

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

**CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO
CANINO**

Livia Maria Souza Semolin

Médica Veterinária

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO
CANINO

Livia Maria Souza Semolin

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Co-orientadora: Dra. Letícia Abrahão Anai

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

2017

Semolin, Livia Maria Souza

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

x, 60 p. : il. ; 29 cm

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

Orientador: Aureo Evangelista Santana

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

Bibliografia

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

CDU 619:616-006:636.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO CANINO

AUTORA: LIVIA MARIA SOUZA SEMOLIN

ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA

COORIENTADORA: LETÍCIA ABRAHÃO ANAI

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

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

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

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

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

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

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

DEDICO

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

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

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

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES e FAPESP pelo financiamento da pesquisa.

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

À Dra. Pamela Reina pela classificação histopatológica dos linfomas.

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

CÉLULAS T REGULADORAS NO LINFOMA CUTÂNEO CANINO

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

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

REGULATORY T CELLS IN CUTANEOUS CANINE LYMPHOMA

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfoma Canino

O linfoma, linfossarcoma ou linfoma maligno pode ser caracterizado pela proliferação clonal de linfócitos malignos nos órgãos linfóides (DHALIWAL et al., 2003), afetando primariamente os linfonodos ou outros órgãos viscerais sólidos, como fígado e baço (COUTO, 2001; VAIL; OGILVIE, 2003), podendo surgir em quase todos os tecidos do corpo (MACEWEN; YOUNG, 2001; CALAZANS et al., 2016).

De acordo com Dobson e Gorman (1994) o linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum em cães, correspondendo a aproximadamente 90% das neoplasias deste grupo, e 5 a 10 % de todas as neoplasias que acometem esta espécie (ROSENTHAL; MACEWEN, 1990; MORRISON, 1998; FAN; LORIMIER, 2005; CALAZANS et al., 2016).

Fatores primários como exposição prolongada a substâncias potencialmente cancerígenas são citados como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma nos cães, mas a etiologia do linfoma canino é considerada multifatorial (GREENLE et al., 1990; VALLI, 1993; JONNES et al., 1997). Alterações genéticas herdadas ou adquiridas podem levar a ativação de proto-oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (p53), levando ao aparecimento do linfoma. A imunossupressão é um estado que possivelmente predispõe cães e gatos a esta neoplasia (CALAZANS et al., 2016). Em outras espécies animais como felinos, bovinos, roedores e aves, assim como em alguns primatas e no homem, a etiologia viral já foi identificada (GREENLE et al., 1990; VALLI, 1993; JONNES et al., 1997; MORRISON, 2005; FONTAINE et al., 2010). Processos inflamatórios crônicos na pele, como dermatites, também já foram relacionados ao aparecimento de linfoma cutâneo no homem (FONTAINE et al., 2010).

Quanto à localização anatômica, os linfomas podem ser classificados em linfoma multicêntrico, digestivo ou alimentar, mediastínico ou tímico, cutâneo e

extranodal (MOULTON; HARVEY, 1990; VAIL; OGILVIE, 2003; CALAZANS et al., 2016).

O linfoma cutâneo é considerado raro, e representa 3 a 8% das diferentes formas de apresentação do linfoma (TESKE, 1994; DHALIWAL et al., 2003), 1% das neoplasias cutâneas no cão (FONTAINE et al., 2010) e 0,02% dos atendimentos nesta espécie (SANTORO et al., 2007). Acomete principalmente animais adultos, com média de 8 anos, sem predisposição sexual, com maior prevalência de animais da raça Cocker Spaniel e Boxer, segundo alguns autores (FOSTER et al., 1997; BHANG et al., 2006; FONTAINE et al., 2010).

Clinicamente, esta neoplasia pode ser caracterizada por lesões localizadas ou mais comumente generalizadas, multifocais, cursando com alopecia, eritema e esfoliação da pele, podendo evoluir para lesões em placas, nódulos ou arciformes, com bordas elevadas, muitas vezes edemaciados, ulcerados e hemorrágicos, que podem comprometer junções mucocutâneas como cavidade oral e região genital, com prurido variável entre ausente a intenso, além de hipopigmentação (NORTH; BANKS, 2009; VAIL et al., 2013). Sua progressão leva ao acometimento de tecidos adjacentes ou distantes, como linfonodos, baço, fígado e medula óssea (MOORE et al., 1994; CALAZANS et al., 2016).

O diagnóstico citológico pode ser realizado a partir de material colhido por punção aspirativa por agulha fina de nódulos ou placas cutâneas, ou imprint de lesões ulceradas, onde observam-se células redondas sugestivas de tumor hematopoiético. O diagnóstico definitivo provém de análise histopatológica do material, colhido a partir de biópsia de lesão representativa, onde se pode definir o epiteliotropismo das células neoplásicas (FONTAINE et al., 2010).

Na avaliação histopatológica, os linfoma cutâneos podem ser classificados em epiteliotrópico ou não epiteliotrópico. O linfoma epiteliotrópico, origina-se mais comumente de linfócitos T e de acordo com critérios estabelecidos em humanos, pode apresentar-se de três formas, Micose Fungóide, Reticulose Pagetóide e Síndrome de Sézary, sendo esta última mais agressiva devido a presença de linfócitos neoplásicos na medula óssea, constituindo a forma leucêmica (FONTAINE

et al., 2010; CALAZANS et al., 2016). As células neoplásicas ficam confinadas à epiderme e apresentam tropismo pelos folículos pilosos e glândulas sudoríparas. (NORTH; BANKS, 2009; VAIL et al., 2013). O linfoma não epiteliotrópico caracteriza-se pelo envolvimento de linfócitos neoplásicos nas porções média e profunda da derme e hipoderme, poupando a epiderme e derme papilar. Podem formar placas ou nódulos dérmicos ou subcutâneos, únicos ou múltiplos (VAIL et al., 2013).

A imunofenotipagem faz-se necessária para o diagnóstico definitivo, uma vez que é difícil diferenciar linfomas de outras neoplasias de células redondas, como os tumores histiocíticos, com base apenas na morfologia celular (NORTH; BANKS, 2009; MOORE et al., 2013). O imunofenótipo B ou T de neoplasia linfóide em cães pode ser obtido através de citometria de fluxo, imunocoloração de cortes de tecido ou de preparações citológicas obtidas por aspiração com agulha fina (RASKIN, 2003).

Ao contrário dos linfomas multicêntricos, os linfomas cutâneos são pouco responsivos à quimioterapia antineoplásica, principalmente quando originários de linfócitos T (NORTH; BANKS, 2009). Nesses casos, os protocolos utilizados para linfomas cutâneos não são tão efetivos, levando à remissão e sobrevida menores. Portanto, linfomas cutâneos epiteliotrópicos de imunofenótipo T são considerados neoplasias de prognóstico desfavorável (LORIMIER, 2006; FONTAINE et al., 2010; VAIL et al., 2013). Nestes casos, o tratamento quimioterápico que fornece melhores resultados é aquele a base de lomustina, que proporciona tempo médio de remissão de três a seis meses, em aproximadamente 80% dos casos (RISBON et al., 2006; FONTAINE et al., 2010; VAIL et al., 2013). A eutanásia é a principal causa de óbito nestes animais devido à severidade das lesões cutâneas e debilidade do animal. Desta forma, a morte natural é rara e normalmente causada pela progressão do linfoma, invasão de células neoplásicas na corrente sanguínea e medula óssea e/ou septicemia (FONTAINE et al., 2010).

2.2 Células T reguladoras (Tregs)

Células T reguladoras (Tregs) são um grupo distinto de linfócitos T com propriedades imunossupressoras, que atuam em condições normais na prevenção de respostas autoimunes e alérgicas, suprimindo outras células do sistema imunológico (CRUVINEL et al., 2008; VEIGA-PAIGA, 2016). Além disto, têm sido alvo de intensas pesquisas sobre suas funções como reguladoras das respostas imunes em diversas enfermidades infecciosas e neoplásicas, por também prevenirem atuação do sistema imune contra patógenos e células tumorais (COOLS et al., 2007; SCHIMIDT et al., 2012).

As primeiras investigações sobre estas células iniciaram na década de 1970 (GERSHON; KONDO, 1970), porém, devido à falta de marcadores celulares específicos, novas descobertas vieram anos depois por Sakaguchi et al. (1995), devido a descoberta do marcador fenotípico CD25 (cadeia α de receptores de interleucinas-2), em células com elevada capacidade imunossupressora T CD4⁺, a partir de então denominadas células T reguladoras. Em 2003, identificou-se o fator de transcrição Foxp3 nestas células, necessário para exercerem as suas capacidades supressoras, o qual, a partir de então, passou a ser utilizado para detecção das mesmas em diversas espécies (FONTENOT et al., 2003). Em cães, as Tregs foram inicialmente identificadas utilizando anticorpos específicos anti-CD4 canino e anti-Foxp3 murino (BILLER et al., 2007; KEPPEL et al., 2008; BANHAM et al., 2009; HORIUCHI et al., 2009; O'NEILL et al., 2009).

Diversos subgrupos de Tregs foram descritos, incluindo Tregs de ocorrência natural, derivadas do timo, e aquelas induzidas pela exposição a antígenos, ativadas na periferia (BEYER; SCHULTZE, 2006). Como o próprio nome sugere, Tregs derivadas do timo desenvolvem-se durante processo normal de maturação de linfócitos, possuindo um amplo repertório de receptores específicos de células T auto-reativos, tendo como principal função a prevenção de doenças autoimunes. Tregs perifericamente induzidas são também conhecidas como Tregs adaptativas ou convertidas, por serem derivadas de células T CD4 *naïve* da periferia, após as mesmas serem expostas a citocinas específicas (por exemplo, IL-10 e TGF- β , fator de transformação do crescimento beta) e antígenos (expostos principalmente por

células apresentadoras de antígeno) (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009). Cabe ressaltar que IL-10 e TGF- β podem ser produzidos por componentes do tumor, promovendo a expansão e/ou conversão de células T em Tregs no microambiente tumoral (SAVAGE et al., 2012).

Com relação à mensuração das Tregs deve-se levar em conta seus mecanismos de ação e características celulares. Por atuarem diretamente sobre células efectoras, pode-se inferir que atuam nos locais de proliferação de linfócitos T (órgãos linfoides secundários, como linfonodos) e nos locais onde a resposta imune é requerida (sítios de infecção, neoplasias, inflamações), locais estes que podem ser avaliados pelo uso de histologia e imuno-histoquímica. Porém, a avaliação de Tregs e células T efectoras no sangue torna-se viável devido ao fato de as mesmas utilizarem-se da corrente sanguínea para atingirem seus destinos finais (BELKAIDE; ROUSE, 2005).

Tregs possuem capacidade supressora para uma variedade de células imunes, incluindo células B, células Natural Killer (NK), células T CD4⁺ e CD8⁺, células dendríticas e monócitos, utilizando-se de diversos mecanismos mediados por citocinas ou contato célula-célula (SCHMIDT et al., 2012).

Estas células Tregs podem atuar regulando diretamente células T efectoras ou indiretamente, bloqueando a função de células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas que têm a função de mediadoras de resposta imune celular, processando e apresentando antígenos para células T e induzindo sua ativação. O mecanismo direto de regulação pode ocorrer de diversas formas como, por exemplo, quando Tregs secretam citocinas supressoras que inibem a função de células T efectoras. Outro mecanismo está relacionado com a competição por citocinas como a IL-2, necessária para a proliferação de Tregs e células T efectoras. Quando consumidas, estas citocinas tornam-se escassas para as células efectoras, levando-as à apoptose (SOJKA et al., 2008). Além disto, moléculas imunossupressoras e anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e IL-35, secretadas por Tregs, levam ao bloqueio da continuidade do ciclo celular das células T efectoras (VEIGA-PARGA, 2016).

Tregs podem interferir na imunidade antitumoral promovendo diminuição da resposta de células T efectoras, especialmente as T CD8⁺. Desta forma, as células tumorais evadem o sistema imune via potencialização da resposta e sobrevivência das Tregs, aumento das mesmas em relação às células T efectoras, e/ou criando um microambiente capaz de aumentar ou ativar estas células imunossupressoras (VEIGA-PARGA, 2016).

Em cães com melanoma, observou-se aumento de Tregs no sangue periférico, quando comparados a animais saudáveis, com diminuição de células T efectoras (Th1) e CD8⁺. Além disto, a porcentagem de Tregs apresentou correlação positiva com o estadiamento tumoral (HORIUCH et al., 2010). Tominaga et al. (2010) observaram que cães com a mesma neoplasia apresentavam também uma porcentagem maior de Tregs no sítio tumoral, quando comparada com a do sangue periférico, o que os levaram a sugerir que as células tumorais poderiam induzir a proliferação local ou a migração seletiva de Treg para o sítio de infiltração tumoral.

Quando avaliadas em cadelas com carcinoma mamário, o número de Tregs infiltrando o sítio tumoral aumentou significativamente nos tumores com fatores prognósticos negativos, como grau histopatológico alto, invasão linfática e necrose. Tais achados sugeriram a participação das Tregs na progressão dos carcinomas mamários, e a utilização das mesmas como potenciais marcadores prognósticos, com perspectivas de desenvolvimento de imunoterapia (KIM et al., 2012; MUCHA et al., 2016).

O'Neill et al. (2009) observaram aumento significativo das Tregs em cães com câncer em relação aos do grupo controle. As maiores porcentagens de Tregs foram observadas em cães com carcinoma, seguidas de sarcoma, linfoma e mastocitoma. De forma semelhante, recentemente, Munhoz et al. (2016) encontraram aumento de Tregs no sangue periférico de cães com linfoma multicêntrico, quando comparados aos animais saudáveis, sem diferença entre os imunofenótipos B e T. Os mesmos animais foram submetidos a tratamento quimioterápico e apresentaram redução destas células na quinta semana de tratamento, chegando a valores próximos aos dos animais saudáveis.

Foi encontrado por Horiuchi et al. (2009) aumento de Tregs no sangue periférico de cães com metástases quando comparados aqueles sem metástases, sendo que nos pacientes com tumores em estágios mais avançados, também ocorreu aumento das mesmas. Tal achado sugere que as Tregs promovam a imunotolerância às células tumorais por suprimirem a atividade de Th1, o que poderia favorecer o aparecimento de metástases.

Biller et al. (2007), utilizaram a expressão de Foxp3 para identificar Tregs em cães saudáveis e com neoplasia. Os autores verificaram um número de Tregs significativamente maior no sangue periférico e linfonodo drenante de cães com neoplasia. Além deste achado, observaram que quanto mais agressivo o tumor, maior o número de células Tregs, sugerindo o valor prognóstico da avaliação numérica destas células.

Um microambiente tumoral dominado por células T *helper* 2 (Th2) e por Tregs foi encontrado no linfoma Hodgkin humano (SCHRECK et al, 2009). O número elevado de células Th2 foi associado com significativo aumento no tempo livre de doença dos pacientes, enquanto a alta razão Tregs/Th2 resultou em redução significativa deste tempo. Este fato leva a crer que as Tregs exerçam efeitos inibitórios na resposta imune antitumoral mediada por células Th2 e que estas últimas podem ter um papel importante na imunidade antitumoral, contradizendo diversos dados que referem as Th2 como favoráveis ao desenvolvimento tumoral por impedirem imunidade celular e aumentarem resposta humoral pró-tumor (NARENDRA et al., 2013).

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

Pesquisadores utilizaram ciclofosfamida em regime metronômico, na dose de 15 mg/m²/dia, e conseguiram diminuir o número e a porcentagem de Tregs a partir do 28º dia de tratamento, além de inibir a angiogênese em cães com sarcoma de tecidos moles (BURTON et al., 2011). Mitchell et al. (2012) utilizaram toceranib na dose de 2,75 mg/kg, em dias alternados, como forma única de tratamento durante duas semanas em cães com neoplasias, e obtiveram uma diminuição significativa de Tregs no sangue periférico. Após este período, associaram o toceranib à ciclofosfamida em dose diária de 12,5 mg/kg, e demonstraram um aumento significativo nas concentrações séricas de IFN- γ , inversamente relacionado ao número de Tregs, após 6 semanas de tratamento. Desta forma, terapias metronômicas podem ter ação imunomoduladora importante no combate às células tumorais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar por intermédio da citometria de fluxo e imuno-histoquímica, as células T reguladoras no sangue periférico e tecido neoplásico de cães com linfoma cutâneo T, identificando o papel destas células no desenvolvimento tumoral e prognóstico.

3.2 Objetivos específicos

- Classificar histologicamente os linfomas cutâneos caninos;
- Avaliar a sobrevida dos cães com linfoma cutâneo;
- Avaliar as células Tregs por meio da expressão de Foxp3, via imuno-histoquímica, em linfomas cutâneos e peles saudáveis de cães, associando o número de células marcadas ao tipo histopatológico e à sobrevida dos pacientes;
- Avaliar a porcentagem de células Tregs, T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico, via citometria de fluxo, em cães com linfoma cutâneo e animais saudáveis, associando-as com o tipo histopatológico e a sobrevida;
- Avaliar a relação entre a sobrevida dos animais com linfoma cutâneo e os valores de Tregs e Treg/CD8⁺;
- Investigar a presença de correlação entre os valores encontrados de Tregs no sangue periférico, através de citometria de fluxo, e no tecido, via imuno-histoquímica, nos animais com linfoma cutâneo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste experimento foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, sob os números 10207/16.

4.1 Grupos experimentais

As parcelas experimentais constituíram-se de 24 cães, machos ou fêmeas, dentre os quais, 12 cães hígidos e 12 cães acometidos por linfoma cutâneo de imunofenótipo T, atendidos junto ao Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As unidades experimentais foram agrupadas como segue:

Grupo Controle (GC): Constituído por 12 cães, hígidos, em bom estado de saúde verificado com base nos resultados do exame clínico detalhado, testes hematológicos (hemograma) e bioquímicos séricos (creatinina e alaninoaminotransferase). Dados referentes à idade, sexo e raça destes animais encontram-se especificados no Apêndice A.

Grupo Linfoma Cutâneo (GLC): Constituído por 12 cães acometidos por linfoma cutâneo T, atendidos junto ao Serviço de Oncologia Veterinária, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, inicialmente sob o diagnóstico citológico, depois confirmado por histopatologia e imuno-histoquímica. Dados referentes à idade, sexo e raça destes animais encontram-se especificados no Apêndice B.

4.2 Avaliação das parcelas experimentais

Os animais com linfoma cutâneo foram submetidos a exame físico detalhado, exames complementares de imagem (radiografia torácica e ultrassonografia abdominal), testes hematológicos e bioquímicos séricos incluindo avaliação de perfil

hepático (Alaninoaminotransferase, Proteína Total, Albumina, Fosfatase Alcalina) e renal (Creatinina), como exames de rotina para início de protocolo terapêutico.

4.3 Obtenção das amostras

Pacientes apresentando nódulos ou lesões em pele com suspeita de linfoma cutâneo foram submetidos ao exame citológico, obtido pela punção aspirativa por agulha fina da(s) área(s) acometida(s). Após confirmação do diagnóstico citológico, realizou-se biópsia incisional da lesão para coleta de amostra tecidual, através do preparo do animal com medicação analgésica (Cloridrato de Tramadol, na dose de 4 mg/kg, pela via intramuscular) e da região a ser biopsiada, com tricotomia e anti-sepsia. Em seguida, a região cutânea recebeu inoculação de anestésico local (Lidocaína, dose máxima 7 mg/kg), seguido de incisão com lâmina de bisturi e exérese de fragmento tumoral medindo no mínimo 1 cm de diâmetro. Procedeu-se sutura tecidual de rotina com fio monofilamentar Nylon 2-0, usando padrão simples separado. Nos animais do GC, realizou-se biópsia de fragmento cutâneo saudável de forma semelhante.

Os fragmentos cutâneos foram fixados em solução de formol tamponado a 10% (pH 7,6) por 24 horas e posteriormente transferidos para solução de álcool 70% até processamento histológico de rotina.

As amostras de sangue foram coletadas dos animais do GC e GLC após anti-sepsia local, por venipunção jugular, com base no sistema a vácuo, utilizando-se de tubos de 10 mL, heparinizados, para posteriores análises da citometria de fluxo. No GLC, a coleta foi realizada após o diagnóstico histopatológico da neoplasia, antes do início do tratamento.

Após diagnóstico de linfoma cutâneo, 10 dos 12 animais foram submetidos a tratamento quimioterápico no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, com protocolo de lomustina 70 a 90 mg/m², pela via oral, a cada 21 dias, associada com prednisona 1 mg/kg, pela via oral, a cada 24 horas, em dose regressiva por até 30 dias, de acordo com a evolução clínica do paciente. Os outros dois animais não

receberam tratamento por opção do proprietário, não sendo excluídos dos experimentos visto que a padronização terapêutica não fazia parte dos objetivos experimentais.

4.4 Classificação histopatológica e imuno-histoquímica

As amostras de linfoma cutâneo fixadas em formol e posteriormente álcool foram submetidas a processamento histológico de rotina e posterior graduação histopatológica realizada pelo Serviço de Patologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) UNESP/Jaboticabal, classificando-os em linfoma cutâneo epiteliotrópico ou não epiteliotrópico. A imuno-histoquímica dos mesmos foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP/Botucatu, para imunofenotipagem e expressão tecidual das células T reguladoras, sendo a última nos linfomas cutâneos e peles saudáveis.

4.4.1 Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas

A caracterização do tipo celular predominante nos linfomas cutâneos foi investigada, empregando-se para isso os anticorpos primários marcadores de linfócitos T (CD3) e de linfócitos B (CD79 α), ambos contra antígenos humanos. A expressão de Foxp3, marcador de células Tregs, nos fragmentos cutâneos controle e linfomatosos, foi avaliada empregando-se anticorpo anti-Foxp3, conforme especificações no Quadro 1.

Quadro 1. Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em cortes parafinados de fragmentos cutâneos caninos, com os respectivos clones e diluições. Jaboticabal, 2017.

Anticorpos	Clones	Diluições
Anti-CD3* (LinfócitosT)	<i>Dako F.7.2.38</i>	1/100
Anti-CD79 α ** (Linfócitos B)	<i>Dako HM57</i>	1/50
Anti-Foxp3 *** (Tregs)	<i>Everest Biotech</i>	1/4000

* anticorpo monoclonal camundongo anti-humano

** anticorpo policlonal coelho anti-humano

*** anticorpo policlonal cabra anti-humano, canino e suíno

4.4.2 Imunofenotipagem e expressão tecidual de Foxp3

O método de imuno-histoquímica empregado foi o polímero *horseradish peroxidase* (HRP - Dako K4068), *3,3' diaminobenzidine tetrachloride* (DAB - Dako K3468-1) e LSAB 2 System-HRP (DakoCytomation Code K0672). Resumidamente, os cortes de tecido (4 μ m) foram distendidos em lâminas carregadas e permaneceram em estufa a 57 °C por 24 horas e, posteriormente, foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes.

Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando uma solução de citrato pH 6,0 em panela de pressão (Pascal®; Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 segundos, à 128°C, aproximadamente. Após essa etapa, ao atingirem a temperatura ambiente, as lâminas contendo os cortes foram lavadas em água deionizada. A seguir foram incubadas em dois banhos de 10 minutos cada em peróxido de hidrogênio 3% (10V) para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água deionizada por cinco minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi conduzido com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum-free –catálogo nº X0909 – DAKO Corp.).

As lâminas contendo os cortes foram incubadas com os anticorpos primários na diluição padronizada (Quadro 1), a 4°C *overnight* ,18 horas, para os anticorpos

anti-CD3 e anti-CD79 α , e 2 horas para o anticorpo anti-Foxp3. Depois, foram novamente lavados em solução tampão de TRIS. Em seguida, as reações anti-CD3 e anti-CD79 α foram incubadas com polímero Envision (Dako, Carpinteria, CA, USA), e a reação anti-Foxp3 com LSAB, sendo posteriormente lavadas com TRIS, por três vezes. A coloração foi obtida utilizando-se o DAB (DakoCytomation, Carpinteria, USA) e a contracoloração pela Hematoxilina de Harris, seguida da desidratação em concentrações crescentes de álcool e xilol. As lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Linfonodos de cães hígidos foram empregados como controle positivo. Para controle negativo, foi realizada a substituição do anticorpo primário por solução tampão (TRIS).

As reações com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79 α foram avaliadas de acordo com a positividade e negatividade das marcações membranosas, caracterizando imunofenótipo T e B, respectivamente, nos linfomas cutâneos. Apenas animais com imunofenótipo T (CD3 positivo e CD79 α negativo, Figura 1) foram separados para este experimento, visto que um número muito pequeno de animais com imunofenótipo B foi encontrado.

As reações com o anticorpo anti-Foxp3 foram avaliadas em campos representativos do corte, com microscópio de luz em aumento de 40x (Figura 2). Cinco campos foram avaliados e 100 células entre marcadas e não marcadas contadas (considerando-se apenas marcação nuclear como positiva), onde ao final se extraíram as médias que representaram as porcentagens de expressão de células T reguladoras nos linfomas cutâneos e fragmentos de peles saudáveis.

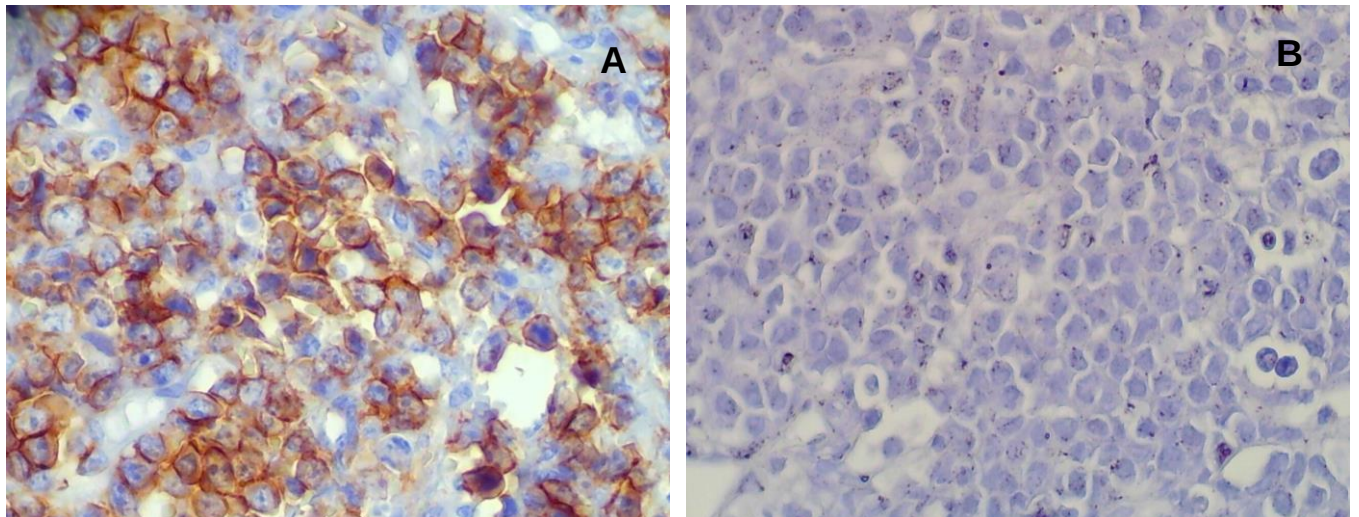


Figura 1. Fotomicrografias evidenciando imunofenotipagem de linfoma cutâneo canino T. A. Marcação imuno-histoquímica membranosa positiva para anticorpo anti-CD3; B. Marcação imuno-histoquímica negativa para anticorpo anti-CD79 α , caracterizando imunofenótipo T. Aumento de 40X. Jaboticabal, 2017.

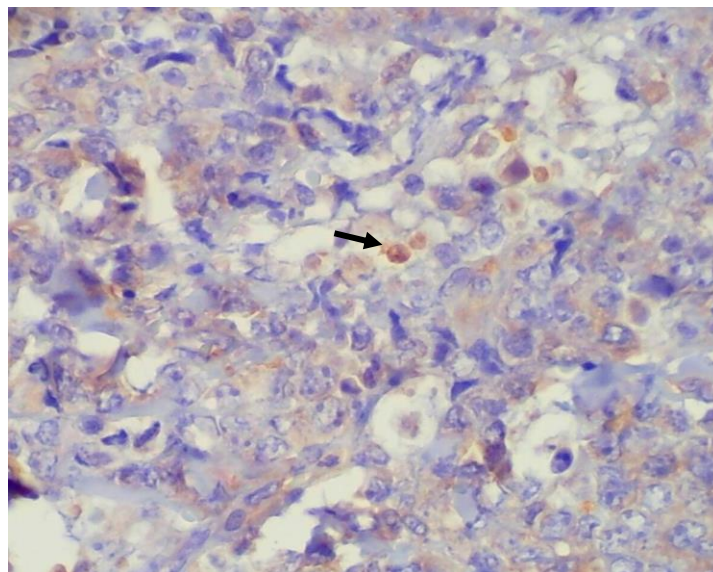


Figura 2. Fotomicrografia evidenciando marcação imuno-histoquímica nuclear de anticorpo anti-Foxp3 (seta) em fragmento de linfoma cutâneo canino. Aumento de 40X. Jaboticabal, 2017.

4.5 Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T, no sangue periférico, por citometria de fluxo

Os animais do GC e GLC foram avaliados quanto às porcentagens de subpopulações de linfócitos T presentes no sangue periférico, por citometria de fluxo, através da técnica de Biller et al. (2007), descrita a seguir.

As células mononucleares foram isoladas a partir de 15 mL de sangue, obtidos por punção venosa e acondicionados em tubos heparinizados. A seguir, o sangue coletado foi diluído (volume:volume) em solução PBS estéril e separado em gradiente de Ficoll-Hypaque, com densidade 1.077g/L (Ficoll-Paque PLUS, Amersham Biosciences, Suécia). Após centrifugação a 720xg por 30 minutos, o anel de células mononucleares foi coletado e ressuspenso em PBS e centrifugado a 720xg por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o anel de leucócitos foi ressuspenso em 2mL de tampão de lise para hemácias ACK (NH_4Cl - 0,15mM, KHCO_3 - 10mM, EDTA - 0,1mM; pH=7,3), por 5 minutos, e novamente centrifugado. As células lavadas foram ressuspensas em 1mL de PBS e posteriormente diluídas (1:20) em azul de tripan 0,5% e contadas em câmara de Neubauer.

As células foram divididas em seis tubos para cada animal, sendo: tubo 1 – somente células sem marcação; tubo 2 – células marcadas com os isotipos controles; tubo 3 – células marcadas com os anticorpos anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE e PanT APC; tubo 4 – somente células sem marcação; tubo 5 – células marcadas com os isotipos controles; tubo 6 – células marcadas com os anticorpos anti-CD4 FITC, PanT APC e anti-Foxp3 PE. Os isotipos controle e os anticorpos utilizados encontram-se listados na Tabela 1. Nos tubos 1, 2 e 3 foram utilizadas 1×10^6 células, e nos tubos 4, 5 e 6, utilizaram-se 2×10^6 células. As células dos tubos 4, 5 e 6 passaram pelo processo de permeabilização de membrana, utilizando-se soluções de permeabilização/fixação e de permeabilização (eBioscience®, cat 00-5223 e cat 00-8333, respectivamente), de acordo com as recomendações do fabricante. Antes de cada marcação, de membrana e intracitoplasmática, 5µL de soro autólogo (previamente incubado em banho-maria a 56°C por 30 minutos), eram acrescentados em cada tubo para bloqueio de reações inespecíficas, e incubados

por 30 e 15 minutos, respectivamente. Ao final do processo eram adicionados, 100µL de solução PBS-formol 1%, para conservação das células.

Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a coleta do sangue. As preparações celulares foram adquiridas em FACSCanto II (BD®), no Laboratório de Imunoparasitologia, de responsabilidade do Prof. Dr. João Santana da Silva, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. No mínimo, cinquenta mil eventos na *gate* de linfócitos foram coletados por tubo e analisados no programa FACSDiva. Fluxogramas representando as escolhas dos *gates* podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

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

Tabela 1. Relação de isotipos controle e anticorpos utilizados na citometria de fluxo, com seus respectivos fluorocromos e volumes utilizados. Jaboticabal, 2017.

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

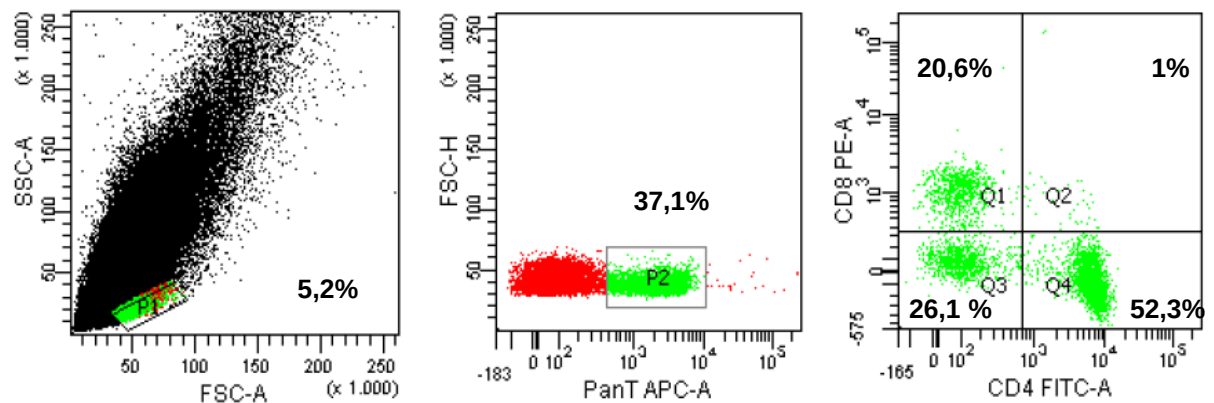


Figura 3. Fluxograma representativo da *gate* de linfócitos (P1); a partir dela a *gate* de linfócitos T (P2) e, a partir desta, a *gate* de linfócitos CD4⁺ (Q4) e CD8⁺ (Q1), de um cão com linfoma cutâneo. Jaboticabal, 2017.

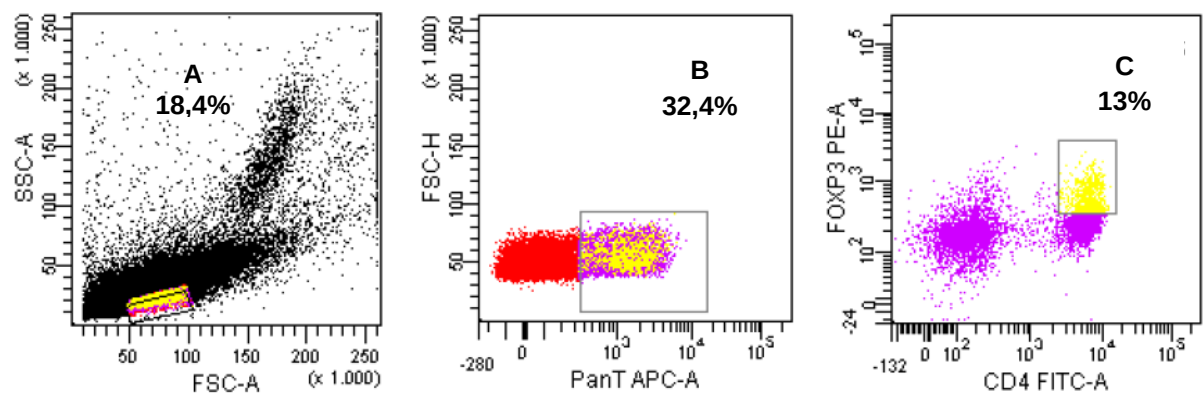


Figura 4. Fluxograma representativo da *gate* de linfócitos (A); a partir dela a *gate* de linfócitos T (B) e, a partir desta, a *gate* de linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ (Treg) (C), de um cão com linfoma cutâneo. Jaboticabal, 2017.

4.6 Análise dos resultados

Utilizou-se o teste T de amostras independentes, quando comparadas duas variáveis que atendessem às suposições de normalidade e homogeneidade. Quando não, utilizou-se o teste Mann Whitney. Quando foram comparadas 3 variáveis, foi feita uma análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida pela comparação aos pares pelo teste de Dunn. Para avaliação de curva de sobrevida, utilizou-se curva de Kaplan Meier, dividindo os resultados em baixo e alto a partir do valor médio encontrado. Para a correlação entre técnicas utilizou-se o teste de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo (ZAR, 1999). GraphPad Prism 5 (*GraphPad Prim5 software package*, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) foi o programa utilizado.

5 RESULTADOS

5.1 Classificação histopatológica

De acordo com a localização histológica das células neoplásicas no tecido epitelial, os linfomas cutâneos foram classificados em epiteliotrópico e não epiteliotrópico, sendo cinco (42%) e sete (58%), respectivamente, conforme fotomicrografias ilustrativas abaixo.

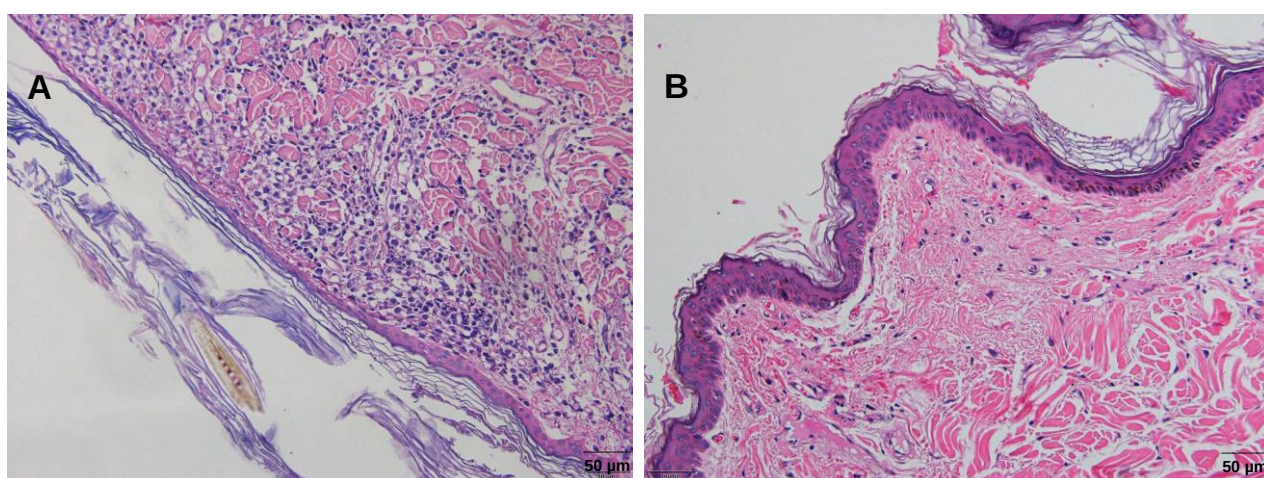


Figura 5. Fotomicrografias representativas de análise histopatológica de linfomas cutâneos em cães, após coloração com Hematoxilina de Harris, em aumento de 20X. A - Linfoma cutâneo epiteliotrópico, com invasão de linfócitos neoplásicas na epiderme; B - Linfoma cutâneo não epiteliotrópico, com epiderme livre de células neoplásicas. Jaboticabal, 2017.

5.2 Avaliação da sobrevida dos pacientes

O tempo de sobrevida dos paciente com linfoma cutâneo T foi calculado a partir do diagnóstico da neoplasia até o óbito do animal, sendo encontrada uma média de 71 dias ($\pm 63,9$), oscilando entre 17 e 180 dias, conforme Tabela 2. Um dos animais (LC2) não retornou para atendimento e seu proprietário não atendeu às ligações telefônicas, não sendo possível determinar sua sobrevida.

Tabela 2. Dados referentes à classificação histopatológica, tratamento, distribuição das lesões, sobrevida e causa óbito dos animais do Grupo Linfoma Cutâneo. Jaboticabal, 2017.

Animal	Histopatológico	Tratamento	Distribuição das lesões	Sobrevida (dias)	Causa óbito
LC1	Não Epiteliotróp.	Lomustina	Localizada	180	Eutanásia
LC2	Não Epiteliotróp.	Ausente	Generalizada	-	-
LC3	Epiteliotrópico	Lomustina	Localizada	80	Progressão Neoplásica
LC4	Epiteliotrópico	Lomustina	Generalizada	27	Progressão Neoplásica
LC5	Não Epiteliotróp.	Lomustina	Localizada	180	Progressão Neoplásica
LC6	Não Epiteliotróp.	Lomustina	Generalizada	14	Progressão Neoplásica
LC7	Não Epiteliotróp.	Ausente	Generalizada	17	Progressão Neoplásica
LC8	Epiteliotrópico	Lomustina	Generalizada	17	Eutanásia
LC9	Epiteliotrópico	Lomustina	Generalizada	46	Progressão Neoplásica
LC10	Não Epiteliotróp.	Lomustina	Generalizada	120	Progressão Neoplásica
LC11	Epiteliotrópico	Lomustina	Generalizada	83	Eutanásia
LC12	Não Epiteliotróp.	Lomustina	Generalizada	18	Progressão Neoplásica
Média				71 ($\pm 63,9$)	

Ao avaliarmos os dados de sobrevida com relação à classificação histopatológica dos animais, não foi observada diferença significativa entre grupos ($p=0,35$), conforme pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3. Dados referentes à sobrevida de acordo com a classificação histopatológica dos animais do Grupo Linfoma Cutâneo. $p=0,35$. Jaboticabal, 2017.

Classificação histopatológica	N	Sobrevida (Dias)
Epiteliotrópico	5	50,6 (± 13)
Não epiteliotrópico	7	88,1 (± 33)

5.3 Expressão tecidual de células Foxp3⁺

Com relação à marcação tecidual de Foxp3, através da técnica imuno-histoquímica, fragmentos cutâneos saudáveis não apresentaram imunomarcação, sugerindo ausência de células T reguladoras nestas amostras. Enquanto isto, fragmentos de nódulos neoplásicos do GLC apresentaram média de 8% (± 5) das células teciduais imunomarcadas para Foxp3, demonstrando a presença de células positivas nesta neoplasia, com diferença significativa entre grupos e $p=0,0007$ (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 4. Valores percentuais de células com expressão nuclear de Foxp3 (Células T reguladoras), em fragmentos de linfoma cutâneo (LC), através de técnica imuno-histoquímica. Jaboticabal, 2017.

Animais (GLC)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Foxp3 (%)	10	9	.	15	10	0	12	13	14	8	0	0

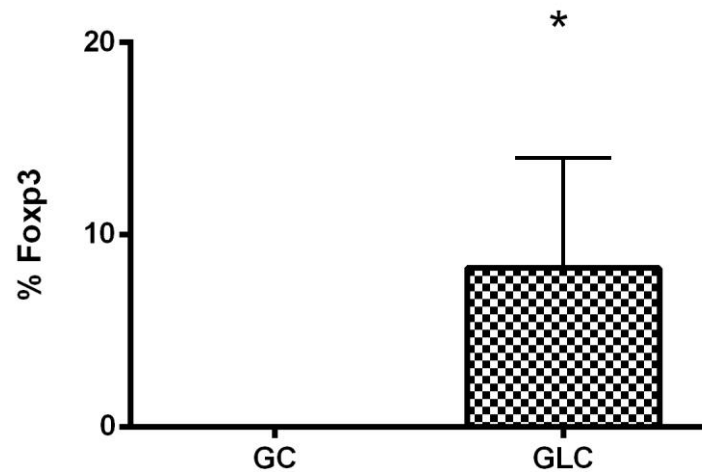


Figura 6. Valores percentuais obtidos de expressão tecidual de Fcpx3 na pele de cões sadios (GC) e cões portadores de linfoma cutâneo (GLC). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, * $p=0,0007$ ($n= 12$ para o GC e 11 para o GLC). Jaboticabal, 2017.

Quando comparadas as porcentagens de células Fcpx3+ entre as classificações histopatológicas epiteliotrópico e não epiteliotrópico, não houve diferença significativa entre os grupos (11 ± 7 e $7\pm4,9$, respectivamente), apenas entre os mesmos e o GC, $p=0,0011$ (Figura 7).

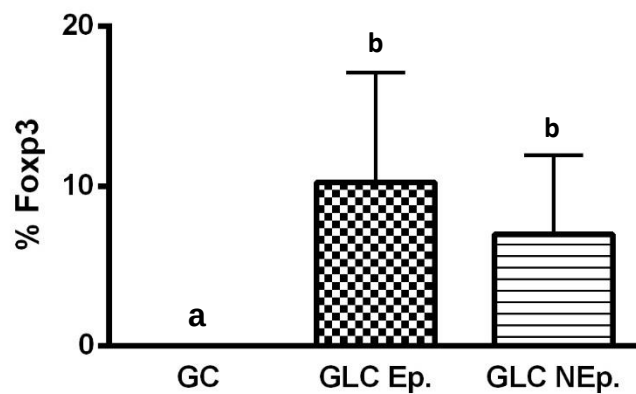


Figura 7. Valores percentuais obtidos de expressão tecidual de Fcpx3 na pele de cões sadios (GC) e cões portadores de linfoma cutâneo epiteliotrópico (GLC Ep.) e não epiteliotrópico (GLC NEp.). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ($n= 12$ para o GC, 4 para o GLC Ep. e 7 para o GLC NEp.). Letras iguais não diferem estatisticamente, $p= 0,0011$. Jaboticabal, 2017.

Ao avaliarmos a distribuição da curva de sobrevida dividimos os animais do GLC em baixa e alta expressão de Foxp3 a partir do valor médio de expressão do mesmo, não sendo observada diferença significativa entre a sobrevida dos subgrupos (médias 83 e 27 dias, respectivamente) ($p=0,677$), conforme Figura 8.

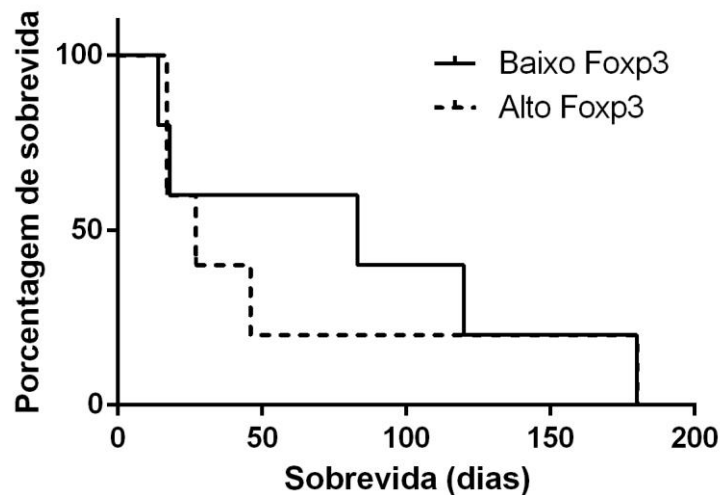


Figura 8. Curva de sobrevida dos animais com linfoma cutâneo e porcentagem baixa e alta de células positivas para o anticorpo anti-Foxp3 no tecido neoplásico, através de técnica imuno-histoquímica. Jaboticabal, 2017.

5.4 Quantificação das Subpopulações de Linfócitos T no sangue periférico

5.4.1 Quantificação no GC X GLC

No presente estudo, cães do GLC apresentaram maior média de porcentagem de Tregs (na *gate* PanT CD4⁺) ($10,84 \pm 1,18$), quando comparados aos animais do GC ($5,67 \pm 0,89$) ($p=0,0021$). Com relação às porcentagens das subpopulações de células CD4⁺ e CD8⁺, não foram observadas diferenças significativas entre os cães do GC ($51,01 \pm 4,92$; $31,78 \pm 5,65$, respectivamente) e os cães do GLC ($48,26 \pm 4,54$; $30,32 \pm 4,82$, respectivamente), com valores de $p=0,68$ e $0,84$.

As médias dos grupos, juntamente com os erros padrão das médias, estão apresentadas na Figura 9. Os valores individuais encontram-se nos Apêndices C e D.

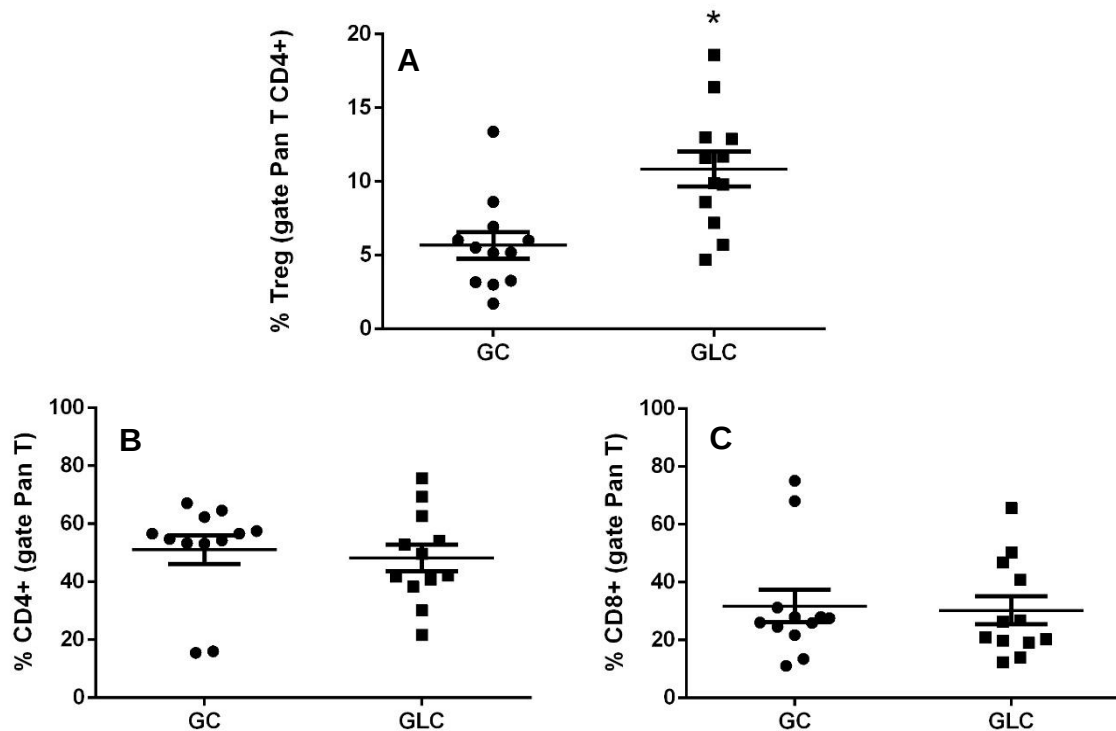


Figura 9. Representação gráfica das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico de cães sadios (GC) e cães portadores de linfoma cutâneo (GLC). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (n= 12 para o GC e 12 para o GLC). A. Valores percentuais obtidos de células T reguladoras (Treg), * p=0,0021. B. Valores percentuais obtidos de linfócitos T CD4⁺. C. Valores percentuais obtidos de linfócitos T CD8⁺. Jaboticabal, 2017.

5.4.2 Quantificação nos diferentes tipos histopatológicos de acordo com o epiteliotropismo

As porcentagens de Tregs não apresentaram diferença significativa entre os animais com linfoma cutâneo epiteliotrópico ($9,52 \pm 1,41$) e não epiteliotrópico ($11,79 \pm 1,76$), apenas entre os últimos e o grupo controle ($5,67 \pm 0,89$), com maior porcentagem destas células no linfoma cutâneo não epiteliotrópico (p=0,001).

Com relação às porcentagens de células $CD4^+$ e $CD8^+$, não houve diferença significativa entre os tipos histopatológicos epiteliotrópico ($45,82 \pm 7,84$ e $33,30 \pm 9,26$, respectivamente) e não epiteliotrópico ($50,00 \pm 5,86$ e $28,19 \pm 5,51$, respectivamente), e entre os mesmos e o grupo controle ($51,01 \pm 4,92$; $31,78 \pm 5,65$, respectivamente) ($p=0,58$ e $0,79$).

As médias dos grupos, juntamente com os erros padrão das médias, estão apresentadas na Figura 10.

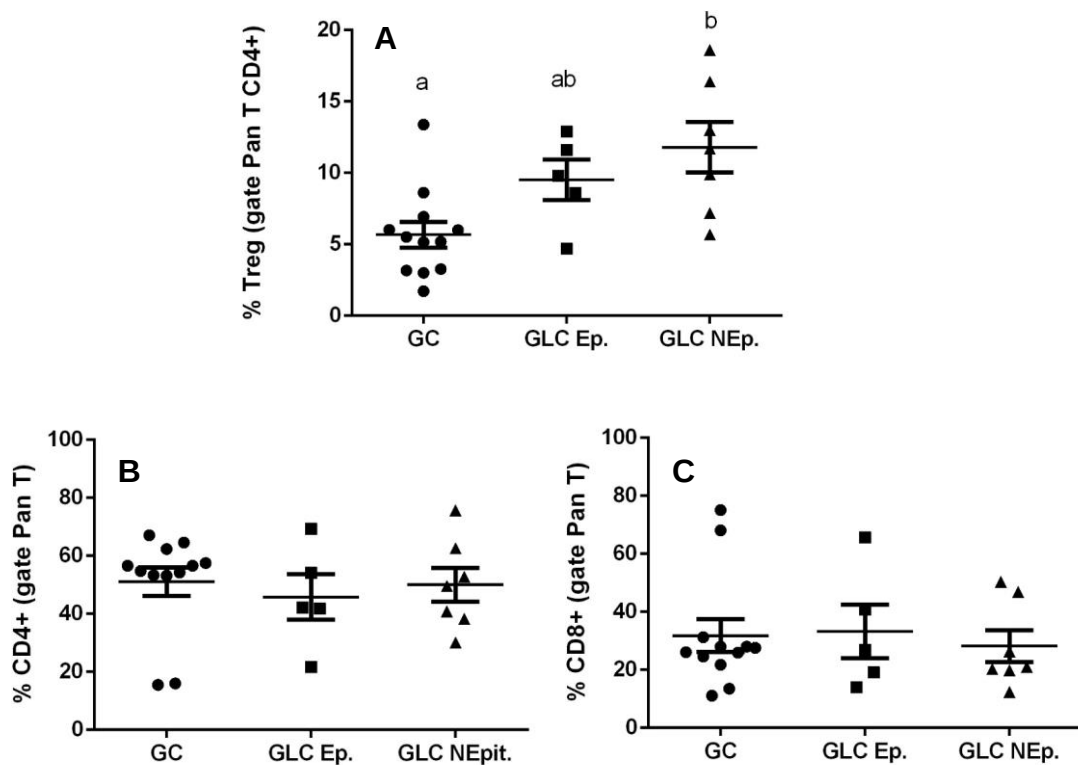


Figura 10. Representação gráfica das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico de cães saudáveis (GC) e cães portadores de linfoma cutâneo epiteliotrópico (GLC Ep.) e não epiteliotrópico (GLC NEp.). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=12$ para o GC, 5 para o GLC Ep. e 7 para o GLC NEp.). Letras iguais não diferem estatisticamente. A. Valores percentuais obtidos de células T reguladoras (Treg). B. Valores percentuais obtidos de linfócitos T $CD4^+$. C. Valores percentuais obtidos de linfócitos T $CD8^+$. Jaboticabal, 2017.

5.4.3 Correlação da porcentagem de Tregs e da relação Treg/CD8⁺, com a sobrevida

Ao avaliarmos a distribuição de sobrevida entre os grupos de animais com linfoma cutâneo com baixa e alta porcentagem de células Tregs no sangue, não foi observada diferença estatística ($p=0,20$), com valores médios de sobrevida de 81,5 e 18 dias, respectivamente. Da mesma forma, quando avaliamos a sobrevida com a relação Treg/CD8⁺ baixa e alta, não foi observada diferença significativa ($p=0,25$), com valores médios de sobrevida de 63 e 18 dias, respectivamente. Curvas representativas da sobrevida com relação aos parâmetros Tregs e Treg/CD8⁺ encontram-se na Figura abaixo.

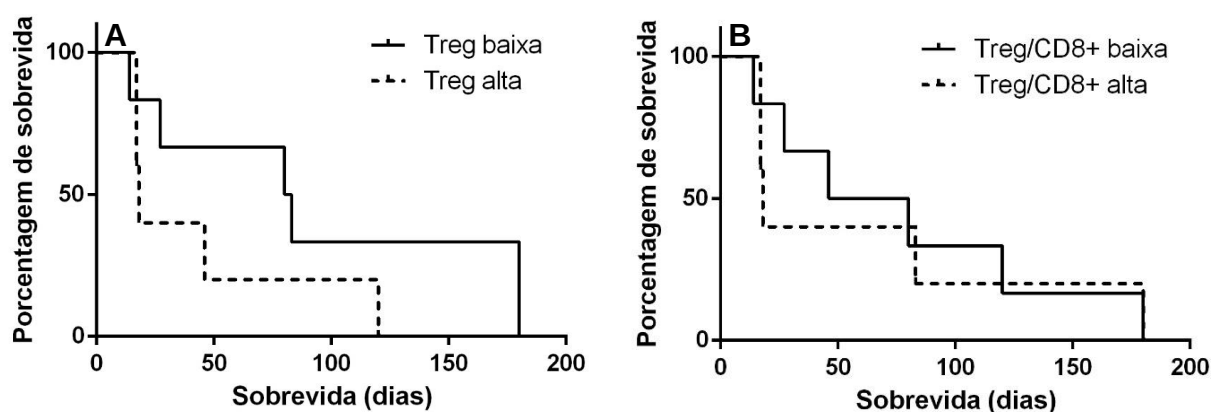


Figura 11. Curva de sobrevida dos animais com linfoma cutâneo e porcentagem baixa e alta de células Treg no sangue periférico (A) e baixa e alta relação Treg/CD8⁺. Jaboticabal, 2017.

5.5 Correlação entre os valores de Tregs no sangue periférico e no tecido neoplásico

Através do teste de Spearman, observou-se que não há correlação entre os valores de Tregs no sangue periférico e no tecido neoplásico nos animais com linfoma cutâneo ($p=0,83$; $r=0,07$). Para tal correlação utilizou-se os valores de % de

Treg (na *gate* PanT CD4⁺), obtidos através de citometria de fluxo, e % de células marcadas para o anticorpo anti-Foxp3, obtidos através de imuno-histoquímica, conforme visualizado na Figura 12.

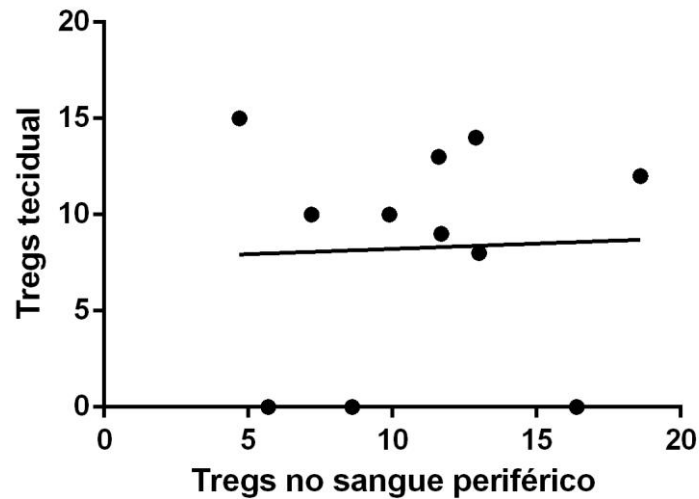


Figura 12. Correlação entre valores obtidos de Tregs no sangue periférico, através de técnica de citometria de fluxo, e Tregs tecidual, obtidas a partir de técnica imuno-histoquímica, em cães com linfoma cutâneo. Jaboticabal, 2017.

6 DISCUSSÃO

O linfoma cutâneo é considerado uma neoplasia rara mundialmente, com diagnóstico mais frequente dentro da especialidade dermatológica, e pouco comum dentre todas as neoplasias (FONTAINE et al., 2010). A idade média dos animais atendidos neste experimento foi de 7,5 anos, muito próxima à citada pela literatura, da mesma forma sem predileção sexual. (FOSTER et al., 1997; BHANG et al, 2006; FONTAINE et al., 2010). Quanto à raça, a maioria dos nossos pacientes eram Sem raça definida, o que não pode ser comparado com a literatura devido à diversidade de raças em cada localidade.

O tratamento quimioterápico utilizado com base na lomustina possibilitou uma sobrevida média baixa, de 71 dias, porém compatível com a literatura, visto que os animais estudados apresentavam imunofenótipo T (RISBON et al., 2006; FONTAINE et al., 2010; VAIL et al., 2013), sendo portanto, um dos tratamentos de escolha para o linfoma cutâneo canino.

Durante a seleção dos animais para a pesquisa em questão, foram diagnosticados 14 cães com linfoma cutâneo, dos quais coletou-se material para as análises laboratoriais. Entretanto, após imunofenotipagem, encontrou-se apenas dois animais com imunofenótipo B, ambos não epiteliotrópicos, que então foram excluídos das análises estatísticas devido ao baixo número. Segundo a literatura, o linfoma cutâneo B possui menor prevalência e está associado à apresentação não epiteliotrópica, assim como o encontrado nesta pesquisa. O linfoma cutâneo não epiteliotrópico pode apresentar imunofenótipo B, T ou não B não T. Já o linfoma cutâneo epiteliotrópico apresenta expressão imunofenotípica T (MOORE; OLIVRY, 1994). Tais dados corroboram os obtidos na classificação histopatológica em questão.

O avanço das pesquisas oncológicas vem procurando mecanismos no microambiente tumoral que permitam ou estimulem o crescimento das células neoplásicas, sua disseminação, sua resistência aos mecanismos de defesa, afim de intervir em tais mecanismos e alterar assim a evolução clínica dos pacientes,

melhorando seu prognóstico. Diante disto, o sistema imune apresenta papel fundamental, e dentro dele, as células T reguladoras (Tregs) são grande objeto de pesquisa para futuras modalidades alvo terapêuticas por atuarem atenuando a resposta imune antitumoral, além de funcionarem como fator preditivo de resposta (MUCHA et al., 2016; VEIGA-PARGA, 2016).

Apesar de propostas de inúmeros marcadores de Tregs, Foxp3 permanece sendo o único amplamente utilizado em pesquisas humanas e veterinárias (FONTENOT et al., 2003; (BILLER et al., 2007; KEPPEL et al., 2008; BANHAM et al., 2009; HORIUCHI et al., 2009; PINHEIRO et al., 2014). Desta forma, quando encontramos marcação positiva significativamente maior de Foxp3, através da técnica imuno-histoquímica, no tecido neoplásico dos cães com linfoma cutâneo, podemos inferir maior presença de Tregs no ambiente tumoral, enquanto tecido cutâneo de animais saudáveis não apresentaram marcação, e portanto não apresentaram células Tregs.

Kim et al. (2012), Carvalho et al. (2016) e Mucha et al. (2016) utilizaram, da mesma forma, técnica imuno-histoquímica para avaliação de Tregs no ambiente tumoral de neoplasias mamárias caninas e observaram um alto número de células imunossupressoras Tregs, assim como Pinheiro et al. (2014) observaram em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico B. Tais pesquisadores, quando associaram os valores obtidos de Tregs nos tecidos aos fatores prognósticos destas neoplasias, observaram associação prognóstica negativa como aumento de Tregs em neoplasias mamárias de grau histopatológico alto e aumento de Tregs e menor tempo livre de doença e sobrevida nos linfomas.

Entretanto, no presente trabalho, quando avaliamos a porcentagem de Tregs tecidual e o tipo histopatológico do linfoma cutâneo e a sobrevida, como fatores prognósticos, não foram encontradas diferenças significativas, o que pode estar relacionado ao baixo número de animais utilizados. Além disto, sabe-se que o linfoma cutâneo canino apresenta-se clinicamente de forma muito agressiva na maioria dos casos e não possui fatores prognósticos pré estabelecidos, apenas quanto ao imunofenótipo. Desta forma, quando optamos pela utilização de animais apenas com imunofenótipo T, houve um agrupamento mais homogêneo, o que pode

ter dificultado a diferenciação dentre os animais. Outra possível explicação é que, independentemente do tipo histopatológico, a sinalização dos linfócitos neoplásicos poderia ser a mesma para a manipulação e diferenciação das Tregs no ambiente tumoral.

Os mecanismos pelos quais Tregs encontram-se aumentadas no microambiente tumoral não estão totalmente elucidados, porém sugere-se que haja um aumento da proliferação local destas células, por exemplo através de diferenciação de linfócitos T CD4 *naïve*, após exposição a citocinas como IL-10 e TGF- β secretadas pelo tumor, ou migração seletiva destas células, da mesma forma por fatores estimulantes produzidos pelo tumor (CURIEL, 2007; CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; SAVAGE et al., 2012; VEIGA-PARGA, 2016).

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

Quando avaliadas quantitativamente no sangue periférico, a população de Tregs de cães portadores de linfoma cutâneo, neste ensaio, revelou aumento superior a 90% quando comparada aos animais controle.

Chaves (2014), em um estudo semelhante com cães acometidos por mastocitoma, encontrou aumento de Tregs no sangue periférico em relação aos animais saudáveis, sem distinção entre as classificações histopatológicas desta neoplasia. Da mesma forma, Mucha et al. (2016) encontraram aumento significativo de Tregs no sangue periférico de cadelas com neoplasias mamárias em diversos estádios. Dados semelhantes foram obtidos por outros autores durante pesquisas com tumores distintos (BILLER et al., 2007; HORIUCHI et al., 2009; O'NEILL et al., 2009; ANAI, 2014; MUNHOZ et al., 2016), o que dá legitimidade às hipóteses e resultados deste ensaio.

Biller et al. (2007) avaliou Tregs no sangue periférico e linfonodo drenante e não drenante em cães com diversos tipos de tumores e cães saudáveis. Foram

encontrados valores maiores de Tregs no sangue periférico e no linfonodo drenante dos cães com neoplasia em relação aos animais saudáveis. Além disto, quando compararam os valores de Tregs dos linfonodos, os linfonodos não drenantes dos pacientes com neoplasia apresentavam valores de Tregs similares aos valores encontrados nos linfonodos dos animais saudáveis. Desta forma, sugeriu-se que as Tregs acumulam-se preferencialmente no linfonodo drenante de cães com câncer, e que este então seria provavelmente o maior responsável pelo aumento das mesmas no sangue periférico.

No presente estudo, houve aumento das Tregs no sangue periférico, assim como na pele com linfoma, em comparação com o grupo controle. A maior proliferação e/ou diferenciação no ambiente tumoral das Tregs poderia ter levado ao acúmulo das mesmas nos tecidos neoplásicos e órgãos linfóides secundários, como os linfonodos, levando a maiores concentrações sanguíneas destas células. Entretanto, quando correlacionamos os valores teciduais e sanguíneos de cada animal, não foi possível obter significância, o que pode ser justificado pelo baixo número de animais e uso de técnicas distintas para detecção das Tregs no tecido e no sangue.

Tregs atuam regulando negativamente respostas imunes e podem suprimir a proliferação e atividade de células B, *Natural Killer*, T CD4⁺ e T CD8⁺, através de diversos mecanismos como contato célula-célula e/ou síntese de citocinas como IL-10 e TGF- β (CURIEL, 2007; MUCHA et al., 2016). As células T CD4⁺ e CD8⁺ possuem um potencial antitumoral importante e estão presentes em vários tipos de neoplasias em humanos e murinos (GERDEMANN et al., 2009; MERLO et al., 2010).

Neste estudo, as células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico não apresentaram diferença entre os animais saudáveis e o GLC, o que corrobora os achados de outras pesquisas em cães com câncer (WINNICKA et al., 2002; WALTER et al., 2006; COLETA, 2009; MITCHELL et al., 2012; ANAI, 2014; CHAVES, 2014; MUCHA et al., 2016; MUNHOZ et al., 2016).

Em contrapartida, O'Neill et al. (2009), obtiveram uma diminuição absoluta de células CD8⁺ em cães com câncer quando comparadas ao grupo controle e também observou uma diminuição de células CD4⁺ em cães com carcinoma comparadas ao

grupo controle. Também foi observado uma diminuição das células CD8⁺ em cães com osteossarcoma quando comparado ao grupo controle por Biller et al. (2010), porém sem diferença quanto às células CD4⁺ entre grupos. Horiuchi et al. (2009), compararam valores de CD4⁺ e CD8⁺ entre cães com e sem metástase, de diversos tumores, obtendo valores menores das mesmas nos pacientes metastáticos, sendo então sugerido pelos autores que animais com metástase possuem diminuição severa de células Th1. Horiuchi et al. (2010) ao avaliarem cães com melanoma oral, observaram que os mesmos apresentam porcentagem menor de células CD4⁺ e CD8⁺ em relação aos animais saudáveis.

É importante salientarmos que o estudo em tela acessou valores numéricos destas células no sangue periférico, sem avaliação de funcionalidade destes linfócitos. Desta forma, não se pode concluir que os valores numéricos semelhantes em ambos os grupos tenham a mesma funcionalidade. Como citado anteriormente, as Tregs podem suprimir ou bloquear a função de outras células do sistema imune, o que poderia estar acontecendo nesta situação, sem perda numérica das mesmas.

Diversos autores associam valores de Tregs e relação Treg/CD8⁺ com fatores prognósticos tumorais como sobrevida, tempo livre de doença, resposta ao tratamento (O'NEILL et al., 2009; BILLER et al. 2010). No presente trabalho, a distribuição da curva de sobrevida com os valores de Tregs e Treg/CD8⁺ não apresentou nenhuma correlação nos animais com linfoma cutâneo, não sendo possível associar tais valores ao prognóstico sobrevida dos pacientes. Munhoz et al. (2016) correlacionaram valores de Treg/CD8⁺ e resposta terapêutica em cães com linfoma multicêntrico submetidos à tratamento quimioterápico e também não encontraram valor prognóstico. Tal resultado pode estar relacionado com o baixo número de animais, fator limitante neste estudo. Além disto, como citado anteriormente, o uso de animais apenas com imunofenótipo T limitou a diversificação das amostras por agrupar um fator prognóstico desfavorável.

Atualmente, muitos estudos envolvendo imunoterapia e uso de anticorpos monoclonais estão sendo desenvolvidos, entretanto, até o presente momento, nenhum fármaco capaz de suprimir especificamente Tregs em cães está disponível (REGAN et al., 2016). Como alternativa, tem-se explorado drogas capazes de

diminuir Tregs em adição aos efeitos diretos e já esperados nas células tumorais. Diante dos resultados obtidos e discutidos, pode-se inferir que sejam úteis maiores estudos envolvendo terapias com esta função em cães com linfoma cutâneo, avaliando assim a resposta clínica destes pacientes em associação a avaliações seriadas de Tregs, visto que é ainda uma neoplasia pouco investigada na Medicina Veterinária, com poucas opções terapêuticas, e prognóstico, na maioria das vezes, muito reservado. Além disto, estudos podem ser desenvolvidos no intuito de utilizarem valores de Tregs como marcadores de recidiva e progressão neoplásica.

7 CONCLUSÕES

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

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

8 REFERÊNCIAS

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

COUTO, C. G. Oncologia: princípios de tratamento do câncer. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 78, p. 864-869, 2001.

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

CURIEL, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 5, 2007.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**. v.30, n.5, p.626-635, 2009.

DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA E. P. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.

DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; AMORIM, R. L.; BANDARRA E. P. Classificação citohistológica dos linfomas caninos. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 4, n. 2, p. 53-59, 2001.

DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.8, p.573-581, 2003.

DOBSON, J.M.; GORMAN, N.T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response tottwo chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 1994.

FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphossarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, January. 2002.

FAN, T.M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p.285-294, apr. 2005.

FIGHERA, R.A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria : O autor, 2001. 214p. Cap.7: Anemias por insuficiência medular: p.145-158.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the developmentan dfunc- tionof CD4⁺CD25⁺ regulatoryT cells. **Nature Immunology**. v. 4, p. 330-336, 2003.

FONTAINE, J.; HEIMANN, M.; DAY, M. J. Canine cutaneous epitheliotropic T cell lymphoma: a review of 30 cases. **Veterinary Dermatology**. v. 21, p. 267-275, 2010.

FOSTER, A.P.; EVANS, E.; KERLIN, R.L. et al. Cutaneous T cell lymphoma with Sé

zary Syndrome ina dog. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 26, p.188-192, 1997.

GERSHON, R.K.; KONDO, K.. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**. v.18, p.723-737, 1970

GREENLEE, P.G., FILIPPA, D.A., QUIMBY, F.W. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**. v.66, p.480-490, 1990.

HORIUCHI, Y. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. **Microbiology Immunology**. v. 53, p. 468-74, 2009.

HORIUCHI, Y. et al. Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Microbiology Immunology**. v. 54, p. 152-159, 2010.

JONES, C.J., HUNT, R.D., KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997.

KEPPEL, K.E. et al. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 123, p. 337-44, 2008.

KIM, H.I. et al. The ratio of intra-tumoral regulatory T cells (FoxP3+)/helper T cells (CD4+) is a prognostic factor and associated with recurrence pattern in gastric cardia cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 104, p. 728-33, 2011.

KIM, J.H et al. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **Veterinary Journal**. v. 193, n. 1, p. 222-227, 2012.

LEIFER, C.E.; MATUS, R.E. Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-1984). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.189, n.2, p.214-217, 1986.

LORIMIER, L. P. Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practic**, v. 36, p. 213-28, 2006.

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M; VAIL, D.M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3. ed Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. p. 558-590.

MITCHELL, L.; THAMM, D.H.; BILLER, B.J. Clinical and Immunomodulatory Effects of Toceranib Combined with Low-Dose Cyclophosphamide in Dogs with Cancer. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 26, p. 355-362, 2012.

MOORE, P. F.; AFFOLTER, V. K.; KELLER, S. M. Canine inflamed nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: a diagnostic conundrum. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 204-211, 2013.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T.; NAYDANT, D. Canine Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma (Mycosis Fungoides) Is a Proliferative Disorder of CD8+ T Cells. **American Journal of Pathology**, v. 144, n. 2, p. 421-429, 1994.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T. Cutaneous Lymphomas in Companion Animals. **Clinics in Dermatology**. v.12 p. 499-505, 1994.

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

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

MOULTON, J.E., HARVEY, J.W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**, 3.ed. California: University of California. p.240-244, 1990.

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

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

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

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

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

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

O'NEILL, K. et al. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 875-81, 2009.

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

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

PINHEIRO, D.;CHANG, Y.; BRYANT, H. et al. Dissecting the Regulatory Microenvironment of a Large Animal Model of Non-Hodgkin Lymphoma: Evidence of a Negative Prognostic Impact of FOXP3+ T Cells in Canine B Cell Lymphoma. **Plos One**. v. 9, n. 8, 2014.

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

RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003.

REGAN, D.; GUTH, A.; COY, J.; DOW, S. Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. **The Veterinary Journal**. v. 207, p. 20–28, 2016.

RISBON, R.E.; DE LORIMIER, L.P.; SKORUPSKI, K. et al. Response of Canine Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma to Lomustine (CCNU): A Retrospective Study of 46 Cases (1999–2004). **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 20, p.1389-1397, 2006.

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

RUBIN, E. The blood and the lymphoid organs. In: RUBIN, E. & FARBER, J.L. **Pathology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Company. cap. 20, 1994.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal Immunology**. v.155, p. 1151-1164, 1995.

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

SANTORO, D.; MARSALLA, R.; HERNANDEZ, J. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study . **Veterinary Dermatology**. v. 18, p. 101-106, 2007.

SAVAGE, P.A.; MALCHOW, S.; LEVENTHAL, D. Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. **Trends in Immunology**. v. 34, n. 1, p. 33-40, 2012.

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

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

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

TOMINAGA, M. et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 438-41, 2010.

TESKE, E.; HEERDE P.V.; RUTTERMAN, G. R.; KURZMAN I. D.; MOORE, P. F.; MACEWEN E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs.

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

VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 91, p. 620-625, 2000.

VAIL, D. M.; PINKERTON, M. E.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small animal clinical oncology**. 5 ed. Saunders. cap. 32, p.608-638, 2013.

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

VALLI, V.E.O. The hematopoietic system.In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER,N. (Ed) **Pathology of domestic animals**, 6.ed. New York: Academic. v.3, p.149-153, 1993.

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

APÊNDICES

Apêndice A

Tabela A. Dados referentes aos animais do Grupo Controle, em relação à idade, sexo e raça. Jaboticabal, 2017.

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

Apêndice B

Tabela B. Dados referentes aos animais do Grupo Linfoma Cutâneo, em relação à idade, sexo e raça. Jaboticabal, 2017.

Animal	Idade	Sexo	Raça
LC1	5 anos	Fêmea	Sem raça definida
LC2	11 anos	Macho	Sem raça definida
LC3	10 anos	Fêmea	Sem raça definida
LC4	5 anos	Macho	Sem raça definida
LC5	9 anos	Macho	Labrador
LC6	12 anos	Fêmea	Sem raça definida
LC7	7 anos	Fêmea	Sem raça definida
LC8	6 anos	Fêmea	Fox paulistinha
LC9	10 anos	Macho	Sem raça definida
LC10	3 anos	Fêmea	Poodle
LC11	4 anos	Macho	Golden Retriever
LC12	8 anos	Fêmea	Boxer

Apêndice C

Tabela C. Porcentagens individuais referentes às subpopulações celulares Treg, CD4⁺, CD8⁺ e Treg/CD8⁺, do Grupo Controle. Jaboticabal, 2017.

	%Treg (gate CD4)	%CD4 (gate linf T)	%CD8 (gate linf T)	Treg/CD8 (gate linf T)
Animais				
C1	5,16	64,64	31,3	0,1067
C2	5,2	56,64	21,81	0,1288
C3	8,62	53,21	27,66	0,2126
C4	3,28	15,56	68,14	0,0166
C5	6,03	54,33	25,98	0,1236
C6	6,95	53,35	24,65	0,1493
C7	5,52	16,08	75,09	0,0932
C8	3,17	56,6	28	0,0775
C9	6	57,5	28	0,1286
C10	3	67,1	13,5	0,1555
C11	1,73	54,75	26,1	0,0490
C12	13,4	62,4	11,1	0,8018

Apêndice D

Tabela D. Porcentagens individuais referentes às subpopulações celulares Treg, CD4⁺, CD8⁺ e Treg/CD8⁺, do Grupo Linfoma Cutâneo. Jaboticabal, 2017.

	%Treg (gate CD4)	%CD4 (gate linf T)	%CD8 (gate linf T)	Treg/CD8 (gate linf T)
Animais				
LC1	9,9	49,6	19,9	0,33166
LC2	11,7	52,8	26,4	0,22727
LC3	9,8	42,2	40,9	0,08068
LC4	4,7	21,7	65,6	0,02439
LC5	7,2	40,9	46,9	0,05970
LC6	5,7	30,1	50,4	0,02579
LC7	18,6	38,3	20,3	0,33005
LC8	11,6	69,3	19,1	0,31414
LC9	12,9	41,8	26,9	0,20446
LC10	13	62,6	21	0,29048
LC11	8,6	54,1	14	0,37857
LC12	16,4	75,7	12,4	0,41935