

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

**CÉLULAS T REGULADORAS EM SANGUE PERIFÉRICO DE  
CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO**

**Mônica Ribeiro Sant'Anna Chaves  
Médica Veterinária**

**2014**

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

**CÉLULAS T REGULADORAS EM SANGUE PERIFÉRICO DE  
CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO**

**Mônica Ribeiro Sant'Anna Chaves**

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

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Veterinária, área de  
Clínica Médica Veterinária**

**2014**

Chaves, Mônica Ribeiro Sant'Anna  
C512c Células T reguladoras em sangue periférico de cães portadores de mastocitoma cutâneo / Mônica Ribeiro Sant'Anna Chaves. -- Jaboticabal, 2014  
xiii, 40 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientador: Aureo Evangelista Santana  
Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Felipe Augusto Ruiz Sueiro  
Bibliografia

1. Cães. 2. Células T reguladoras. 3. Citometria de Fluxo. 4. Mastocitoma. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** CÉLULAS T REGULADORAS EM SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO

**AUTORA:** MÔNICA RIBEIRO SANT'ANNA CHAVES

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

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



Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

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



Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

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



Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO

Laboratório VEPAT - Patologia e Biologia Molecular Veterinária / Campinas/SP

Data da realização: 11 de julho de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MÔNICA RIBEIRO SANT'ANNA CHAVES** - nascida em 22 de agosto de 1985, natural de São Gonçalo do Sapucaí, estado de Minas Gerais. Iniciou sua formação em 2004, no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras – UFLA, tendo concluído a graduação nesta instituição em julho de 2009. No período de fevereiro de 2010 a janeiro de 2012 participou do Programa de Aprimoramento Profissional na área de Patologia Clínica Veterinária, no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana. Em março de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária, na mesma instituição e sob mesma orientação.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Maria do Carmo e Paulo**, e meus irmãos, **Thiago e Raquel**, que são os pilares da minha vida, pelo apoio incondicional.

Ao **Felipe Dias**, pelo seu amor, amizade e cumplicidade. Você torna meus dias mais felizes. Não poderia existir uma pessoa melhor para estar ao meu lado.

Às minhas companheiras de república **Talita Raposo, Erika Terra, Andresa Matsui, Michelle Avante, Mariana Kihara, Rozana Wendler**, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos que conquistei em Jaboticabal, especialmente **Andressa Francisca, Leticia Anai, Paulo Jark, Michelle Avante, Darcio Zangirolami, Mariana Kihara, Kalina Simplício, Giovanni Hernandez, Felipe Kunz, Ana Gering, Thuanny Lopes, Ana Tristão, Pedro Teles, Andresa Matsui, Erika Terra, Talita Raposo, Diana Cifuentes, Felipe Barros, Gabriel Aquino, Thiago Munhoz, Rozana Wendler**, por serem os responsáveis por dias melhores e mais divertidos. Vocês são muito especiais pra mim.

Aos amigos **Guilherme Buso, Carla Conde, Juliana Florenzano, Fernando Martorelli, Raphael Torrão, Vivian Souza, Diego Martins, Mário Cabral, Heloisa Tabet, Isabella Mazzucatto, Silvia Drago**, que apesar da distância estão sempre presentes na minha vida e desejando o meu melhor.

Aos cães que foram incluídos neste trabalho e seus proprietários, por permitirem que novas fontes de conhecimento sejam adquiridas.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Profº **Aureo Evangelista Santana**, por acreditar na minha capacidade profissional e pela confiança no meu trabalho.

Aos amigos **Letícia Anai** e **Thiago Munhoz**, pelo conhecimento e apoio em cada etapa de realização deste trabalho.

Aos pós-graduandos **Paulo Jark**, **Livia Semolin**, **Mariana Miotto**, **Giovanni Hernandez**, **Marília Ferreira** e à toda a equipe do Serviço de Oncologia Veterinária (**SOV**), Unesp/Jaboticabal, pelo atendimento clínico aos animais, auxílio na colheita de amostras e acompanhamento dos pacientes.

Aos veterinários do Centro Avançado em Veterinária (**CAVET**) – Ribeirão Preto/SP, pela confiança em compartilhar os casos de mastocitoma.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica, **Douglas**, **Matheus**, **Aloisio** e **Nathan**, pela ajuda na execução dos exames eritroleucométricos e bioquímico-séricos.

À **Denise Ferraz**, responsável pela Citometria de Fluxo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, pela disposição na realização das análises citofluorométricas.

À **Fabiana Rossetto de Moraes**, responsável pela Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da mesma universidade, pelo auxílio na realização de exames citofluorométricos e análise dos resultados.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (**FCAV**), e todos seus funcionários, pela oportunidade de aprendizado e pelo acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1. Mastocitoma cutâneo canino.....	02
2.2. Células T reguladoras (Tregs).....	08
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivos gerais.....	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Animais.....	13
4.2. Classificação histológica dos mastocitomas.....	13
4.3. Obtenção das amostras de sangue.....	14
4.4. Avaliação quantitativa de células T regs no sangue periférico.....	14
4.5. Análise estatística dos resultados.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1. Avaliação clínico-patológica da população de cães acometidos por mastocitoma cutâneo.....	17
5.2. Quantificação das subpopulações linfocitárias no sangue periférico.....	18
5.2.1. Grupo controle x Grupo mastocitoma.....	18
5.2.2. Mastocitomas de alto grau x Mastocitomas de baixo grau.....	20
5.3. Avaliação da relação Treg/CD8 <sup>+</sup> .....	21
5.3.1. Grupo controle x Grupo mastocitoma.....	21
5.3.2. Mastocitomas de alto grau x Mastocitomas de baixo grau.....	22
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO.....	27

8. REFERÊNCIAS.....	28
APÊNDICES.....	35

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 014352/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Quantificação imunofenotípica de células T regulatórias em cães portadores de mastocitoma cutâneo**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de julho de 2012.

Jaboticabal, 03 de julho de 2012.

  
**Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**  
Coordenador - CEUA

## CÉLULAS T REGULADORAS EM SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMA CUTÂNEO

**RESUMO** – O mastocitoma é uma neoplasia caracterizada pela proliferação de mastócitos e corresponde ao tumor cutâneo mais frequente em cães. Seu comportamento biológico extremamente variável dificulta a determinação prognóstica e terapêutica, o que torna necessário a busca por indicadores prognósticos mais confiáveis. As células T regulatórias (Tregs) constituem um subgrupo dos linfócitos T que expressam CD4 e CD25, e são transcritas pelo fator Foxp3. As Tregs, através de seu potencial imunossupressor, regulam as respostas imunes em diversas enfermidades. Do ponto de vista oncológico, elas são responsáveis pela limitação da resposta imune antitumoral, promovendo uma tolerância imunológica às células neoplásicas mastocitárias. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo quantificar, através da citometria de fluxo, a expressão de Tregs e a relação Treg/CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cães portadores de mastocitoma cutâneo (n = 18) no momento do diagnóstico. Tais variáveis também foram avaliadas entre diferentes graus histológicos de mastocitoma, segundo classificação de Kiupel et al. (2011). Os resultados mostraram que cães portadores de mastocitoma ( $8,99 \pm 1,15$ ) apresentaram porcentagem significativamente maior ( $p < 0,01$ ) de Tregs do que cães saudáveis ( $4,71 \pm 0,51$ ). Não houve diferença nas quantidades de Tregs obtidas para cães portadores de mastocitoma de alto grau ( $5,55 \pm 1,16$ ) e baixo grau ( $4,96 \pm 0,70$ ). Cães com mastocitoma ( $0,27 \pm 0,04$ ) também apresentaram relação Treg/CD8<sup>+</sup> significativamente maior ( $p = 0,04$ ) do que os cães controle ( $0,12 \pm 0,01$ ). Concluiu-se que o mastocitoma em cães leva a um aumento na população de Tregs no sangue periférico, além de propiciar um aumento na relação Treg/CD8<sup>+</sup>.

**Palavras-chave:** cães, células T reguladoras, citometria de fluxo, mastocitoma.

## REGULATORY T CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF DOGS WITH CUTANEOUS MAST CELL TUMOR

**ABSTRACT** – Mast cell tumor is a neoplastic proliferation of mast cells which is the most frequent cutaneous tumor in dogs. Its extremely variable biological behavior makes the prognostic and therapeutic determination more difficult, which demands the search for more reliable prognostic indicators. The regulatory T cells (Tregs) are a subset of T lymphocytes that express CD4 and CD25, and are transcribed by Foxp3 factor. The Tregs, through their immunosuppressive potential, regulate the immune responses in several diseases. Regarding the oncological aspects, they are responsible for the limitation of the antitumoral immune response, promoting an immunological tolerance to the neoplastic mast cells. In this context, the current study had the objective to quantify, through flow cytometry, the expression of Tregs and the Treg/CD8<sup>+</sup> ratio in the peripheral blood of dogs with cutaneous mast cell tumor (n = 18) at diagnosis. Such variables were also evaluated in different histologic grades of mast cell tumor, according to the grading system proposed by Kiupel et al. (2011). The results indicated that dogs with mast cell tumor ( $8,99 \pm 1,15$ ) showed significantly higher percentage ( $p < 0,01$ ) of Tregs when compared to healthy dogs ( $4,71 \pm 0,51$ ). There was not difference in the quantities of Tregs for dogs with high ( $5,55 \pm 1,16$ ) and low ( $4,96 \pm 0,70$ ) grade mast cell tumor. Dogs with mast cell tumor ( $0,27 \pm 0,04$ ) also presented significantly higher Treg/CD8<sup>+</sup> ratio ( $p = 0,04$ ) when compared to control dogs ( $0,12 \pm 0,01$ ). It was concluded that the mast cell tumor in dogs increases Tregs in the peripheral blood, and also leads to a higher Treg/CD8<sup>+</sup> ratio.

**KEYWORDS:** dogs, regulatory T cells, flow cytometry, mast cell tumor.

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> - Sistema de graduação histológica de mastocitomas caninos segundo método de Patnaik et al. (1984).....	04
<b>Tabela 2</b> - Critérios de classificação histológica dos mastocitomas cutâneos caninos sugeridos por Kiupel et al. (2011).....	04
<b>Tabela 3</b> - Sistema de estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde para mastocitomas caninos.....	06
<b>Tabela 4</b> - Relação de isotipos controle e anticorpos utilizados à citometria de fluxo, com seus respectivos fluorocromos e volumes utilizados.....	15

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, de Tregs no sangue periférico de cães saudáveis (controle) e acometidos por mastocitoma (doente).....	18
<b>Figura 2</b> - Modelos representativos dos locais de escolha de cada <i>gate</i> : (A) <i>gate</i> de linfócitos; (B) <i>gate</i> de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e (C) <i>gate</i> de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> (Treg).....	19
<b>Figura 3</b> - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, de células T CD4 <sup>+</sup> (A) e CD8 <sup>+</sup> (B) no sangue periférico de cães controle e acometidos por mastocitoma (doentes).....	20
<b>Figura 4</b> - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, obtidos para Tregs em cães acometidos por mastocitoma de alto grau e baixo grau.....	21
<b>Figura 5</b> - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, de células T CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães acometidos por mastocitoma de alto grau e baixo grau.....	21
<b>Figura 6</b> - Distribuição dos valores médios, e respectivos erros padrões, obtidos para a relação Treg/CD8 <sup>+</sup> em cães controle e acometidos por mastocitoma (doentes).....	22
<b>Figura 7</b> - Distribuição dos valores médios, e respectivos erros padrões, obtidos para a relação Treg/CD8 <sup>+</sup> em cães acometidos por mastocitoma de alto grau e baixo grau.....	23

## 1. INTRODUÇÃO

As células T reguladoras (Tregs) integram um grupo distinto de células T CD4<sup>+</sup>, com propriedades imunossupressoras, relacionadas à prevenção de respostas autoimunes. Estas células são, atualmente, alvos de pesquisas que especulam sua função como reguladoras de respostas imunes em condições fisiológicas, bem como em diversas situações patológicas.

Diversos estudos em humanos têm evidenciado um aumento na porcentagem de Tregs em sangue periférico, linfonodos sentinela e no sítio tumoral em casos de doenças oncológicas, fato geralmente relacionado com prognóstico desfavorável. Em neoplasias que acometem os cães (carcinomas, linfomas, melanoma, osteossarcoma) a participação das Tregs vem sendo bastante estudada nos últimos anos, objetivando a busca por novos fatores prognósticos, e possivelmente, formas complementares de tratamento. Entretanto, o comportamento das supracitadas células, em cães portadores de mastocitomas, carece de consistência e de documentação.

O mastocitoma é uma neoplasia de alta incidência na prática médico-oncológica veterinária, apresentando a terceira maior frequência dentre as neoplasias cutâneas na espécie canina. A variabilidade de seu comportamento biológico, torna desafiadora a predição da melhor conduta a ser tomada. Em função disso, faz-se necessária a condução de estudos mais detalhados com relação ao seu comportamento biológico e a busca de indicadores prognósticos mais confiáveis.

O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente a expressão de Tregs no sangue periférico de cães portadores de mastocitoma cutâneo, no momento do diagnóstico, e sua correlação com a graduação histológica, com vistas à uma melhor compreensão do comportamento das referidas células, em tais pacientes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Mastocitoma cutâneo canino

O mastocitoma cutâneo é caracterizado por uma proliferação de mastócitos neoplásicos (THAMM; VAIL, 2007), e apresenta-se como um tumor cutâneo muito frequente em cães, representando cerca de 11% (VILLAMIL et al., 2011) do total dessas neoplasias. Estudos brasileiros relatam frequência entre 20,9% (SOUZA et al., 2006) e 22,4% (MEIRELLES et al., 2010), sendo considerada a segunda neoplasia maligna mais frequente em cães (DE NARDI et al., 2002), atrás somente das neoplasias mamárias.

A etiologia e a causa de sua alta morbidade são pouco compreendidas, sugerindo-se exposição à substâncias irritantes e inflamações crônicas como fatores predisponentes (DALECK et al., 2009). Além disso, alguns autores evidenciaram, em seus ensaios, que a mutação no gene c-KIT também pode contribuir para o desenvolvimento da doença (ZEMKE et al., 2002; WEBSTER et al., 2007).

A neoplasia mastocitária ocorre com maior frequência em animais idosos, podendo ser observada também em cães de diversas idades (THAMM; VAIL, 2007; DALECK et al., 2009). Não há predileção sexual, mas já está bem estabelecida a predisposição de algumas raças, como Boxer, Boston Terrier, Bulldog, Labrador e Beagle (DOBSON; SCASE, 2007; COSTA-CASAGRANDE et al., 2008). Animais sem raça definida também apresentam incidência de mastocitoma bastante importante na rotina oncológica veterinária brasileira (HUPPES et al., 2013). A raça Boxer, apesar da sua predisposição, tende a apresentar graus histológicos mais baixos, com um prognóstico mais favorável (WELLE et al., 2008). O mastocitoma desenvolve-se com maior frequência no tronco ou períneo (50%), seguido por extremidades (40%) e regiões de cabeça e pescoço (10%) (COUTO, 2006; DALECK et al., 2009). No estudo realizado por Huppés et al. (2013), os locais com maior ocorrência de mastocitoma foram os membros, seguidos por formações tumorais dispersas.

A apresentação clínica do tumor é muito variável (DOBSON; SCASE, 2007), mas, na maioria das vezes, apresenta-se como nódulos solitários, ainda que 11 a 14% dos animais podem apresentá-lo sob a forma de múltiplas lesões (THAMM; VAIL, 2007; DALECK et al., 2009).

Além dos sinais cutâneos é comum o aparecimento de síndromes paraneoplásicas decorrentes da liberação de aminas vasoativas na circulação, conseqüente à degranulação dos mastócitos (THAMM; VAIL, 2007). Nesse sentido, é oportuno lembrar que mastócitos maduros apresentam grânulos intracitoplasmáticos que estocam mediadores da inflamação tais como histamina, proteases, fatores quimiotáticos, citocinas e metabólitos do ácido araquidônico (WELLE et al., 2008; BLACKWOOD et al., 2012). Os maiores efeitos da degranulação dos mastócitos são observados no trato gastrintestinal, onde pode ocorrer ulceração, levando à anorexia, melena, anemia e até mesmo, perfuração intestinal (DOBSON; SCASE, 2007; WELLE et al., 2008).

O diagnóstico do mastocitoma está fundamentado no exame físico, invariavelmente complementado por achados citopatológicos e histopatológicos. A citologia aspirativa por agulha fina é considerada o método mais simples para se diagnosticar o mastocitoma, por ser pouco invasiva, de baixo risco para o paciente e de reduzida agressão ao processo neoplásico (SANTANA et al., 2009).

Citologicamente, os mastocitomas integram o grupo das neoplasias de células redondas, apresentando núcleos redondos a levemente ovais, cromatina finamente puntiforme e moderada quantidade de citoplasma, o qual contém pequenos grânulos arroxeados, evidenciados por corantes do tipo Romanowsky (DENICOLA, 2009).

Já o exame histopatológico é o procedimento para confirmação diagnóstica e determinação do grau do tumor, predizendo seu provável comportamento biológico e auxiliando na previsão prognóstica e conduta terapêutica (KIUPEL et al., 2011).

O método de graduação histológica mais tradicional é o de Patnaik et al. (1984), o qual classifica os mastocitomas em 3 diferentes graus, onde o grau I corresponde a um tumor diferenciado, o grau II a um tumor moderadamente diferenciado e o grau III a um tumor indiferenciado (Tabela 1). Este sistema de classificação, por ser baseado em critérios subjetivos, gera muita variabilidade nos

resultados (NORTHUP et al., 2005), e a tendência é que, quanto maior o número de observadores, maior a discordância entre eles (PINCZOWSKI et al., 2008).

**Tabela 1** - Sistema de graduação histológica de mastocitomas caninos segundo método de Patnaik et al. (1984)

<b>Grau I</b>	Mastócitos uniformes, de ovóides a arredondados, núcleos excêntricos, com cromatina densa, ausência de figuras de mitose e necrose.
<b>Grau II</b>	Aumento da celularidade, pleomorfismo celular moderado, as células podem invadir subcutâneo e eventualmente tecidos profundos, apresentam de 0-2 figuras de mitose (por campo microscópico de grande aumento) e podem conter áreas de edema e necrose
<b>Grau III</b>	Células com alto grau de anaplasia, células multinucleadas, núcleos de tamanhos variáveis, muitas figuras de mitose e atípicas, células invadindo tecidos mais profundos

Buscando uma graduação histológica mais precisa e menos propensa a variações, um novo sistema foi proposto por Kiupel et al. (2011), o qual apresenta critérios mais objetivos. Esta proposta de graduação apresenta apenas 2 graus histológicos (baixo grau e alto grau) e os critérios de classificação, quantitativamente determinados, foram baseados em achados morfológicos das células neoplásicas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Critérios de classificação histológica dos mastocitomas cutâneos caninos sugeridos por Kiupel et al. (2011)

<b>Critérios</b>	<b>Quantidade</b>
Figuras de mitose	7 em 10 cga/400x
Células multinucleadas (3 núcleos ou mais)	≥ 3 em 10 cga/400x
Núcleos bizarros (acentuadamente atípicos e pleomórficos)	≥ 3 em 10 cga/400x
Cariomegalia	pelo menos 10% das células neoplásicas

cga = campo de grande aumento

Os mastocitomas de alto grau são caracterizados a partir da presença de um ou mais dos critérios descritos na Tabela 2. Já os de baixo grau correspondem àqueles cujas características histológicas não se encaixam nos critérios abordados (KIUPEL et al., 2011).

O tratamento primário inclui ressecção cirúrgica, associada ou não à quimioterapia antineoplásica. Atualmente, os fármacos mais utilizados para o tratamento do mastocitoma em cães são vimblastina e prednisona, lomustina ou a associação de vimblastina com lomustina (HAYES et al., 2007). A determinação do melhor protocolo terapêutico a ser adotado depende da graduação histológica, do estadiamento clínico (tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos e presença de metástase a distância), e demais fatores prognósticos tais como a raça, localização, velocidade de crescimento, entre outros (DALECK et al., 2009). Entretanto, a variação do comportamento biológico do mastocitoma dentro de um mesmo grau histológico torna difícil a predição da melhor conduta a ser tomada (COOPER et al., 2009; STREFEZZI et al., 2010).

Recentemente, estratégias terapêuticas complementares têm sido estudadas para o tratamento de mastocitomas cutâneos caninos. Jark et al. (2012) relatam o uso de inibidores de tirosina-quinase (toceranib, imatinib e masitinib) no tratamento dos mastocitomas, com o objetivo de evitar a proliferação celular, inibindo assim a angiogênese.

Diante da variabilidade clínica do tumor, muitos fatores prognósticos são utilizados para prever seu comportamento. A graduação histológica é o fator mais consistente (WELLE et al., 2008; KIUPEL et al., 2011), mas alguns autores sustentam que a localização tumoral também pode ser utilizada pra prever este comportamento (KIUPEL et al., 2004; O'CONNELL; THOMSON, 2013). Tumores que se desenvolvem nas regiões prepucial, inguinal, subungueal e mucocutâneas (cavidade oral e períneo) tendem a ser mais agressivos (THAMM; VAIL, 2007, O'CONNELL; THOMSON, 2013). A velocidade de crescimento e a presença de ulceração (MULLINS et al., 2006; HANH et al., 2010), assim como o estágio clínico avançado e a presença de metástases no momento do diagnóstico (MURPHY et al., 2006), também estão correlacionados a um pior prognóstico.

O estadiamento clínico utilizado para cães acometidos por mastocitoma cutâneo baseia-se no sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (THAMM; VAIL, 2007) como expressado na Tabela 3.

**Tabela 3** - Sistema de estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde para mastocitomas caninos.

Estadio	Descrição
0	Um tumor incompletamente excisado da derme, identificado histologicamente, sem envolvimento do linfonodo regional. 0a: Sem sinais sistêmicos 0b: Com sinais sistêmicos
I	Um tumor confinado à derme, sem envolvimento do linfonodo regional. Ia: Sem sinais sistêmicos Ib: Com sinais sistêmicos
II	Um tumor confinado à derme, com envolvimento do linfonodo regional. IIa: Sem sinais sistêmicos IIb: Com sinais sistêmicos
III	Múltiplos tumores dérmicos; tumores grandes e infiltrativos, com ou sem envolvimento do linfonodo regional. IIIa: Sem sinais sistêmicos IIIb: Com sinais sistêmicos
IV	Qualquer tumor com metástases à distância, incluindo envolvimento do sangue periférico ou medula óssea

Apesar da falta de consenso entre diferentes autores, a apresentação clínica de uma ou múltiplas formações tumorais, no mesmo paciente, também pode ser usada como um possível fator prognóstico (PREZIOSI et al., 2007).

O índice mitótico presente na avaliação histopatológica também é um importante fator prognóstico para mastocitomas cutâneos (ROMANSIK et al., 2007; ELSTON et al., 2009). Os autores associam índices mitóticos como sendo uma condicionante a um menor tempo de sobrevivência dos animais em estudo.

A proteína KIT tem sido considerada um importante fator prognóstico de mastocitoma cutâneo em cães. De acordo com os padrões de imunomarcagem de KIT, os mastocitomas são divididos em três grupos. O padrão KIT I é determinado

por uma marcação perimembranosa, e não está associado a recorrência da doença ou diminuição no tempo de sobrevida. Já os padrões KIT II e KIT III (marcação citoplasmática focal e difusa, respectivamente), estão associados ao aumento da taxa de recorrência e diminuição da sobrevida dos pacientes acometidos (KIUPEL et al., 2004).

Outro marcador imuno-histoquímico com grande valor prognóstico para cães com mastocitoma cutâneo é o Ki-67 (VASCELLARI et al., 2012). Este marcador representa uma proteína nuclear expressa nas fases ativas do ciclo celular, sendo assim determinada como um índice de proliferação celular (SCHOLZEN, GERDES, 2000). Webster et al. (2007) determinaram o valor de corte para o índice Ki-67 como 23 células imunopositivas por campo. Segundo estes autores, cães com valores de Ki-67 acima de 23 apresentaram menor tempo de sobrevida e maior taxa de recorrência local e metástases à distância do que aqueles com valores inferiores a 23 por campo.

Recentemente, houve um encontro de médicos veterinários pesquisadores na Unesp, campus de Jaboticabal, no qual o mastocitoma cutâneo canino foi o tema. Após 3 dias de discussão, a equipe de pesquisadores e os médicos veterinários presentes chegaram a um consenso sobre o tema (em fase de publicação). Nesse consenso, foi determinado que a análise citológica deve ser utilizada somente para o diagnóstico dos mastocitomas, não sendo utilizada para graduação do tumor. Além disso, foi indicado que os mastocitomas cutâneos caninos fossem classificados com ambas as propostas de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011), indicando também o índice mitótico em 10 campos de grande aumento/400x, de acordo com a metodologia empregada nos trabalhos de Romansik et al. (2007) ( $\leq 5$  e  $> 5$  figuras de mitose) ou Elston et al. (2009) (0; 1-7 e  $> 7$  figuras de mitose), citando-se a fonte de referência no laudo.

Diferentemente dos mastocitomas cutâneos, que se originam na derme e se estendem para tecidos profundos, existe um grupo de mastocitomas que se restringe apenas ao tecido adiposo subcutâneo, o qual apresenta comportamento biológico menos agressivo e melhor prognóstico (NEWMAN et al., 2007), o qual não será abordado no estudo em tela.

## 2.2. Células T reguladoras (Tregs)

O sistema imune atua na defesa do hospedeiro contra patógenos e células alteradas, como no caso do câncer. A imunidade inata, representada principalmente pelas células dentríticas, macrófagos e células *natural killer* (NK), atua como a primeira linha de defesa. Já a imunidade adaptativa, que consiste nos linfócitos T, linfócitos B e seus mediadores humorais (citocinas e anticorpos), atinge excelente especificidade através do rearranjo somático de receptores antigênicos em cada linhagem de linfócito (NARENDRA et al., 2013).

O principal mecanismo imunológico que contribui para tal se dá por meio do reconhecimento de antígenos tumorais via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, onde linfócitos T naíve se tornam células T efetoras. As células CD8<sup>+</sup> citotóxicas, ao reconhecerem os peptídeos apresentados pelo complexo MHC-I, iniciam a produção de citocinas, como IFN- $\gamma$  e outras moléculas efetoras (perforinas e granzima-B), as quais possuem atividade citolítica em células alvo (ABBAS, LICHTMAN, 2008).

As células CD4<sup>+</sup> representam uma subpopulação celular heterogênea, que pode apresentar diferentes fenótipos. Células T<sub>H1</sub> CD4<sup>+</sup>, secretam citocinas (principalmente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2), que corroboram com a função citotóxica das células CD8<sup>+</sup>, beneficiando a imunidade antitumoral. Entretanto, células T<sub>H2</sub>, que expressam altos níveis de IL-4, -5, -6, -10 e -13, podem induzir anergia das células T, impedindo a imunidade celular antitumoral, além de aumentar a resposta humoral pró-tumor, promovendo a resposta imune humoral pelas células B. Em contraste às células T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub>, que representam produtos finais da diferenciação de células CD4<sup>+</sup> naíve, outras subpopulações CD4<sup>+</sup>, como T<sub>H17</sub> e células T reguladoras (Treg), são capazes de transdiferenciação, de acordo com o estímulo recebido (NARENDRA et al., 2013).

A plasticidade das células T<sub>H17</sub> permite que elas desempenhem um duplo papel no câncer (CHEN, OPPENHEIM, 2014). Suas citocinas podem tanto fornecer suporte ao desenvolvimento tumoral, promovendo a angiogênese (MARTIN et al., 2012), quanto contribuir com a resposta imune anti-tumoral, através da

transdiferenciação em uma progênie do tipo T<sub>H</sub>1, liberando IFN- $\gamma$  e recrutando células CD8<sup>+</sup> citotóxicas (MARTIN-OROZCO et al., 2009).

Já as Tregs representam um grupo distinto de linfócitos CD4<sup>+</sup> com propriedades imunossupressoras (BILLER et al., 2007). Recentemente, Ye et al. (2011), utilizando T<sub>H</sub>17 clonados a partir de células CD4<sup>+</sup> de diferentes cânceres humanos, identificaram um processo de transdiferenciação onde as células T<sub>H</sub>17 poderiam expressar Foxp3, passando a atuar como Treg.

Em pacientes com câncer, o sistema imune antitumoral não exerce seu desempenho ideal. Antígenos tumorais podem não ser detectados; células dendríticas e células T podem reconhecer os antígenos como próprios, criando respostas de células T reguladoras ao invés de respostas efetoras; ou mais importante, fatores no microambiente tumoral podem suprimir as células T efetoras que foram produzidas (MOTZ; COUKOS, 2013).

Os primeiros relatos da existência de uma célula T supressora datam do final dos anos 60. Após algumas décadas de estudos, Sakaguchi et al. (1995) fizeram uma descoberta marcante e descreveram uma população distinta de células CD4<sup>+</sup> que expressava a cadeia  $\alpha$  do receptor da interleucina (IL)-2 (CD25) capaz de prevenir doenças autoimunes.

Do ponto de vista molecular, demonstrou-se que o fator de transcrição Foxp3 é um gene fundamental no desenvolvimento e na função das Tregs, tornando assim um marcador intracelular específico para estas células (FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003; COOLS et al., 2007; BANHAM et al., 2009; KIM et al., 2012). O fator Foxp3 é expresso em Tregs CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> de ratos, e sua contínua expressão é essencial para a estabilidade da linhagem Treg (BANERJEE et al., 2013). Em cães, as Tregs foram identificadas utilizando-se anticorpos específicos anti-CD4 canino e Foxp3 murino (BILLER et al., 2007; KEPPEL et al., 2008; BANHAM et al., 2009; HORIUCHI et al., 2009 ; O'NEILL et al., 2009, TOMINAGA et al., 2010).

Tais células são alvos de intensas pesquisas, focando particularmente sua função como reguladoras da resposta imune fisiológica e sua participação em diversas enfermidades infecciosas, alérgicas, neoplásicas, autoimunes, bem como seu papel na imunologia dos transplantes (COOLS et al., 2007; CRUVINEL et al., 2008; HA, 2009).

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

A ausência destas células implica diretamente no surgimento de doenças autoimunes, além de potencializar a resposta imune contra aloantígenos e tumores (SAKAGUCHI et al., 2001; SHEVACH, 2002).

De outra parte, no câncer, as Tregs parecem estar envolvidas no mecanismo de escape dos tumores do sistema imune do hospedeiro (NISHIKAWA; SAKAGUCHI, 2010). As Tregs regulam negativamente as respostas imunes (CRUVINEL et al., 2008), modulando a imunidade antitumoral e permitindo a progressão do câncer (FACCIABENE et al., 2012). Estas células também são responsáveis pela inibição da atuação das células  $CD8^+$ , as quais são responsáveis pela lise das células tumorais (FINN, 2008). Entretanto, este papel das células Tregs não é bem documentado na veterinária.

Biller et al. (2007) e O'Neill et al. (2009) observaram um número significativamente maior de Tregs em cães com câncer em relação aos animais saudáveis. De acordo com O'Neill et al. (2009) as maiores porcentagens de Tregs foram observadas em cães com carcinoma, seguidas de sarcoma, linfoma e mastocitoma. Resultados semelhantes foram encontrados por Tominaga et al. (2010), os quais observaram uma maior porcentagem de Tregs no sangue periférico de cães portadores de melanoma em cavidade oral, quando comparados aos animais controle.

No estudo de cães com linfoma multicêntrico, também se observa um aumento significativo da porcentagem de Tregs em sangue periférico, quando comparados aos cães clinicamente saudáveis (ANAI et al., 2013; MUNHOZ, 2013). Munhoz (2013) também notou uma diminuição significativa das Tregs, assemelhando-se ao grupo controle, após a 5ª semana de tratamento quimioterápico com o protocolo de Madison-Wisconsin.

As células T reguladoras também apresentaram-se numericamente aumentadas no sangue periférico de cães com metástases quando comparadas às daqueles sem metástases, sendo que nos pacientes com tumores em estágios mais avançados, também ocorreu aumento destas células (O'NEILL et al., 2009). Tal achado sugere que as Tregs promovem a imunotolerância às células tumorais por suprimirem a imunidade tipo I, o que poderia favorecer o aparecimento de metástases (HORIUCHI et al., 2009).

Em cães com câncer, o aumento da relação Treg/CD8<sup>+</sup> no sangue periférico está relacionado a um pior prognóstico. No estudo de cães com osteossarcoma, esta alta relação foi associada a um menor tempo de sobrevivência (BILLER et al., 2010). Este fato deve-se, possivelmente, à redução numérica das células CD8<sup>+</sup> em contrapartida ao aumento das Tregs, favorecendo assim a imunossupressão (O'NEILL et al., 2009).

A dualidade das células T reguladoras nos cânceres requer um número maior de estudos a fim de melhorar sua compreensão. Adicionalmente, os mastocitomas cutâneos em cães podem apresentar comportamento biológico imprevisível, mesmo quando classificados sob os critérios de Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). Conhecer a importância das Tregs nos mastocitomas cutâneos caninos pode auxiliar como um critério adicional para prever a evolução do caso.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Neste estudo objetivou-se quantificar, por intermédio da citometria de fluxo, as células T reguladoras no sangue periférico de cães com mastocitoma, no momento do diagnóstico.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Caraterizar, de forma clínico-patológica, a população de cães acometidos por mastocitoma cutâneo;

Comparar a expressão de Tregs e avaliar a relação Treg/CD8<sup>+</sup> em cães portadores de mastocitoma e cães saudáveis;

Comparar a expressão de Tregs e avaliar a relação Treg/CD8<sup>+</sup> em diferentes graus histológicos do mastocitoma, segundo a classificação de Kiupel et al. (2011).

Quantificar e comparar as subpopulações linfocitárias (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) em cães portadores de mastocitoma e cães saudáveis.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Neste estudo foram utilizados 16 cães, machos ou fêmeas, de diferentes raças, pesos e idades, atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, bem como no Centro Avançado em Veterinária, Ribeirão Preto, com diagnóstico clínico, citológico e histopatológico de mastocitoma cutâneo (denominado grupo doente). Por outro lado, 10 animais saudáveis, machos ou fêmeas, de diferentes raças, pesos e idades, compuseram o grupo controle. As avaliações clínicas e laboratoriais, incluindo o hemograma, e morfofuncionalidades renal e hepática, foram conduzidas com o fito de avaliar o estado de saúde dos animais doentes e controle, em momento único. Dados individuais obtidos para as diferentes variáveis biológicas em animais controle e portadores de mastocitoma encontram-se nos Apêndices A e B, respectivamente.

A inclusão de todas as parcelas experimentais, neste ensaio, foi feita mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por parte dos proprietários.

O protocolo experimental foi submetido, analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob o número 014352/12.

### **4.2. Classificação histológica dos mastocitomas**

Inicialmente, todos os casos atendidos junto às instituições previamente mencionadas e com relação aos quais havia suspeita de mastocitoma, eram submetidos a exames de preparações citoscópicas, obtidas por punção aspirativa por agulha fina. Após o estabelecimento do diagnóstico citológico, realizou-se biópsia para colheita de amostras teciduais da formação tumoral, cujos fragmentos amostrais foram então fixados em solução de formol a 10% tamponado (pH 7,6). Após processamento histológico de rotina, os cortes eram avaliados por patologistas

do Laboratório VETPAT de Campinas/SP e pela patologista Geórgia Modé Magalhães (Ribeirão Preto/SP), cuja confirmação diagnóstica e classificação seguiram os fundamentos sugeridos por Kiupel et al. (2011). Optou-se por esta classificação por tratar-se de método atual de classificação de mastocitomas, dotado de critérios objetivos, portanto propenso a uma menor variação. Para os animais que apresentavam mais de um nódulo, considerou-se, para efeito de inclusão no ensaio, aquele de maior grau histológico.

#### **4.3. Obtenção das amostras de sangue**

Antes de qualquer procedimento cirúrgico ou quimioterápico, os cães com mastocitoma foram avaliados clinicamente, e amostras de sangue foram obtidas por venipunção jugular. De acordo com o porte do animal, no mínimo 6 e no máximo 20 mL de sangue foram colhidos e armazenados em tubos à vácuo heparinizados, para posterior análise citofluorométrica. Já, para exames eritroleucométricos e bioquímico-séricos, aliquotizaram-se 2 mL em EDTA K3, para obtenção do hemograma; e 2 mL sem anticoagulante, para sinérese e obtenção da fase sérica para os exames bioquímicos. Da mesma forma, volume semelhante de sangue foi obtido e aliquotizado nos diferentes tubos, para avaliação dos animais controles.

#### **4.4. Avaliação quantitativa de células T regs no sangue periférico**

A avaliação das Tregs no sangue periférico foi realizada de acordo com a técnica de Biller et al.(2007), adaptada, e descrita a seguir.

As células mononucleares foram isoladas a partir do sangue colhido em tubo heparinizado (conforme descrito no item 4.3). A referida amostra de sangue foi diluída (v:v) em PBS estéril (preparado a partir de PBS 10X solution, Hexapur<sup>®</sup>) e suas células separadas em gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE<sup>®</sup> Healthcare, Suécia). Após 30 minutos de centrifugação a 340 g, a 18°C, o anel de células mononucleares foi coletado, ressuspenso em PBS e centrifugado a 340 g por 10 minutos (18°C). Descartado o sobrenadante, o botão de células foi ressuspenso em 2 mL de tampão de lise para hemácias ACK (NH<sub>4</sub>Cl – 0,15M, KHCO<sub>3</sub> – 10mM, EDTA

– 0,1mM; pH=7,3), e homogeneizado por 5 minutos. A solução foi novamente lavada em PBS e centrifugada. O sobrenadante foi ressuspenso em 1 mL de PBS e as células foram, posteriormente, diluídas (1:20) em azul de tripan 0,5% e contadas em câmara de Neubauer. Para cada animal foram aliquoteados 6 tubos, sendo: tubo 1 – somente células sem marcação; tubo 2 – células marcadas com os isotipos controles; tubo 3 – células marcadas com os anticorpos CD4:FITC, PanT APC e CD8:PE; tubo 4 – somente células sem marcação; tubo 5 – células marcadas com os isotipos controles descritos anteriormente; tubo 6 – células marcadas com os anticorpos CD4:FITC, PanT APC e Foxp3 PE. Os isotipos controle e os anticorpos utilizados acham-se listados na Tabela 4. Nos tubos 1, 2 e 3 foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células, e nos demais (4, 5 e 6), utilizaram-se  $2 \times 10^6$  células. As células dos tubos 4, 5 e 6 passaram pelo processo de permeabilização de membrana, utilizando-se soluções de permeabilização/fixação e de permeabilização (eBioscience®, ref 00-5521-00), de acordo com as recomendações do fabricante. Antes de cada marcação, membranária ou intracitoplasmática, 5  $\mu$ L de soro autólogo (previamente incubado em banho-maria a 56°C por 30 minutos), eram acrescentados em cada tubo para bloqueio de reações inespecíficas, e incubados por 30 e 15 minutos, respectivamente. Após lavagem das células e centrifugação pós-marcação, 100  $\mu$ L de solução PBS-formol 1% eram adicionados à preparação, para conservação das células.

**Tabela 4** - Relação de isotipos controle e anticorpos utilizados à citometria de fluxo, com seus respectivos fluorocromos e volumes utilizados.

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

As análises citofluorométricas foram realizadas num prazo máximo de 24 horas após a coleta do sangue.

As células mononucleares, em suspensão, foram identificadas e quantificadas pelo tamanho, granularidade interna e intensidade de fluorescência, em citômetro de fluxo, empregando-se antígenos de identificação de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e detecção intracelular de FoxP3<sup>+</sup>.

As quantificações celulares foram adquiridas em FACSCanto II (BD<sup>®</sup>), junto ao Laboratório de Citometria de Fluxo, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. No mínimo 50.000 eventos foram registrados por tubo e analisados pelo software FacsDiva.

#### **4.5. Análise estatística dos resultados**

O Teste-t, de amostras independentes, foi utilizado para estabelecer a comparação entre as médias de dois grupos distintos, quando estes atendiam às condições de normalidade e homogeneidade. Quando as referidas condições não foram atendidas, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa Prism (GraphPad Prism 4, San Diego, CA, USA). Para todas as variáveis estudadas, considerou-se o valor de  $p < 0,05$  (ZAR, 1999) como sendo significativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação clínico-patológica da população de cães acometidos por mastocitoma cutâneo

Os cães portadores de mastocitoma incluídos neste ensaio apresentaram média de idade de 8,5 anos, variando de 3 a 13 anos. Seis raças foram identificadas, sendo que os animais da raça Pitbull e aqueles sem raça definida (SRD), foram os mais acometidos (5/16 cada), seguidos por Pinscher e Boxer (2/16 cada), Labrador e Fox Paulistinha, com um exemplar de cada (1/16). Verificou-se, neste experimento, predomínio de fêmeas (68,75%) em comparação aos machos (31,25%).

A apresentação clínica mais comum do mastocitoma, verificada no experimento em tela, foi a de nódulos únicos (12/16). Um cão apresentou 2 nódulos e três apresentaram múltiplos nódulos. Dentre os animais que apresentaram somente um nódulo, as localizações mais comuns incluíram membros (5/12), tórax (2/12), mama (2/12), região inguinal (2/12) e abdômen (1/12).

A avaliação das diferentes características hematológicas dos cães portadores de mastocitoma revelou valores médios dentro da amplitude de normalidade referida, por diversos autores, para a espécie canina, sem alterações significativas. Em nenhuma das parcelas experimentais foi observada a presença de mastócitos circulantes. Da mesma maneira, os valores bioquímico-séricos mantiveram-se dentro da amplitude de normalidade para cães.

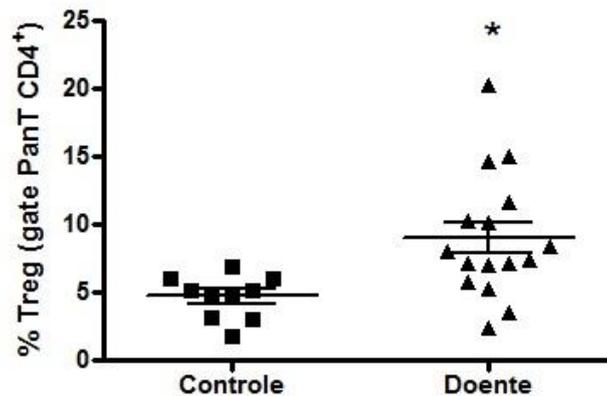
A análise histopatológica das amostras de mastocitomas (n=16) revelou 8 mastocitomas de alto grau e 8 de baixo grau. Vale lembrar que para os animais que apresentaram mais de um nódulo, foi incluído no estudo aquele de maior graduação.

## 5.2. Quantificação das subpopulações linfocitárias no sangue periférico

Valores individuais das subpopulações celulares Treg, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos cães do grupo controle e dos portadores de mastocitoma (alto grau e baixo grau) estão apresentados nos Apêndices C, D e E.

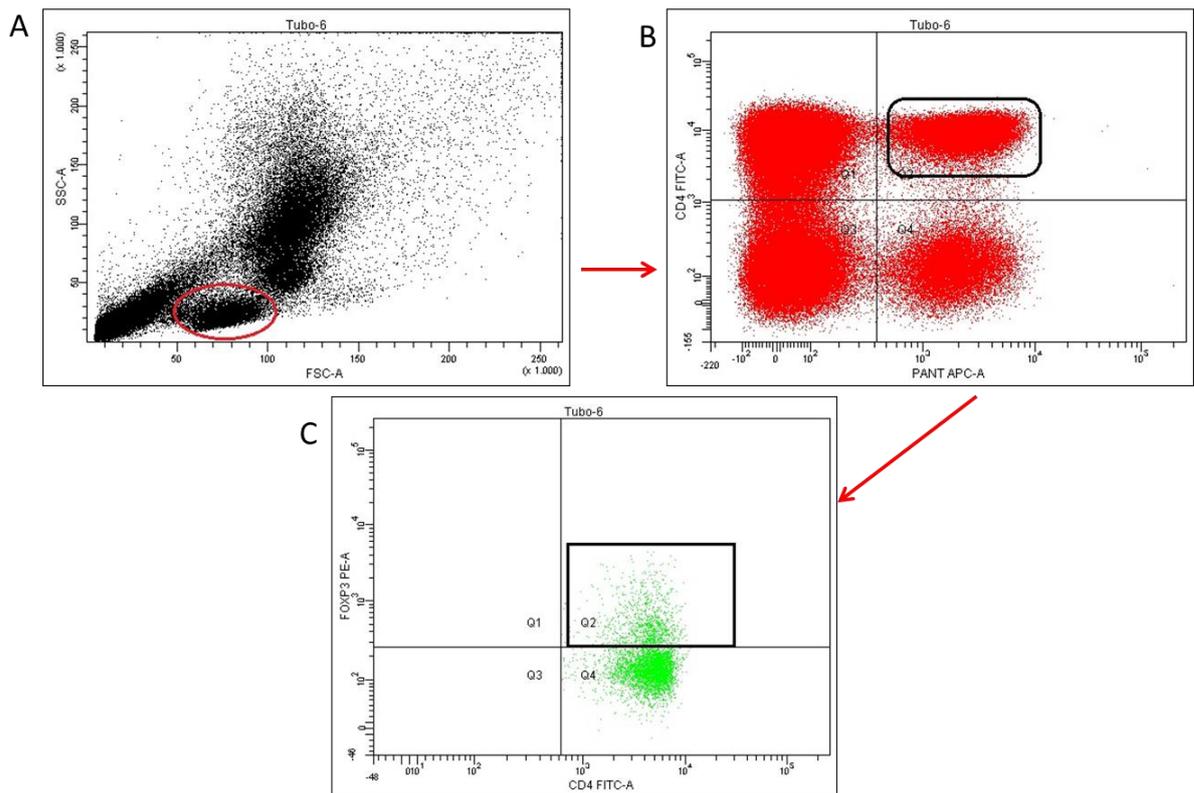
### 5.2.1. Grupo controle x Grupo mastocitoma

Cães com mastocitoma cutâneo apresentaram porcentagens significativamente maiores ( $p < 0,01$ ) de Tregs ( $8,99 \pm 1,15$ ), quando comparados àqueles do grupo controle ( $4,71 \pm 0,51$ ), cujas médias e respectivos erros padrões dos referidos grupos, estão apresentados na Figura 1.



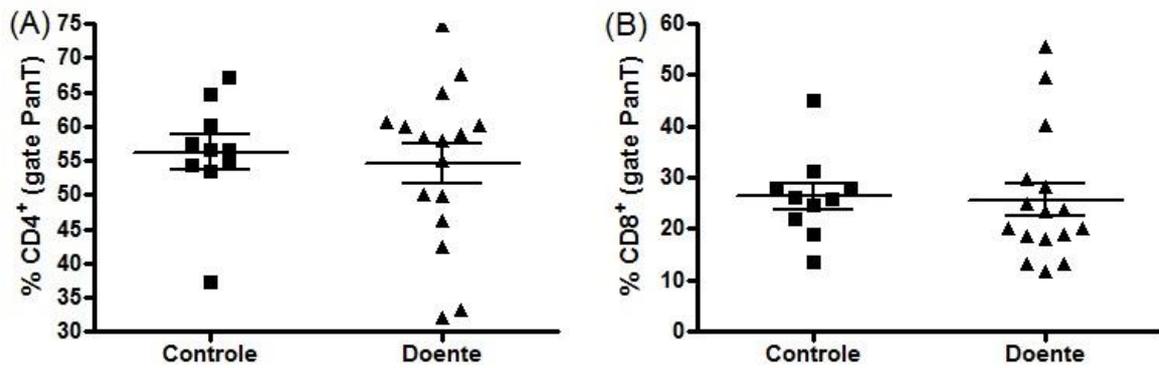
**Figura 1** - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, de Tregs no sangue periférico de cães saudáveis (controle) e acometidos por mastocitoma (doente).

A quantificação de Tregs foi realizada a partir do *gate* PanT CD4<sup>+</sup>, de acordo com suas características imunofenotípicas. A Figura 2 representa o local de escolha de cada *gate* a partir dos gráficos de distribuição de células.



**Figura 2** - Modelos representativos dos locais de escolha de cada *gate*: (A) *gate* de linfócitos; (B) *gate* de linfócitos CD4<sup>+</sup> e (C) *gate* de linfócitos CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Treg).

Na avaliação das populações celulares CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, a média das porcentagens não diferiu entre animais portadores de mastocitoma ( $54,53 \pm 2,93$ ;  $25,59 \pm 3,17$ , respectivamente) e animais do controle ( $56,23 \pm 2,53$ ;  $26,33 \pm 2,64$ , respectivamente). Entretanto, o grupo controle apresentou médias ligeiramente superiores (Figura 3).



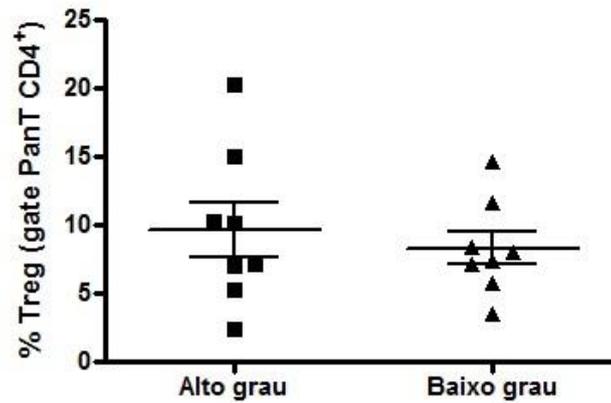
**Figura 3** - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, de células CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) no sangue periférico de cães controle e acometidos por mastocitoma (doentes).

Quando transformadas em valores absolutos, a partir da contagem global de leucócitos e relativa para linfócitos, as subpopulações linfocitárias de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> também não apresentaram alterações quantitativas significativas.

### 5.2.2. Mastocitomas de alto grau x Mastocitomas de baixo grau

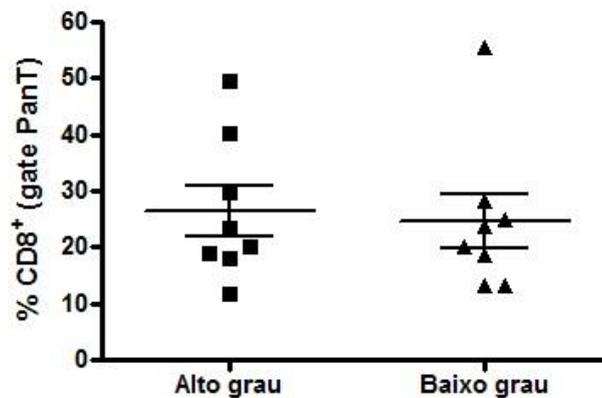
No estudo comparativo entre diferentes graus de mastocitoma, dois animais foram excluídos da avaliação estatística, posto que não foram submetidos a tempo ao exame histopatológico. Tal comparação foi realizada, então, com base nos 16 cães portadores de mastocitoma, sendo 8 classificados como alto grau e 8 como baixo grau.

Os valores percentuais médios, e respectivos erros padrões, obtidos para Tregs de mastocitomas de alto grau ( $5,55 \pm 1,16$ ) e baixo grau ( $4,96 \pm 0,70$ ) não diferiram estatisticamente ( $p = 0,56$ ), apesar dos valores médios destes serem ligeiramente menores que os daqueles (Figura 4).



**Figura 4** - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, obtidos para Tregs em cães acometidos por mastocitoma de alto grau e baixo grau.

As contagens, percentuais ou absolutas, de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> também não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos de baixo e alto grau. Entretanto, na avaliação das células CD8<sup>+</sup> um animal do grupo baixo grau se destacou por apresentar valores mais elevados que os demais, como mostra a Figura 5.



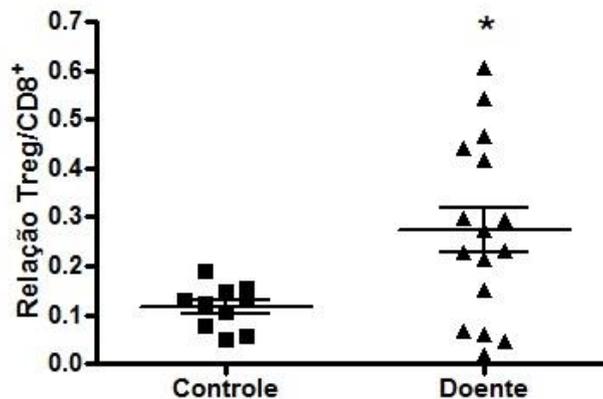
**Figura 5** - Distribuição percentual das médias, e respectivos erros padrões, de células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cães acometidos por mastocitoma de alto grau e baixo grau.

### 5.3. Avaliação da relação Treg/CD8<sup>+</sup>

#### 5.3.1. Grupo controle x Grupo mastocitoma

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

A avaliação da relação Treg/CD8<sup>+</sup>, em cães acometidos por mastocitoma cutâneo evidenciou que o grupo de animais doentes apresentou quociente significativamente elevado ( $0,27 \pm 0,04$ ) quando comparado ao grupo controle ( $0,12 \pm 0,01$ ), como ilustrado na Figura 6.

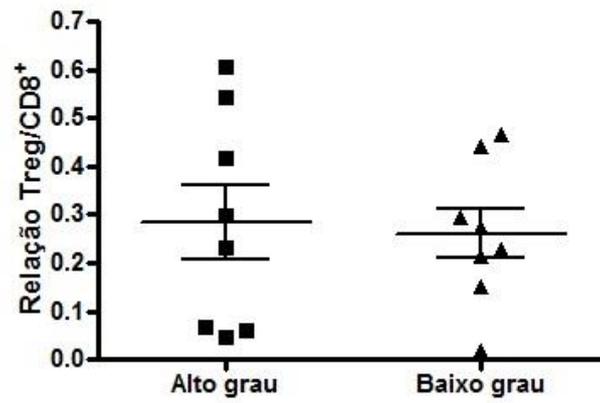


**Figura 6** - Distribuição dos valores médios, e respectivos erros padrões, obtidos para a relação Treg/CD8<sup>+</sup> em cães controle e acometidos por mastocitoma (doentes).

### 5.3.2. Mastocitomas de alto grau x Mastocitomas de baixo grau

A relação Treg/CD8<sup>+</sup> não apresentou diferença significativa ( $p = 0,81$ ) entre os valores médios obtidos para cães portadores de mastocitoma de alto grau ( $0,28 \pm 0,08$ ) e baixo grau ( $0,26 \pm 0,05$ ), como mostra a Figura 7. Apesar disso, cães portadores de mastocitomas de alto grau apresentaram médias ligeiramente maiores que os de baixo grau.

Dentre os animais portadores de mastocitoma de alto grau, três cães apresentaram médias inferiores ao restante do grupo. Entretanto, estes animais não demonstraram características únicas que justificassem tal comportamento.



**Figura 7** - Distribuição dos valores médios, e respectivos erros padrões, obtidos para a relação Treg/CD8<sup>+</sup> em cães acometidos por mastocitoma de alto grau e baixo grau.

## 6. DISCUSSÃO

A avaliação quantitativa da população de Tregs, no sangue circulante de cães portadores de mastocitoma, neste ensaio, revelou que cães acometidos pela referida neoplasia apresentam um aumento de aproximadamente 50% de Tregs quando comparado aos animais controle. Os resultados aqui encontrados são semelhantes àqueles reportados por outros autores, para a quantificação de Tregs no sangue de cães portadores de câncer em geral (BILLER et al., 2007; HOURIUCHI et al., 2009; O'NEILL, et al., 2009; BILLER et al., 2010; TOMINAGA et al., 2010; MUNHOZ, 2013; ANAI et al., 2013), o que dá legitimidade às hipóteses e resultados deste ensaio.

Por outro lado, a quantificação de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, no sangue periférico, realizada neste experimento, não revelou diferença na comparação dos grupos mastocitoma e controle, ainda que o grupo controle tenha apresentado médias ligeiramente maiores, das referidas classes celulares. Possivelmente, diante de uma população amostral maior de unidades experimentais, essa diferença pudesse se revelar numericamente mais importante.

Ao se avaliar as quantidades de Tregs com relação aos diferentes graus histológicos de mastocitomas, não foi verificada diferença estatística ( $p=0,56$ ), apesar do número médio de Tregs encontrado para mastocitomas de alto grau ( $5,55 \pm 1,16$ ) ter sido ligeiramente maior que aquele verificado para os de baixo grau ( $4,96 \pm 0,70$ ). Cabe ressaltar entretanto que, neste estudo, a maior porcentagem (20,3%) de Treg encontrada entre os animais acometidos por mastocitoma, foi observada em um caso de mastocitoma de alto grau. Considerando que mastocitomas de alto grau estão relacionados a um pior prognóstico, este fato torna-se esperado, uma vez que o aumento das Tregs levam a uma imunossupressão do paciente, prejudicando a imunidade antitumoral.

As quantidades de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> também não apresentaram diferenças estatísticas na comparação entre os grupos de mastocitoma de baixo grau ( $54,51 \pm 4,06$ ;  $24,70 \pm 4,77$ , respectivamente) e alto grau ( $54,54 \pm 4,50$ ;  $26,49 \pm 4,47$ , respectivamente).

De outra parte, na avaliação apenas das células CD8<sup>+</sup>, dentre os cães com mastocitoma de baixo grau, apenas um animal apresentou um valor cerca de 100% superior à média do restante dos animais do mesmo grupo. Este animal, no qual obteve-se a menor porcentagem de células CD4<sup>+</sup>, foi o único, dentre os portadores de mastocitoma de baixo grau, a apresentar ulceração tumoral.

Provavelmente, a avaliação em graus histológicos de cães com mastocitoma não seja o parâmetro mais adequado para demonstrar o comportamento de cada tumor. Torna-se importante também a avaliação imunoistoquímica das células, objetivando maiores esclarecimentos sobre o tipo tumoral envolvido em cada caso.

Vale ressaltar que não foram encontrados estudos que investigassem as Tregs levando em consideração os diferentes graus histológicos dos mastocitomas.

Estudos realizados em pacientes humanos, portadores de câncer, indicaram uma associação entre o grau de infiltração de Tregs nos tumores e a supressão da resposta de células T CD8<sup>+</sup>, contribuindo com a determinação prognóstica da doença cancerosa (SATO et al., 2005; MCCOY et al., 2013). Tal indicação, estimulou, neste ensaio, a busca por uma melhor compreensão do referido fenômeno e, se por acaso, tal associação está também presente no sangue periférico de cães. O'Neill et al. (2009) observaram que a relação Treg/CD8<sup>+</sup> apresentou-se significativamente aumentada em casos de diferentes tipos de tumores acometendo caninos (sarcoma, carcinoma, linfoma e mastocitoma), quando comparado a cães saudáveis. Da mesma forma, Biller et al. (2010) referiram um aumento marcante da relação Treg/CD8<sup>+</sup> no sangue de cães com osteossarcoma.

Corroborando os estudos supracitados, os resultados obtidos no ensaio em tela revelaram um aumento significativo ( $p=0,04$ ) na relação Treg/CD8<sup>+</sup> em cães acometidos por mastocitoma ( $0,26 \pm 0,04$ ), quando comparados aos cães controle ( $0,11 \pm 0,01$ ).

Uma das justificativas para o aumento da relação Tregs/CD8<sup>+</sup> poderia ser o discreto decréscimo das células T CD8<sup>+</sup> paralelamente ao aumento de Tregs no sangue circulante de cães acometidos por mastocitoma cutâneo, como sugerido por O'Neill et al. (2009).

Ainda, no que diz respeito à relação Tregs/CD8<sup>+</sup>, o grupo de cães com mastocitomas de alto grau apresentou valores médios discretamente maiores do que

aqueles de baixo grau. Este ligeiro aumento na relação Treg/CD8<sup>+</sup> em cães com mastocitomas de alto grau pode estar relacionado a um pior prognóstico de tais animais, como relatado por Biller et al. (2010). Possivelmente, este achado poderá se relacionar ao fato de que animais acometidos por mastocitomas de alto grau tendem a apresentar menor tempo de sobrevida (Kiupel et al., 2011). Partindo-se desse pressuposto, é bem atraente a idéia da concepção e execução de um novo ensaio, assim como posterior análise e interpretação dos seus resultados, no intuito de se confirmar a efetiva correlação entre a relação Tregs/CD8<sup>+</sup> e o tempo de sobrevida de animais acometidos por mastocitoma, ou mesmo outros estados neoplásicos. Se faz necessário, entretanto, que para confirmar tal hipótese, o protocolo experimental deverá cobrir um maior tempo de acompanhamento dos pacientes acometidos pela neoplasia.

Estudos prospectivos envolvendo Tregs e mastocitomas cutâneos também poderão contribuir com formas alternativas de tratamento, como imunoterapias baseadas na modulação destas células.

## 7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados, e nas condições em que este ensaio foi realizado, conclui-se que:

- ✓ O mastocitoma é observado em diferentes raças e idades, e de diferentes formas e locais, predominando a região de membros e a apresentação clínica de nódulo único.
- ✓ Cães portadores de mastocitoma cutâneo apresentam aumento quantitativo de células T reguladoras no sangue periférico, comparados a animais saudáveis;
- ✓ A relação Tregs/CD8<sup>+</sup> é maior em cães acometidos por mastocitoma cutâneo;
- ✓ A porcentagem de células T reguladoras no sangue periférico, assim como a relação Treg/CD8<sup>+</sup>, não se alterou frente os diferentes graus histológicos do mastocitoma cutâneo em cães;
- ✓ As parcelas de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> não apresentam alterações significativas nos animais com mastocitoma.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**, 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 576 p.
- ANAI, L. A.; MUNHOZ, T. D.; SEMOLIN, L. M.; VIEIRA, M. C.; COSTA, M. T.; SANTANA, A. E.; FONSECA, D. M. Quantification of T regulatory cells in peripheral blood and lymphnodes in dogs with multicentric lymphoma. In: PROCEEDINGS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ONCOLOGY, 2013, Portugal.
- BANERJEE, A.; VASANTHAKUMAR, A.; GRIGORIADIS, G. Modulating T regulatory cell in cancer: how close are we? **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 5, p. 340-349, 2013.
- BANHAM, A.H.; LYNE, L.; SCASE, T.J.; BLACKLAWS, B.A. Monoclonal antibodies raised to the human Foxp3 protein can be used effectively for detecting Foxp3<sup>+</sup> T cells in other mammalian species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 3-4, p. 376-381, 2009.
- BEACHER-ALLAN, C.; BROWN, J.A.; FREEMAN, G.J.; HAFLER, D.A. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 3, p. 1245-1253, 2001.
- BILLER, B.J.; ELMSLIE, R.E.; BURNETT, R.C.; AVERY, A.C.; DOW, S.W. Use of Foxp3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 1-2, p. 69-78, 2007.
- BILLER, B.J.; GUTH, A.; BURTON, J.H.; DOW, S.W. Decreased ratio of CD8<sup>+</sup> T cells to regulatory T cells associated with decreased survival in dogs with osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1118-1123, 2010.
- BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DEVOS, J.P.; FORNEL-THIBAUD, P.; HIRSCBERGER, J.; KESSLER, M.; PASTOR, J.; PONCE, F.; SAVARY-BATAILLE, K.; ARGYLE, D.J. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. 1-29, 2012.
- CHEN, X.; OPPENHEIM, J. J. Th17 cells and T<sub>regs</sub>: unlikely allies. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 5, p. 723-731, 2014.
- COOLS, N.; PONSAERTS, P.; VAN TENDELOO, V.F.I.; BERNEMAN, Z.N. Regulatory T cells and human disease. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2, p. 1-11, 2007.
- COOPER, M.; TSAI, X.; BENNET, P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 196-206, 2009.

COSTA-CASAGRANDE, T.A.; ELIAS, D.S.; MELO, S.R.; MATERA, J.M. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 176-183, 2008.

COUTO, C.G. Tumores de mastócitos em cães e gatos. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 84, p. 1109-1111.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; SALMAZI, K.C.; KÁLLAS, E.G.; ANDRADE, L.E.C. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 342-355, 2008.

DALECK, C.R., ROCHA, N.S., FURLANI, J.M., CESAR, J.R.F. Mastocitoma. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 16, p. 282-292.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**. v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DENICOLA, D.B. Células redondas. In: COWELL, R.L., TYLER, R.D., MEINKOTH, J.H., DENICOLA, D.B. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**, 3 ed. São Paulo: Medvet, 2009. cap. 4, p. 68-77.

DOBSON, J.M.; SCASE, T.J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 8, p. 424-431, 2007.

ELSTON, L. B.; SUEIRO, F. A. R.; CAVALCANTI, J. N.; METZE, K. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 2, p. 362-364, 2009.

FACCIABENE, A.; MOTZ, G.T.; COUKOS, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2162-2171, 2012.

FINN, O.J. Cancer immunology. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 25, p. 2704-2715, 2008.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

FURLANI, J. M.; DALECK, C. R.; VICENTI, F. A. M.; DE NARDI, A. B.; PEREIRA, G. T.; SANTANA, A. E.; EURIDES, D.; SILVA, L. A. F. Mastocitoma canino: estudo

retrospectivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 242-250, 2008.

HA, T.Y. The role of regulatory T cells in cancer. **Immune Network**, v. 9, n. 6, p. 209-235, 2009.

HANH, K.A.; LEGENDRE, A.M.; SHAW, N.G.; PHILLIPS, B.; OGILVIE, G.K.; PRESCOTT, D.M.; ATWATER, S.W.; CARRERAS, J.K.; LANA, S.E.; LADUE, T.; RUSK, A.; KINET, J.P.; DUBREUIL, P.; MOUSSY, A.; HERMINE, O. Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. **American Journal of Veterinary Research**. v. 71, n. 11, p. 1354-1361, 2010.

HAYES A., ADAMS V., SMITH K., MAGLENNON G., MURPHY S. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, n. 3, p. 168-176, 2007.

HORI, S.; NOMURA, T., SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, 2003.

HORIUCHI, Y., TOMINAGA, M.; ICHIKAWA, M.; YAMASHITA, M.; JIKUMARU, Y.; NARIAI, Y.; NAKAJIMA, Y.; KUWABARA, M.; YUKAWA, M. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 8, p. 468-474, 2009.

HUPPES, R. R.; BORIN-CRIVELLENTI, S.; DE NARDI, A. B.; CASTANHEIRA, T. L. L.; CRIVELENTI, L. Z.; AMPUEIRO, R. A. N.; AMORIN, R. L.; TINUCCI-COSTA, M. Estudo retrospectivo (2007-2011) da casuística de cães com mastocitoma cutâneos atendidos em um hospital escola. **Clinica Veterinária**, v. 104, p. 48-52, 2013.

JARK, P. C.; MACHADO, L. H. A.; SAKATE, M.; CALAZANS, S.G.; CÁPUA, M. L. B.; TINUCCI-COSTA, M.; DE NARDI, A. B. Inibidores de tirosina-quinase no tratamento de mastocitomas cutâneos em cães – revisão. **Clínica Veterinária**, v. 99, p. 50-56, 2012.

KEPPEL, K.E.; CAMPBELL, K.L.; ZUCKERMANN, F.A.; GREELEY, E.A.; SCHAEFFER, D.J.; HUSMANN, R.J. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 337-344, 2008.

KIM, J.H.; HUR, J.H.; LEE, S.M.; IM, K.S.; KIM, N.H.; SUR, J.H. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 222-227, 2012.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; KANEENE, J.B.; MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumor. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 4, p. 371-377, 2004.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; BAILEY, K.L.; BEST, S.; DELAY, J.; DENTRISAC, C.J.; FITZGERALD, S.D.; GAMBLE, D.; GINN, P.E.; GOLDSCHIMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J.; HOWERTH, E.W.; JANOVITZ E.B., LANGOHR, I.; LENZ, S.D.; LIPSCOMB, T.P.; MILLER, M.A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T.P.; NEYEN, I.; O'TOOLE, D., RAMOS-VARA, J.; SCASE, T.J.; SCHUMAN, F.Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R.C.; SMITH, K.; SNYDER, P.W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N.L.; STEFICEK, B.A.; STROMBERG, P.C.; VALLI, V.E.; WEISBRODE, S.E.; YAGER, J., HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

MARTIN, F.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- $\beta$ -dependent immunosuppressive activity? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 742-749, 2012.

MARTIN-OROZCO, N.; MURANSKI, P.; CHUNG, Y.; YANG, X. O.; YAMAZAKI, T.; LU, S.; HWU, P.; RESTIFO, N. P.; OVERWIJK, W. W.; DONG, C. Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 787-798, 2009.

McCOY, M. J.; NOWAK, A. K.; VAN DER MOST, R. G.; DICK, I. M.; LAKE, R. A. Peripheral CD8<sup>+</sup> T cell proliferation is prognostic for patients with advanced thoracic malignancies. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 3, p. 529-539, 2013.

MEIRELLES, A.E.W.B.; OLIVEIRA, E.C.; RODRIGUES, B.A.; COSTA, G.R.; SONNE, L.; TESSER, E.S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 968-973, 2010.

MOTZ, G. T.; COUKOS, G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 61-73, 2013.

MULLINS, M.N.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J.; EHRHART, E.J.; THAMM, D.H.; LANA, S.E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 1, p. 91-95, 2006.

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

MURPHY, S.; SPARKES, A.H.; BLUNDEN, A.S.; BREARLEY, M.J.; SMITH, K.C. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Record**, v. 158, n. 9, p. 287–291, 2006.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 94, n. 5, p. 629-644, 2001.

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

NEWMAN, S. J.; MRKONJICH, L.; WALKER, K. K.; ROHRBACH, B. W. Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 4, p. 231-239, 2007.

NISHIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in tumor immunity. **The International Journal of Cancer**, v. 124, n. 4, p. 759-767, 2010.

NORTHUP, N.C.; HARMON, B.G.; GIEGER, T.L.; BROWN, C.A.; CARMICHAEL, K.P.; GARCIA, A.; LATIMER, K.S.; MUNDAY, J.S.; RAKICH, P.M.; RICHEY, L.J.; STEDMAN, N.L.; CHENG, A.L.; HOWERTH, E.W. Variation among pathologists in histological grading of canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 3, p. 245-248, 2005.

O'CONNELL, K.; THOMPSON, M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 1, p. 51-62, 2013.

O'NEILL, K.; GUTH, A.; BILLER, B.; ELMSLIE, R.; DOW, S. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 875-881, 2009.

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEWEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 469-474, 1984.

PICCIRILLO, C.A.; LETTERIO, J.J.; THORNTON, A.M.; MCHUGH, R.S.; MAMURA, M.; MIZUHARA, H. SHEVACH, E.M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor  $\beta$ 1 production and responsiveness. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 2, p. 237-245, 2002.

PINCZOWSKI, P.; TORRES-NETO, R.; FABRIS, V. E.; LAUFER-AMORIM, R. Mastocitoma canino: abordagem histopatológica e imunoistoquímica na busca de biomarcadores prognósticos. **Clínica Veterinária**, v. 77, p. 76-80, 2008.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 287-296, 2007.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P. H.; MOORE, P. F.; LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 335-341, 2007.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S.; TAKAHASHI, T.; YAMAZAKI, S.; KUNIYASU, Y.; ITOH, M.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J. Immunologic self-tolerance maintained by T-cell-mediated control of self-reactive T cells: implications for autoimmunity and tumor immunity. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 11, p. 911-918, 2001.

SANTANA, A. E.; SEKI, M. C.; GAMA, F. G. V.; SOBREIRA, M. F. R.; CANESIN, A. P. M. N. Citologia aspirativa com agulha fina aplicada ao estudo das neoplasias. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. cap. 4, p. 75-91.

SATO, E.; OLSON, S. H.; AHN, J.; BUNDY, B.; NISHIKAWA, H.; QIAN, F.; JUNGBLUTH, A. A.; FROSINA, D.; GNIATIC, S.; AMBROSONE, C.; KEPNER, J.; ODUNSI, T.; RITTER, G.; LELE, S.; CHEN, Y. T.; OHTANI, H.; OLD, L. J.; ODUNSI, K. Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 102, v. 51, p. 18538-18549, 2005.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SHEVACH, E.M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more question than answers. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 6, p. 389-400, 2002.

SIMOES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 6, p. 637-647, 1994.

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; DE BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555-560, 2006.

STRAUSS, L.; BERGMANN, C.; SZCZEPANSKI, M.; GOODING, W.; JOHNSON, J. T.; WHITESIDE, T. L. A unique subset of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ 1 mediates suppression in the tumor microenvironment. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n.15, p. 4345-4354, 2007.

STREFEZZI, R.F.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G.; CATÃO-DIAS, J.L. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559-565, 2010.

THAMM, D.H.; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small animal clinical oncology**, 4 ed. Saint Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2007. cap. 19, p. 402-424.

TOMINAGA, M.; HORIUCHI, Y.; ICHIKAWA, M.; YAMASHITA, M.; OKANO, K.; JIKUMARU, Y.; NARIAI, Y.; KADOSAWA, T. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 3, p. 438-441, 2010.

VASCELLARI, M., GIANTIN, M., CAPELLO, K., CARMINATO, A., MORELLO, E. M., VERCELLI, A., GRANATO, A., BURACCO, P., DACASTO, M., MUTINELLI, F. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 110-121, 2012.

VILLAMIL, J.A.; HENRY, C.J.; BRYAN, J.N.; ELLERSIECK, M.; SCHULTZ, L.; TYLER, J.W.; HAHN, A.W. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. 7, p. 960-965, 2011.

WEBSTER, J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R.; KANEENE, J.B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 298-308, 2007.

WELLE, M.M.; BLEY, C.R.; HOWARD, J.; RÜFENACHT, S. Canine mast cell tumors: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 321-339, 2008.

WHITESIDE, T.L. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 1, p. 67-72, 2014.

YE, J.; SU, X.; HSUEH, E. C.; ZHANG, Y.; KOENIG, J. M.; HOFT, D. F.; PENG, G. Human tumor-infiltrating Th17 cells have the capacity to differentiate into IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> T cells with potent suppressive function. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 4, p. 936-951, 2011.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999, 663 p.

ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 529-535, 2002.

## **APÊNDICES**

**Apêndice A****Quadro A:** Dados referentes aos cães do grupo controle (C).

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

## Apêndice B

**Quadro B:** Dados referentes aos cães do grupo mastocitoma (M).

<b>Animal</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Tipo histológico (KIUPEL et al., 2011)</b>	<b>Localização</b>
<b>M1</b>	Fox Paulistinha	Macho	6	Alto grau	Inguinal
<b>M2</b>	Pit Bull	Fêmea	6	Baixo grau	Múltiplos
<b>M3</b>	Pinscher	Macho	8	Alto grau	Inguinal
<b>M4</b>	Pit Bull	Fêmea	8	Alto grau	Múltiplos
<b>M5</b>	Pit Bull	Fêmea	13	Alto grau	Membro
<b>M6</b>	Pit Bull	Fêmea	6	Baixo grau	Membro
<b>M7</b>	S.R.D.	Macho	10	Baixo grau	Abdômen
<b>M8</b>	S.R.D.	Macho	3	Alto grau	Múltiplos
<b>M9</b>	S.R.D.	Fêmea	8	Alto grau	Membro
<b>M10</b>	Boxer	Fêmea	10	Baixo grau	Membro
<b>M11</b>	S.R.D.	Fêmea	11	Baixo grau	Tórax/Orelha
<b>M12</b>	Labrador	Fêmea	9	Alto grau	Mama
<b>M13</b>	Boxer	Fêmea	11	Baixo grau	Tórax
<b>M14</b>	Pinscher	Fêmea	7	Baixo grau	Mama
<b>M15</b>	Pitbull	Macho	9	Baixo grau	Membro
<b>M16</b>	S.R.D.	Fêmea	11	Alto grau	Tórax

S.R.D.= Sem raça definida

## Apêndice C

**Quadro C:** Valores individuais referentes às subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e Treg, no momento do diagnóstico, dos cães do grupo controle (C).

<b>Animais</b>	<b>% Treg (gate CD4<sup>+</sup>)</b>	<b>% Treg (gate linf T)</b>	<b>% CD4<sup>+</sup> (gate linf T)</b>	<b>% CD8<sup>+</sup> (gate linf T)</b>	<b>Treg/CD8<sup>+</sup> (gate linf T)</b>
C1	5,16	3,34	64,64	31,3	0,11
C2	5,2	2,81	56,64	21,81	0,13
C3	6,03	3,21	54,33	25,98	0,12
C4	6,95	3,68	53,35	24,65	0,15
C5	1,73	1,28	54,75	26,1	0,05
C6	3,17	2,17	56,6	28	0,08
C7	6	3,6	57,5	28	0,13
C8	3	2,1	67,1	13,5	0,15
C9	4,9	2,48	37,3	45,1	0,05
C10	4,95	3,6	60,1	18,9	0,19

## Apêndice D

**Quadro D:** Valores individuais referentes às subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e Treg, no momento do diagnóstico, dos cães com mastocitoma de alto grau (A).

<b>Animais</b>	<b>% Treg (gate CD4<sup>+</sup>)</b>	<b>% Treg (gate linf T)</b>	<b>% CD4<sup>+</sup> (gate linf T)</b>	<b>% CD8<sup>+</sup> (gate linf T)</b>	<b>Treg/CD8<sup>+</sup> (gate linf T)</b>
A1	20,3	10,3	42,4	19	0,54
A2	10,3	5,4	60,2	18,1	0,30
A3	2,4	1,4	60	29,6	0,05
A4	7	4,7	55	20,3	0,23
A5	7,1	3	33,2	49,4	0,06
A6	5,3	2,7	50	40,3	0,07
A7	10,1	7,1	74,9	11,7	0,61
A8	15	9,8	60,6	23,5	0,42

## Apêndice E

**Quadro E:** Valores individuais referentes às subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e Treg, no momento do diagnóstico, dos cães com mastocitoma de baixo grau (B).

<b>Animais</b>	<b>% Treg (gate CD4<sup>+</sup>)</b>	<b>% Treg (gate linf T)</b>	<b>% CD4<sup>+</sup> (gate linf T)</b>	<b>% CD8<sup>+</sup> (gate linf T)</b>	<b>Treg/CD8<sup>+</sup> (gate linf T)</b>
B1	5,8	4,3	58,9	20,2	0,21
B2	7,1	5,5	58	18,7	0,29
B3	8,4	5,8	65	13,1	0,44
B4	3,5	1	32	55,4	0,02
B5	11,6	6,2	67,6	13,3	0,47
B6	14,6	7,7	58,4	28,2	0,27
B7	8	5,4	49,9	23,8	0,23
B8	7,4	3,8	46,3	24,9	0,15