comparou a classificação de Kiel atualizada e a classificação da REAL-WHO humana. Foi observado

que a maioria das entidades clínico-morfológicas, inicialmente caracterizadas pela classificação de Kiel, apresentam uma similaridade com as relatadas pelo sistema de classificação da WHO. No entanto, a comparação direta entre as duas classificações parece ainda difícil, devido à necessidade de se ampliar as informações sobre os dados clínicos e a resposta ao tratamento (PONCE et al., 2010).

Apesar de haver uma tendência recente de maior utilização da classificação da WHO para os animais domésticos para o linfoma canino, a Kiel atualizada têm seu valor, isso porque a divisão dos tumores pelos graus é muito mais clara nessa classificação (LENNERT, FELLER, 1992; PONCE et al., 2010; VALLI et al., 2002; VALLI et al., 2011).

Independentemente do critério utilizado, a determinação do índice proliferativo pela quantificação da expressão do antígeno Ki-67 pode resultar em um aumento na acurácia das classificações dos linfomas caninos. Além disso, uma correlação positiva foi observada entre a proporção de células positivamente marcadas pelo Ki-67 e a morfologia celular, o imunofenótipo, o grau de malignidade e a sobrevida dos animais (SUZANO et al., 2008; PONCE et al., 2010; SIERRA MATIZ et al., 2018).

Tem havido interesse crescente em relação aos componentes do estroma e de sua participação na amplificação ou na inibição da progressão tumoral (XU; WANG, 2017). Além disso, a cinética das drogas antineoplásicas no interior dos tumores é influenciada pela condutividade intersticial, sendo esta determinada pela quantidade e densidade da matriz extracelular (MEC) e pela fibrose do estroma (MATSUMURA, 2012).

Deve-se considerar que a interação entre as células neoplásicas dos LNH e o estroma não é um evento passivo, nem aleatório. É um processo complexo, altamente regulado, durante o qual estas células são atraídas e retidas nos tecidos em resposta a interações com as células estromais. A gênese tumoral é reconhecida como um processo dependente da comunicação ativa e permanente entre as células malignas e vários componentes estromais em seu microambiente (XU; WANG, 2017).

A MEC regula o desenvolvimento e a homeostase tecidual e sua desregulação contribui para a progressão tumoral. Ela serve não apenas como suporte para a organização tecidual, mas também está envolvida nos mecanismos bioquímicos e biofísicos que

direcionam o crescimento, a sobrevivência, a migração e a diferenciação celulares, além de modular o desenvolvimento vascular e a função imune (PICKUP et al., 2014).

Modificações genéticas nas células tumorais iniciam e impulsionam o tumor, mas o câncer progride dentro de uma MEC dinâmica que modula virtualmente todas as facetas do comportamento das células tumorais e das células estromais associadas ao tumor. Assim, o sucesso na prevenção do câncer e dos protocolos de tratamento requer uma compreensão aprofundada dos mecanismos de feedback entre a MEC em evolução, as células tumorais e o estroma celular associado ao tumor (PICKUP et al., 2014).

A MEC consiste em uma grande variedade de macromoléculas, que variam de tecido para tecido em termos de composição e do elenco de estruturas específicas presentes (THEOCHARIS et al., 2016). Seus principais constituintes são as proteínas fibrosas, como o colágeno, elastina, fibronectina, lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; THEOCHARIS et al., 2016).

A MEC pode ser classificadas em matriz intersticial, que circunda as células, e matriz pericelular, que está em contato íntimo com a célula, como a membrana basal (THEOCHARIS et al., 2016). Estes dois domínios têm em comum a presença de um suporte de colágeno (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003), sendo este o elemento predominante (KADLER et al., 2007).

O colágeno tipo I é o principal colágeno fibrilar da MEC, proporcionando força de tensão e limitando a capacidade de distensão tecidual (VENNING et al., 2015). A deposição anormal deste tipo de colágeno é uma das alterações mais bem documentadas em vários tipos de tumor (PROVENZANO et al., 2008). Na verdade, o colágeno I está envolvido na indução e manutenção do fenótipo invasivo (VENNING et al., 2015). O colágeno tipo III predomina na parede dos vasos sanguíneos e copolimeriza com o colágeno tipo I (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Já foi relatada a redução da capacidade invasiva e metastática de neoplasias mamárias, como consequência da inibição da síntese de colágeno (GILKES et al., 2013; XIONG et al., 2014). Além disso, fibras colágenas alinhadas em ângulo perpendicular à superfície do tumor facilitam e promovem a invasão celular, demonstrando que não só a quantidade de fibras, mas também sua orientação, são importantes para o desenvolvimento do fenótipo invasivo (ZHANG et al., 2013).

Tradicionalmente, colorações como as de Van Gieson e várias formas de tricrômico têm sido utilizadas para detectar fibras de colágeno em cortes de tecido (RICH e WHITTAKER, 2005). No entanto, estas colorações podem não ser as ideais. O Picrosirius Red em combinação com o ácido pícrico é um método de coloração seletivo para o tecido conjuntivo e tem sido utilizado para diferenciar as fibras de colágeno (WEATHERFORD, 1972). A molécula alongada deste corante reage com o colágeno e realça a birrefringência normal destas fibras, alinhando-se paralelamente com o eixo longitudinal de cada molécula de colágeno (ALLON et al., 2006).

Se os cortes corados pelo método do Picrosirius Red são observados sob polarização, as cores exibidas pelas fibras delgadas, compostas por procolágeno ou por fibras patológicas, variam entre o verde e o amarelo-esverdeado e as cores das fibras espessas, de arranjo compacto normal, variam entre o alaranjado e o vermelho. Assim, as cores das fibras guardam relação com a espessura, a densidade e o arranjo espacial (DAYAN et al., 1989).

O método do Picrosirius Red associado a microscopia de polarização tem sido utilizado em estudos na medicina humana, relacionados a diversos tipos de fibrose (CAMPBELL et al., 2011; COLEMAN, 2011) e de condições patológicas (KOREN et al. 2001; ALLON et al., 2006), tais como nevus e lesões odontogênicas (TRAU et al, 1991; HIRSHBERG et al, 1996; HIRSHBERG et al, 1999). Além disso, o método do Picrosirius Red associado à microscopia de polarização poderia ajudar a diferenciar os tumores malignos dos benignos em casos duvidosos, seja no arranjo ou na espessura das fibras de colágeno (ALLON et al., 2006).

Nos animais domésticos essa técnica já foi utilizada em equinos, nas endometroses (COSTA et al., 2017) e na avaliação da distribuição do colágeno nos sarcoides equinos (WILLIAMS et al., 1982; SCARELLI, 2015). Fibras delgadas de coloração verde, consideradas como imaturas ou patológicas, predominam no limite do tumor com o tecido normal em um dos tipos mais agressivos de sarcoide equino, o que pode estar relacionado com a capacidade infiltrativa da neoplasia (SCARELLI, 2015).

Não existem dados sobre a utilização do método do Picrosirius Red na avaliação do colágeno em processos neoplásicos de origem linfoide, seja no homem ou nos animais

domésticos. Esta avaliação permitiria correlacionar estes achados com os diferentes subtipos da neoplasia e seu comportamento biológico.

A imuno-histoquímica é uma técnica que também pode ser utilizada para a diferenciação dos tipos de colágeno, tendo sido realizados vários estudos com esta finalidade em diversos órgãos e em diferentes espécies (TEKGUL et al., 1996; AUGSBURGER; HENZI, 2008; COSTA et al., 2017). Assim, a confrontação dos dados referentes à distribuição e arranjo do colágeno, obtidos pelos métodos histoquímicos e imuno-histoquímicos, podem permitir a caracterização do estroma dos tumores linfoides. Esta caracterização se torna importante na medida em que as fibras colágenas são o principal constituinte da MEC e guardam relação estreita com a atividade fibroblástica presente no microambiente tumoral (OHSHIO et al., 2015).

Além disso, estudos recentes sugeriram a hipótese de que o silenciamento de determinados genes, como o C-P3H e o C-P4H, podem contribuir para o aparecimento dos linfomas humanos como resultado da biossíntese aberrante de colágeno, má formação de membrana basal ou outras anormalidades do colágeno promotoras de neoplasia (HATZIMICHAEL et al., 2012).

A reticulina, método à base de prata que cora as fibras reticulares, pode auxiliar no diagnóstico de processos patológicos, detectar a presença, severidade e padrão da deposição de reticulina em diversos distúrbios hematológicos, inclusive o linfoma (THIELE et al., 1999; AHLUWALIA et al., 2003; TALAULIKAR et al., 2008). Na leucemia há evidências de que maior quantidade de reticulina fornece proteção relativa para as células contra a quimioterapia, sendo observado menor duração de remissão nesses pacientes (NORÉN-NYSTRÖM et al., 2008). Acredita-se que em neoplasias com maior nível de fibras de reticulina as células podem estar mais protegidas contra sinais de apoptose (NATH et al., 2011).

Além dos componentes estruturais da MEC, outras moléculas são fundamentais para o desenvolvimento de neoplasias isso porque a sobrevivência e o crescimento do tumor dependem do aporte de oxigênio e de nutrientes, e são dependentes da neovascularização, que por sua vez é estimulada por fatores pró e antiangiogênicos estocados na MEC (PICKUP et al., 2014). Em condições fisiológicas o VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) é essencial para a formação de vasos sanguíneos em embriões, indução



da permeabilidade vascular e estímulo da proliferação endotelial, e nos tumores estimula a angiogênese e a metástase (GIANTIN et al., 2012). O VEGF é produzido por diversas células tumorais além de algumas células estromais associadas ao tumor (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; FUKUMURA et al., 1998; POWELL et al., 2013).

Nos linfomas humanos o VEGF tem potencialmente duas funções, aumentar a angiogênese e a proliferação e/ou sobrevivência das células tumorais induzida por sinalização autócrina (GRATZINGER et al., 2010). A expressão de VEGF por células neoplásicas foi demonstrada em subtipos agressivos de linfoma incluindo Linfoma de Células T Periférico (LCTP), Linfoma de Células T Angioimunoblástico, Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB), Linfoma de Células do Manto, Linfoma Primariamente de Efusão e tumores indolentes como Leucemia Linfocítica Crônica/ Linfoma Linfocítico de Pequenas Células (LLC/LLP) (FOSS et al., 1997; CHEN et al., 2000; KAY et al., 2002; POTTI et al., 2002; CANNON et al., 2003; ZHAO et al., 2004; GRATZINGER et al., 2007; GRATZINGER et al., 2008).

Expressão aumentada de VEGF foi associada com áreas de transformação de linfomas de células B indolentes para LDGCB agressivos e subgrupos com prognóstico ruim nos LDGCB (SHIPP et al., 2002). Além do VEGF, receptores de VEGF são expressos por diversas células de linfoma, particularmente LLC e subtipos agressivos de LNH, implicando mecanismos autócrinos e parácrinos de sobrevida mediada pelo VEGF (FOSS et al., 1997; DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU et al., 2002; WANG et al., 2004).

A elevação sérica de VEGF antes do tratamento em pacientes com LDGCB prediz a resposta à terapia e sobrevida após a quimio-imunoterapia e pode ajudar a estratificar esses pacientes em grupos de risco (DULETIĆ-NAČINOVIĆ et al., 2016). Em pacientes com LDGCB do tipo ABC (células B ativadas) refratários ou com recorrência da doença, menores níveis de VEGF são associados a prognóstico bom (BROSÉUS et al., 2017). Jiang e colaboradores (2016) realizaram uma metanálise e verificaram que pacientes com LDGCB com maiores níveis de VEGF exibem sobrevida geral menor, o que significa que a expressão desse marcador pode ser um determinante prognóstico independente nesses pacientes. Em LNH de forma geral o VEGF também é considerado como um fator prognóstico (YANG et al., 2015).

Em cães foram observados níveis plasmáticos de VEGF mais elevados nos animais portadores de linfoma, quando comparados aos níveis presentes em animais saudáveis, havendo correlação com o sub-estádio b da classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO) (GENTILINI et al., 2005). Trabalhos recentes sinalizaram que os linfomas T, principalmente os de alto grau, expressam mais intensamente VEGF do que os linfomas B e o tecido linfóide saudável (ARESU et al., 2012; ARICÒ et al., 2013). Além disso, sugerem como fator preditivo a redução dos níveis séricos de VEGF que ocorre durante o tratamento quimioterápico (ARESU et al., 2012).

Há aumento de angiogênese tumoral quando comparado à linfonodos normais nos tecidos de cães, assim, animais com linfoma são candidatos em potencial para tratamento com agente antiangiogênicos, somados à quimioterapia padrão, independente do grau da neoplasia (WOLFESBERGER et al., 2008; RODIGHIERI et al., 2015). Assim, a determinação do VEGF além de poder atuar como fator prognóstico em neoplasias caninas, tem o potencial de integrar o protocolo de tratamento. A eficácia de drogas antiangiogênicas foi comprovada em linhagem celular de carcinoma e adenoma mamário, carcinoma prostático e sarcoma de tecidos moles (STM) e em modelo xenográfico murino para o STM (PLATT et al., 2006; ADELFINER et al., 2015).

O microambiente tumoral é composto por várias populações de células estromais, entre as quais estão fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, que influenciam a regulação do crescimento neoplásico, a imunidade tumoral e a resposta à quimioterapia e à radioterapia (REGAN et al., 2016). A interação com as células estromais afeta a agressividade e a motilidade das células tumorais, e em última análise, são responsáveis pela disseminação da neoplasia (MUELLER; FUSENIG, 2004).

Os fibroblastos associados ao câncer (FAC) são o componente estromal dominante no microambiente tumoral, sendo responsáveis pela geração de estímulos tumorigênicos (OHSHIO et al., 2015). FAC são comumente identificados pela expressão de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) (PAUNESCU et al. 2011). Entre suas funções na progressão tumoral está a secreção de fatores de crescimento, além de citocinas imunossupressivas (MURATA et al., 2011; HARPER; SAINSON, 2014).

Os FAC são também caracterizados pela expressão de níveis elevados de proteases e proteínas da matriz extracelular, que podem influenciar a progressão tumoral

(BHOWMICK et al., 2004). Já foi demonstrado em estudos que utilizaram modelos animais, que o VEGF derivado dos FAC tem função importante na angiogênese tumoral (DONG et al., 2004).

A presença destas células já foi observada no estroma de diversas neoplasias malignas humanas, incluindo as de mama, rim, fígado, bexiga, cólon e próstata, sendo frequentemente associada a um prognóstico pior (KELLERMANN et al., 2007; SUROWIAK et al., 2007; SWIETLICKI et al., 2013). Ao que tudo indica, são particularmente numerosas dentro do estroma de carcinomas metastáticos e invasivos (SWIETLICKI et al., 2013).

A cocultura de células neoplásicas de tumores mamários de cadela com FAC resultou em um microambiente que promoveu a adesão, a angiogênese e a transição epitelial-mesenquimal (KRÓL et al., 2012). Além disso, através de um experimento com modelo de cultivo celular tridimensional, verificou-se que a penetração de drogas no tumor é menor naqueles com maior proporção de FAC (JAGANATHAN et al., 2014).

Quando a sua disposição espacial em relação aos outros componentes do estroma dos carcinomas é analisada, os FAC são mais evidentes no estroma mesenquimal “jovem”, em áreas que correspondem a uma invasão primária do estroma, ou mais consistentemente, na periferia da lesão, sendo pouco desenvolvidos ou ausentes no centro da área esclerótica destas neoplasias (SCHÜRCH et al, 1981).

A interação entre o tumor e o estroma é um pré-requisito para a progressão tumoral e assim, um passo crítico neste sentido é a transição dos fibroblastos para FAC e a detecção deste tipo celular no estroma nos indica um prognóstico pior (ALILI et al., 2014). Além disso, estas células têm sido consideradas como possíveis alvos terapêuticos em estudos experimentais que utilizam modelos de linfoma murino (OHSHIO et al., 2015) e também em linfomas humanos, principalmente nos tumores de células T indolentes (RUAN et al., 2006). Entretanto, não existem dados sobre a identificação dos FAC em linfomas caninos.

Em vista do que foi aqui apresentado, pode-se afirmar que a importância do estroma para a neoplasia vai além de sua influência no desenvolvimento e progressão tumoral. Ele tem sido apontado também como parte importante na resposta à quimioterapia (MINCHINTON; TANNOCK, 2006). De forma geral, a resistência às terapias antitumorais é atribuída a mutações genéticas, amplificação de genes ou alterações epigenéticas que

influenciam a absorção, o metabolismo ou a eliminação das drogas pelas células individualmente (TRÉDAN et al., 2007).

Porém, a efetividade da terapia depende da capacidade da droga de penetrar no tecido do tumor e atingir todas as células tumorais em concentrações potencialmente letais (KURTOVA et al., 2009). Desse modo, a cinética da distribuição da droga dentro do tumor é considerada uma função da condutividade intersticial que é determinada pela quantidade e densidade de MEC e pela fibrose do estroma (TRÉDAN et al., 2007).

Isso vem sendo estudado também nas neoplasias linfoides. Há evidências que sugerem que a interação entre as células neoplásicas no linfoma de células do manto e as células do estroma, no microambiente tumoral, seja na medula óssea ou em órgãos linfoides secundários, leve a progressão da doença promovendo a sobrevivência das células, seu crescimento e também a resistência à ação das drogas antineoplásicas (BURGER; FORD, 2011).

Desta forma, enquanto o tratamento convencional elimina a maior parte das células neoplásicas, células residuais podem permanecer protegidas em nichos de tecidos, recebendo sinais de células acessórias que permitem a persistência de doença residual e a recorrência (KURTOVA et al., 2009). Baseado nesse conceito, o microambiente do linfoma tem se tornado uma área de pesquisa em crescimento e testes clínicos iniciais, que têm como alvo a interrupção da interação entre as células tumorais e seu microambiente, têm mostrado resultados promissores (BURGER; FORD, 2011).

## 7. CONCLUSÕES

- As fibras colágenas mostraram padrão variado de arranjo e distribuição, correspondendo as fibras de colágeno III um padrão mais delicado e as fibras de colágeno I um padrão mais denso.
- Nos linfomas de imunofenótipo T o arranjo denso do colágeno foi mais acentuado do que nos linfomas de imunofenótipo B.
- As fibras de reticulina são mais abundantes nos linfomas de imunofenótipo T.
- Os linfomas caninos estudados exibem células mesenquimais que expressam alfa-actina de músculo liso não havendo variação entre os imunofenótipos ou graus.
- Nos linfomas ocorre a expressão de fator de crescimento endotélio vascular pelas células neoplásicas, sendo maior nos linfomas de imunofenótipo T do que nos linfomas de imunofenótipo B. Sendo mais acentuada nos linfomas T de alto grau.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ADELFINER, M. et al. Preclinical Testing Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-5b451 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody for Canine Cancer Therapy. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 4075-4092, 2015.

AHLUWALIA, J. et al. The reticulin stain in bone marrow biopsies - beyond marrow fibrosis. **Br J Haematol**, v. 123, n. 3, p. 379, 2003.

ALILI, L. et al. Fibroblast-to-myofibroblast switch is mediated by NAD (P)H oxidase generated reactive oxygen species. **Biosci Rep**, v. 34, n. 1, p. 7-17, 2014.

ALLON, I. et al. Stromal differences in salivary gland tumors of a common histopathogenesis but with different biological behavior: A study with picosirius red and polarizing microscopy. **Acta Histochem**, v. 108, n. 4, p. 259-264, 2006.

ARESU, L. et al. VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma. **Vet Comp Onc**, v. 12, n. 1, p.29-26, 2012.

ARICÒ, A. et al. The role of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and in vitro study. **BMC Vet Res**, v. 9, p.1-10, 2013a.

ARICÒ, A. et al. Matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor expression in canine leukaemias. **Vet J**, v. 196, n. 2, p. 260-262, 2013b.

AUGSBURGER, H. R.; HENZI, D. Immunohistochemical expression of collagen types I, III, IV and  $\alpha$ -actin in the uterine horns of nulliparous and multiparous beagles. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p.1070–1076, 2008.

AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. **Front Oncol**, v. 4, p. 1-8, 2014.

BERGHOFF, A. S. et al. Preoperative Diffusion-Weighted Imaging of Single Brain Metastases Correlates with Patient Survival Times. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2013.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v.432, n. 7015, p.332-337, 2004.

BLASEL, S. et al. MR perfusion in and around the contrast-enhancement of primary CNS lymphomas. **J Neurooncol**, v. 114, p. 127–134, 2013.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J Pathol**, v. 200, n.4, p. 423–428, 2003.

BROSÉUS, J. et al. VEGF121, is predictor for survival in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma and is related to an immune response gene signature conserved in cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 53, p. 90808-90824, 2017.

BURGER, J. A.; FORD, R. J. The microenvironment in mantle cell lymphoma: Cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. **Semin Cancer Biol**, v. 21, n. 5, p. 308– 312, 2011.

BUTLER, J. M.; KOBAYASHI, H.; RAFII, S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p. 138–146, 2010.

CAMPBELL, D. J. et al. Impact of type 2 diabetes and the metabolic syndrome on myocardial structure and microvasculature of men with coronary artery disease. **Cardiovasc Diabetol**, v. 10, p. 80, 2011.

CANNON, M.; PHILPOTT, N. J.; CESARMAN, E. The Kaposi's sarcoma associated herpesvirus G protein-coupled receptor has broad signaling effects in primary effusion lymphoma cells. **J Virol**, v. 77, n. 1, p. 57-67, 2003.

CHANG, G. et al. Pterostilbene Induces Cell Apoptosis and Cell Cycle Arrest in T-Cell Leukemia/Lymphoma by Suppressing the ERK1/2 Pathway. **BioMed Research International**, ID 9872073, p. 1-11, 2017.

CHEN, H. et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3181-3187, 2000.

CHOU, J.; SHAHI, P., WERB, Z. MicroRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment. **Cell Cycle**, v. 12, n. 20, p. 3262-3271, 2013.

COLEMAN, R. Picrosirius red staining revisited. **Acta Histochem**, v.113, n. 3, p.231-233, 2011.

COMAZZI, S.; GUSCETTI, F.; MARCONATO L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. **Hematol Oncol**, v. 32, n. 2, p.68-71, 2014.

COSTA, L. D. et al. Identificação dos colágenos I, III, IV e  $\alpha$ -SMA e participação dos miofibroblastos no processo fibrótico das endometroses equinas. **Arq Bras Med Vet Zootec (Online)**, v. 69, p. 1398-1406, 2017.

DAYAN, D. et al. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, v. 93, p. 27-29, 1989.

DOBSON, J. M. et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. **J Small Anim Pract.**, v.42, n.8, p. 377-384, 2001.



DOBSON, J. M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. **ISRN Vet Sci**, v. 2013, p. 1-23, 2013.

DONG, J. et al. VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. **EMBO J**, v. 23, n. 14, p. 2800-2810, 2004.

DONG, R. et al. Polyphyllin I inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating the expression of fibroblast activation protein alpha (FAP) and hepatocyte growth factor (HGF) in cancer-associated fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 497, n. 4, p. 1129-1134, 2018.

DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU, I. A. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **J Pathol**, v. 197, n. 5, p. 677-683, 2002.

DULETIĆ-NAČINOVIĆ, A. et al. Concurrent Elevations of VEGF, Osteopontin and MCP-1 Serum Levels are Independent Predictors of Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **Acta Haematol**, v. 136, n. 1, p. 52-61, 2016.

DVORAK, H. F. Vascular permeability to plasma, plasma proteins, and cells: an update. **Curr Opin Hematol**, v. 17, n. 3, p. 225-229, 2010.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, 2002.

EIRO, N. et al. Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. *Cell Oncol (Dordr)*. v. 41, n. 4, p. 369-378, 2018.

FERRARA, N. et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**, v. 13, n. 1, p. 18-32, 1992.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Trends Cardiovasc Med**, v. 3, n. 6. p. 244-250, 1993.

FERRARA N.; DAVIS-SMYT, T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. **Endocr Rev**. v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FOSS, H. D. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. **J Pathol**, v. 183, n. 1, p. 44-50, 1997.

FU, R. et al. Hodgkin's lymphoma associated with myelofibrosis: A case report. **Oncol Lett**, v. 10, n. 3, p. 1551-1554, 2015.

FU, Z. et al. Cancer-associated fibroblasts from invasive breast cancer have an attenuated capacity to secrete collagens. **Int J Oncol**. v. 45, n. 4, p. 1479-88, 2014.

FUKUMURA, D. et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. **Cell**, v. 94, n. 6, p. 715-725, 1998.

GANJOO, K. N. et al. Rituximab, bevacizumab and CHOP (RA-CHOP) in untreated diffuse large B-cell lymphoma: safety, biomarker and pharmacokinetic analysis. **Leuk Lymphoma**, v. 47, p. 998–1005, 2006.

GENTILINI, F. et al. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. **Leuk Res**, v. 29, n.11, p.1263–1269, 2005.

GIANTIN, M. et al. Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mast Cell Tumours. **J Comp Pathol**, v. 147, n.4, p. 419-429, 2012.

GILKES, D. M. et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. **Cancer Res**, v. 73, n. 11, p. 3285–96, 2013.

GRATZINGER, D. et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. **Am J Pathol**, v. 170, n. 4, p. 1362-1369, 2007.

GRATZINGER, D. et al. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. **Lab Invest**, v. 88, n. 1, p. 38-47, 2008.

GRATZINGER, D. et al. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). **Br J Haematol** v. 148, n. 2, p. 235-44, 2010.

HARPER, J.; SAINSON, R. C. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer associated fibroblasts. **Semin Cancer Biol**, v. 25, p. 69–77, 2014.

HATZIMICHAEL, E. et al. The collagen prolyl hydroxylases are novel transcriptionally **silenced genes in lymphoma**. **Br J Cancer**, v. 107, n. 8, p. 1423-1432, 2012.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. The central odontogenic fibroma and the hyperplastic dental follicle: study with picrosirius red and polarizing microscopy. **J Oral Pathol Med**, v.25, n. 3, p.125–127, 1996.

HIRSHBERG, A. et al. Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. **J Oral Pathol Med**, v.28, n. 9, p.410–412, 1999.

ISHII, G., OCHIAI, A., NERI, S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 99, p. 186-196, 2016.

ITO, D.; FRANTZA, A. M.; MODIANO, J. F. Canine lymphoma as a comparative model for humannon-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 159, n. 3-4, p. 192-201, 2014.

JACOBS, R. M.; MESSICK, J. B.; VALLI, V. E. Tumors of the hemolymphatic system. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa State University Press, Ames, 2002. p.119-198.

JACOBSON, M. D. et al. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. **Nature**, v. 361, n. 6410, p. 365–369, 1993.

JAFFE, E. S. et al. **World Health Organization Classification of Tumors- Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, IARC Press, 2001.

JAGANATHAN, H. et al. Three-Dimensional In Vitro Co-Culture Model of Breast Tumor using Magnetic Levitation. **SCIENTIFIC REPORTS** | 4 :6468 |DOI:10.1038/srep06468

JIANG, L. et al. Abnormal vascular endothelial growth factor protein expression may be correlated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: A meta-analysis. **J Can Res Ther**, v. 12, n.2, p. 605-611, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v.41, n.3, p. 267-274, 1978.

KADLER, K. et al. Collagens at a glance. **J Cell Sci**, v. 120, n. 12, p. 1955–1958, 2007.

KAY, N. E. et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and antiangiogenic molecules. **Leukemia**, v. 16, n. 5, p. 911-919, 2002.

KELLERMANN, M. G. et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849-853, 2007.

KIM, K. J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v. 362, n. 6423, p.841-844, 1993.

KIM, S. et al. Effects of Bevacizumab on Bcl-2 Expression and Apoptosis in Retinal Pigment Epithelial Cells under Oxidative Stress Korean **J Ophthalmol**, v. 29, n. 6, p. 424-432, 2015.

KOREN, R. et al. Capsular collagen staining of follicular thyroid neoplasms by picosirius red: role in differential diagnosis. **Acta Histochem**, v. 103, n. 2, p. 151-157, 2001.

KRÓL, M. et al. The gene expression profiles of canine mammary cancer cells grown with carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) as a co-culture in vitro. **BMC Vet Res**, v.8, 35, 1-22, 2012.

KUMAR, S. et al. Bone marrow biopsy in non-Hodgkin lymphoma: A morphological study. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 52, p. 332-338, 2009.

KURTOVA, A. et al. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. **Blood**, v.113, n. 19, p. 4604–4613, 2009.

LAXMANAN, S. et al. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 334, p. 193–198, 2005.

LENNERT, K.; FELLER, A. C. **Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas**, 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

LUO, H. et al. Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. **Cancer Lett**, v. 361, n. 2, p. 155-63, 2015.

MARCONATO, L.; GELAIN, M. E.; COMAZZI, S. The dog as a possible animal model for human non- Hodgkin lymphoma: a review. **Hematol Oncol**, v. 31, p. 1-9, 2013.

MATSUMURA, Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v.64, n. 8, p. 710-719, 2012.

MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumors. **Nat Rev Cancer**, v.6, n. 8, p. 583–592, 2006.

MUELLER, M.; FUSENIG, N. Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 11, p. 839–849, 2004.

MURATA, T. et al. HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. **Cancer Res**, v. 71, n. 21, p. 6633–42, 2011.

NATH, S. V. et al. Reticulin fibres anchor leukaemic blasts in the marrow of patients with acute lymphoblastic leukaemia. **Med Hypotheses**, v. 77, n. 3, p. 333-335, 2011.

NÓREN-NYSTRÖM, U. et al. Bone marrow fibrosis in childhood acute lymphoblastic leukemia correlates to biological factors, treatment response and outcome. **Leukemia**. v. 22, n. 3, p. 504-510, 2008.

OHSHIO, Y. et al. Cancer-associated fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based vaccine. **Cancer Sci**, v. 106, n. 2, p.134–142, 2015.

OWEN, L. N. **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals**. Geneva: World Health Organization, 1980.

PAUNESCU, V. et al. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. **J Cell Mol Med**. v. 15, n. 3, p. 635-646, 2011.

PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO Rep**, v. 15, n. 12, p. 1243-1253, 2014.

PLATT, S. R. et al. Vascular endothelial growth factor expression in canine intracranial meningiomas and association with patient survival. **J Vet Intern Med**, v. 20, n. 3, p. 663-668, 2006.

PONCE, F. et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Vet Pathol**, v. 47, n.3, p. 414-433, 2010.

POTTI, A. et al. Immunohistochemical detection of C-kit (CD117) and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in mantle cell lymphoma. **Anticancer Res**, v. 22, n.5, p. 2899-2901, 2002.

POWELL, J. R. et al. Prognostic significance of hypoxia inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. **Leuk Lymphoma**, v. 54, n. 5, p. 959–66, 2013.

PROVENZANO, P. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Med**, v 6, n.11. p. 6-11, 2008.

REGAN, D. et al. Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. **Vet J**, v. 207, p. 20-28, 2016.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Braz J morphol Sci**, v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.

RICHARDS, K. L.; SUTER, S. E. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? **Immunol Rev**, v. 263, p. 173-191, 2015.

RIIHJÄRVI, S. et al. High serum vascular endothelial growth factor level is an adverse prognostic factor for high-risk diffuse large B-cell lymphoma patients treated with dose-dense chemoimmunotherapy. **Eur J Haematol**, v. 89, n. 5, p. 395-402, 2012.

RODIGHERI, S. M. et al. Serum concentration and immunostaining of vascular endothelial growth factor in dogs with multicentric lymphoma. **Semin Cienc Agrar**, v. 36, n. 4, p. 2649-2660, 2015.

RUAN, J. et al. Magnitude of Stromal Hemangiogenesis Correlates with Histologic Subtype of Non-Hodgkin's Lymphoma. **Clin Cancer Res**, v.12, n.19, p.5622-5631, 2006.

SALVEN, P.; TEERENHOVI, L.; JOENSUU, H. A. High Pretreatment Serum Vascular Endothelial Growth Factor Concentration Is Associated With Poor Outcome in Non-Hodgkin's Lymphoma. **Blood**, v. 90, n. 8, p. 3167-3172, 1997.

SCARELLI, S. P. **Avaliação histoquímica do colágeno e expressão imunoistoquímica de metaloproteinases e alfa-actina de músculo liso no sarcoide equino.** 27 de outubro de 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. FMVZ UNESP Botucatu, 2015.



SHIPP, M. A. et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. **Nature Med**, v. 8, n. 1, p 68-74, 2002.

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T. A.; LAGACÉ, R. Stromal myofibroblasts in primary invasive and metastatic carcinomas. A combined immunological, light and electron microscopy study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol** , v. 391, p. 125-132, 1981.

SIERRA MATIZ, O. R. et al. Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. **J Vet Diagn Invest**, v. 30, n. 2, p. 263-267, 2018.

SUGIMOTO, H. et al. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. **Cancer Biol Ther**, v. 5, n. 12, p. 1640-1646, 2006.

SUROWIAK, P. et al. Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. **Anticancer Res**, v. 27, n. 4C, p. 2917-2924, 2007.

SUZANO, S. M. C. et al. Proliferação celular nos linfomas caninos. **Braz J Vet Res An Sci**, v. 45, p. 313-319, 2008.

SORENMO, K. et al. Outcome and toxicity associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol in canine lymphoma: 130 cases. **Vet Comp Oncol**, v. 8, 196- 208, 2010.

STOPECK, A. T. et al. A Phase II Trial of Single Agent Bevacizumab in Patients with Relapsed, Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma: Southwest Oncology Group Study S0108. **Leuk Lymphoma**, v. 50, n. 5, p. 728–735, 2009.

SWIETLICKI, E. A. et al. Epimorphin deletion inhibits polyposis in the Apcmin/+ mouse model of colon carcinogenesis via decreased myofibroblast HGF secretion. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 305, n. 8, p. G564-G572, 2013.

TALAULIKAR, D. et al. Role of immunohistochemistry in staging diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **J Histochem Cytochem**. v. 56, n.10, p.893-900, 2008.

TEKGUL S. et al. Collagen types I and III localization by in situ hybridization and immunohistochemistry in the partially obstructed young rabbit bladder. **J Urol**, v. 156, p. 582-586, 1996.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 97, p. 4-27, 2016.

THIELE, J. et al. Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma--a practical guideline. **J Clin Pathol**. v. 52, n. 4, p. 294-300, 1999.

TRAU, H. et al. Connective tissue nevi collagens. Study with picrosirius red and polarizing microscopy. **Am J Dermatopathol**, v.13, n. 4, p.374-377, 1991.

TRÉDAN, O. et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, n. 19, p. 1441-1454, 2007.

VALLI, V.E. et al. **WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals**. 2ed. Armed Forces Institute of Pathology, 190p, 2002.

VALLI, V. E. et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization Criteria. **Vet Pathol**. v.48, n.1, p. 198-211, 2011.

VAN DER VELDT, A. A. et al. Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of antiangiogenic drugs. **Cancer Cell**, v. 21, p. 82–91, 2012.

VENNING, F. A.; WULLKOPF, L.; ERLER, J. T. Targeting ECM disrupts cancer progression. **Front Oncol**, v.5, p. 224, 2015.

WANG, E. S. et al. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. **Blood**, v. 104, n.9, p. 2893-2902, 2004.

WEATHERFORD, T. W. Staining of collagenous and non-collagenous structures with picosirius red F3BA. **Ala J Med Sci**, v. 9, n. 4, p. 383-388, 1972.

WILLIAMS, I. F.; HEATON, A.; MCCULLAGH, K. G. Connective tissue composition of the equine sarcoid. **Equine Vet J**, v. 14, n. 4, p. 305-310, 1982.

WOLFESBERGER, B. et al. Microvessel density in normal lymph nodes and lymphomas of dogs and their correlation with vascular endothelial growth factor expression. **Res Vet Sci**, v. 85, p. 56-61, 2008.

XIONG, G. et al. Prolyl-4-hydroxylase  $\alpha$  subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. **BMC Cancer**, v.14, n.1, p. 1-12, 2014.

XU, B.; WANG, T. Intimate cross-talk between cancer cells and the tumor microenvironment of B-cell lymphomas: The key role of exosomes. **Tumor Biol** v. 39, n.6, p. 1 –12, 2017.

YANG, J. et al. VEGF Overexpression Is a Valuable Prognostic Factor for Non-Hodgkin's Lymphoma Evidence from a Systemic Meta-Analysis. **Dis Markers**, p. 1-9, 2015.

YAZHOU, C. et al. Clinicopathological Significance of Stromal Myofibroblasts in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. **Tumor Biol**, v. 25, p. 290–295, 2004.

YOON, K. A. et al. Adverse prognostic impact of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma**, v. 58, p. 2677-2682, 2017.

ZHANG, K. et al. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. **Nat Cell Biol**, v.15, n.6, p.677–687, 2013.

ZHAO, W. L. et al. Vascular endothelial growth factor-A is expressed both on lymphoma cells and endothelial cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related to lymphoma progression. **Lab Invest**, v. 84, n. 11, p. 1512-1519, 2004.

ZHOU, Z. et al. The prognostic value and pathobiological significance of Glasgow microenvironment score in gastric cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 143, p.883–894, 2017.