

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 TÉC. 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

TABELA 1 - Especificações dos anticorpos utilizados no projeto quanto a diluição, fabricante, clone, incubação e controle positivo.....	16
TABELA 2 - 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
TABELA 3 - 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
TABELA 4 - Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	21
TABELA 5 - Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	21
TABELA 6 - Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	21
TABELA 7 - Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	27
TABELA 8 - Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	27
TABELA 9 - Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	27
TABELA 10 - 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
TABELA 11 - Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	30
TABELA 12 - Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	30
TABELA 13 - Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	30

TABELA 14 - 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
TABELA 15 - Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	32
TABELA 16 - Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	32
TABELA 17 - Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	32
TABELA 18 - Mediana do escore de marcação de α -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.....	33
TABELA 19 - Mediana do escore de marcação de α -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.....	33
TABELA 20 - Mediana do escore de marcação de α -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.....	33
TABELA 21 - 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 α -SMA, VEGF, colágeno tipo I e tipo III nos linfomas caninos.....	37
ANEXO 1 - Dados clínicos de todos os animais incluídos no projeto, com respectiva classificação histológica dos tumores.....	95
ANEXO 2 - 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 μ 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 μ 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 μ 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- α SMA. A) Escore 1. B) Escore 4. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Barra = 20 μ m. Fonte: elaboração dos autores.....34
- FIGURA 6** - Linfomas Caninos - Diferentes apresentações da imunomarcção de α 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 μm ; C = 10 μm . 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 μm . 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- αSMA 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 μm . 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- αSMA 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 α 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 α -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 α -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 α -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 α -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 (α 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).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Caracterizar o estroma e o microambiente tumoral nos linfomas caninos, avaliando a distribuição e o arranjo das fibras de colágeno tipo I e III e de reticulina, a presença e distribuição de fibroblastos associados ao câncer e a expressão de fator de crescimento do endotélio vascular, correlacionando-os com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar empregando o método de Picrosirius Red a distribuição, arranjo e proporção de colágeno no estroma tumoral.
- Determinar por método imuno-histoquímico a presença de colágenos tipo I e tipo III no estroma tumoral.
- Descrever a espessura, arranjo e distribuição das fibras de reticulina e sua proporção no estroma tumoral pelo método de Reticulina.
- Analisar por método imuno-histoquímico a presença e distribuição de células mesenquimais que expressam alfa-actina de músculo liso.
- Investigar por método imuno-histoquímico a expressão de fator de crescimento do endotélio vascular.
- Correlacionar estes achados com o imunofenótipo e o grau das neoplasias

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras e critérios de inclusão/exclusão

As amostras de linfomas caninos foram provenientes do arquivo de tecidos parafinados do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu e também dos casos diagnosticados pelo mesmo serviço durante o desenvolvimento do projeto. Ainda, foram gentilmente cedidas e utilizadas amostras da Profa. Dra. Sabryna Calazans e do Laboratório privado VETMOL. As amostras coletadas durante o desenvolvimento do projeto foram fixadas em solução de formaldeído a 10%, em temperatura ambiente por 48 horas, rotineiramente processadas e incluídas em parafina segundo protocolo padrão adotado pelo serviço de Patologia.

Inicialmente todos os casos com diagnóstico prévio ou suspeita de linfoma canino foram recuperados do arquivo de blocos do Serviço de Patologia. As respectivas lâminas foram revisadas e os linfomas com conservação ruim, tamanho muito reduzido ou pouco material no bloco de parafina foram excluídos. Os anticorpos anti-CD-20, anti-CD3 e anti-Ki67 foram utilizados para se estabelecer o imunofenótipo e índice proliferativo e permitir em sequência a classificação dos linfomas.

Os critérios utilizados para classificação foram aqueles estabelecidos pela Classificação de Kiel atualizada (LENNERT, FELLER, 1992) e pela Classificação dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da World Health Organization (WHO) (VALLI et al., 2002). Esta classificação foi realizada através de avaliação das lâminas histológicas coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), sendo os critérios principais considerados a morfologia celular e arranjo, juntamente com o imunofenótipo e índice proliferativo.

Os casos foram divididos em quatro grupos de acordo com o grau e imunofenótipo. Todos os linfomas de baixo grau, com exceção dos que foram negativos para o anticorpo anti-Ki67, foram selecionados para o estudo. O dobro do número de casos foi selecionado para os tumores de alto grau. Dentre os linfomas de alto grau, foram escolhidos preferencialmente os de mesma classificação histológica, além de amostras com menor quantidade de áreas necróticas ou com hemorragia e quando disponível, o tecido de eleição

foi o linfonodo. Ao total foram utilizados sessenta casos, sendo 21 linfomas B de alto grau (LBA), nove linfomas B de baixo grau (LBB), 20 linfomas T de alto grau (LTA) e 10 linfomas T de baixo grau (LTB).

Os dados referentes a raça, sexo, idade, estado reprodutivo e peso corporal dos animais foram obtidos a partir do prontuário dos animais. A classificação anatômica das neoplasias foi determinada segundo JACOBS et al., (2002) e o estadiamento clínico dos linfomas de acordo com o modelo proposto por OWEN (1980). O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética e Experimentação Animal da FMVZ/UNESP – Campus Botucatu/SP sob o número 73/2016.

4.2 Técnicas histoquímicas

A técnica do Picrosirius Red (JUNQUEIRA et al., 1978) seguiu o protocolo estabelecido do Laboratório do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu e incluiu as seguintes etapas: os cortes com espessura de cinco μm foram distendidos em lâminas histológicas comuns, as lâminas foram colocadas em estufa a 56°C e posteriormente desparafinizadas. O material foi imerso em solução de ácido fosfomolibdico 0,2% por dois minutos e em seguida lavado em água corrente e água destilada. Após este processo, permaneceu imerso em solução 0,1% de Direct Red (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO) dissolvido em ácido pícrico 1,5% (aquoso saturado) por 110 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de ácido clorídrico a 0,1 N por dois minutos. Depois destas etapas, o material foi lavado em solução de álcool a 70% durante 45 segundos e submetido aos processos de desidratação, diafanização e montagem em resina.

Para avaliação das fibras reticulares, as amostras foram coradas com o método de reticulina, utilizando-se um kit comercial (Kit EasyPath, Reticulina; Erviegas, cód. EP-12-20021). O procedimento incluiu a desparafinização das lâminas seguida de aplicação das seguintes soluções, com lavagem em água destilada entre as etapas: permanganato de potássio por um minuto, ácido oxálico dois minutos, alúmen de ferro cinco minutos, prata amoniacal cinco minutos, formol cinco minutos, cloreto de ouro um minuto e tiosulfato de sódio um minuto. Finalmente, as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina.

4.3 Técnicas imuno-histoquímicas

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas de acordo com protocolo estabelecido pelo laboratório do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP Campus de Botucatu – SP. Para recuperação antigênica, foram utilizados três métodos. No caso dos colágenos, a recuperação foi por digestão enzimática em pepsina 1%, pH 1,8 (Pepsina 1:10.000 NF- Nuclear, SP, Brasil) em duas etapas, incubação em estufa a 60°C por três minutos e, em seguida, em estufa a 37°C por dez minutos. Para o VEGF foi utilizado o micro-ondas, no qual as lâminas foram submetidas a quatro ciclos de cinco minutos na potência de 800W em solução de citrato pH 6,0. Para os demais anticorpos as lâminas foram tratadas com solução de citrato, pH 6,0 em panela de pressão microprocessada Pascal (Dako Denmark A/S). Após resfriamento até a temperatura ambiente as lâminas foram submetidas à incubação a 27°C em solução de peróxido de hidrogênio pronta para uso (Spring Bioscience, cód.: DHP-125), por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida, posteriormente, lavados em solução tampão de TRIS pH 7,4 e incubados com o anticorpo secundário Histofine® (Nichirei Bioscience, Japão, REF: 414154F) durante 30 minutos seguido de nova lavagem com o tampão TRIS.

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen® – Dako, EUA) por três minutos, lavadas em água destilada, contra-coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente durante três minutos, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina. O controle negativo foi feito incubando-se as amostras somente com o diluente de anticorpo.

As informações de cada anticorpo, referente a diluição, fabricante, clone, tempo de incubação e controle positivo estão apresentadas a seguir (Tabela 1):

TABELA 1. Especificações dos anticorpos utilizados no projeto quanto a diluição, fabricante, clone, incubação e controle positivo.

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Clone	Incubação	Controle positivo
CD3	1:500	Dako	Policlonal	27°C, 2 h	Linfonodo
CD20	1:1000	SpringBioscience	Policlonal	27°C, 2 h	Linfonodo
Ki-67	1:100	Dako	MIB-1	27°C, 2 h	Linfonodo
Colágeno I	1:1000	Novotec	Policlonal	4°C, 18 h	Pele
Colágeno III	1:1000	Novotec	Policlonal	4°C, 18 h	Pele
VEGF	1:100	SpringBioscience	Policlonal	4°C, 18 h	Placenta
α -SMA	1:1250	Dako	1A4	27°C, 2 h	Pele

4.4 Análise dos dados

Em todas as análises microscópicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, foi utilizado o microscópio de luz modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), dispendo de câmera digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) acoplada a um microcomputador. As imagens foram processadas pelo programa computacional de análise de imagem Axiovision 4.6.3 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

Com o auxílio de luz polarizada em campo escuro, as fibras colágenas nas amostras de linfoma coradas com Picrosirius Red foram avaliadas quanto a cor, espessura, distribuição, arranjo e escore de quantidade, o qual variou de 1 a 4 de acordo com quantidade crescente de colágeno observada no estroma, sendo que o corte histológico inteiro foi analisado para se caracterizar essas variáveis, uma vez que em alguns casos estes tinham distribuição heterogênea pela amostra. Ainda, através do uso do software de análise de imagens Image J foi mensurada a proporção de colágeno presente em cinco campos representativos de grande aumento (CGA – 400X), sem polarização, e a média destes calculada.

Utilizando-se o método de reticulina foram avaliados a espessura das fibras, seu arranjo, distribuição e escore de quantidade, o qual variou de 1 a 3 de acordo com quantidade crescente no estroma. Foi mensurada também a proporção presente na amostra

através do software Image J, com a mesma metodologia descrita acima para o Picrosirius Red.

Para os anticorpos anti- CD3 e CD20 a avaliação foi referente a presença ou ausência de marcação pelas células neoplásicas no citoplasma e membrana citoplasmática, respectivamente, determinando-se assim o imunofenótipo. Para o anticorpo anti-Ki-67 foi realizada a contagem de todas as células presentes, negativas e positivas em cinco campos aleatórios em CGA, sendo este resultado transformado em percentual de células positivas.

A avaliação da imunomarcação pelo anticorpo anti- α SMA foi realizada através da observação de arranjo e distribuição dessas células, além de escore crescente de quantidade de marcação de 1 a 4. O VEGF foi avaliado através da multiplicação do escore de intensidade com o de quantidade de marcação nas amostras, de forma semelhante a metodologia estabelecida por RODIGHIERI et al. (2015). A análise imuno-histoquímica do colágeno no estroma tumoral foi realizada através da determinação do tipo predominante de colágeno (I ou III) presente na amostra e o escore crescente de quantidade de marcação (1, 2 ou 3) de cada colágeno.

4.5 Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva de todos os parâmetros avaliados. Com auxílio do software GraphPad Prism 7.05 os valores obtidos com a avaliação do Picrosirius Red, reticulina, α -SMA, VEGF e colágeno tipo I e III foram comparados dentro dos quatro grupos com o teste de Kruskal-Wallis. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar esses valores entre cada um dos grupos, entre os imunofenótipos e entre os graus. Foi realizado ainda coeficiente de correlação de Spearman para investigar a correlação entre a porcentagem de marcação de Ki67 e todas as variáveis analisadas descritas acima, bem como das variáveis entre si. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valores de P inferiores a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

O perfil racial dos animais avaliados teve a distribuição de 30 cães sem raça definida, seis Boxers, quatro Pastor Alemão e outras 13 raças. A frequência entre machos e fêmeas foi de 50%. A idade variou entre 2 e 14 anos, com média de 7,6 anos. A média de peso entre os 43 cães em que este dado foi apurado foi de 19,6 kg. Os anexos 1 e 2 trazem essas informações de forma detalhada, bem como os dados de forma anatômica, estadiamento clínico e estado reprodutivo, acompanhados das respectivas porcentagens.

5.2 Classificação dos tumores

Utilizando-se a classificação de Kiel e da WHO foram observados, respectivamente, 14 e 12 subtipos diferentes de linfoma. As tabelas 2 e 3 exibem o número de cada um dos diferentes subtipos dentro dos grupos de acordo com cada uma das classificações.

TABELA 2. Classificação dos linfomas de acordo com a classificação de Kiel atualizada (LENNERT, FELLER, 1992) de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.

Grupo	Classificação	N
LBA		
	Linfoma Centrobástico	18
	Linfoma Imunoblastico B	2
	Linfoma de Células B Linfoblástico	1
LBB		
	Linfoma de Células B Monocitoide	6
	Linfoma Centrocítico	2
	Linfoma Linfoplasmocítico	1
LTA		
	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	8
	Linfoma de Células T Anaplásico de Grandes Células	5
	Linfoma de Células T Imunoblastico	4
	Linfoma de Células T Linfoblástico	3
LTB		
	Linfoma de Células T Pleomórfico de Pequenas Células	4
	Linfoma de Zona T	4
	Linfoma de Células T linfocítico	1
	Micose Fungoide	1

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau.

TABELA 3. 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.

Grupo	Classificação	N
LBA		
	Linfoma Difuso de Grandes Células B	20
	Linfoma de Células B Linfoblástico	1
LBB		
	Linfoma de Células B de Zona Marginal	6
	Linfoma da Zona do Manto	2
	Linfoma Linfoplasmocítico	1
LTA		
	Linfoma de Células T Periférico	11
	Linfoma de Células T Anaplásico de Grandes Células	5
	Linfoma T Intestinal	1
	Linfoma de Células T Linfoblástico	3
LTB		
	Linfoma de Células T Periférico	7
	Linfoma Hepatoesplênico	1
	Linfoma de Células T pró-linfocítico	1
	Micose Fungoide	1

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau.

5.3 Histoquímica

5.3.1. Picrosirius Red

Como comentários gerais, notou-se que o colágeno mais fortemente corado corresponde a cor vermelha quando observado na luz polarizada. As fibras mais delicadas

exibem predominantemente coloração verde ou verde amarelada e fibras de coloração vermelha ou rósea correspondem a fibras mais espessas.

Os valores de porcentagem de colágeno obtidos com auxílio do Image J estão expressos em mediana da porcentagem de acordo com os grupos, o imunofenótipo e o grau. Os valores estão descritos nas tabelas 4, 5 e 6 a seguir, com indicação da existência ou não de diferença estatística. Essas tabelas exibem também os valores de escore de marcação.

TABELA 4. Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.

Grupo	% (Quartil inferior/superior)	Escore
LBA	2,15 (1,54 - 3,31) a	2 a
LBB	1,86 (0,67 - 5,89) ab	2 ac
LTA	4,66 (2,92 - 8,54) b	3 b
LTB	3,45 (1,41 - 8,53) ab	2 bc

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 5. Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.

Imunofenótipo	% (Quartil inferior/superior)	Escore
B	2,15 (1,38 - 3,55) a	2 a
T	4,39 (2,71 - 7,45) b	3 b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 6. Mediana da porcentagem e do escore de colágeno no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.

Grau	% (Quartil inferior/superior)	Escore
Alto	3,09 (2,06 - 5,46) a	2 a
Baixo	2,43 (1,39 - 6,88) a	2 a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

As variáveis avaliadas com auxílio da luz polarizada estão descritas a seguir, com o número correspondente de casos de acordo com o grupo e sua porcentagem dentro do grupo. Em relação as cores observadas (Figura 1) todos os tumores tiveram predomínio de fibras de coloração variando entre o verde e o verde amarelado, sendo esta a única coloração presente em dois LBB (22,2%). Em um LBA (4,7%), um LBB (11,1%) e um LTA (5%) observou-se também quantidade discreta de fibras de coloração amarela. Já em dois LBA (9,5%), um LBB (11,1%), um LTA (5%) e um LTB (10%) notou-se ainda quantidade discreta de fibras de coloração laranja. Além do predomínio de fibras de coloração verde amarelada havia também quantidade discreta de fibras de coloração vermelha em cinco LBA (23,8%), três LBB (33,3%), três LTA (15%) e dois LTB (20%). Outro espectro de cores observado foi de predominância de fibras de coloração verde amarelada, presença menor de fibras de coloração laranja ou amarelo alaranjada e quantidade discreta de fibras de coloração vermelha em nove LBA (42,8%), um LBB (11,1%), oito LTA (40%) e quatro LTB (40%). Por fim, quatro LBA (19%), um LBB (11,1%), sete LTA (35%) e três LTB (30%) exibiram em menor proporção fibras de coloração laranja ou amarelo alaranjada e quantidade discreta de fibras de coloração vermelha e rosa.

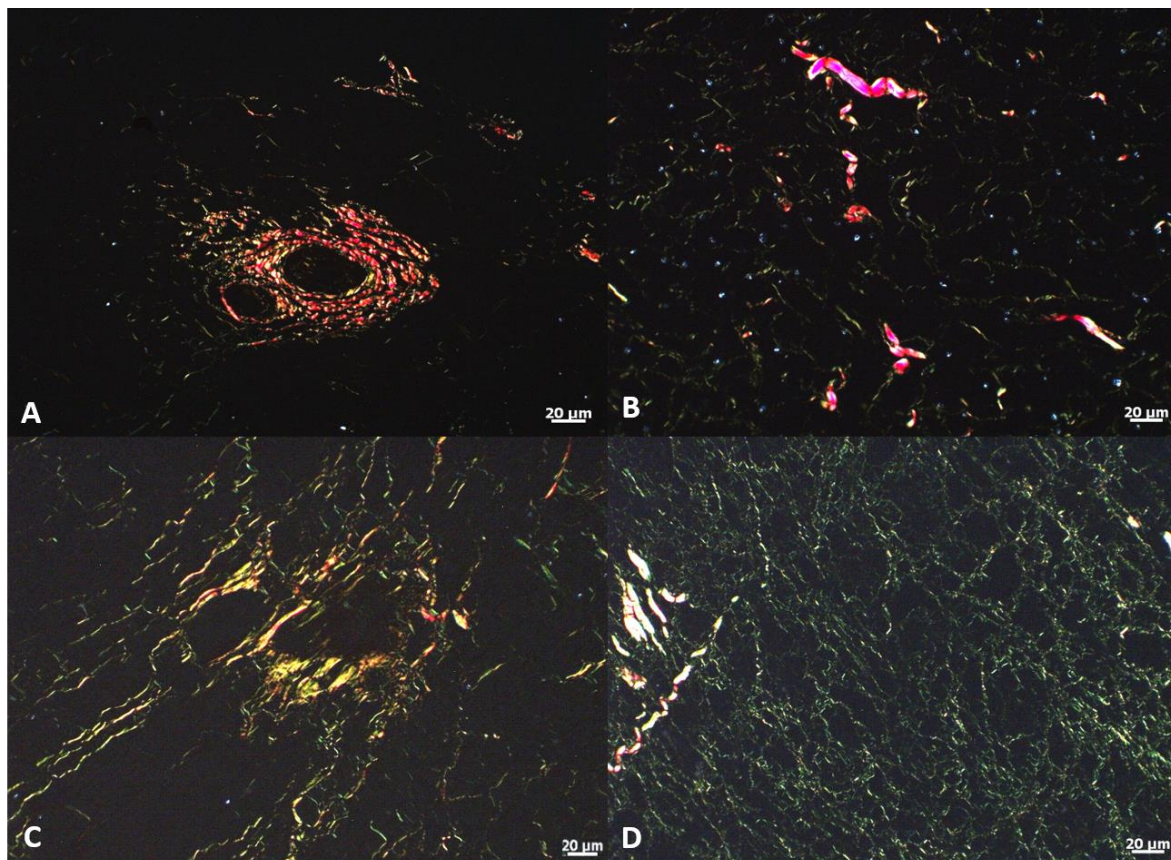


FIGURA 1. Linfomas Caninos - Diferentes cores das fibras de colágeno observadas pela técnica de Picrosirius Red sob luz polarizada. A) Nota-se fibras com arranjo concêntrico (circundando vasos sanguíneos) de coloração predominantemente vermelha. B) Fibras mais espessas com coloração rosa e as mais delgadas de coloração verde. C) Predomínio de fibras com coloração alaranjada. D) A maior parte das fibras exibe coloração verde a verde amarelado. Barra = 20 µm. Fonte: elaboração dos autores.

A espessura das fibras nos tumores teve a seguinte distribuição: delicada (1 LBA – 4,7%, 3 LBB – 33,3%); delicada, com áreas mais espessas em região central e/ou ao redor de vasos (15 LBA – 71,4%, 2 LBB – 22,2%, 5 LTA – 25%, 4 LTB – 40%); heterogênea com predomínio de fibras delicadas (5 LBA – 23,8%, 3 LBB – 33,3%, 12 LTA – 60%, 5 LTB – 50%) ou ainda heterogênea com predomínio de fibras espessa (1 LBB – 11,1%, 3 LTA – 15%, 1 LTB – 10%).

De acordo com a quantidade de colágeno observada em todo o corte histológico estabeleceu-se um escore de marcação (Figura 2) crescente de 1 (10 LBA – 47,6%, 4 LBB

– 44,4%), 2 (7 LBA – 33,3%, 3 LBB – 33,3%, 7 LTA – 35%, 6 LTB – 60%), 3 (4 LBA – 19%, 1 LBB – 11,1%, 9 LTA – 45%, 2 LTB – 20%) e 4 (1 LBB – 11,1%, 4 LTA – 20%, 2 LTB – 20%).

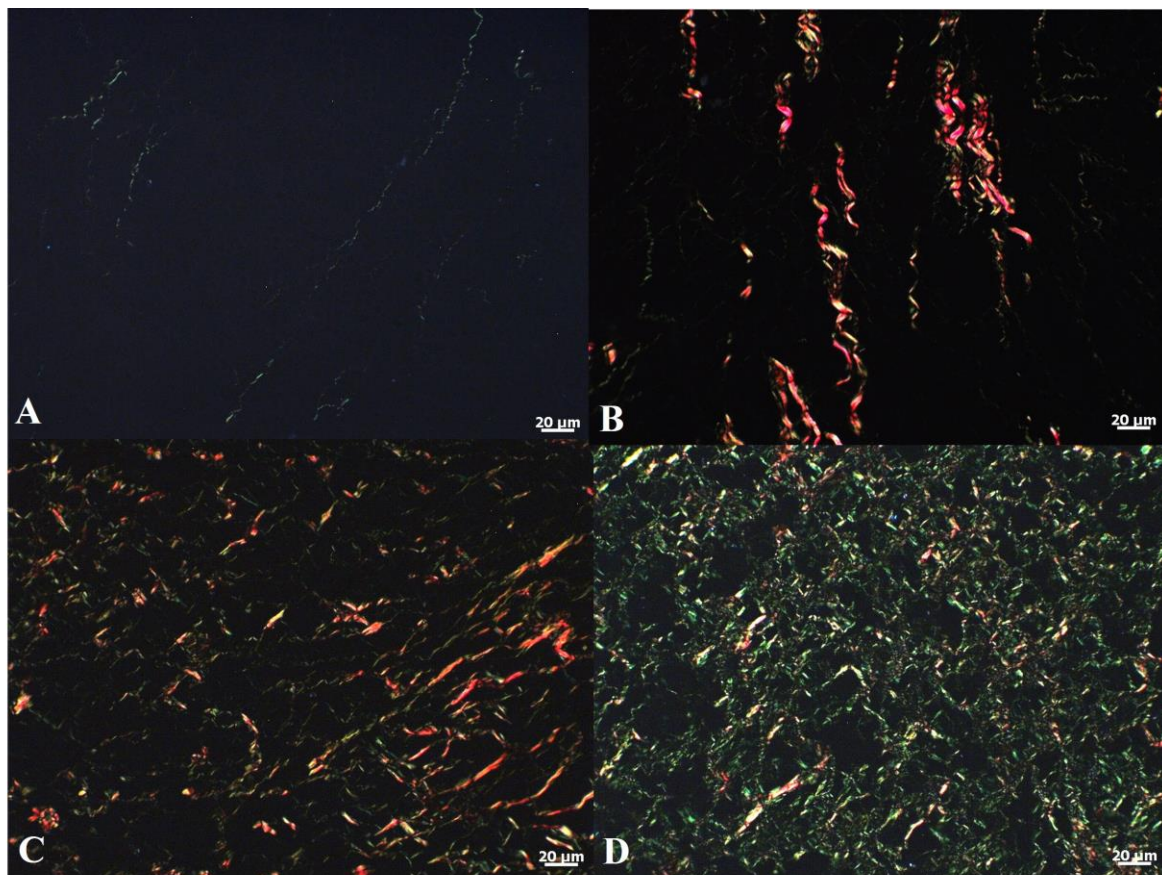


FIGURA 2. Linfomas Caninos - variação dos escores de quantidade de colágeno observada. A) Escore 1 – nota-se poucas fibras delicadas de colágeno de coloração verde em feixes longitudinais. B) Escore 2 – há quantidade moderada de fibras em feixes longitudinais, delicadas de coloração verde e espessas 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. Picrosirius Red, sob luz polarizada. Barra = 20 µm. Fonte: elaboração dos autores.

Verificou-se que alguns tumores exibiram distribuição de colágeno homogênea (3 LBA – 14,3%, 3 LBB – 33,3%, 1 LTA – 5%, 2 LTB – 20%), enquanto em outros ela foi heterogênea (4 LBA – 19%, 1 LBB – 11,1%, 12 LTA – 60%, 4 LTB – 40%). Nos demais

foi possível notar que havia maior concentração na periferia (4 LTA – 20%, 4 LTB – 40%) ou centro (14 LBA – 66,6%, 5 LBB – 55,5%, 3 LTA – 15%, 6 LTB – 60%) da neoplasia. Em parte dos casos houve um acúmulo de colágeno ao redor de vasos, imediatamente adjacente aos vasos de forma concêntrica e em sequência em feixes paralelos (17 LBA – 80,9%, 4 LBB – 44,4%, 2 LTA – 10%, 7 LTB – 70%).

Finalmente, foram observados alguns tipos de arranjo das fibras colágenas nos tumores (Figura 3). Houve predomínio de feixes, seguido de ilhas em 15 LBA (71,4%), sete LBB (77,7%), quatro LTA (20%) e cinco LTB (50%); predomínio de ilhas, seguido de feixes em um LBA (4,7%), 11 LTA (55%) e três LTB (30%) e por fim em cinco LBA (23,8%), dois LBB (22,1%) e cinco LTA (25%) as fibras se arranjaram de forma diversa, tais como aleatório, feixes curtos, longos e em diversas direções, ilhas e trabéculas.

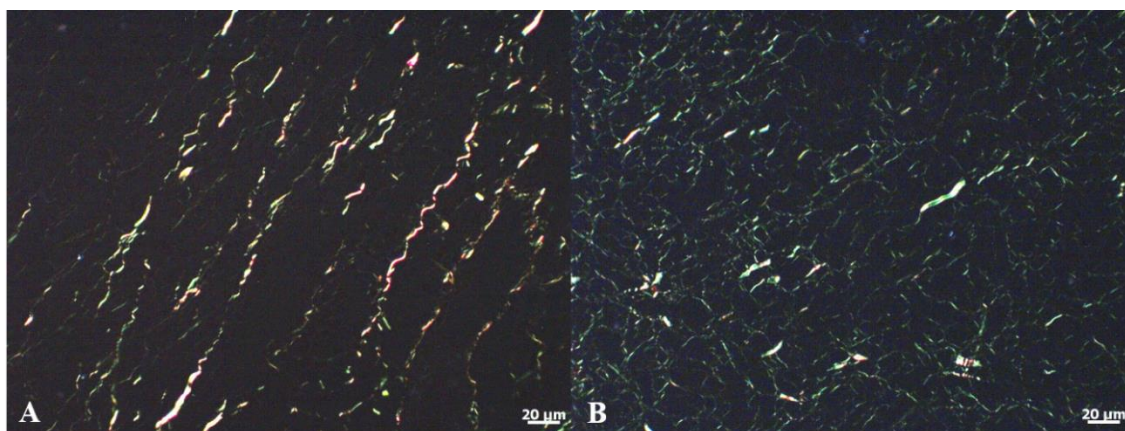


FIGURA 3. Linfomas caninos - Principais tipos de arranjo de colágeno observado no estroma dos linfomas estudados. A) Fibras colágenas arranjadas em feixes, predominantemente paralelos longitudinais. B) Nota-se fibras colágenas organizadas delimitando ilhas de células neoplásicas. Picrosirius Red, sob luz polarizada. Barra = 20 μ m. Fonte: elaboração dos autores.

5.3.2 Reticulina

A espessura das fibras de reticulina nos linfomas variou entre delicada (2 LBA – 9,5%, 4 LBB – 44,4%), predomínio de delicada (19 LBA – 90,5%, 4 LBB – 44,4%, 18

LTA – 80%, 8 LTB – 80%) ou predomínio de espessa (1 LBB – 11,1%, 2 LTA – 10%, 2 LTB – 20%).

O escore de quantidade de marcação teve a seguinte distribuição: 1 (9 LBA – 42,8%, 6 LBB – 66,6%, 1 LTA – 5%, 1 LTB – 10%), 2 (9 LBA – 42,8%, 2 LBB – 22,2%, 8 LTA – 40%, 5 LTB – 50%) e 3 (3 LBA – 14,4%, 1 LBB – 11,1%, 11 LTA – 55%, 4 LTB – 40%).

Quanto a distribuição, em alguns tumores ela foi homogênea (4 LBA – 19%, 4 LBB – 44,4%, 7 LTA – 35%, 1 LTB – 10%), enquanto na maioria dos linfomas foi heterogênea (13 LBA – 61,9%, 2 LBB – 22,2%, 9 LTA – 45%, 4 LTB – 40%). Observou-se ainda que alguns tumores exibiram maior concentração de fibras na periferia (1 LBA – 4,7%, 3 LBB – 33,3%, 1 LTA – 5%, 3 LTB – 30%) e em outros era mais evidente no centro da neoplasia (6 LBA – 28,6%, 1 LBB – 11,1%, 4 LTA – 20%, 3 LTB – 30%) da neoplasia. Em parte dos casos notou-se quantidade acentuada de reticulina ao redor de vasos (16 LBA – 76,2%, 3 LBB – 33,3%, 3 LTA – 15%, 5 LTB – 50%).

Finalmente, foram observados alguns tipos de arranjo das fibras de reticulina nos tumores. Houve predomínio de feixes e trabéculas em 7 LBA (33,3%); feixes e ilhas em seis LBA (28,6%), seis LBB (66,6%), dois LTA (10%) e cinco LTB (50%); predomínio de feixes em cinco LBA (23,8%), quatro LTA (20%) e três LTB (30%) e predomínio de ilhas em três LBA (14,4%), três LBB (33,3%), 14 LTA (70%) e dois LTB (20%).

Os valores de porcentagem de reticulina obtidos com auxílio do Image J estão expressos em mediana da porcentagem de acordo com os grupos, o imunofenótipo e o grau. Esses valores estão descritos nas tabelas 7, 8 e 9 a seguir, com a indicação de existência ou não de diferença estatística. A figura 4 ilustra parte das características das fibras de reticulina observadas no estroma dos tumores.

TABELA 7. Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.

Grupo	% (Quartil inferior-superior)	Escore
LBA	0,95 (0,60-1,92) a	2 a
LBB	1,02 (0,91-2,56) a	1 a
LTA	4,38 (1,99-5,84) b	3 b
LTB	2,58 (1,81-5,24) b	2 ab

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 8. Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.

Imunofenótipo	% (Quartil inferior-superior)	Escore
B	1,01 (0,76-2,09) a	1,5 a
T	2,97 (1,87-5,71) b	2,5 b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 9. Mediana da porcentagem e do escore de reticulina no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.

Grau	% (Quartil inferior-superior)	Escore
Alto	1,88 (0,95-4,37) a	2 a
Baixo	2,15 (1,02-2,97) a	2 a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

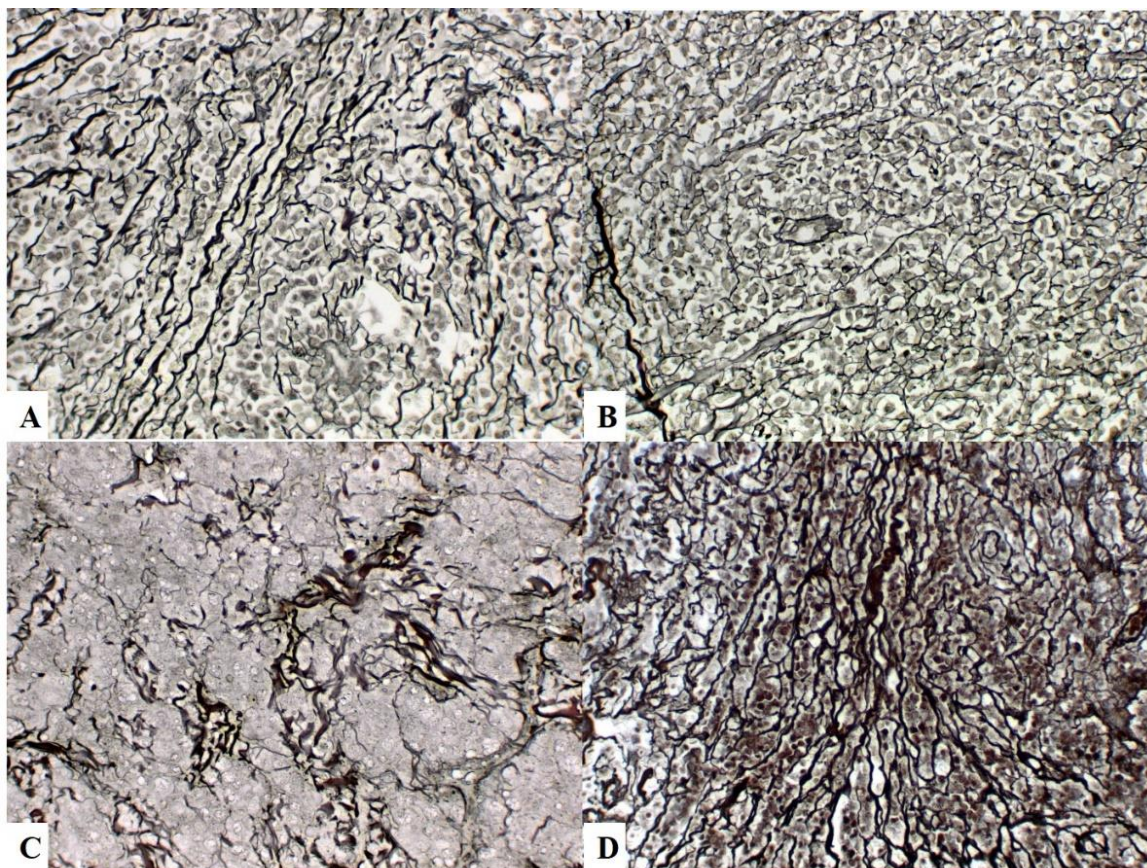


FIGURA 4. Linfomas Caninos - Características das fibras de reticulina observadas através do método de Reticulina. A) Arranjo das fibras em feixes. B) Arranjo das fibras predominantemente em feixes delimitando ilhas de células neoplásicas. C) Presença de fibras delgadas e espessas no estroma. D) Predomínio de fibras espessas no estroma. Aumento de 400X. Fonte: elaboração dos autores.

5.4 Imuno-histoquímica

5.4.1 Colágenos

Nos linfomas estudados houve maior marcação do colágeno tipo III em relação ao tipo I no estroma, com exceção de um LTA e um LTB nos quais a marcação dos dois tipos de colágeno foi equivalente. Os dados referentes ao escore de marcação dos colágenos no estroma dos tumores estão explicitados na tabela 10. As tabelas 11, 12 e 13 trazem a

mediana do escore de marcação de acordo com os grupos, imunofenótipo e grau das neoplasias, assim como indicação de existência ou não de diferença estatística entre eles.

TABELA 10. 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.

Escore		Grupos			
		LBA	LBB	LTA	LTB
Colágeno I	1	19 (90,5%)	7 (77,7%)	6 (30%)	8 (80%)
	2	2 (9,5%)	1 (11,1%)	11 (55%)	2 (20%)
	3	-	1 (11,1%)	3 (15%)	-
Colágeno III	1	16 (76,2%)	6 (66,6%)	3 (15%)	5 (50%)
	2	5 (23,8%)	1 (11,1%)	10 (50%)	5 (50%)
	3	-	2 (22,2%)	7 (35%)	-

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau.

TABELA 11. Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.

	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III
Grupo		
LBA	1 a	1 a
LBB	1 ab	1 ab
LTA	2 b	2 b
LTB	1 a	1,5 a

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 12. Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.

	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III
Imunofenótipo		
B	1 a	1 a
T	2 b	2 b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 13. Mediana do escore de marcação do colágeno no estroma tumoral dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.

	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III
Grau		
Alto	1 a	2 a
Baixo	1 a	1 a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

5.4.2 VEGF

Foram observados nove escores diferentes de imunomarcção citoplasmática para o VEGF pelas células linfoides dos tumores avaliados, os quais estão explicitados na tabela 14. Nas tabelas seguintes 15, 16 e 17 estão as medianas do escore dentro dos grupos, imunofenótipo e graus, com respectiva presença ou não de diferença estatística.

TABELA 14. 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.

Escore	Grupo			
	LBA	LBB	LTA	LTB
1	1	3	-	-
2	5	1	-	1
3	6	1	-	2
4	3	1	1	1
6	1	3	-	1
8	3	-	2	2
10	1	-	3	1
12	1	-	-	1
15	-	-	14	1

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

TABELA 15. Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.

Grupo	Escore
LBA	3 a
LBB	3 ba
LTA	15 c
LTB	7 da

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 16. Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.

Imunofenótipo	Escore
B	3 a
T	13,5 b

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 17. Mediana do escore de marcação de VEGF pelas células tumorais dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.

Grau	Escore
Alto	8 a
Baixo	4 b

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

5.4.3 α SMA

Em relação à quantidade de imunomarcação para a α -SMA no estroma dos linfomas, foi observado que em nove LBA (42,8%), quatro LBB (44,4%), sete LTA (35%) e três

LTA (30%) o escore foi 1. A maior parte dos casos teve escore 2, sendo 10 LBA (47,6%), oito LTA (40%) e quatro LTB (40%). O escore 3 foi atribuído à dois LBA (9,5%), cinco LBB (55,5%), quatro LTA (20%) e dois LTB (20%). Já um LTA (5%) e um LTB (10%) foram classificados como escore 4 de marcação. As tabelas 18, 19 e 20 trazem a mediana do escore de marcação, com a indicação de existência ou não de diferença estatística entre os grupos, imunofenótipos e graus. A figura 5 ilustra esses escores.

TABELA 18. Mediana do escore de marcação de α -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo e o grau das neoplasias.

Grupo	Escore
LBA	2 a
LBB	3 a
LTA	2 a
LTB	2 a

LBA: linfoma B de alto grau, LBB: linfoma B de baixo grau, LTA: linfoma T de alto grau; LTB: linfoma T de baixo grau. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 19. Mediana do escore de marcação de α -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o imunofenótipo das neoplasias.

Imunofenótipo	Escore
B	2 a
T	2 a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

TABELA 20. Mediana do escore de marcação de α -SMA no estroma dos linfomas caninos de acordo com o grau das neoplasias.

Grau	Escore
Alto	2 a
Baixo	2 a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística nas colunas.

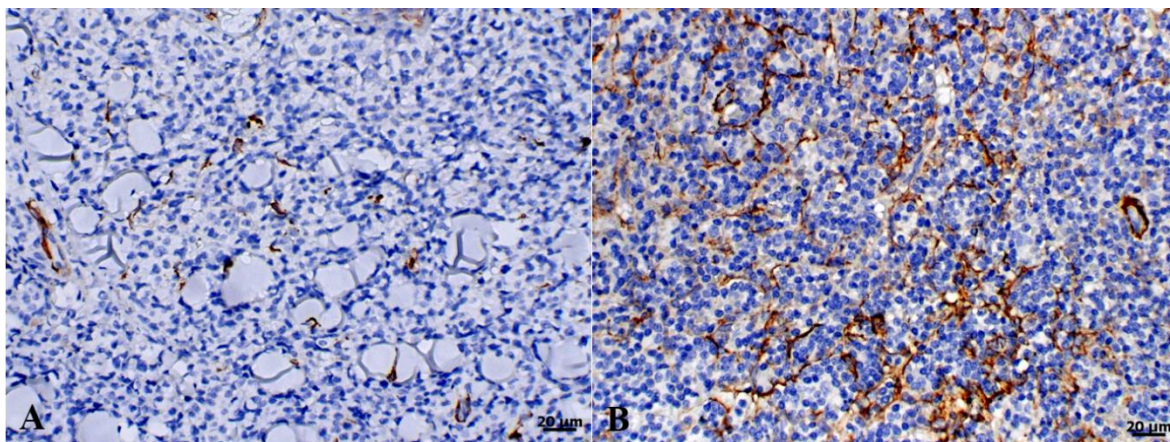


FIGURA 5. Linfomas Caninos - Diferentes escores de imunomarcção do anticorpo anti- α SMA. A) Escore 1. B) Escore 4. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Barra = 20 μ m. Fonte: elaboração dos autores.

Foram observadas diferentes apresentações da imunomarcção do anticorpo anti- α SMA no estroma dos linfomas caninos (Figura 6). Na menor parte dos casos as células estavam individualizadas (2 LBB - 22,2%, 2 LTA - 10%, 3 LTB - 30%). Foi observado também arranjo em feixes e células individualizadas (4 LBA - 19%, 1 LBB - 11,1%, 6 LTA - 30%, 1 LTB - 10%). Em outros tumores havia poucas células individualizadas, feixes multifocais e maior quantidade de marcação ao redor de vasos de forma concêntrica (4 LBA - 19%, 3 LBB - 33,3%, 2 LTA - 10%, 3 LTB - 30%). Na maior parte dos casos havia arranjo em feixes, por vezes células individualizadas, com maior quantidade de marcação adjacente à alguns vasos, em especial os maiores, frequentemente associado à trabéculas de tecido colagenoso (10 LBA - 47,6%, 6 LTA - 30%, 3 LTB - 30%).

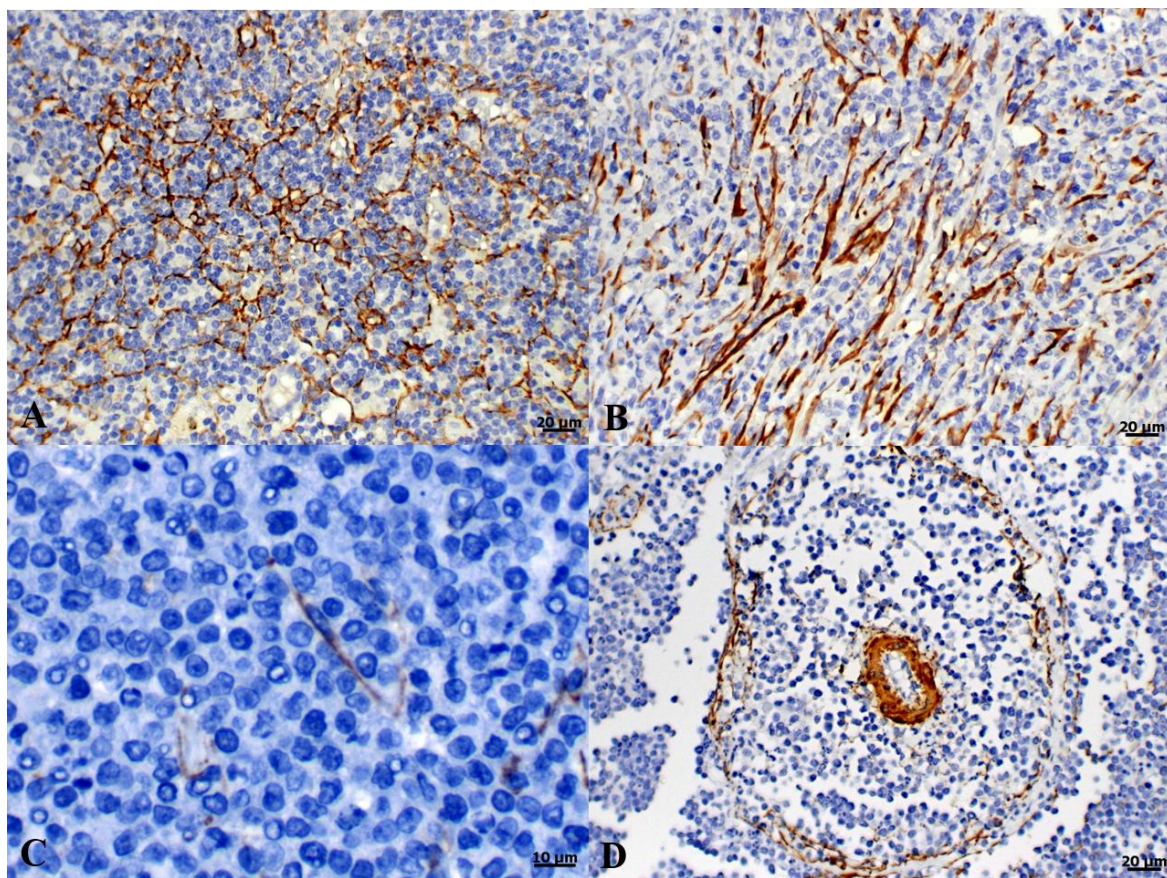


FIGURA 6. Linfomas Caninos - Diferentes apresentações da imunomarcção de α SMA no estroma dos linfomas caninos. A) Arranjo em feixes delimitando ilhas de células neoplásicas. B) Marcação em feixes. C) Fibroblasto individualizado. D) Arranjo concêntrico ao redor de uma arteríola que exibe marcação positiva em sua camada muscular. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Barra A, B e D = 20 μ m; C = 10 μ m. Fonte: elaboração dos autores.

Na maior parte dos casos a distribuição de marcação foi heterogênea (21 LBA - 100%, 9 LBB - 100%, 19 LTA - 95%, 10 LTB - 100%) e em um LTA (5%) ela foi homogênea pela amostra. Por fim, foi possível constatar que em um LBA (4,7%), um LBB (11,1%) e um LTB (10%) havia marcação mais evidente no centro da neoplasia, enquanto que em um LBA (4,7%), um LBB (11,1%) e dois LTA (10%) era mais concentrada na periferia.

As figuras 7 e 8 trazem todas as avaliações realizadas em um Linfoma de origem B e um de origem T, respectivamente.

Destaca-se ainda que houve correlação positiva entre os valores de escore e porcentagem de colágeno pelo método de Picrosirius Red, imunomarcção dos colágenos tipo I e tipo III e escore de VEGF, os valores de r e P estão descritos na tabela 21. Não ocorreu correlação desses parâmetros com o escore de α -SMA, com exceção da porcentagem de reticulina ($r= 0,271$; $P= 0,040$). Na avaliação de correlação da porcentagem de imunomarcção para o Ki-67 e dos parâmetros citados anteriormente, esta foi significativa e positiva apenas para o escore de VEGF ($r= 0,342$; $P= 0,013$).

TABELA 21. 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 imunomarcação para α -SMA, VEGF, colágeno tipo I e tipo III nos linfomas caninos.

		Ki67	Picrosirius - Escore	Picrosirius - %	Reticulina - Escore	Reticulina - %	α-SMA	VEGF	Colágeno tipo I
Picrosirius- Escore	r	0,031	-	-	-	-	-	-	-
	P	0,817							
Picrosirius - %	r	0,119	0,662	-	-	-	-	-	-
	P	0,375	<0,0001						
Reticulina - Escore	r	0,163	0,608	0,679	-	-	-	-	-
	P	0,223	<0,0001	<0,0001					
Reticulina - %	r	0,125	0,591	0,697	0,703	-	-	-	-
	P	0,353	<0,0001	<0,0001	<0,0001				
α-SMA	r	-0,102	0,152	0,099	0,161	0,271	-	-	-
	P	0,450	0,2581	0,461	0,230	0,040			
VEGF	r	0,324	0,528	0,383	0,440	0,597	0,165	-	-
	P	0,013	<0,0001	0,003	0,0006	<0,0001	0,218		
Colágeno tipo I	r	0,110	0,567	0,570	0,572	0,667	0,040	0,461	-
	P	0,412	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,765	0,0003	
Colágeno tipo III	r	0,028	0,655	0,637	0,516	0,687	0,092	0,553	0,751
	P	0,830	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,494	<0,0001	<0,0001

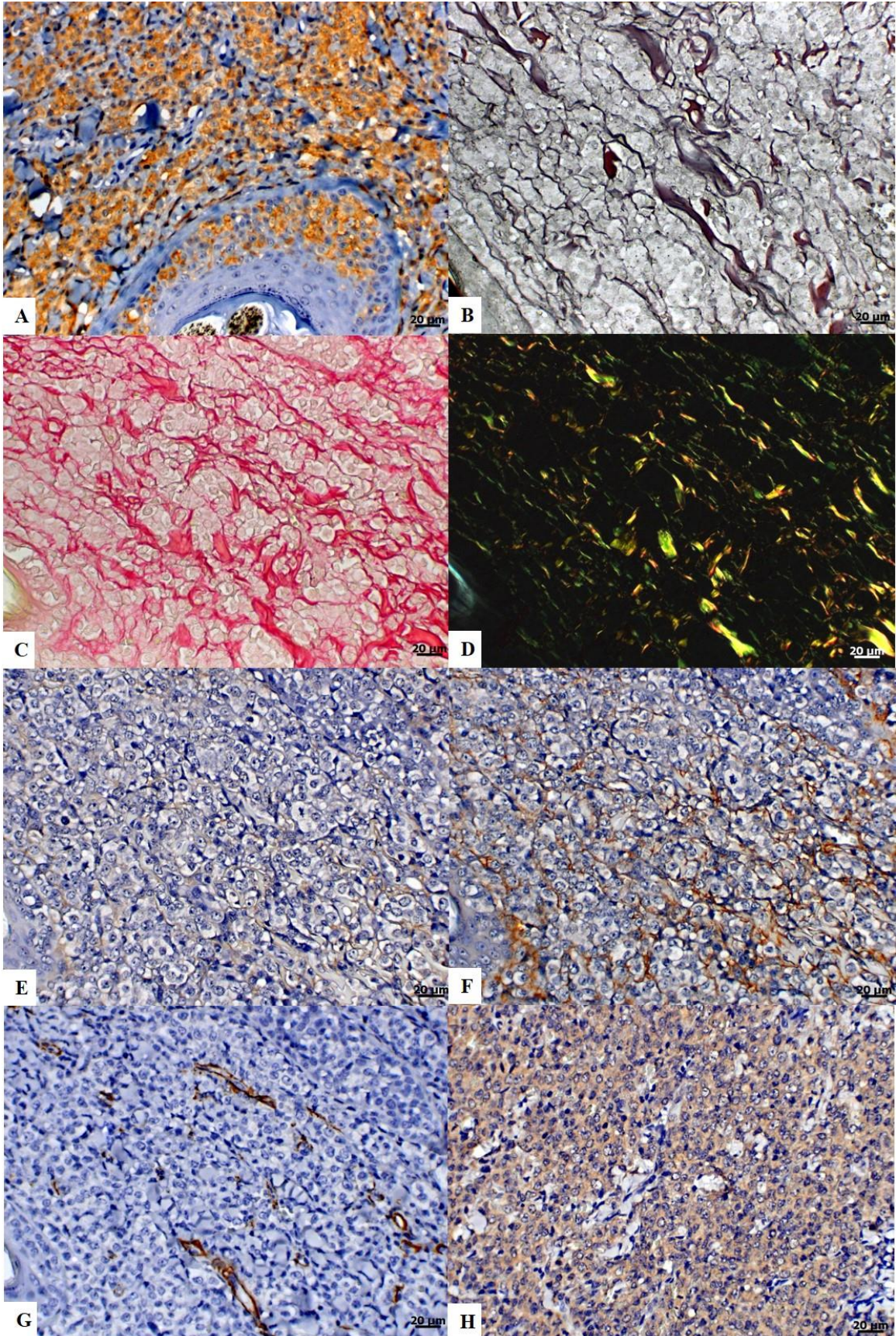


FIGURA 7. Linfomas Caninos - Ilustração das avaliações realizadas no projeto. Linfoma Imunoblástico T/ Linfoma de Células T Periférico. Barra = 20 μ m. A) Imunomarcção citoplasmática difusa para o anticorpo anti-CD3. Nota-se a invasão dos anexos cutâneos pelas células neoplásicas (epiteliotropismo). 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) Imunomarcção das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo I. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. F) Imunomarcção das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo III. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. G) Imunomarcção discreta para o anticorpo anti- α SMA no estroma. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. H) Imunomarcção citoplasmática intensa difusa nas células linfóides neoplásicas para o anticorpo anti-VEGF. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Fonte: elaboração dos autores.

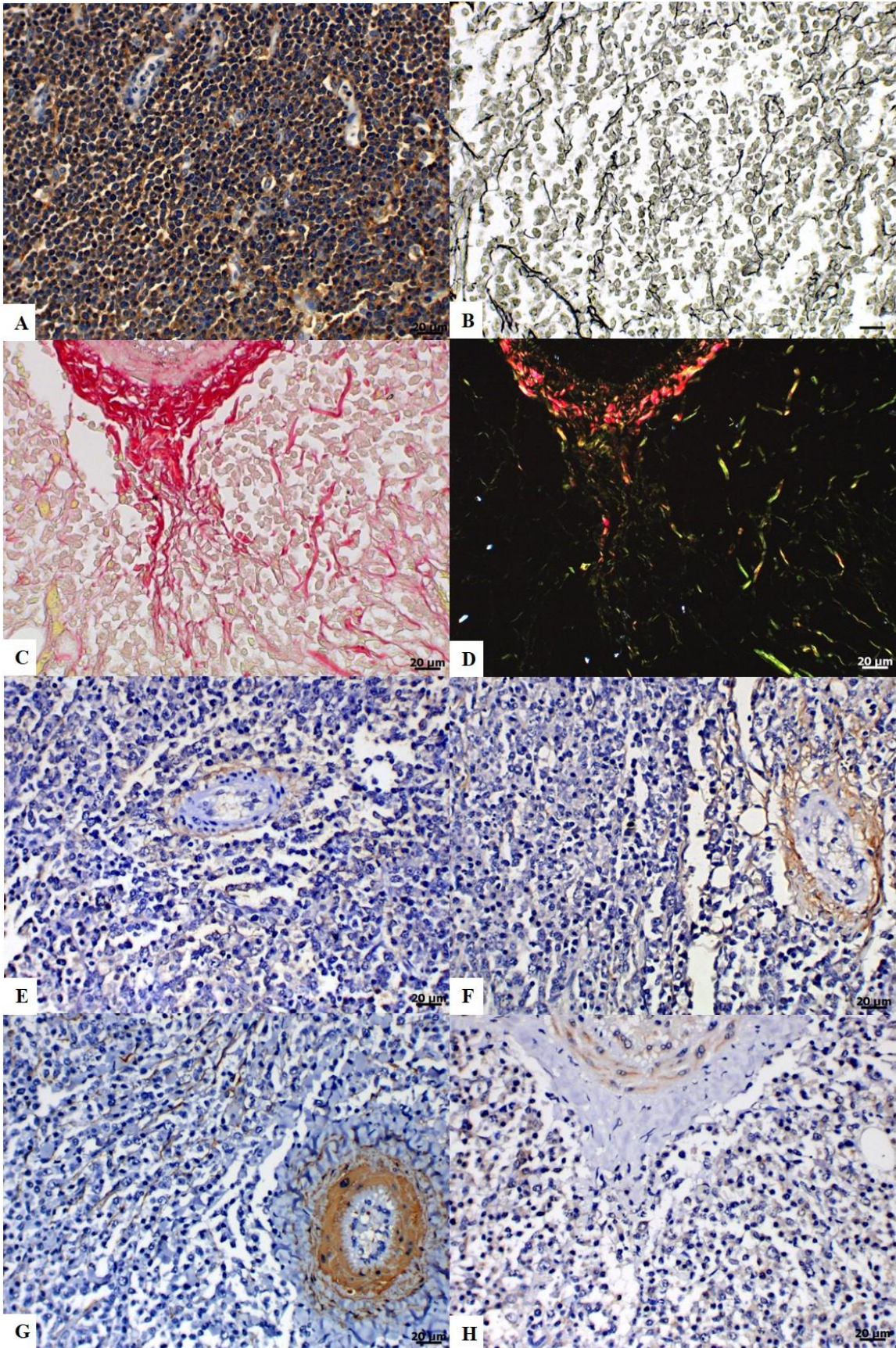


FIGURA 8. Linfomas Caninos - Ilustração das avaliações realizadas no projeto. Linfoma Centroblastico/ Linfoma Difuso de Grandes Células B. Barra = 20 μ m. A) Imunomarcção difusa para o anticorpo anti-CD20. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. B) Marcação das fibras de reticulina 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) Imunomarcção das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo I. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. F) Imunomarcção das fibras de colágeno no estroma para o anticorpo anti-colágeno tipo III. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. G) Imunomarcção discreta para o anticorpo anti- α SMA no estroma. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. H) Imunomarcção citoplasmática discreta nas células linfoides neoplásicas para o anticorpo anti-VEGF. Histofine, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Fonte: elaboração dos autores.

6. DISCUSSÃO

Os LNHs são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns no cão e apresentam semelhanças com os humanos em relação a aspectos importantes, como incidência, influência ambiental, biologia tumoral e tratamento, tendo sido propostos como modelo de ocorrência espontânea para o estudo dos LNHs humanos (PONCE et al., 2010; MARCONATO et al., 2013; COMAZZI et al., 2014; ITO et al., 2014; RICHARDS; SUTER, 2015). Os cães apesar de apresentarem uma resposta inicial alta ao protocolo quimioterápico mais amplamente utilizado, o CHOP (Ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e prednisona), exibem frequentemente recidiva do tumor, geralmente refratária à terapia, o que leva a falha do tratamento e ao final, à morte do animal (SORENMO et al., 2010).

Esses tumores representam um grupo heterogêneo, sendo que o linfoma de origem T, apesar de menos frequente, é tido como de pior prognóstico, com pior resposta a quimioterapia, o que traz um desafio maior para seu tratamento (CHANG et al., 2017). Levando-se em consideração os efeitos colaterais dos protocolos quimioterápicos convencionais, se faz necessário um conhecimento mais aprofundado da biologia do tumor, em especial entre os diferentes imunofenótipos, com o objetivo de fornecer um prognóstico mais acurado e possibilitar a proposição de novas modalidades associadas de terapia.

Nos linfomas estudados houve maior marcação imuno-histoquímica do colágeno tipo III em relação ao tipo I o que também foi observado com a técnica de Picrosirius Red, uma vez que em todos os tumores prevaleceu a cor verde/verde amarelado que corresponde ao colágeno imaturo, tipo III (JUNQUEIRA et al., 1978; COSTA et al., 2017).

A quantidade de colágeno estromal é diferente entre os grupos, sendo maior nos linfomas de imunofenótipo T, sendo esta diferença mais acentuada nos Linfomas T de alto grau. Deve-se ressaltar que a quantidade de estroma conjuntivo não mostrou diferença entre os graus das neoplasias quando comparados linfomas de mesmo imunofenótipo. Isso pode potencialmente contribuir para o pior prognóstico dos Linfomas de origem T (DOBSON et al., 2001), visto que a maior quantidade de colágeno pode influenciar a ação dos agentes quimioterápicos, dificultando o tratamento (MATSUMURA, 2012). De fato, uma maior

quantidade de estroma está associada a pior prognóstico, por exemplo no câncer gástrico (ZHOU et al., 2017).

Em relação a reticulina os resultados foram semelhantes. Foi observada maior quantidade de fibras reticulares no estroma de linfomas T quando comparados aos linfomas B, e dentre os linfomas de imunofenótipo T sobressaem aqueles de alto grau. Da mesma forma, a quantidade de estroma conjuntivo não mostrou diferença entre os graus das neoplasias quando comparados linfomas de mesmo imunofenótipo. Assim, o imunofenótipo parece contribuir mais do que o grau para as características da composição da MEC, sendo estes aqui analisados considerados entre os principais elementos presentes no estroma (KADLER et al., 2007).

Há predomínio de fibras delicadas em todos os tipos de linfoma, sendo a distribuição majoritariamente homogênea nos B de baixo grau e heterogênea nos demais. Ainda, chama a atenção grande quantidade de reticulina ao redor dos vasos, em especial os maiores, nos linfomas B de alto grau e linfomas T de baixo grau. O arranjo predominante é de feixes e ilhas nos linfomas B de baixo grau e linfomas T de baixo grau, já nos linfomas T de alto grau predominam as ilhas.

Nas neoplasias linfoproliferativas, a grande maioria dos estudos que avaliam a rede de fibras de reticulina o fazem nas biópsias de medula óssea e observam que as fibras de reticulina estão aumentadas nas áreas de infiltração neoplásica (THIELE et al., 1999; NORÉN-NYSTRÖM et al., 2008; KUMAR et al., 2009; NATH et al., 2011; FU et al., 2015).

Ainda, a coloração de reticulina auxilia na detecção de pequenos focos neoplásicas que podem não ser tão visíveis pelo método de hematoxilina-eosina, realçando as fibras de reticulina que circundam as células neoplásicas (KUMAR et al., 2009). Este padrão também foi observado na maioria dos linfomas aqui avaliados.

Poucos trabalhos avaliam a rede de reticulina no tumor primário e os que o fazem observam também aumento significativo dessa rede (BERGHOFF et al., 2013; BLASEL et al., 2013), sendo um fator prognóstico negativo independente para sobrevida nesses tumores (BERGHOFF et al., 2013), o que é condizente com nossa observação de maior quantidade de reticulina nos linfomas de imunofenótipo T, que são tidos como de pior prognóstico (DOBSON et al., 2001).

Observou-se uma forte correlação positiva entre os escores obtidos com a avaliação pelo Picrosirius Red e a Reticulina e as porcentagens calculadas através do software Image J (0,60 e 0,70, respectivamente). Isso mostra que a avaliação utilizando-se escores, ainda que mais subjetiva, é confiável, uma vez que foi possível chegar as mesmas conclusões com ambos os métodos.

O microambiente tumoral tem papel crucial no crescimento do tumor, o que envolve as células imunes, estromais, matriz extracelular e angiogênese (BUTLER et al, 2010) e nos últimos anos o impacto clínico da expressão de VEGF tem ganhado destaque, devido a essa conexão entre angiogênese tumoral e sobrevida, bem como a demonstração de benefício clínico da inibição de VEGF e aumento da sobrevida em pacientes com diversos tipos de cânceres (BRÓSEUS et al., 2017).

Em nossa pesquisa foi verificada uma expressão maior de VEGF nos Linfomas T em comparação com os linfomas B, bem como em Linfomas T de Alto Grau em relação aos T de baixo grau, assim como observado por Aresu et al. (2012) e Aricò et al. (2013b) o que pode ter relação com o comportamento biológico mais agressivo e disseminação mais rápida dos Linfomas T, em especial os de alto grau.

Nos LNH humanos se sabe que a expressão de VEGF está correlacionada ao subtipo, grau, curso clínico e sobrevida, sendo que pacientes com níveis elevados apresentam maior probabilidade de recorrência ou morte do que os pacientes com níveis menores (SALVEN et al., 1997).

Destaque-se que isso foi antes da incorporação do rituximab aos protocolos de tratamento, ainda assim trabalhos mais recentes de metanálise, confirmam que níveis maiores de VEGF estão relacionados a pior prognóstico no LDGCB (JIANG et al., 2016; YOON et al., 2017), o subtipo mais comum de linfoma, tanto no homem, quanto no cão (VALLI et al., 2011; ITO et al., 2014), assim é razoável supor que esta relação também deva ocorrer no cão. Os níveis séricos de VEGF refletem a produção dessa citocina no corpo e podem influenciar o comportamento biológico dos linfomas de diversas maneiras, visto que tem papel importante no crescimento tumoral (DULETIĆ-NAČINOVIĆ et al., 2016).

De forma geral, nas células do linfoma, um loop autócrino envolvendo VEGF e seus receptores pode não apenas induzir geração *in situ* de vasos sanguíneos e linfáticos,

facilitando a disseminação hematogênica das células tumorais, mas também promover o crescimento e disseminação das células tumorais (DVORAK, 2010; GRATZINGER et al., 2010). Ainda, o VEGF induz ativação de genes anti-apoptose, incluindo Bcl-2, o que protege as células tumorais de apoptose (JACOBSON et al., 1993, KIM et al., 2015).

Além disso, estruturas vasculares anormais no tumor, o que pode ser resultado da atividade de VEGF, podem diminuir o recebimento local de fármacos, prejudicando o tratamento (VAN DER VELDT et al., 2012). Também existem evidências de que altas concentrações de VEGF tenham papel na evasão do sistema imune pelas células do linfoma (LAXMANAN et al., 2005; RIIHIJÄRVI et al., 2012).

Em estudos pré-clínicos realizados em modelo xenográfico de linfoma, a administração de anticorpo monoclonal anti-VEGF levou a regressão tumoral, mostrando efeito antitumoral sinérgico com o rituximab (WANG et al., 2004). Em um estudo fase II, 11 de 45 pacientes com recorrência de LNH agressivo exibiram doença estável e tempo de resposta médio prolongados, após uma única dose de bevacizumab, uma droga antiangiogênica (STOPECK et al., 2009).

Essa droga combinada a quimioterapia convencional, se mostrou segura e eficaz em casos recém diagnosticados de LDGCB (GANJOO et al., 2006). Nossos resultados associados aos publicados na literatura dão suporte para investigar a aplicabilidade do uso de drogas antiangiogênicas nos LNH nos cães, sendo recomendado a detecção da expressão de VEGF no tecido ressecado para a recomendação de uso dessa terapia alvo (YANG, 2015)

Destaca-se que houve correlação do escore de marcação de VEGF nos linfomas estudados com o índice de proliferação avaliado pela expressão de Ki-67, o que reforça ainda mais seu potencial como marcador prognóstico. Assim, são necessários estudos prospectivos com dados de *follow up* dos pacientes, em especial relacionados a sobrevida. A realização de estudos clínicos pode ajudar a elucidar o potencial para uso de substâncias anti-angiogênicas e sua eficácia nos linfomas caninos.

Em nossos casos, não observamos relação entre a expressão de α -SMA por fibroblastos tumorais estromais (FAC) e os diferentes subgrupos de linfoma ou mesmo o índice proliferativo. Yazhou et al. (2004) também não encontraram relação entre a expressão de Ki67 e quantidade de FAC em carcinoma mamário. No entanto, trabalhos

mais recentes constataam pior prognóstico nos tumores com maior quantidade de FAC, e a razão para isso é baseado no papel bem estabelecido dessa célula como componente crucial no microambiente de diversos tumores como, por exemplo, câncer gástrico (DONG et al., 2018) e de mama, pois contribuem para iniciação tumoral, crescimento, invasão, metástase, angiogênese, remodelação da MEC, inflamação associada ao câncer e resistência a terapia, fatores que contribuem para a malignidade do tumor (LUO et al., 2015; EIRO et al., 2018).

Apesar de o papel dos FAC estar bem estabelecido na progressão do tumor, não necessariamente há uma relação direta entre quantidade de FAC e produção de MEC, isso porque Fu et al. (2014) observaram que ocorre expressão de SMA no estroma de carcinoma mamário invasivo e não em tecido normal ou adenomas, mas apesar disso há menor quantidade de colágeno no estroma dos tumores agressivos, acompanhado de menor produção de proteínas por esses FAC, sugerindo assim que a remodelação das estruturas estromais e microambiente tumoral podem ser atribuídas a alterações biológicas nos FAC, incluindo seu perfil de expressão de proteínas.

Ainda, nem todos os FAC expressam α -SMA (ISHII et al., 2016). Apesar de este ser o marcador mais amplamente utilizado, é possível detectá-los também por meio de outros marcadores, como tenascina-C e FAP (fibroblast activation protein) (SUGIMOTO et al., 2006). Existem diferentes subtipos de FAC, que podem ter funções diferentes na evolução do tumor, contribuindo para sua inibição ou progressão, assim é necessário um estudo mais aprofundado, levando em consideração esses subtipos, para se determinar o papel dos FAC na neoplasia (AUGSTEN, 2014).

Finalmente, no nosso conhecimento, não existem trabalhos que avaliem a quantidade de FAC entre os diferentes grupos de linfoma, tanto em humanos quanto em animais domésticos. Portanto, ainda não se tem uma conclusão definitiva sobre a importância dessas células no microambiente tumoral deste tipo de neoplasia em especial.

Destaca-se que o presente trabalho caracterizou a composição do estroma fibroso, expressão de VEGF e FAC nos linfomas caninos dentre os diferentes imunofenótipos e graus, sendo que o linfoma T de alto grau exibiu os maiores níveis tanto de colágeno, reticulina, quanto VEGF, o que pode estar relacionada ao pior prognóstico apresentado por animais com esse tipo de tumor. O VEGF exibe potencial como marcador prognóstico no linfoma canino. São necessários estudos com dados de acompanhamento clínico dos

animais, em especial, relacionados a sobrevida, para confirmar o papel prognóstico do VEGF, bem como da quantidade de estroma fibroso. Ainda, estudos clínicos podem elucidar o potencial e eficácia do uso de drogas antiangiogênicas no linfoma canino, o que, com base em nossas observações, provavelmente teria maior eficácia nos linfomas T de alto grau. A relação dos miofibroblastos com o desenvolvimento e progressão do linfoma canino necessita de mais estudos, em especial quanto a função dessas células em contraponto a detecção apenas de sua quantidade.

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 α -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 α -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 α 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.

1 9. TRABALHO CIENTÍFICO 1

2 Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Comparative Pathology, normas
3 disponíveis em:
4 https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623050?generatepdf=true

5

6

7

8 Canine lymphoma fibrous stroma: does the phenotype matters?

9

10 M C L Silva*, J L Sequeira*, R T Neto†, S G Calazans§

11

12 * Department of Veterinary Clinics, Service of Veterinary Pathology, School of Veterinary
13 Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-681,
14 Brazil, †Private Veterinary Pathology Laboratory, VETMOL, Botucatu 18608-970, Brazil
15 and § Veterinary Teaching Hospital, Department of Veterinary Science, Franca University
16 (UNIFRAN), Franca 14404-600, Brazil

17

18

19 Correspondence to: M. C. L. Silva 55 11 988962405, (e-mail: claucordioli@hotmail.com)

20

21

22 Funding: This work was supported by CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de
23 Pessoal de Nível Superior.

24

25

26

27

28

29

30

31

32

Summary

33 Stroma contribution to tumour progression has gained increasing visibility given its role on
34 cell growth, survival, differentiation and migration, in addition to modulation of immune
35 and vascular development. The aim of this work was to investigate fibrous components of
36 canine lymphoma stroma. Following updated Kiel and WHO classifications, tumours were
37 divided into four groups according to B or T immunophenotype and high or low grade.
38 Collagen and reticulin fibres distribution, arrangement and amount were evaluated in
39 Picrosirius Red and reticulin stained slides as well as immunostain for collagen I and III.
40 Type III was the preponderant collagen observed in both histochemical and
41 immunohistochemical evaluations. Staining percentage and scores were significantly
42 different among groups and immunophenotypes, with high-grade T-cell lymphomas
43 exhibiting the largest amount, which may be connected to the worse prognosis presented by
44 them.

45 *Keywords:* dog, haematopoietic neoplasia, collagen, reticulin

46

47 Introduction

48 Canine non-Hodgkin's lymphomas (cNHL), the most common haematological cancer in
49 dogs, are comprised by various subtypes most commonly classified according to WHO
50 Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (Valli *et al.*,
51 2002), or Updated Kiel Classification (Lennert and Feller, 1992) characterized mainly
52 based on cell morphology, immunophenotype (B or T) and grades (high or low) in the
53 hopes that they reflect biological behaviour and response to therapy as it does on the human
54 WHO classification (Valli *et al.*, 2002).

55 There has been an increasing interest on stromal components and their role on promoting
56 or inhibiting cancer progression (Xu and Wang, 2017). Extracellular matrix (ECM)
57 regulates tissue development and homeostasis and its deregulation contributes to tumour
58 progression. It is crucial not only as a scaffold upon which tissues are organized but it is
59 also involved on biochemical and biophysical mechanisms that drive cell growth, survival,
60 migration and differentiation, along with modulation of vascular development and immune
61 function (Pickup *et al.*, 2014).

62 ECM is comprised by a variety of molecules, the main component being fibrous proteins
63 such as collagen, elastin, fibronectin, laminin, glycoproteins, proteoglycans and
64 glycosaminoglycans (Bosman and Stamenkovic, 2003; Theocharis *et al.*, 2016). It can be
65 classified into interstitial and pericellular matrix with both having collagen as the major
66 component (Bosman and Stamenkovic, 2003; Kadler *et al.*, 2007; Theocharis *et al.*, 2016).

67 Increased collagen deposition is one of the best well documented changes in various
68 tumours (Provenzano *et al.*, 2008) and reduction of metastatic and invasive capacity as a
69 consequence of collagen synthesis inhibition has been reported in mammary tumours
70 (Gilkes *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2014). Furthermore, it is known that drug penetration
71 within tumours is influenced by interstitial conductivity, which in return is determined by
72 density and quantity of ECM and stroma fibrosis (Matsumura, 2012).

73 To our knowledge, there are no previous studies on canine lymphoma stroma, therefore
74 the aim of this study was to describe the fibrous component of canine lymphoma stroma.
75 We set out to characterize distribution, arrangement and amount of tumour collagen and
76 reticulin amongst the immunophenotypes and grades. Our initial hypothesis was that
77 lymphomas of T cell origin would have a greater amount of collagen than those of B cell
78 origin.

79

80 **Materials and methods**

81 *Samples and histological classification*

82 Formalin-fixed paraffin wax-embedded tissues previously diagnosed or suspect for
83 lymphoma were retrieved from the archives of Veterinary Pathology Service of Sao Paulo
84 State University (UNESP), with part of the samples obtained from collaboration with
85 another Veterinary School and a private laboratory. Tumours showing signs of poor
86 fixation or insufficient sample size were excluded. Cases were revised and classified
87 simultaneously by two of the authors (M. C. L. Silva and J. L. Sequeira) in accordance to
88 WHO Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (Valli *et al.*,
89 2002) and Updated Kiel Classification (Lennert and Feller, 1992) criteria. In addition to
90 haematoxylin and eosin (HE) stained slides immunohistochemistry for immunophenotype
91 and proliferation index (CD20, CD3 and Ki67) were available. The cases were grouped
92 according to immunophenotype and grade into 21 cases of high-grade B-cell lymphoma

93 (HB), 9 of low-grade B-cell lymphoma (LB), 20 of high-grade T-cell lymphoma (HT) and
94 10 of low-grade T-cell lymphoma (LT).

95 *Histochemistry*

96 Picrosirius Red technique was performed in 5 µm dewaxed, rehydrated tissue sections
97 submitted to 0.2% phosphomolybdic acid solution for 2 min, followed by 0.1% Direct Red
98 F3BA (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO) diluted in 1.5% aqueous picric acid
99 solution for 110 min. Afterwards, the slides were immersed in 0.1 N hydrochloric acid for
100 2 min and then washed in 70° ethyl alcohol, dehydrated and coverslip mounted. Area of
101 collagen fibres was measured in 5 representative high-power fields (x400) with Image J
102 software and the mean percentage calculated for each case. The slides were imaged under
103 polarized light to visualize collagen colours, thickness, distribution, arrangement and score
104 (1 to 4). The percentage of reticulin fibres in stroma was assessed as described for
105 Picrosirius using a commercial kit (EasyPath, EP-12- 20021, SP, Brazil). Finally, reticulin
106 fibres thickness, arrangement, distribution and staining score (1 to 3) were evaluated in
107 each case.

108

109 *Immunohistochemistry*

110 Immunophenotype was established using a polyclonal pan-T-cell marker, CD3 (diluted 1 in
111 500, rabbit, polyclonal, Dako, Carpinteria, CA, USA) and CD20 (diluted 1 in 1000, rabbit,
112 polyclonal, SpringBioscience, Pleasanton, USA) as a pan-B-cell marker. Ki-67 MIB-1
113 clone (diluted 1 in 100, mouse, Dako) was used in to assess proliferation index, which was
114 calculated as a mean of 5 high-power fields immunolabelling percentage.

115 Three µm tissue sections were dewaxed, rehydrated and submitted to antigen retrieval
116 with pepsin solution (pH 1.8) for 3 min at 60°C followed by 10 min at 37°C and then
117 washed five times in distilled water. Endogenous peroxidase activity was blocked by
118 incubating the slides in a commercial solution (Spring Bioscience, DHP-125) for 20 min at
119 27°C. Collagen type I and III primary antibodies (rabbit, polyclonal, Novotec, Bron,
120 France) diluted 1 in 1000 in Dako antibody diluent were incubated overnight at 4°C in a
121 humid chamber. Those antibodies were previously successfully used in canine tissue
122 (Volpato *et al.* 2012). After rinsing the tissues three times with TrisEDTA buffer (pH 7.4)
123 to remove unbound primary antibodies, histofine (Nichirei Bioscience, Japan,

124 REF: 414154F) secondary antibody was applied for 30 min at 27°C. Reaction visualization
125 was obtained with 3,-3'-diaminobenzidine (DAB, Dako). Thereafter, sections were
126 counterstained with Harris's haematoxylin, dehydrated and coverslipped. A normal canine
127 skin tissue was used as positive control. Replacement of primary antibody by antibody
128 diluent was used as a negative control. A score of increasing immunolabelling amount (1 to
129 3) for collagen I and III was attributed to each case and the predominant collagen type
130 present assessed.

131

132 *Statistical analysis*

133 Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 7.05. Kruskal-Wallis was used
134 for comparing all four groups and Mann-Whitney for immunophenotype, grade and the two
135 by two individual groups comparison. The differences were considered significant if the P-
136 value was < 0.05.

137

138 **Results**

139 *Collagen*

140 Interestingly, the borders between neoplastic and normal tissue, when present, were very
141 clear, especially in low power field, with predominance of green over red colour and
142 usually smaller amount of fibres in the former (Fig 1). Overall, collagen fibres displayed a
143 range of colours, green to yellowish-green being the reigning one in all tumours with
144 Picrosirius Red under polarized microscopy. Most HB (9/21), HT (8/20) and LT (4/10)
145 lymphomas, in addition to predominance of green, showed orange/yellowish-orange and
146 small amount of red. Predominance of green followed by discrete quantity of red was
147 observed in most LB cases (3/9). Score 1 was attributed to the majority of B-cell
148 lymphomas (14/30), whereas most LT (6/10) had score 2 and HT (9/20) score 3 (Fig. 3).
149 The median of those scores significantly differed between groups ($P = 0.0006$), and
150 immunophenotypes ($P < 0.0001$). All but one B-cell lymphomas exhibited thin or
151 predominantly thin fibres, with thicker fibres in central and/or perivascular areas. T-cell
152 lymphomas, on the other hand, exhibited both thick and thin fibres, with predominance of
153 the later. They were heterogeneously distributed in most T-cell cases (16/30) and more
154 concentrated in central areas on B-cell tumours (19/30). Finally, the fibres were arranged

155 in bundles and islands, with predominance of the former in most B-cell (22/30) and LT
156 (7/10) lymphomas, whereas in HT cases islands prevailed (11/20). Collagen area median
157 percentage was significantly different among groups ($P = 0.0194$) and immunophenotypes
158 ($P = 0.0026$) but not grades ($P = 0.4804$). Staining percentage and scores were significantly
159 correlated ($r = 0,6622$, $P < 0.0001$).

160 In almost all cases collagen type III immunolabelling predominated over type I (58/60)
161 and in one HT and one LB it was equivalent. Score 1 of collagen immunolabelling was
162 more frequent in B-cell cases (26/30), score 1 or 2 in LT (10/10) ones and score 2 in HT
163 lymphomas (11/20). Immunohistochemistry also showed difference of collagen type I and
164 III (Fig. 2) amount between groups ($P = 0.0004$) and immunophenotypes ($P = 0.0018$, $P =$
165 0.0005 , respectively).

166

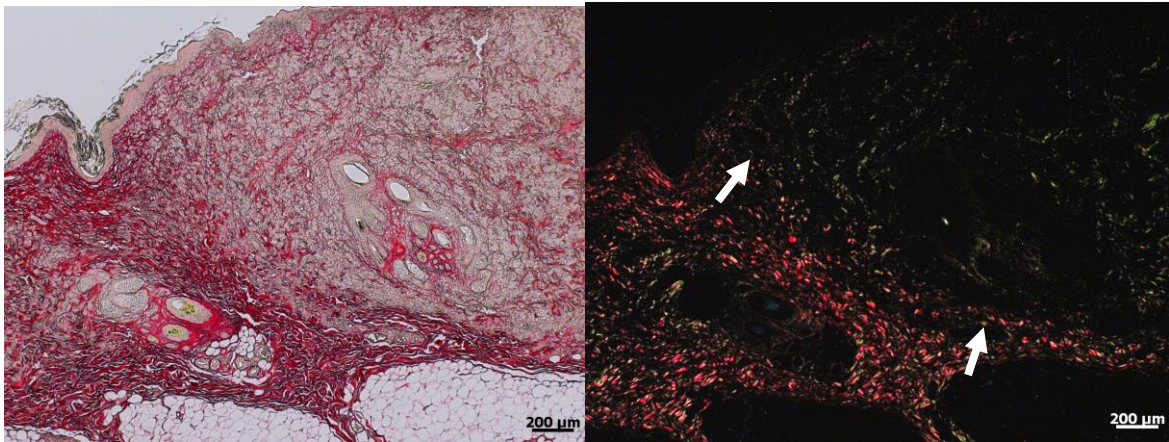
167 *Reticulin*

168 Predominantly delicate reticulin fibres heterogeneously distributed were present in most
169 lymphoma cases. The majority of HB had fibres arranged in bundles and trabeculae,
170 whereas low grade lymphomas exhibited bundles and islands, and HT showed more
171 frequently islands.

172 Staining score was mainly low in LB (score 1 – 6/9), low to moderate (1 and 2 – 18/21) in
173 HB, moderate in LT (score 2 – 5/10) and high (score 3 – 11/20) in HT cases. The median of
174 those scores significantly differed between groups ($P = 0.0008$), and immunophenotypes (P
175 < 0.0001). Similar to collagen, reticulin area median percentage was significantly different
176 among groups ($P < 0.0001$) and immunophenotypes ($P < 0.0001$) but not grades ($P =$
177 0.5624). Staining percentage and scores were significantly correlated ($r = 0,7032$, P
178 < 0.0001).

179 Differences between each group regarding collagen immunolabelling, as well as, reticulin
180 and collagen staining score and percentage is depicted in Fig 2. Fig 3 illustrates most
181 striking differences.

182



183

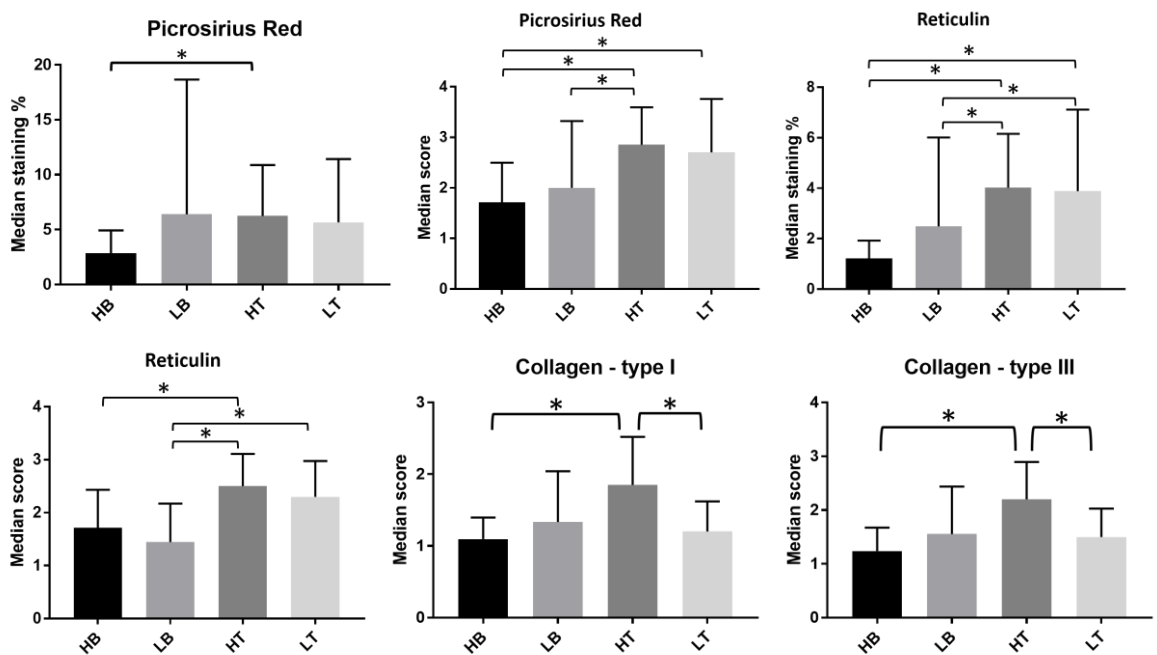
184 Fig 1. Delimitation of a high-grade T-cell lymphoma infiltrating the skin. (A) Picrosirius

185 Red. (B) Picrosirius Red under polarized light. Green fibres on the upper right, red thick

186 fibres on down left. Arrows indicate borders between normal and abnormal tissue. Bar, 200

187 µm.

188



189

190

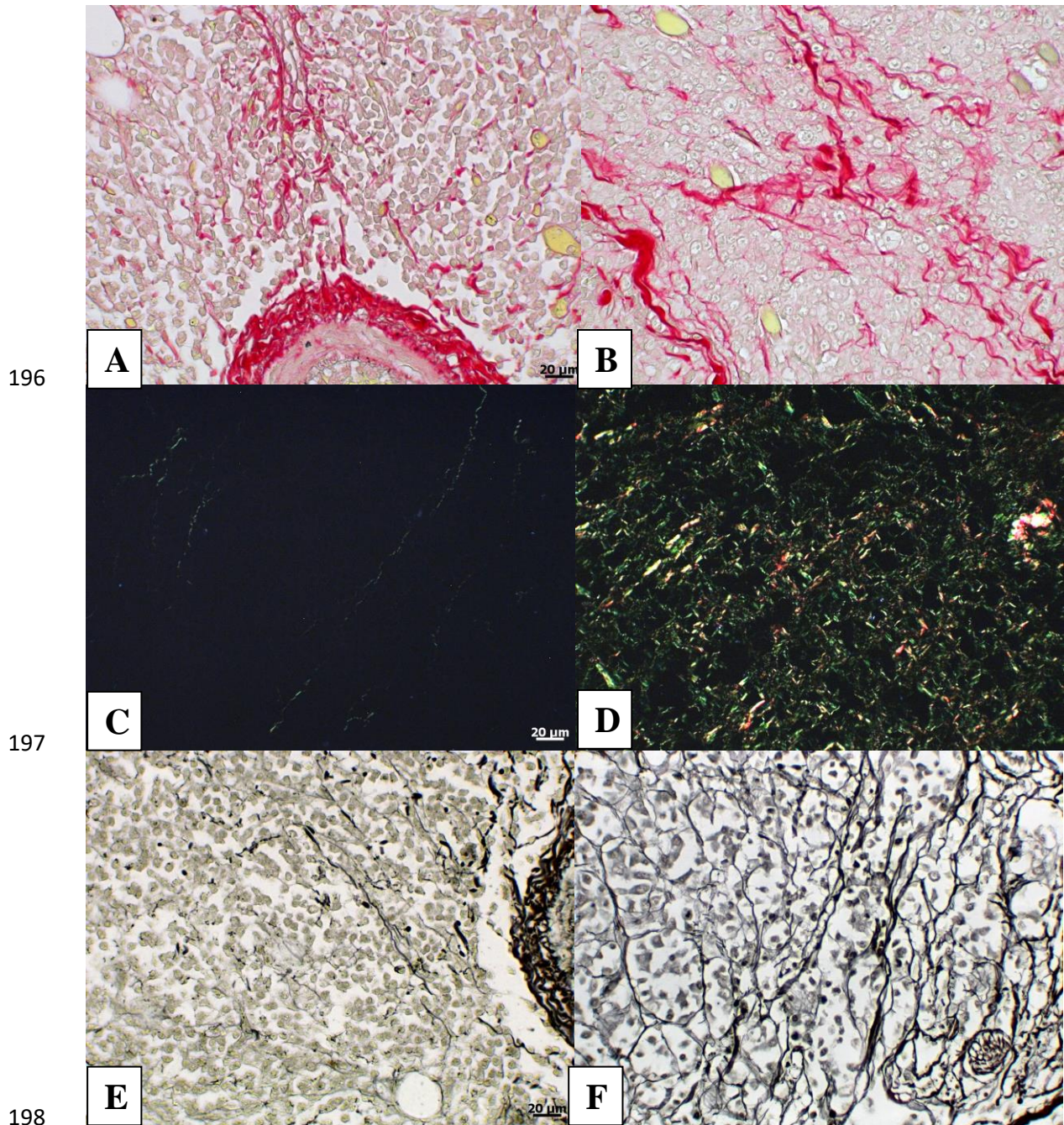
191 Fig. 2. Bar graph showing the median percentage/expression score of collagen and

192 reticulin in canine lymphoma stroma according to each group. The symbol * indicates

193 statistical significance between groups. HB, high-grade B-cell lymphoma; LB, low-grade

194 B-cell lymphoma; HT, high-grade T-cell lymphoma; LT, low-grade T-cell lymphoma.

195



199 Fig. 3. Sections of canine high-grade B-cell lymphoma on the first column and a T-cell one
 200 on the second. Bar, 20 µm. Discrete (A) and large (B) amount of staining with Picrosirius
 201 Red. Staining score 1 (C) and 4 (D) with Picrosirius Red under polarized light. Reticulin
 202 staining score 1 (E) and 3 (F).

203

204

205

Discussion

206

207 On our cases, immunolabelling of collagen type III prevailed over type I, finding also
208 obtained with Picrosirius Red technique, once all lymphomas showed preponderance of
209 green/yellowish-green fibres which correspond to type III immature collagen (Junqueira et
210 al., 1978; Costa et al., 2017).

211 The amount of collagen is different among groups, with high-grade T-cell lymphoma
212 showing the highest levels. The difference is even more pronounced when comparing T
213 with B-cell lymphomas. This could potentially contribute to the poor prognosis of T-cell
214 lymphomas (Dobson et al., 2001), given that larger collagen quantity can hinder
215 chemotherapy drugs action, making treatment more difficult (Matsumura, 2012). Indeed, a
216 greater collagen amount is associated with poorer prognosis, for instance, on gastric cancer
217 (Zhou *et al.*, 2017).

218 We observed a larger quantity of reticulin fibres on high-grade T-cell lymphomas when
219 compared to B-cell ones. Low-grade T-cell lymphomas exhibited higher levels than high-
220 grade, but not low-grade, B-cell lymphoma. Therefore, immunophenotype may contribute
221 more to the amount of the studied components, which are the principal ones on stroma
222 (Kadler *et al.*, 2007).

223 The majority of studies evaluating reticulin fibres network on lymphoproliferative
224 tumours, do so on bone marrow biopsy verifying increase on areas infiltrated with
225 neoplastic cells (Thiele et al., 1999; Norén-Nyström et al., 2008; Kumar et al, 2009; Nath et
226 al., 2011; Fu et al., 2015). Also, reticulin stain can help detect small foci that may not be as
227 visible on routine stains such as HE (Kumar et al, 2009). Furthermore, it is reported that
228 stain highlighted reticulin fibres around neoplastic cells, pattern which was also observed
229 on most of our cases.

230 Few studies analysed reticulin network on primary tumour and the ones that did also
231 observed increase of that network (Berghoff *et al.*, 2013; Blasel *et al.*, 2013). Also, it was
232 found to be an independent negative predictive value for survival on those patients
233 (Berghoff *et al.*, 2013) which is in accordance to our findings of greater amount on T-cell
234 lymphomas, considered to have poor prognosis.

235 Additionally, collagen (with Picrosirius Red) and reticulin scores demonstrated strong
236 positive correlation (0.60 and 0.70, respectively) with percentages obtained with Image J

237 software which shows that even though score evaluation may be more subjective it is
238 reliable, once it was possible to reach similar conclusions using both methodologies.

239 In conclusion, the present study has characterized the composition of canine lymphoma
240 fibrous stroma among different immunophenotypes and grades, with high-grade T-cell
241 lymphomas exhibiting the largest amount, observation which might be related to poor
242 prognosis presented by those tumours and further studies, with follow-up data, considering
243 cell origin and grade, may help elucidate that possible link.

244

245

Acknowledgments

246 We thank Carlos Eduardo Fonseca-Alves for statistical analysis assistance.

247

248

Conflict of Interest Statement

249 The authors declare no potential conflicts of interest that could influence or bias the content
250 of this manuscript.

251

252

References

253 Berghoff AS, Spanberger T, Ilhan-Mutlu A, Magerle M, Hutterer M et al. (2013)
254 Preoperative Diffusion-Weighted Imaging of Single Brain Metastases Correlates with
255 Patient Survival Times. *PLoS ONE*, **8**,1-8.

256

257 Blasel S, Jurcoane A, Bähr O, Weise L, Harter PN et al. (2013) MR perfusion in and
258 around the contrast-enhancement of primary CNS lymphomas. *Journal of Neuro-oncology*,
259 **114**, 127–134.

260

261 Bosman FT, Stamenkovic I. (2003) Functional structure and composition of the
262 extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, **200**, 423–428.

263

264 Costa LD, Dias MC, Alvarenga MA, Sequeira JL (2017) Identification of collagens types I,
265 III, IV and α -SMA and the participation of myofibroblasts in the fibrotic process in equine
266 endometrosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **69**, 1398-1406.

267

- 268 Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P et al. (2001) Prognostic
269 variables in canine multicentric lymphosarcoma. *The Journal of Small Animal Practice*,
270 **42**, 377-384.
- 271
- 272 Fu R, Yu H, Wu YH, Liu H, Shao ZH (2015) Hodgkin's lymphoma associated with
273 myelofibrosis: A case report. *Oncology Letters*, **10**, 1551-1554.
- 274
- 275 Gilkes DM, Chaturvedi P, Bajpai S, Wong CC, Wei H et al. (2013) Collagen prolyl
276 hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Research*, **73**, 3285–96.
- 277
- 278 Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani RR (1978) Differential staining of collagens type I,
279 II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum*,
280 **41**, 267-274.
- 281
- 282 Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *Journal of*
283 *Cell Science*, **120**, 1955–1958.
- 284
- 285 Kumar S, Rau AR, Naik R, Kini H, Mathai AM et al. (2009) Bone marrow biopsy in non-
286 Hodgkin lymphoma: A morphological study. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*,
287 **52**, 332-338.
- 288
- 289 Lennert K, Feller AC (1992) *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 2nd Edit.
290 Berlin: Springer-Verlag.
- 291
- 292 Matsumura Y (2012) Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Advanced Drug Delivery*
293 *Reviews*, **64**, 710-719.
- 294
- 295 Nath SV, Nicholson I, Tapp H, Zola H, Zannettino AC et al. (2011) Reticulin
296 fibres anchor leukaemic blasts in the marrow of patients with acute
297 lymphoblastic leukaemia. *Medical Hypotheses*, **77**, 333-335.
- 298

- 299 Nören-Nyström U, Roos G, Bergh A, Botling J, Lönnerholm G et al. (2008) Bone marrow
300 fibrosis in childhood acute lymphoblastic leukemia correlates to biological factors,
301 treatment response and outcome. *Leukemia*, **22**, 504-510.
302
- 303 Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the
304 hallmarks of cancer. *EMBO Reports*, **15**, 1243-1253.
305
- 306 Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L et al. (2008) Collagen density
307 promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine*, **6**, 6-11.
308
- 309 Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK (2016) Extracellular matrix
310 structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **97**, 4-27.
311
- 312 Thiele J, Zirbes TK, Kvasnicka HM, Fischer R (1999) Focal lymphoid aggregates
313 (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and
314 malignant lymphoma-a practical guideline. *Journal of Clinical Pathology*, **52**, 294-300.
315
- 316 Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF (2002) *WHO International*
317 *Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals*. 2nd Edit. Armed
318 Forces Institute of Pathology, pp. 1-190.
319
- 320 Volpato R, Martin I, Ramos RS, Tsunemi MH, Laufer-Amorin R et al. (2012)
321 Immunohistochemical of the cervix and uterus of bitches diagnosed with pyometra.
322 *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **64**, 1109-1117.
323
- 324 Xiong G, Deng L, Zhu J, Rychahou PG, Xu R (2014) Prolyl-4-hydroxylase α subunit 2
325 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. *BMC*
326 *Cancer*, **14**, 1-12.
327

- 328 Xu B, Wang T (2017) Intimate cross-talk between cancer cells and the tumor
329 microenvironment of B-cell lymphomas: The key role of exosomes. *Tumor Biology*, **39**, 1-
330 12.
- 331
- 332 Zhou ZH, Ji CD, Zhu J, Xiao HL, Zhao HB et al. (2017) The prognostic value
333 and pathobiological significance of Glasgow microenvironment score in gastric cancer.
334 *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **143**, 883–894.

335 10. TRABALHO CIENTÍFICO 2

336

337 Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Comparative Pathology, normas
338 disponíveis em:

339 https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623050?generatepdf=true

340

341 Vascular endothelial growth factor and α -SMA expression in canine lymphomas

342

343 M C L Silva*, J L Sequeira*, Rafael Torres Neto†, Sabryna Gouveia Calazans§

344

345 * Department of Veterinary Clinics, Service of Veterinary Pathology, School of Veterinary
346 Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-681,
347 Brazil, †Private Veterinary Pathology Laboratory, VETMOL, Botucatu 18608-970, Brazil
348 and § Veterinary Teaching Hospital, Department of Veterinary Science, Franca University
349 (UNIFRAN), Franca 14404-600, Brazil

350

351

352 Correspondence to: M. C. L. Silva* 55 11 988962405, (e-mail: claucordioli@hotmail.com)

353

354

355 Funding: This work was supported by CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de
356 Pessoal de Nível Superior.

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

Summary

367 Canine Non-Hodgkin lymphomas (cNHL) are a heterogenous group of tumours with
368 different prognosis and response to therapy. Tumour microenvironment is known to be
369 pivotal for cancer development with vascular endothelial growth factor (VEGF) being
370 implicated in tumoral angiogenesis and survival and among cellular components cancer
371 associated fibroblasts (CAFs) play a role on tumour progression, secreting various
372 cytokines, including VEGF. Sixty lymphomas were divided into four groups according to
373 immunophenotype and grade and immunoexpression of VEGF and α -SMA evaluated on
374 neoplastic lymphoma cells and stroma, respectively. Tumours exhibited various scores
375 which significantly differed between groups, immunophenotypes and grades, high-grade T-
376 cell lymphoma showing the highest levels. Additionally, they were positively correlated
377 with proliferation index. There was no difference regarding α -SMA expression within
378 groups, immunophenotypes or grades. VEGF has potential as a prognostic marker for
379 canine lymphoma. Further, the use of anti-angiogenic drugs should be investigated taking
380 into account immunophenotype and grade and animals with high-grade T-cell tumours
381 would probably benefit more from its use.

382 *Keywords:* dog; lymphoma; VEGF; myofibroblast

383

384

Introduction

385 Non-Hodgkin lymphomas (NHL) are the most common haemopoietic malignancies of dogs
386 and due to their similarities with the human disease, such as incidence, biological
387 behaviour, shared environmental risk factors, frequent subtypes and treatment strategies,
388 they have been proposed as spontaneous occurring models for the human counterparts
389 (Comazzi *et al.*, 2014; Richards and Suter, 2015).

390 NHL represent a heterogeneous group of tumours, and although T-cell lymphoma is less
391 frequent than B-cell, it has a poor prognosis and response to therapy, posing a greater
392 treatment challenge (Chang *et al.*, 2017).

393 Despite the high initial good response dogs have to current chemotherapy protocols
394 (CHOP being the most commonly used), the toxicity of the drugs used limits its efficacy,
395 particularly in the elderly, whom lymphoma most commonly afflicts, and most patients

396 eventually relapse and die mainly due to development of drug resistance (Sorenmo *et al.*,
397 2010).

398 Currently, it is widely accepted that cancer progression depends largely on neoplastic cells
399 interactions with tumour microenvironment (Chou *et al.*, 2013). Vascular endothelial
400 growth factor (VEGF) a cytokine produced by several tumour and stroma associated cells
401 (Powell *et al.*, 2013) is implicated in tumoral angiogenesis and metastasis (Giantin *et al.*,
402 2012).

403 VEGF exerts two potential functions on human lymphoma, to increase angiogenesis and
404 tumour cells proliferation/survival as an autocrine growth factor for those cells in addition
405 to the paracrine effects on endothelial cells (Gratzinger *et al.*, 2008). VEGF expression by
406 aggressive and indolent subtypes of lymphomas has been demonstrated, including
407 Peripheral T-Cell Lymphoma, Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma, Diffuse Large B-
408 Cell Lymphoma (DLBCL), and Mantle Cell Lymphoma (Foss *et al.*, 1997; Potti *et al.*,
409 2002; Zhao *et al.*, 2004; Gratzinger *et al.*, 2007; Gratzinger *et al.*, 2008).

410 VEGF is considered to have prognostic value for LNH (Yang *et al.*, 2015). In DLBCL
411 elevation of that cytokine serum levels before treatment predicts response to therapy and
412 survival after chemoimmunotherapy and can help to stratify those patients into risk groups
413 (Duletić-Načinović *et al.*, 2016).

414 Relatively recent studies found higher VEGF expression levels on canine T-cell
415 lymphomas compared to B-cell lymphomas and healthy lymph nodes (Aresu *et al.*, 2012;
416 Aricò *et al.*, 2013). Also, predictive value is attributed to the expression reduction that
417 occurs during treatment (Aresu *et al.*, 2012).

418 Cancer associated fibroblasts (CAFs), the main stromal cellular component, play crucial
419 roles toward a pro-tumorigenic tissue microenvironment (Ohshio *et al.*, 2015). CAFs are
420 frequently identified by alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expression (Paunescu *et al.*,
421 2011) and among its roles on tumour progression are growth factors and
422 immunosuppressive cytokines secretion (Murata *et al.*, 2011; Harper and Sainson, 2014).
423 Using animal models, studies showed that VEGF produced by CAFs are important for
424 tumoral angiogenesis (Dong *et al.*, 2004).

425 Detection of CAFs indicates poor prognosis (Alili *et al.*, 2014), those cells been
426 considered potential therapeutic targets on lymphoma mouse models (Ohshio *et al.*, 2015)

427 and human lymphomas, especially indolent T-cell lymphomas (Ruan *et al.*, 2006). To the
428 best of our knowledge there are no studies evaluating CAF on canine lymphoma.

429 Taking side effects of conventional chemotherapeutic drugs into consideration a better
430 understanding of tumour biology, specially within different immunophenotypes, is
431 necessary to provide a more accurate prognosis and fundament proposal of new associated
432 therapy modalities. Our initial hypothesis was that lymphomas of T-cell origin would have
433 a greater expression of those protein than those of B-cell origin. Therefore, the aim of this
434 study was to describe VEGF and α -SMA expression on neoplastic lymphoma cells and
435 stroma, respectively, within the different immunophenotypes and grades.

436

437

Materials and methods

438

Samples and histological classification

439 Sample and group selection are described in a previous study (Silva *et al.*, 2019). The cases
440 were grouped according to immunophenotype and grade into 21 cases of high-grade B-cell
441 lymphoma (HB), 9 of low-grade B-cell lymphoma (LB), 20 of high-grade T-cell lymphoma
442 (HT) and 10 of low-grade T-cell lymphoma (LT).

444

Immunohistochemistry

445 Immunohistochemical staining was performed in 3 μ m tissue sections. Slides were
446 dewaxed, rehydrated and in citrate buffer (pH 6.0) they were submitted to two methods of
447 heat antigen retrieval, for α -SMA a pressurized cook (Pascal, Dako, Carpinteria, CA, USA)
448 was used and for VEGF four cycles of 5 min in microwave (800W). The slides were then
449 cooled down to room temperature and washed five times in distilled water. A ready-to-use
450 solution (Spring Bioscience, DHP-125, Pleasanton, USA) was applied to block endogenous
451 peroxidase activity for 20 min at 27°C. Anti-VEGF (diluted 1 in 100, rabbit, polyclonal,
452 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and α -SMA (diluted 1 in 1250; mouse, 1A4 clone,
453 Dako) primary antibodies diluted in Dako antibody diluent were incubated overnight at 4°C
454 in a humid chamber. Those antibodies were previously successfully used in canine tissue
455 (Wolfesberger *et al.*, 2008; Paunescu *et al.*, 2011, respectively). The tissues were rinsed
456 three times with TrisEDTA buffer (pH 7.4) and histofine (Nichirei Bioscience, Japan,
457

458 REF: 414154F) secondary antibody was applied for 30 min at 27°C. 3, 30-
459 diaminobenzidine (DAB, Dako) was used for visualization. Thereafter, sections were
460 counterstained with Harris's haematoxylin, dehydrated and coverslipped. Canine placenta
461 was used as positive control for VEGF and a normal canine skin for α -SMA. Antibody
462 diluent replacement of primary antibody was used as a negative control. VEGF slides were
463 scored similarly to the methodology used by Rodigheri *et al.* (2015). Briefly, it
464 encompasses multiplication of intensity (1 to 3) and percentage (1 - <10%; 2 - 10-24%; 3 -
465 25-49%; 4 - 50-75%; 5 - >75%) scores of labelling. α -SMA expression distribution and
466 immunolabelling score was assessed for each case.

467

468 *Statistical analysis*

469 With the aid of GraphPad Prism 7.05 Kruskal-Wallis was used for comparing all four
470 groups and Mann-Whitney for immunophenotype, grade and the two by two individual
471 groups comparison. Differences were considered significant with P-value < 0.05.

472

473

473 **Results**

474 *VEGF*

475 All samples were positive for that antibody with various percentages of tumours cells
476 immunolabelling. Neoplastic cells, when positive, displayed cytoplasmic predominantly
477 diffuse labelling. Plasma cells were strongly positive, part of the macrophages and
478 endothelial cells were positively labelled. Residual normal lymphoid follicles, if present,
479 were always negative. Tumours exhibited nine scores of immunolabelling (Table 1) and the
480 median of those scores significantly differed between groups (P <0.0001),
481 immunophenotypes (P <0.0001) and grades (P =0.0275). Overall, T-cell lymphomas
482 showed higher scores than B-cell ones, and within the former high-grade had the highest
483 levels (Fig. 1). VEGF expression was positively correlated with proliferation index (r =
484 0.3247, P = 0.0137).

485

486

487

488

489

490

491

Table 1

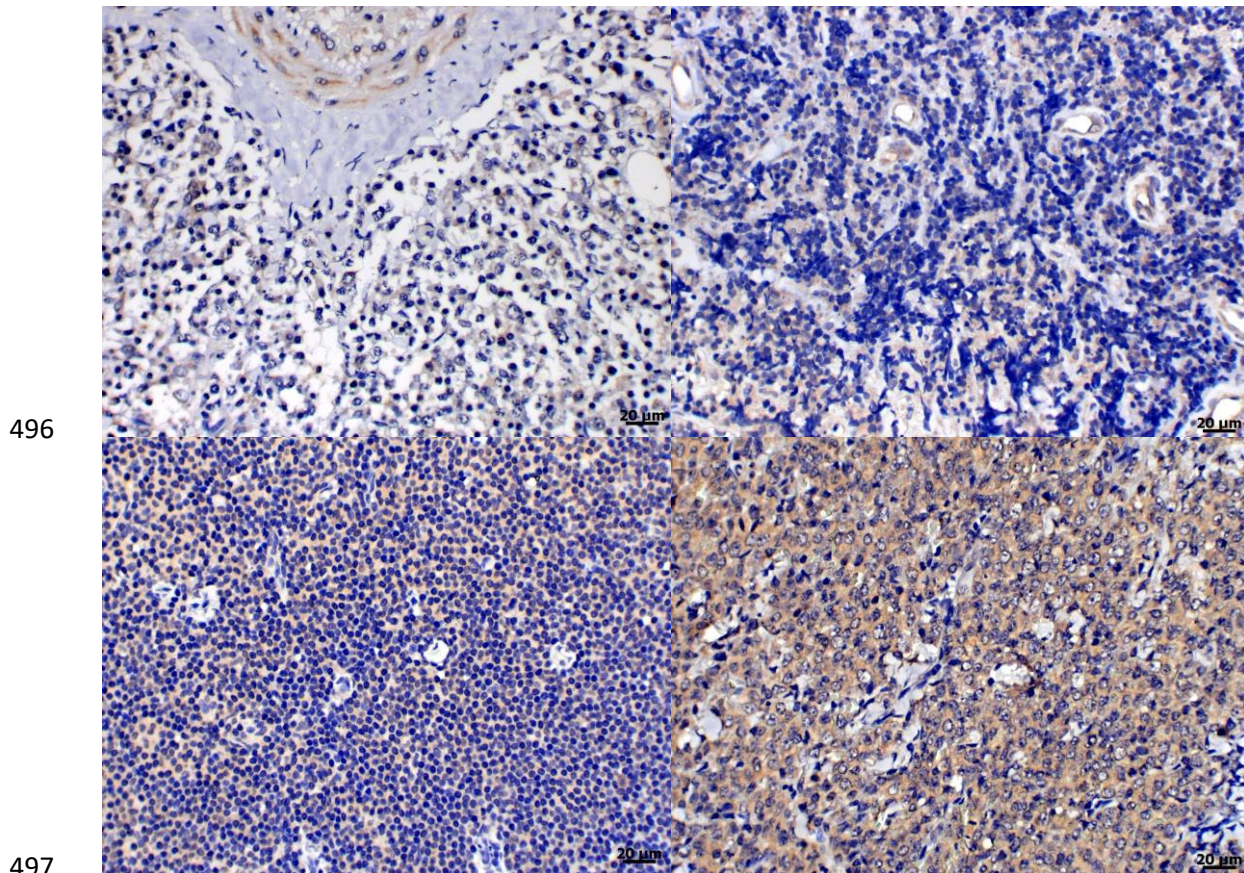
492

Distribution of VEGF immunolabeling score according to the groups

<i>Score</i>	<i>HB</i>	<i>LB</i>	<i>HT</i>	<i>LT</i>
1	1	3	-	-
2	5	1	-	1
3	6	1	-	2
4	3	1	1	1
6	1	3	-	1
8	3	-	2	2
10	1	-	3	1
12	1	-	-	1
15	-	-	14	1
Median score	3	3	15	7
(min-max)	(1-12)	(1-6)	(4-15)	(2-15)

493 HB, high-grade B-cell lymphoma; LB, low-grade B-cell lymphoma; HT, high-grade T-cell
 494 lymphoma; LT, low-grade T-cell lymphoma.

495

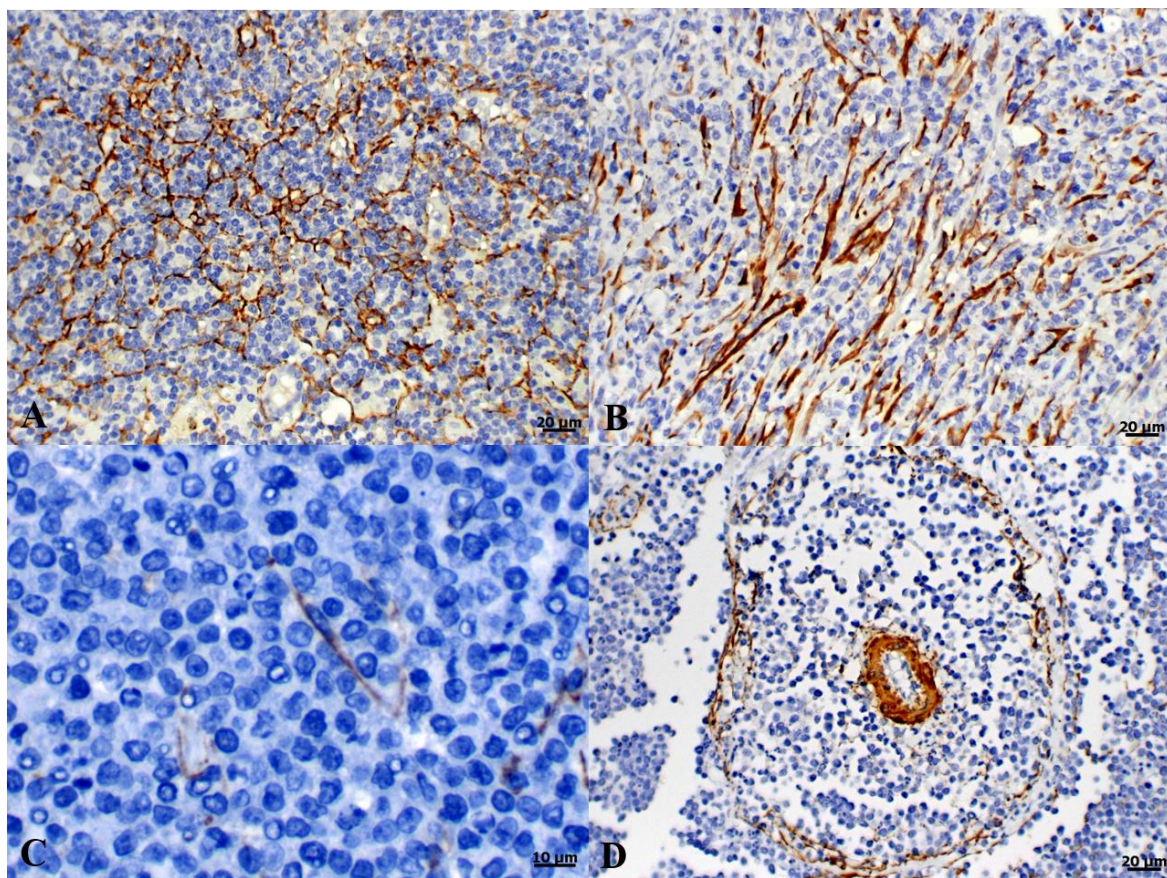


498 Fig. 1. Canine lymphoma VEGF cytoplasmic immunolabelling. (A) High-grade B-cell
 499 lymphoma exhibiting a discrete labelling (score 2). Note endothelial cells labelling at the
 500 upper centre. (B) Low-grade B-cell lymphoma with score 4. (C) Low grade T-cell
 501 lymphoma, score 10. (D) High-grade T-cell lymphoma, score 15. Bar, 20 µm. IHC.

502

503 *α-SMA*

504 Different patterns of immunolabeling on stroma were observed. (Fig. 2). Most cases
 505 displayed bundle arrangement, some individualized labelled cells and prominent labelling
 506 around part of the blood vessels, specially the larger ones, more frequently but not
 507 necessarily associated with collagenous tissue. In a few cases cells were individualized. In
 508 the majority of tumours immunolabelling was heterogeneously distributed. Most high-
 509 grade and LT cases had staining score 2, whereas most LB showed score 3. (Table 2). The
 510 median of those scores did not differ between groups, immunophenotypes or grades ($P >$
 511 0.05)



512
 513 Fig. 2. Different arrays of α -SMA immunolabelling observed on canine lymphoma stroma.
 514 (A) labelling surrounding neoplastic cell delimitating islands. (B) fibres arranged mainly in
 515 longitudinal parallel bundles. (C) Individual cancer associated fibroblast cytoplasmic
 516 labelling at the centre. (D) concentric labelling around an arteriole. Bar A, B e D, 20 μ m;
 517 C, 10 μ m.

518

519

Table 2

520

Absolute and relative number of cases in each score according to the groups.

<i>Score</i>	<i>HB</i>	<i>LB</i>	<i>HT</i>	<i>LT</i>
1	9 (42.8%)	4 (44.4%)	7 (35%)	3 (30%)
2	10 (47.6%)	-	8 (40%)	4 (40%)
3	2 (9.5%)	5 (55.5%)	4 (20%)	2 (20%)
4	-	-	1 (5%)	1 (10%)

521 HB, high-grade B-cell lymphoma; LB, low-grade B-cell lymphoma; HT, high-grade T-cell
 522 lymphoma; LT, low-grade T-cell lymphoma.

523

524

525

Discussion

526 Tumour microenvironment has a crucial role on tumour growth and encompasses immune
527 and stromal cells, ECM and angiogenesis (Butler *et al.*, 2010). Clinical impact of VEGF
528 expression has gained visibility recently due to the correlation between tumoral
529 angiogenesis and survival, as well as the clinical benefit of VEGF inhibition and patient
530 survival increase in several cancers (Bróseus *et al.*, 2017).

531 On our studied lymphomas there was a higher VEGF expression by T-cell lymphomas
532 compared to B-cell ones, and in high-grade T-cell lymphomas compared to low-grade,
533 which was also observed by Aresu *et al.* (2012) and Aricò *et al.* (2013), and might have
534 connection to the more aggressive behaviour and faster dissemination of T-cell lymphomas,
535 specially the high-grade ones.

536 Similar to Wolfesberger *et al.* (2008) findings, plasma, when present in vessels, was
537 immunoreactive for VEGF, which they attributed to blood platelets, released during platelet
538 aggregation. In accordance to those authors we observed that only part of endothelial cells
539 was positively immunolabeled and plasma cells were strongly positive. Considering neo-
540 angiogenesis does not occur in adults under physiological conditions it is believed that
541 VEGF-expressing endothelial cells, macrophages, lymphocytes and plasma cells are
542 involved in sustaining mature blood vessels and maintaining permeability of normal
543 microcirculation (Berse *et al.*, 1992; Wolfesberger *et al.*, 2008).

544 It is known for a long time that VEGF expression on human NHL is related to subtype,
545 grade, clinical outcome and survival, with greater recurrence or death probability in patients
546 with higher levels (Salven *et al.*, 1997). Recent meta-analysis confirm that higher VEGF
547 levels are related to worse prognosis on DLBCL (Jiang *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2017), the
548 most common lymphoma subtype both in humans and dogs (Valli *et al.*, 2011; Ito *et al.*,
549 2014), so it is reasonable to assume that relationship could also exist with dogs. Serum
550 VEGF levels are frequently evaluated and they reflect the body production of that cytokine
551 which can influence lymphoma biological behaviour in many ways given its important role
552 on tumour (Duletić-Načinović *et al.*, 2016).

553 Overall, a VEGF and its receptors autocrine loop on lymphoma cells can not only induce
554 in situ generation of lymphatic and blood vessels but also promote tumoral cells growth and
555 metastasis (Dvorak, 2010; Gratzinger *et al.*, 2010) in addition to activation of anti-apoptosis
556 genes, including Bcl-2, which protects tumour cells from apoptosis (Jacobson *et al.*, 1993;
557 Kim *et al.*, 2015). Besides, abnormal tumour vascular structures, which can result from
558 VEGF activity, can diminish local drug delivery, hindering treatment (Van Der Veldt *et al.*,
559 2012). Furthermore, evidences suggest that high VEGF concentration may have a role on
560 immune system evasion by lymphoma cells (Laxmanan *et al.*, 2005; Riihijärvi *et al.*, 2012).

561 Bevacizumab (an anti-VEGF drug) inhibited tumour growth by supressing angiogenesis in
562 a xenograft model of canine hemangiopericytoma (Michishita *et al.*, 2013) and in pre-
563 clinical trials, studies with lymphoma xenografic mouse model, administration of anti-
564 VEGF antibody led to tumour regression showing synergistic anti-tumoral effect with
565 rituximab (Wang *et al.*, 2004). In a phase II clinical trial 11 out of 45 patients with
566 recurrence of aggressive lymphoma exhibited prolonged stable disease and average
567 response time after a single dose of bevacizumab (Stopeck *et al.*, 2009). Furthermore, that
568 drug combined to conventional chemotherapy has shown to be safe and effective on newly
569 diagnosed DLBCL cases (Ganjoo *et al.*, 2006). Scientific data published associated with
570 our results support use of anti-angiogenic drugs investigation on cNHL, with evaluation of
571 VEGF expression on resect tissue guiding recommendation of that targeted therapy use
572 (Yang, 2015).

573 We also observed a correlation between proliferation index and VEGF immunolabeling on
574 studied lymphomas which reinforces its potential prognostic value. A limitation of our
575 study was the lack of patient follow-up, so it was not possible to conclude anything on that
576 regard.

577 We did not see different immunolabeling levels of α - SMA expressing CAFs between
578 lymphoma subgroups nor correlation with proliferation index. Yazhou *et al.* (2004) also
579 reports no association of CAFs with Ki67 expression on mammary carcinoma. However, in
580 recent studies, tumours expressing larger quantities of CAFs exhibited worse prognosis,
581 given the well stablished role of those cells as a crucial component on the
582 microenvironment of various tumours such as gastric (Dong *et al.*, 2018) and mammary
583 cancer, due to their contribution to cancer initiation, growth, invasion, metastasis,

584 angiogenesis, ECM remodelling, cancer associated inflammation and therapy resistance, all
585 of which contributes to tumour malignancy (Luo *et al.*, 2015; Eiro *et al.*, 2018).

586 Even though the role of CAFs on tumour progression in general is well established, there
587 is not necessarily a direct relation of CAFs quantity with ECM production. Fu *et al.* (2014)
588 observed α - SMA expression on invasive mammary carcinoma stroma and not on benign or
589 normal tissue, and, in spite of that, there was a smaller amount of stromal collagen on more
590 aggressive tumour, with less protein production by those cells, suggesting remodelling of
591 stromal components and tumour microenvironment may be attributed to biological changes
592 on FACs, including protein expression profile.

593 Furthermore, not all CAFs express α - SMA (Ishii *et al.*, 2016). Even though it is the most
594 commonly used marker, other proteins such as tenascin-C and FAP (fibroblast activation
595 protein) can also detect those cells (Sugimoto *et al.*, 2006). There are different subtypes of
596 CAFs that may exert different roles on tumours, contributing to its progression or inhibition
597 (Augsten *et al.*, 2014), therefore a more extensive study, taking into account those
598 subtypes, is needed to determine myofibroblasts potential role on lymphoma. Also, to our
599 knowledge, there are no studies regarding CAFs quantity among different lymphoma
600 subtypes in domestic animals or humans, so it is not possibly to ascertain, at least for the
601 time being, their contribution for malignancy on that particular cancer.

602 In summary, the present study has described cancer associated fibroblast and VEGF
603 expression on canine lymphoma detailing it according to immunophenotypes and grades.
604 VEGF exhibits potential as a prognostic marker for canine lymphomas and further
605 prospective studies with follow-up data, especially regarding survival, are needed. In
606 addition, clinical trials can help elucidate the potential and efficacy for anti-angiogenic
607 drugs use on canine lymphomas, which probably would be more effective on high-grade T-
608 cell lymphomas, based on ours and literature data finding. The contribution of
609 myofibroblasts to canine lymphoma development and progression is yet to be elucidated.

610

611

Acknowledgments

612 We thank Carlos Eduardo Fonseca-Alves for statistical analysis assistance.

613

614

Conflict of Interest Statement

615 The authors declare no potential conflicts of interest that could influence or bias the content
616 of this manuscript.

617 **References**

618 Alili L, Sack M, Puschmann K, Brenneisen P (2014) Fibroblast-to-myofibroblast switch is
619 mediated by NAD (P)H oxidase generated reactive oxygen species. *Bioscience Reports*, **34**,
620 7-17.

621
622 Aresu L, Aricò A, Comazzi S, Gelain ME, Riondato F et al. (2012) VEGF and MMP-9:
623 biomarkers for canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, **12**, 29-26.

624
625 Aricò A, Giantin M, Gelain ME, Riondato F, Comazzi S et al. (2013) The role of vascular
626 endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and
627 in vitro study. *BMC Veterinary Research*, **9**, 1-10.

628
629 Augsten M (2014) Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor
630 microenvironment. *Frontiers in Oncology*, **4**, 1-8.

631
632 Broséus J, Mourah S, Ramstein G, Bernard S, Mounier N et al. (2017) VEGF121, is
633 predictor for survival in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma and is related
634 to an immune response gene signature conserved in cancers. *Oncotarget*, **8**, 90808-90824.

635
636 Butler JM, Kobayashi H, Rafii S (2010) Instructive role of the vascular niche in promoting
637 tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nature Reviews. Cancer*, **10**, 138–
638 146.

639
640 Chang G, Xiao W, Xu Z, Yu D, Li B et al. (2017) Pterostilbene Induces Cell Apoptosis and
641 Cell Cycle Arrest in T-Cell Leukemia/Lymphoma by Suppressing the ERK1/2 Pathway.
642 *BioMed Research International*, ID 9872073, 1-11.

643
644 Chou J, Shahi P, Werb Z. (2013) MicroRNA-mediated regulation of the tumor
645 microenvironment. *Cell Cycle*, **12**, 3262-3271.

646

647 Comazzi S, Guscetti F, Marconato L. (2014) First meeting of the European canine
648 lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma.
649 CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematological Oncology*, **32**, 68-71.

650

651 Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G et al. (2004) VEGF-null cells require
652 PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. The
653 *EMBO Journal*, **23**, 2800-2810.

654

655 Dong R, Guo J, Zhang Z, Zhou Y, Hua Y (2018) Polyphyllin I inhibits gastric cancer cell
656 proliferation by downregulating the expression of fibroblast activation protein alpha (FAP)
657 and hepatocyte growth factor (HGF) in cancer-associated fibroblasts. *Biochemical and*
658 *Biophysical Research Communications*, **497**, 1129-1134.

659

660 Duletić-Naćinovi A, Gačić V, Valković T, Lučin K, Fišić E et al. (2016) Concurrent
661 Elevations of VEGF, Osteopontin and MCP-1 Serum Levels are Independent Predictors of
662 Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Acta Haematologica*, **136**, 52-
663 61.

664

665 Dvorak HF (2010) Vascular permeability to plasma, plasma proteins, and cells: an update.
666 *Current Opinion in Hematology*, **17**, 225-229.

667

668 Eiro N, González L, Martínez-Ordoñez A, Fernandez-Garcia B, González LO et al. (2018)
669 Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and
670 angiogenesis. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, **41**, 369-378.

671

672 Foss HD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M et al. (1997) Expression of vascular
673 endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *The Journal of Pathology*,
674 **183**, 44-50.

675

676 Ganjoo KN, An CS, Robertson MJ, Gordon LI, Sen JA et al. (2006) Rituximab,
677 bevacizumab and CHOP (RA-CHOP) in untreated diffuse large B-cell lymphoma: safety,
678 biomarker and pharmacokinetic analysis. *Leukemia & Lymphoma*, **47**, 998–1005.

679

680 Fu Z, Song P, Li D, Yi C, Chen H et al. (2014) Cancer-associated fibroblasts from invasive
681 breast cancer have an attenuated capacity to secrete collagens. *International Journal of*
682 *Oncology*, **45**, 1479-88.

683

684 Giantin M, Aresu L, Benali S, Aricò A, Morello EM et al. (2012) Expression of Matrix
685 Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Vascular Endothelial
686 Growth Factor in Canine Mast Cell Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, **147**, 419-
687 429.

688

689 Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ, Kapp AV, Tibshirani RJ et al. (2007) Microvessel
690 density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse
691 large B-cell lymphoma subtypes. *The American Journal of Pathology*, **170**, 1362-1369.

692

693 Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP et al. (2008) Prognostic significance
694 of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma
695 treated with anthracycline-based chemotherapy. *Laboratory Investigation; a Journal of*
696 *Technical Methods and Pathology*, **88**, 38-47.

697

698 Gratzinger, D, Advani R, Zhao S, Talreja N, Tibshirani RJ et al. (2010) Lymphoma cell
699 VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in
700 diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *British*
701 *Journal of Haematology*, **148**, 235-44.

702

703 Harper J, Sainson RC (2014) Regulation of the anti-tumour immune response by cancer
704 associated fibroblasts. *Seminars in Cancer Biology*, **25**, 69–77.

705

706 Ishii G, Ochiai A, Neri S (2016) Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-
707 associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Advanced Drug Delivery*
708 *Reviews*, **99**, 186-196.

709

710 Ito D, Frantza AM, Modiano JF (2014) Canine lymphoma as a comparative model for
711 human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Veterinary Immunology*
712 *and Immunopathology*, **159**, 192-201.

713

714 Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC et al. (1993) Bcl-2 blocks
715 apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, **361**, 365–369.

716

717 Jiang L, Sun JH, Quan LN, Tian YY, Jia CM et al. (2016) Abnormal vascular endothelial
718 growth factor protein expression may be correlated with poor prognosis in diffuse large
719 B-cell lymphoma: A meta-analysis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **12**,
720 605-611.

721

722 Kim S, Kim YJ, Kim NR, Chin HS (2015) Effects of Bevacizumab on Bcl-2 Expression
723 and Apoptosis in Retinal Pigment Epithelial Cells under Oxidative Stress. *Korean Journal*
724 *of Ophthalmology:KJO*, **29**, 424-432.

725

726 Laxmanan S, Robertson SW, Wang E, Lau JS, Briscoe DM et al. Vascular endothelial
727 growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways.
728 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 334, p. 193–198, 2005.

729

730 Luo, H. Tu G, Liu Z, Liu M (2015) Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of
731 breast cancer progression. *Cancer Letters*, **361**, 155-63.

732

733 Michishita M, Uto T, Nakazawa R, Yoshimura H, Ogihara K et al. (2013) Antitumor Effect
734 of Bevacizumab in a Xenograft Model of Canine Hemangiopericytoma. *Journal of*
735 *Pharmacological Sciences* **121**, 339-342.

736

- 737 Murata T, Mizushima H, Chinen I, Moribe H, Yagi S et al. (2011) HB-EGF and PDGF
738 mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to
739 support progression of uterine cervical cancers. *Cancer Research*, **71**, 6633–42.
740
- 741 Ohshio Y, Teramoto K, Hanaoka J, Tezuka N, Itoh Y et al. (2015) Cancer-associated
742 fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based
743 vaccine. *Cancer Science*, **106**, 134–142.
744
- 745 Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA, Gavriiliuc OI et al. (2011) Tumour-associated fibroblasts
746 and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *Journal of Cellular and*
747 *Molecular Medicine*, **15**, 635-646.
748
- 749 Potti A, Ganti AK, Kargas S, Koch M (2002) Immunohistochemical detection of C-kit
750 (CD117) and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in mantle cell
751 lymphoma. *Anticancer Research*, **22**, 2899-2901.
752
- 753 Powell JR, Dojcinov S, King L, Wosniak S, Gerry S, et al. (2013) Prognostic significance
754 of hypoxia inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in
755 patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Leukemia &*
756 *Lymphoma*, **54**, 959–66.
757
- 758 Richards KL, Suter SE. (2015) Man’s best friend: what can pet dogs teach us about non-
759 Hodgkin’s lymphoma? *Immunological Reviews*, **263**, 173-191.
760
- 761 Riihijärvi S, Nurmi H, Holte H, Björkholm M, Fluge O et al. (2012) High serum vascular
762 endothelial growth factor level is an adverse prognostic factor for high-risk diffuse large B-
763 cell lymphoma patients treated with dose-dense chemoimmunotherapy. *European Journal*
764 *of Haematology*, **89**, 395-402.
765

- 766 Rodigheri SM, Calazans SG, Laufer-Amorim R, De Nardi AB, Sequeira JL et al. (2015)
767 Serum concentration and immunostaining of vascular endothelial growth factor in dogs
768 with multicentric lymphoma. *Semina: Ciências Agrárias*, **36**, 2649-2660.
769
- 770 Ruan J, Hyjek E, Kermani P, Christos PJ, Hooper AT et al. (2006) Magnitude of Stromal
771 Hemangiogenesis Correlates with Histologic Subtype of Non-Hodgkin's Lymphoma.
772 *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer*
773 *Research*, **12**, 5622-5631.
774
- 775 Sorenmo K, Overley B, Krick E, Ferrara T, Lablanc A et al. (2010) Outcome and toxicity
776 associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol
777 in canine lymphoma: 130cases. *Veterinary Comparative Oncology*, **8**, 196- 208.
778
- 779 Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H (1997) A High Pretreatment Serum Vascular
780 Endothelial Growth Factor Concentration Is Associated With Poor Outcome in Non-
781 Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, **90**, 3167-3172.
782
- 783 Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R (2006) Identification of fibroblast
784 heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biology & Therapy*, **5**, 1640-1646.
785
- 786 Stopeck AT, Unger JM, Rimsza LM, Bellamy WT, Iannone M et al. (2009) A Phase II
787 Trial of Single Agent Bevacizumab in Patients with Relapsed, Aggressive Non-Hodgkin
788 Lymphoma: Southwest Oncology Group Study S0108. *Leukemia & Lymphoma*, **50**, 728–
789 735.
790
- 791 Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J et al. (2011) Classification of
792 canine malignant lymphomas according to the World Health Organization Criteria.
793 *Veterinary Pathology*, **48**, 198-211.
794

- 795 Van Der Veldt AA, Lubberink M, Bahce I, Walraven M, de Boer MP et al. (2012) Rapid
796 decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for
797 scheduling of antiangiogenic drugs. *Cancer Cell*, **21**, 82– 91.
- 798
- 799 Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin DJ et al. (2004) Targeting autocrine
800 and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo.
801 *Blood*, **104**, 2893-2902.
- 802
- 803 Wolfesberger B, Tonar Z, Witter K, Guija de Arespacohaga A, Skalicky M et al. (2008)
804 Microvessel density in normal lymph nodes and lymphomas of dogs and their correlation
805 with vascular endothelial growth factor expression. *Research in Veterinary Science*, **85**, 56-
806 61.
- 807
- 808 Yang J, Li W, He X, Zhang G, Yue L et al. (2015) VEGF Overexpression Is a Valuable
809 Prognostic Factor for Non-Hodgkin's Lymphoma Evidence from a Systemic Meta-
810 Analysis. *Disease Markers*, 1-9, 2015.
- 811
- 812 Yazhou C, , Wenlv S, Weidong Z, Licun W (2004) Clinicopathological Significance of
813 Stromal Myofibroblasts in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Tumor Biology: The*
814 *Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **25**,
815 290–295.
- 816
- 817 Yoon KA, Kim MK, Eom HS, Lee H, Park WS et al. (2017) Adverse prognostic impact of
818 vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with diffuse large B-cell
819 lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, **58**, 2677-2682.
- 820
- 821 Zhao WL, Mourah S, Mounier N, Leboeuf C, Daneshpouy ME et al. (2004) Vascular
822 endothelial growth factor-A is expressed both on lymphoma cells and endothelial cells in
823 angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related to lymphoma progression. *Laboratory*
824 *Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, **84**, 1512-1519.

Anexo 1. Dados clínicos de todos os animais incluídos no projeto, com respectiva classificação histológica dos tumores.

N	Raça	Sexo	Idade (Anos)	Peso (Kg)	Estado reprodutivo	Forma anatômica	Estádio	Grupo	Classificação	
									Kiel (LENNERT, FELLER, 1992)	WHO (VALLI et al., 2002)
1	Border Collie	M	8	31,2	inteiro	Cutânea	III	LTB	Micose Fungoide	Micose Fungoide
2	SRD	F	6,5	7,2	castrado	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblástico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
3	SRD	M	4,5	12,2	inteiro	Isolada	V	LTB	Linfoma de Células T Pleomórfico de Pequenas Células	Linfoma Hepatoesplênico
4	Poodle	F	9	-	-	Multicêntrica	IV	LBB	Linfoma Centrocítico	Linfoma da Zona do Manto
5	SRD	F	4	-	-	Multicêntrica	III	LBB	Linfoma de Células B Monocitoide	Linfoma de células B de Zona Marginal
6	SRD	F	8	23,5	castrado	Multicêntrica	IV	LTA	Linfoma de Células T Linfoblástico	Linfoma de Células T Periférico
7	Boxer	M	8	18,5	-	Cutânea	-	LBB	Linfoma Centrocítico	Linfoma da Zona do Manto

8	SRD	F	7	19,3	castrado	Cutânea	-	LTA	Linfoma de Células T Imunoblástico	Linfoma de Células T Periférico
9	SRD	M	13,5	26,5	inteiro	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
10	Labrador	M	8	56,8	inteiro	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
11	SRD	F	2	6,3	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
12	Pit Bull	M	5,5	33,2	inteiro	Isolada	IV	LBB	Linfoma de Células B Monocitoide	Linfoma de Células B de Zona Marginal
13	SRD	F	3	11	castrado	Multicêntrica	IV	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Periférico
14	SRD	M	-	15	inteiro	Multicêntrica	III	LTA	Linfoma de Células T Imunoblástico	Linfoma de Células T Periférico
15	SRD	F	5	29	inteiro	Isolada	IV	LBB	Linfoma de Células B Monocitoide	Linfoma de Células B de Zona Marginal

16	SRD	F	13,5	16,8	castrado	Multicêntrica	III	LTB	Linfoma de Zona T	Linfoma de Células T Periférico
17	Poodle	F	9	5,7	inteiro	Isolada	IV	LBB	Linfoma Linfoplasmocítico	Linfoma Linfoplasmocítico
18	Beagle	M	11	17	castrado	Multicêntrica	V	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
19	Boston Terrier	F	6	10	inteiro	Multicêntrica	V	LBA	Linfoma de Células B Linfoblástico	Linfoma Linfoblástico B
20	SRD	M	8	-	-	Mediastinal	IV	LTB	Linfoma de Células T Pleomórfico de Pequenas Células	Linfoma de Células T Periférico
21	Basset Hound	F	12	20	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
22	Boxer	F	5	21,1	-	Multicêntrica	V	LTB	Linfoma de Células T linfocítico	Linfoma de Células T Pró-linfocítico
23	SRD	M	6	-	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
24	Boxer	M	5	18,8	-	Cutânea	IV	LTA	Linfoma de Células T Anaplásico de	Linfoma Anaplásico de Grandes Células

Grandes Células										
25	SRD	M	6	-	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
26	Border Colie	F	-	-	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Imunoblastico B	Linfoma Difuso de Grandes Células B
27	SRD	F	7	18,6	-	Mediastinal	V	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
28	Lhasa Apso	M	-	6,7	inteiro	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
29	SRD	F	9	7	inteiro	Multicêntrica	IV	LTA	Linfoma de Células T Imunoblastico	Linfoma de Células T Periférico
30	SRD	M	5	7,3	inteiro	Multicêntrica	IV	LBB	Linfoma de Células B Monocitoide	Linfoma de Células B de Zona Marginal
31	SRD	M	5	34,2	inteiro	Mediastinal	IV	LTA	Linfoma de Células T Imunoblastico	Linfoma de Células T Periférico
32	PA	M	6	38,6	inteiro	Isolada	I	LTB	Linfoma de células T pleomórfico de pequenas células	Linfoma de Células T Periférico
33	PA	F	10	-	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B

34	SRD	F	9	8,7	inteiro	Digestiva	III	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Periférico
35	PA	F	7	26	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
36	SRD	F	6	-	castrado	Multicêntrica	I	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Periférico
37	SRD	F	7	9,9	inteiro	Multicêntrica	IV	LTA	Linfoma de Células T linfoblástico	Linfoma Linfoblástico T
38	SRD	F	8	18	-	Multicêntrica	III	LTA	Linfoma de Células T Anaplásico de Grandes Células	Linfoma Anaplásico de Grandes Células
39	Dogue Alemão	F	8	-	-	Multicêntrica	V	LBA	Linfoma Centroblastico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
40	PA	M	6	40,8	-	Multicêntrica	V	LBB	Linfoma de Células B	Linfoma de Células B de Zona Marginal

										Monocitoide
41	Pastor Belga	F	10	-	-	Multicêntrica	V	LBA	Linfoma Centroblástico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
42	Labrador	F	6	-	-	Multicêntrica	-	LTA	Linfoma de Células T Anaplásico de Grandes Células	Linfoma Anaplásico de Grandes Células
43	Boxer	M	11	-	-	Mediastinal	IV	LBA	Linfoma Centroblástico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
44	Dachshund	M	12	19	-	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Imunoblástico B	Linfoma Difuso de Grandes Células B
45	SRD	M	3	11	-	Multicêntrica	V	LTA	Linfoma de Células T Linfoblastico	Linfoma Linfoblástico T
46	Boxer	M	7,5	24,5	inteiro	Digestiva	IV	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Intestinal
47	SRD	F	12	27,3	castrado	Mediastinal	IV	LBA	Linfoma Centroblástico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
48	Doberman	F	adulto	21	inteiro	Multicêntrica	IV	LBA	Linfoma Centroblástico	Linfoma Difuso de Grandes Células B

49	Boxer	M	5	-	-	Mediastinal	III	LTB	Linfoma de Células T Pleomórfico de Pequenas Células	Linfoma de Células T Periférico
50	SRD	M	7	-	-	Isolada	IV	LTA	Linfoma de Células T Anaplásico de Grandes Células	Linfoma Anaplásico de Grandes Células
51	Pit Bull	M	6	33	inteiro	Isolada	IV	LBB	Linfoma de Células B Monocitoide	Linfoma de células B de Zona Marginal
52	Poodle	M	9	8,5	inteiro	Multicêntrica	III	LBA	Linfoma Centroblástico	Linfoma Difuso de Grandes Células B
53	SRD	M	14	13,2	inteiro	Cutânea	II	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Periférico
54	SRD	F	8,5	20	castrado	Cutânea	II	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Periférico

55	SRD	M	6	21,8	-	Cutânea	II	LTA	Linfoma de Células T Anaplásico de Grandes Células	Linfoma Anaplásico de Grandes Células
56	Basset Hound	F	6,5	18,2	-	Isolada	I	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Periférico
57	SRD	M	9,5	12,3	inteiro	Multicêntrica	IV	LTA	Linfoma de Células T Pleomórfico de Médias e Grandes Células	Linfoma de Células T Periférico
58	SRD	M	12	-	-	-	-	LTB	Linfoma de Zona T	Linfoma de Células T Periférico
59	SRD	F	5	-	-	-	-	LTB	Linfoma de Zona T	Linfoma de Células T Periférico
60	Lhasa Apso	M	9	-	-	-	-	LTB	Linfoma de Zona T	Linfoma de Células T Periférico

SRD: sem raça definida. PA: Pastor Alemão. LBA: Linfoma B de Alto Grau, LBB: Linfoma B de Baixo Grau, LTA: Linfoma T de Alto Grau, LTB: Linfoma T de Baixo Grau.

Anexo 2. Valor absoluto e relativo de raça, sexo, forma anatômica, estadiamento clínico e estado reprodutivo dos animais que participaram do estudo.

Parâmetro	Número de casos	Porcentagem (%)
RAÇA		
SRD	30	50
Outras	20	33,3
Boxer	6	10
Pastor Alemão	4	6,7
SEXO		
Macho	30	50
Fêmea	30	50
FORMA ANATÔMICA		
Multicêntrica	34	56,7
Isolada	8	13,3
Cutânea	7	11,7
Mediastinal	6	10
Digestiva	2	3,3
ND	3	5
ESTADIAMENTO CLÍNICO		
Estadio I	3	5
Estadio II	3	5
Estadio III	8	13,3
Estadio IV	31	51,7
Estadio V	9	15
ND	6	10
ESTADO REPRODUTIVO		
Inteiro	21	35
Castrado	9	15
ND	30	50

SRD: sem raça definida; Outras: Basset Hound, Beagle, Border Collie, Boston Terrier, Dachshund, Doberman, Dogue Alemão, Labrador, Lhasa Apso, Pastor Belga, Pit Bull, Poodle e Rottweiler; ND: não disponível