

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

**CÉLULAS T REGULADORAS EM CÃES COM LINFOMA
MULTICÊNTRICO: QUANTIFICAÇÃO, EM SANGUE
PERIFÉRICO, NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E APÓS A
ETAPA INICIAL DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Thiago Demarchi Munhoz

Médico Veterinário

2013

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

**CÉLULAS T REGULADORAS EM CÃES COM LINFOMA
MULTICÊNTRICO: QUANTIFICAÇÃO, EM SANGUE
PERIFÉRICO, NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E APÓS A
ETAPA INICIAL DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Thiago Demarchi Munhoz

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária (Clínica Médica
Veterinária)**

2013

Munhoz, Thiago Demarchi
M966c Células T reguladoras em cães com linfoma multicêntrico: quantificação, em sangue periférico, no momento do diagnóstico e após a etapa inicial do tratamento quimioterápico. / Thiago Demarchi Munhoz. -- Jaboticabal, 2013
x, 45 f. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Mirela Tinucci Costa
Banca examinadora: Helio José Montassier, Silvia Regina Ricci Lucas, Felipe Augusto Ruiz Sueiro, Sabryna Gouveia Calazans
Bibliografia

1. Cães. 2. Linfoma multicêntrico. 3. Células T reguladoras. 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

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

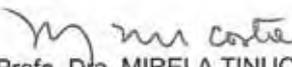
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CÉLULAS T REGULADORAS EM CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO: QUANTIFICAÇÃO, EM SANGUE PERIFÉRICO, NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E APÓS A ETAPA INICIAL DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

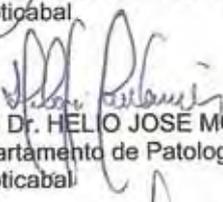
AUTOR: THIAGO DEMARCHI MUNHOZ

ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

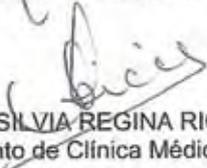
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



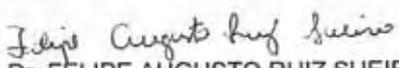
Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



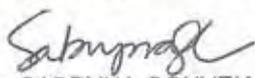
Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. SILVIA REGINA RICCI LUCAS
Departamento de Clínica Médica / Universidade de São Paulo / São Paulo/SP



Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO
Patologia e Biologia Molecular Veterinária / Campinas/SP



Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS
Universidade de Franca / Franca/SP

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THIAGO DEMARCHI MUNHOZ – nascido na cidade de Ilha Solteira – SP, em 15 de janeiro de 1982. Médico Veterinário formado em 2005 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal – SP. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica do CNPq/PIBIC e, nos anos de 2005 e 2006, participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais, no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV-UNESP/Jaboticabal. Ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, na mesma faculdade, em fevereiro de 2007, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2009. Atualmente é aluno de Doutorado do mesmo programa, continuando sob a mesma orientação.

DEDICATÓRIA

A todos os cães que foram incluídos neste trabalho e a todas as pessoas que trabalham com Oncologia, veterinária ou humana, que se engajam na tentativa de desvendar os mistérios do câncer.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Milton** e **Regina**, e meus irmãos, **Angelica**, **Carolina** e **Lucas**, pelo apoio incondicional durante toda a minha caminhada.

A minha orientadora Profa. Dra. **Mirela Tinucci Costa**, pelos ensinamentos e confiança, e pela contribuição direta na realização deste grande sonho.

Aos **pós-graduandos** do Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/Unesp Jaboticabal, em especial aos que participaram do Projeto Linfoma (**Letícia Anai**, **Lívia Semolin** e **Manuela Vieira**), pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

À equipe do Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, em especial à **Izaíra Brandão**, **Wendy Rios** e **Ana Paula Masson**, por todo o suporte técnico, e do Laboratório de Imunoparasitologia, da mesma faculdade, do qual eu agradeço imensamente a pós doutoranda **Denise Moraes da Fonseca**, por todo o apoio técnico-científico oferecido para a execução e conclusão desta tese.

Aos Professores Doutores **Felipe Sueiro** (VetPat) e **Reneé Amorim** (FMVZ/Unesp Botucatu), pela colaboração com os laudos histopatológicos e de imuno-histoquímica. Também ao pós-graduando **Carlos Eduardo Alves** (FMVZ/Unesp Botucatu), pelo auxílio nas técnicas de imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. **Aureo Evangelista Santana** e ao biólogo **Eugênio de Campos Filho**, do Laboratório de Patologia Clínica da FCAV/Unesp, pela contribuição nos laudos citológicos.

Aos veterinários do Centro Avançado em Veterinária (CAVET) – Ribeirão Preto, SP, especialmente à Profa. Dra. **Sabryna Calazans**, pela confiança em compartilhar os casos de linfoma.

Aos meus amigos de república **Maurício**, **Fábio**, **Marcelo**, **Gustavo** e **Bruno**, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Imuno-histoquímica da FCAV/Unesp Jaboticabal **Érika Terra, Paulo Jark, Mariana Rondelli, Reinaldo Garrido e Andrea Calado**, por todos os anos convívio.

A todos os amigos que fiz em Jaboticabal durante os anos aqui morados, em especial ao casal **Franco Poggiani e Sabrina Costa**, pela cumplicidade e amizade verdadeira, sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo auxílio fornecido (2010/11908-5) para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

	Página
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. Animais.....	11
4.2. Classificação histológica e imunofenotipagem dos linfomas.....	11
4.2.1. Anticorpos da reação imuno-histoquímica	12
4.2.2. Técnica da reação imuno-histoquímica.....	12
4.3. Protocolo quimioterápico e avaliação do animais.....	14
4.4. Quantificação das subpopulações de células T, no sangue periférico, por citometria de fluxo	15
4.5. Análise estatística dos resultados.....	16
5. Resultados e Discussão	17
5.1. Quantificação das subpopulações de células T no sangue periférico	17
5.1.1. Animais do grupo controle X animais do grupo linfoma	17
5.1.2. Quantificação de Tregs nos linfomas tipos B e T.....	22
5.1.3. Quantificação das subpopulações linfocitárias antes e depois da quimioterapia.....	23
5.1.4. Avaliação da relação Treg/CD8 ⁺ na resposta ao tratamento.....	26
6. Conclusões	29
7. Referências	30
Apêndices	37



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

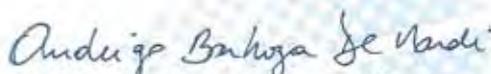


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 018606/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Células T regulatórias em cães com linfoma multicêntrico: quantificação no momento do diagnóstico e após etapa inicial do tratamento quimioterápico**", sob a responsabilidade da Profª Drª Mirela Tinucci Costa 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 04 de setembro de 2012.

Jaboticabal, 04 de setembro de 2012.


Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

**CÉLULAS T REGULADORAS EM CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO:
QUANTIFICAÇÃO, EM SANGUE PERIFÉRICO, NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO
E APÓS A ETAPA INICIAL DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum nos cães e uma das mais frequentes, dentre todas as neoplasias, nesta espécie. Apresenta-se em diversas localizações anatômicas e pode apresentar classificações histológicas e imunofenotipos distintos. Dependendo da resposta imune do paciente frente à instalação de um tumor, algumas informações sobre o prognóstico podem ser obtidas. Atualmente, as células T reguladoras (Tregs) vêm sendo estudadas em algumas neoplasias caninas, por seu comprovado potencial imunossupressor, principalmente por inibir a resposta antitumoral. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos quantificar, por citometria de fluxo, as células Tregs em sangue periférico de cães com linfoma multicêntrico de imunofenótipos B e T, respectivamente 14 e 8 cães, no momento do diagnóstico e após o primeiro ciclo de quimioterapia antineoplásica com o protocolo Madison-Wisconsin (MW) de 19 semanas adaptado, e comparar com cães saudáveis (n=10), buscando quantificá-las em cães com linfoma de diferentes imunofenótipos antes e após a 5ª semana do protocolo MW. Os resultados mostraram que cães com linfoma apresentaram uma porcentagem significativamente maior de Tregs ($18,84 \pm 2,56$) quando comparada aos cães sem neoplasia ($4,70 \pm 0,50$) ($p < 0,01$). Além disso, após a 5ª semana de tratamento houve uma significativa redução da população de Tregs ($7,54 \pm 1,08$), atingindo valores semelhantes a dos cães controle ($4,70 \pm 0,50$) ($p > 0,05$). Não houve diferença nas Tregs em relação aos imunofenotipos B ($17,45 \pm 2,77$) e T ($21,27 \pm 5,27$) ($p > 0,05$). Concluiu-se que o linfoma em cães leva a um aumento de células Tregs e que o tratamento com o protocolo quimioterápico MW reduz significativamente as células Tregs em sangue periférico, atingindo valores próximos aos dos cães saudáveis.

Palavras-chave: cães; linfoma multicêntrico, citometria de fluxo; células T reguladoras

**REGULATORY T CELLS IN DOGS WITH MULTICENTRIC LYMPHOMA:
PERIPHERAL BLOOD QUANTIFICATION AT DIAGNOSIS AND AFTER THE INITIAL
STAGE CHEMOTHERAPY**

Lymphoma is the most common hematopoietic malignancy in dogs and one of the most frequent among all neoplastic diseases in this species. It can occur in several anatomical locations with distinct histological and immunophenotypes. Depending on the host immune response towards the tumor, prognosis information could be collected. Because its well established immunosuppressant, antitumor activity, the function of regulatory T cells (Tregs) in canine neoplasias has been investigated. In this study, we sought to quantify, using flow cytometry, the Tregs subpopulation in peripheral blood of healthy dogs (10) and in those diagnosed with type-B (14) and type-T (8) multicentric lymphoma before (at diagnosis) and after the first cycle (5-week) of 19-week Madison-Wisconsin (MW) protocol of chemotherapy. Our results indicated that dogs with lymphoma showed higher percentage of Tregs ($18,84 \pm 2,56$) when compared to healthy dogs ($4,70 \pm 0,50$) ($p < 0,01$). In addition, 5-week chemotherapy treatment reduced the Tregs subpopulation ($7,54 \pm 1,08$) to levels similar to control ($4,70 \pm 0,50$) ($p > 0,05$). There was no difference in Tregs percentage between B-type ($17,45 \pm 2,77$) and T-type ($21,27 \pm 5,27$) lymphoma ($p > 0,05$). With this, we conclude that canine lymphoma increases Tregs in the peripheral blood and the MW protocol of chemotherapy reduces this cell subpopulation to control values.

Key-words: dogs; multicentric lymphoma; flow cytometry, regulatory T cells.

1. INTRODUÇÃO

As células T reguladoras (Tregs) compõem uma subpopulação de linfócitos T com propriedades imunossupressoras, extremamente úteis para impedir uma resposta de autoimunidade. Elas induzem a supressão das células T efetoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, acarretando, por fim, no comprometimento da resposta imune. Contudo, também podem interferir nas respostas imunes consideradas benéficas, principalmente na imunidade antitumoral, inibindo a atuação das células T CD8⁺, consideradas fundamentais na eliminação das células tumorais.

A participação das Tregs em alguns tumores caninos (carcinomas, sarcomas, melanoma, osteossarcoma) vem sendo explorada nos últimos anos. Com relação ao linfoma, a principal neoplasia hematopoiética e uma das mais frequentes dentre todos os tumores de cães, poucos estudos encontram-se disponíveis. O mais recente (MITCHELL et al., 2012) concluiu que a predominância de Tregs em cães linfomatosos prejudica a proliferação de células T efetoras antitumorais, como as CD4⁺ e CD8⁺, acarretando em pior prognóstico para os pacientes.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo quantificar as Tregs em cães com linfoma multicêntrico, de imunofenótipos B e T, antes e após o primeiro ciclo do tratamento quimioterápico, correlacionando-as com as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, visando compreender a papel das Tregs no linfoma canino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Linfoma canino

Linfoma é uma neoplasia caracterizada por proliferação clonal de linfócitos malignos, com origem na medula óssea, timo, baço, fígado e linfonodos. A neoplasia pode se desenvolver em praticamente qualquer órgão, pela contínua migração dos linfócitos pelos diferentes tecidos do organismo (TESKE, 1994; FIGUERA et al., 2002; VAIL; YOUNG, 2007; DALECK et al., 2008). Trata-se de uma das neoplasias malignas mais comuns em cães representando de 8,5 a 9% de todos os tumores caninos (DOBSON et al., 2001). Em um levantamento realizado em 2002, nos Estados Unidos, da população total estimada de 60,7 milhões de cães, encontrou-se uma variação de 3342 a 18210 casos de linfoma naquele ano (MORRISON, 2004).

Aparentemente, não há predisposição sexual (TESKE, 1994) e os animais adultos a idosos são os mais acometidos. A literatura americana aponta o Boxer, Rottweiler, Poodle, Chow-chow, Beagle, Basset hound, Pastor alemão, São Bernardo, Scottish terrier, Airedale terrier e Bulldog como as raças que apresentam maior incidência (MORRISON, 2002; VAIL; YOUNG, 2007).

No Brasil, poucos são os levantamentos feitos sobre a ocorrência de linfoma em cães. Fráguas (2008) registrou, entre 2003 e 2006, no Hospital Veterinário da FCAV UNESP/Jaboticabal, 108 cães acometidos, com predominância de cães sem raça definida (SRD), adultos jovens, sem predileção entre os sexos. Resultados semelhantes também foram obtidos em estudos retrospectivos de cães com linfoma realizados na região de Botucatu – SP (CARDOSO et al., 2002) e na região norte do Paraná (MORENO; BRACARENSE, 2007).

Embora a precisa etiologia do linfoma canino não seja conhecida, acredita-se que fatores genéticos, ambientais, imunológicos, tóxicos e infecciosos possam ter importância (TESKE, 1994; MORRISON, 2002; VAIL; YOUNG, 2007). Estudos sobre os linfomas em cães relacionam sua ocorrência a disfunções imunes. Aparentemente,

a imunossupressão predispõe ao estabelecimento e manutenção da malignidade. Além disso, a proliferação celular causada por qualquer agente infeccioso pode aumentar o risco da transformação neoplásica (BRUNKER; HOOVER, 2007).

O linfoma pode se apresentar em diferentes localizações anatômicas, recebendo a classificação de multicêntrico, mediastinal ou tímico, alimentar, cutâneo e extranodal (FIGUERA et al., 2002). Cerca de 80% dos cães desenvolvem a forma multicêntrica, que é caracterizada pelo aumento dos linfonodos, inicialmente submandibulares, pré-escapulares e axilares, progredindo para linfadenomegalia generalizada, acompanhados de desconforto, apatia, febre, hiporexia e anorexia e, muitas vezes, efusão torácica e ascite (MORENO; BRACARENSE, 2007).

Animais com linfoma mediastinal podem apresentar a síndrome da veia cava cranial e alterações respiratórias conseqüentes à efusão pleural ou à formação neoplásica no mediastino. Cães com linfoma alimentar costumam apresentar hiporexia a anorexia, emese, diarréia e perda de peso, além de desconforto abdominal (DALECK et al, 2008). Os sinais clínicos do linfoma cutâneo são variáveis, incluindo eritema e descamação, despigmentação e alopecia, além da formação de placas, nódulos e ulcerações locais (SANTORO et al., 2007). Nos linfomas extranodais, a apresentação clínica varia conforme o órgão afetado (FIGUERA et al., 2002).

A avaliação citológica de aspirado por agulha fina é um método confiável e comumente utilizado para o diagnóstico do linfoma canino (DICKINSON, 2008). Contudo, deve-se efetuar a biopsia incisional ou excisional do tecido comprometido para avaliação e classificação histopatológica (MORRISON, 2004; VAIL; YOUNG, 2007).

A poliquimioterapia é a modalidade terapêutica mais utilizada e eficaz no tratamento de cães com linfoma e pode ser acompanhada de cirurgia, que traz bons resultados apenas nos estádios iniciais ou para nódulos isolados. A radioterapia é indicada somente em situações críticas, no tratamento de nódulos isolados, em associação ou não à quimioterapia antineoplásica, quando se deseja rápida redução do

tamanho tumoral ou em casos de linfoma resistente à quimioterapia (DALECK et al., 2008).

Protocolos quimioterápicos combinando ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona são considerados os de escolha para o tratamento do linfoma canino. Há muitas variações nas combinações dos fármacos resultando em tempo livre de doença e de sobrevida semelhantes. Essas variações vão de diferenças na ordem de administração dos fármacos, adição de L-asparaginase ou metotrexato ao protocolo, alterações mínimas nas doses e aumento ou redução na duração do tempo de quimioterapia (CHUN et al., 2000; GARRETT et al., 2002; CHUN, 2009; MARCONATO, 2010).

O protocolo UW-19 é uma versão condensada do protocolo da Universidade de Wisconsin-Madison (HOSOYA et al., 2007), capaz de proporcionar uma sobrevida média de 1 a 2 anos. Inclui a utilização de L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona. A utilização da L-asparaginase não altera a resposta ao tratamento e o tempo de sobrevida, podendo ser utilizada no início do protocolo ou posteriormente, como terapia de resgate, ficando essa decisão a critério do médico veterinário (DALECK et al., 2008). Os linfomas frequentemente recidivam após uma boa resposta inicial à quimioterapia e se tornam resistentes a um amplo espectro de antineoplásicos (GERARDI, 2008).

O prognóstico do linfoma canino varia e depende de um número de fatores, tais como: da localização e extensão da doença, gravidade dos sinais clínicos, grau histológico, imunofenótipo, exposição prévia à quimioterapia ou a corticoides, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas, do índice de proliferação do tumor e da presença de comorbidades, ou condições paraneoplásicas. Embora o linfoma canino seja raramente curável (menos que 10% dos casos), em grande parte dos animais o tratamento resulta em longo tempo livre de progressão da doença, com boa qualidade de vida (VAIL; YOUNG, 2007).

2.2. Células T Reguladoras (Tregs)

A análise histológica de tumores extraídos de seres humanos e animais demonstrou graus variados de infiltrados de células do sistema imune, sugerindo o recrutamento destas células em resposta à proliferação neoplásica. Esta resposta imunológica é mediada por macrófagos, células *natural killer* (NK), células dendríticas, linfócitos T e, ocasionalmente, linfócitos B, promovendo rejeição e destruição das células tumorais. 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 pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, capazes de eliminar as células tumorais. Os linfócitos T CD4⁺ também são importantes na imunidade antitumoral, atuando na liberação de citocinas (sinais auxiliares) para geração e ativação das células T CD8⁺ (ABBAS; LICHTMAN, 2008; WHITESIDE, 2008).

Embora o sistema imune tenha o potencial de reconhecer antígenos associados ao tumor e dirigir uma resposta citotóxica efetiva, esta resposta muitas vezes falha em prevenir o crescimento local e a disseminação das células neoplásicas. A descoberta de uma subpopulação de células T “supressora” surgiu na década de 70, todavia, devido à falta de técnicas moleculares e celulares para provar sua existência, somente em 1995 foi descrita uma população de célula T CD4⁺CD25⁺ com potente atividade supressora, caracterizadas como células T reguladoras (SAKAGUCHI et al., 1995).

Células T reguladoras (Tregs) são alvos de intensas pesquisas sobre sua função nas respostas imunes fisiológicas e sua participação em diversas enfermidades infecciosas, alérgicas, neoplásicas, auto-imunes e na imunologia dos transplantes (COOLS et al., 2007). Uma das primeiras citações sobre as Tregs foi feita por Sakaguchi et al. (1995). Esses autores as descreveram como linfócitos T CD4⁺ que expressavam constitutivamente a cadeia α do receptor da interleucina (IL) 2 (CD25) e eram responsáveis pela supressão do desenvolvimento de doenças auto-imunes em camundongos. Anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que essas células T CD4⁺CD25⁺ representavam aproximadamente 10% das células CD4⁺ periféricas em indivíduos saudáveis (SAKAGUCHI et al., 2005). Com o avanço das

pesquisas foram detectados outros marcadores expressos pelas Tregs, como CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein*), CD103, CD45RO, CD73 e CD39, entre outros (AKBAR et al., 2007; DEAGLIO et al., 2007).

Do ponto de vista molecular, demonstrou-se que o fator de transcrição Foxp3 é predominantemente expresso nas Tregs tímicas e periféricas. Além disto, células T *naive* transfectadas com o mRNA para o gene Foxp3 adquirem características de células reguladoras tornando-se anérgicas e supressoras *in vitro*, além da expressão fenotípica e produção de citocinas e outras moléculas relacionadas às Tregs. Desta forma, o Foxp3 é considerado um gene de grande importância no desenvolvimento e na função destas células (SAKAGUCHI, 2005; CRUVINEL et al., 2008; KNUEPPEL et al., 2011; BENOIST; MATHIS, 2012). Embora o Foxp3 seja transitoriamente expresso em algumas células T humanas ativadas, ele tornou-se o melhor marcador proteico com o qual se identificam as Tregs. Em cães, tais Tregs foram caracterizadas utilizando 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).

As Tregs podem ser classificadas em naturais ou induzidas. As naturais constituem uma população homogênea de células derivadas do timo, que necessita de ativação via TCR (receptor de célula T) para se tornar supressora (PICCIRILLO et al., 2002). São células relacionadas com a manutenção da auto tolerância e de grande importância para manutenção da homeostase do sistema imunitário (BAECHER-ALLAN et al., 2001). Contudo, as funções dessas células não ocorrem de maneira antígeno-específica (DIECKMANN et al., 2002). As induzidas diferenciam-se na periferia a partir de células T CD4⁺ convencionais, após a exposição a sinais de citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β), conhecidas inicialmente como Tr1 e Th3, respectivamente, ou a células apresentadoras de antígenos (APCs) (BELKAID, 2007). 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).

As funções desempenhadas pelas Tregs acontecem por meio de contato célula-célula ou por liberação de fatores solúveis (SAKAGUCHI, 2007). A interação da molécula CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) (presente nas Tregs) com seu ligante nas APCs (CD80 e CD86) leva à produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), promovendo a degradação do triptofano e liberando produtos tóxicos, refletindo em anergia ou apoptose das células efetoras (FALLARINO et al., 2003). A ativação das Tregs também resulta em liberação de granzima/perforina, levando a apoptose celular (CAO et al., 2007). A expressão das endonucleotidases CD39 e CD73 promove a geração de adenosina, culminando em inibição funcional das células dendríticas assim como de células T ativadas (BOPP et al., 2007).

As Tregs também apresentam a capacidade de produzir e induzir citocinas supressoras como IL-10, TGF- β e IL-35, inibindo a ativação de células T e suprimindo a função das APCs (BENOIST; MATHIS, 2012). Outra forma de atuação das Tregs seria via competição por fatores de crescimento, como a IL-2. Isto levaria à apoptose das células efetoras por privação de citocinas promotoras de crescimento (SOJKA et al., 2008).

Em humanos há evidências que as Tregs regulam de maneira negativa a função efetora contra tumores, resultando na disfunção de células T efetoras (KARUBE et al., 2004; GÁRATE et al., 2009), o que parece também ocorrer nos cães (HORIUCHI et al., 2009). Biller et al. (2007), utilizaram a expressão de Foxp3 para identificar Tregs em cães saudáveis e com câncer. Os autores verificaram um número de Tregs significativamente maior no sangue periférico de cães com neoplasia. Além deste achado, observaram que quanto mais maligno o tumor, maior o número de células Treg. Adicionalmente, essas células acumulavam-se, preferencialmente, em linfonodos drenantes dos tumores.

De modo semelhante, O'Neill et al. (2009) observaram aumento significativo das Tregs em cães com câncer quando comparados aos cães saudáveis. Também observaram que os maiores aumentos, em porcentagem, das Tregs ocorreram em cães com carcinoma, quando comparados com aqueles com sarcoma, linfoma e mastocitoma. Os autores sugerem que o aumento na porcentagem de Treg nos cães

com carcinoma poderia indicar que este grupo celular estava, de fato, aumentado relativamente às células T CD4⁺ efetoras. Os pesquisadores acreditam que a diminuição significativa no número total de linfócitos T CD4⁺ nos cães com carcinoma, quando comparados com os sadios seria responsável por esta resposta.

Horiuchi et al. (2009) detectaram aumento significativo na porcentagem de Tregs no sangue periférico de cães portadores de neoplasia com metástase em comparação ao grupo não metastático. Além disso, a porcentagem dessas células T foi maior nos pacientes com tumores em estágios mais avançados, sugerindo que as Tregs promovem imunotolerância das células tumorais por suprimirem a resposta de células T *helper* (Th) do tipo 1, ou seja, produtoras de IFN- γ , o que poderia favorecer a presença de metástases.

Avaliando o papel do infiltrado inflamatório no linfoma Hodgkin humano clássico via expressão dos fatores de transcrição Foxp3 (Tregs), T-bet (células Th1) e c-Maf (células Th2), Schreck et al. (2009) observaram que o microambiente tumoral fora composto, basicamente, por células Th2 e por Tregs. Contrariando o postulado de que as células Th2 poderiam contribuir para o crescimento tumoral, números elevados dessas células foram associados com significativo aumento no tempo livre de doença dos pacientes. Adicionalmente, a razão Treg/Th2 alta resultou em uma resposta contrária sugerindo que as Tregs exerceram efeitos inibitórios na resposta imune antitumoral mediada por células Th2 e que estas últimas podem ter particular importância na imunidade antitumoral.

Tominaga et al. (2010) observaram que cães com melanoma em cavidade oral apresentavam maior porcentagem de Treg no sangue periférico que os animais controle, e uma porcentagem ainda maior de Treg no sítio tumoral, quando comparada com a do sangue periférico dos mesmos cães com câncer. Estes achados os levaram a sugerir que as células tumorais poderiam induzir a proliferação local ou a migração seletiva de Treg para o sítio da neoplasia, via sinalização por TGF- β ou prostaglandina E2.

Pesquisas realizadas em pacientes humanos com câncer demonstraram uma associação entre o grau de infiltração de Treg nos tumores e a supressão da resposta de células CD8⁺ (SATO et al., 2005). Em mulheres com câncer de mama avançado foi identificada alta expressão de Foxp3 em linfonodos sentinelas, achado que corrobora os estudos feitos com outros tipos de neoplasias (MANDSFIELD et al., 2009).

Em cães com câncer, foi observado, que quanto maior a razão Treg/CD8⁺ em sangue periférico, pior o prognóstico desses animais, possivelmente por 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 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).

Recentemente, pesquisadores utilizando-se de ciclofosfamida em regime metronômico, na dose de 15 mg/m²/dia, 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). Estudos como os de Burton et al. (2011) demonstram a importância de se procurar reduzir a população de células Tregs e a participação destas células na patogênese do câncer em humanos e animais.

Portanto, torna-se importante o estudo das células T reguladoras no linfoma canino, procurando entender a participação deste tipo celular frente à relação hospedeiro-tumor, vislumbrando, futuramente, formas de terapias mais específicas para esta neoplasia bastante comum nos cães.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Pretendeu-se, com este estudo quantificar as células T reguladoras em sangue periférico de cães com linfoma multicêntrico de imunofenótipos B e T, no momento do diagnóstico e após o primeiro ciclo de quimioterapia antineoplásica (5ª semana) com o protocolo Madison-Wisconsin (UW-19).

3.2. Objetivos específicos

Comparar o número de células T reguladoras entre cães saudáveis e cães com linfoma multicêntrico;

Avaliar se os imunofenótipos B e T dos linfomas tem relação com o número de células T reguladoras;

Avaliar o efeito da quimioterapia antineoplásica sobre o número de células T reguladoras após o seu primeiro ciclo (5ª semana), comparativamente às contagens iniciais;

Avaliar se a relação Treg/CD8⁺ pode ser utilizada como um marcador de resposta clínica ao tratamento quimioterápico.

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 o número 018606/12.

4.1. Animais

Fizeram parte deste estudo 22 cães, machos ou fêmeas, de diferentes raças, pesos e idades, atendidos no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp Jaboticabal e no Centro Avançado em Veterinária, Ribeirão Preto, com diagnóstico de linfoma (por citologia e confirmado por histopatologia) multicêntrico (grupo linfoma - GL). Dez animais saudáveis, também machos ou fêmeas, de diferentes raças, pesos e idades, compuseram o grupo controle (GC)¹. Exame físico completo e exames laboratoriais (hemograma, ALT, creatinina, proteína total e albumina) foram realizados para se comprovar o estado de saúde dos animais do GC (momento único) e do GL; estes últimos no momento do diagnóstico e semanalmente, antes das sessões de quimioterapia e ao final da 5ª semana, limite do tempo experimental. A participação de todos os cães deste estudo teve anuência de seus proprietários.

4.2. Classificação histológica e imunofenotipagem dos linfomas

O diagnóstico presuntivo de linfoma multicêntrico foi estabelecido mediante exame citológico de amostras obtidas por punção aspirativa do linfonodo acometido. A seguir foi realizada biópsia excisional do mesmo linfonodo e o material fixado em solução de formol a 10% tamponado (pH 7,6). Após o processamento histológico de rotina, o diagnóstico foi confirmado por exame histopatológico realizado no Laboratório VetPat, sob responsabilidade do Prof. Dr. Felipe A. Ruiz Sueiro que adota os critérios

¹ Dados pertencentes aos animais controle como idade, sexo e raça, encontram-se no Apêndice A.

da Organização Mundial de Saúde (OMS) (SUEIRO et al., 2004). A imunofenotipagem foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP/Botucatu, sob responsabilidade da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim. Foram selecionados 14 linfomas de imunofenótipo B (GLB)² e 8 de imunofenótipo T (GLT)³.

4.2.1. Anticorpos da reação imuno-histoquímica

A caracterização do tipo celular predominante nos linfomas foi investigada, empregando-se para isso os anticorpos primários marcadores de linfócitos T (CD3) e de linfócitos B (CD79 α), ambos contra antígenos humanos, produzidos pela DAKO[®] (Quadro 1).

Quadro 1 - Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em linfomas caninos, em cortes parafinados, com os respectivos clones, diluições e procedências.

Anticorpos	Clones	Diluições	Conservação do tecido
CD3* (LinfócitosT)	F.7.2.38	1/100	Parafinado
CD79 α ** (Linfócitos B)	HM57	1/20	Parafinado

* camundongo anti-humano (monoclonal)

** coelho anti-humano (policlonal)

4.2.2. Técnica da reação imuno-histoquímica

² Dados referentes aos animais do GLB como idade, sexo, raça, tipo histológico do tumor e estadiamento da doença segundo a OMS encontram-se no Apêndice B.

³ Dados referentes aos animais do GLB como idade, sexo, raça, tipo histológico do tumor e estadiamento da doença segundo a OMS encontram-se no Apêndice C.

O método de imuno-histoquímica empregado foi pelo polímero *horseradish peroxidase* (HRP) e *3,3' diaminobenzidine tetrachloride* (DAB). Resumidamente, os cortes de tecido (4 μ) 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 n° X0909 – DAKO Corp.).

As lâminas contendo os cortes foram incubadas com o anticorpo primário na diluição padronizada (Quadro 1) e, então, incubados a 4°C *overnight* (18 horas). Depois, foram novamente lavados em solução tampão de TRIS (Tris-HCl - 0,05M, NaCl – 0,15M; pH=7,6). Em seguida foram incubadas com polímero Envision (Dako, Carpinteria, CA, USA) e posteriormente lavadas com TRIS por três vezes. A coloração foi obtida utilizando-se o DAB (DakoCytomation, Carpinteria, USA) e a contracoloração pela hematoxilina Harrys, 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 negativo, além de amostras de linfoma. Ambos receberam tratamento com o *Universal Negative Control Mouse* (Dako[®] N1698-1). Os mesmos linfonodos foram também empregados como controle positivo das reações. Fotomicrografias representativas da positividade e negatividade das reações com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79 encontram-se no Apêndice D.

4.3. Protocolo quimioterápico e avaliação dos animais

Antes do início da quimioterapia, os animais com linfoma foram avaliados clinicamente, quando também foi realizado o estadiamento do tumor, obedecendo às normas estabelecidas pela OMS (Apêndice E). Também, neste momento, 15 mL de sangue foram obtidos por venipunção jugular e armazenadas em tubos a vácuo heparinizados para realização de hemograma e bioquímica sérica (5 mL), conforme protocolo adotado pelo serviço de Oncologia Veterinária do referido Hospital e 10 mL para separação de leucócitos, para citometria de fluxo.

Após a confirmação histopatológica do diagnóstico de linfoma, os cães foram submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin de 19 semanas adaptado (UW-19) (HOSOYA et al., 2007; CHUN et al., 2009) (Quadro 2). Antes de cada sessão de quimioterapia, sangue dos animais foi colhido para repetição dos exames laboratoriais, como já descrito. A separação de leucócitos para citometria de fluxo foi repetida no grupo linfoma apenas após a 5ª semana de tratamento. Nos retornos semanais e ao término de período experimental (5ª semana de tratamento), baseando-se na avaliação clínica e tamanho do tumor, a resposta ao tratamento era classificada em remissão completa, remissão parcial, doença estável e doença em progressão (Apêndice F).

Quadro 2: Protocolo quimioterápico de UW-19 adotado para os animais do grupo GL.

	Semanas																		
UW-19	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
L-asparaginase (400 UI/kg, IM)*																			
Vincristina (0,75 mg/m ² , IV)	•		•			•		•			•		•			•		•	
Ciclofosfamida (200 mg/m ² , VO)		•					•					•					•		
Doxorrubicina (30 mg/m ² , IV)				•					•					•					•
Prednisona**	•	•	•	•															

*L-asparaginase não foi utilizada antes da 5ª semana; seu uso variou de acordo com a disponibilidade do fármaco e a condição financeira de cada proprietário; ** 2 mg/kg, VO, q24h, 7 dias; 1,5 mg/kg, VO, q24h, 7 dias; 1 mg/kg, VO, q24h, 7 dias; 0,5 mg/kg, VO, q24h, 7 dias.

4.4. Quantificação das subpopulações de células T, no sangue periférico, por citometria de fluxo

As células mononucleares foram isoladas a partir de 10 mL de sangue, coletados em tubos heparinizados (descrito no item 3.3). A seguir, o sangue coletado foi diluído (v:v) em PBS estéril (NaCl - 137mM, KCl - 2,7mM, Na₂HPO₄ - 8,1mM e KH₂PO₄ -1,5mM; pH=7,2) e separado em gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE[®]). Após centrifugação a 1500 rpm por 30 minutos, o anel de células mononucleares foi coletado e ressuspenso em PBS e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o anel de leucócitos foi ressuspenso em 2mL de tampão de lise para hemácias ACK (NH₄Cl - 0,15mM, KHCO₃ - 10mM, EDTA - 0,1mM; pH=7,3), por 5 minutos, e novamente centrifugado. As células foram lavadas, ressuspenso em 1mL de PBS e posteriormente contadas em câmara de Neubauer. Antes da incubação, por meia hora, com os anticorpos de superfície e intracelular, acrescentava-se, por tubo, 5µL de soro autólogo para bloqueio de reações inespecíficas, incubando-se por 40 minutos.

As células mononucleares em suspensão foram identificadas e quantificadas pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência, em citômetro de fluxo, empregando-se antígenos de identificação de células PanT, CD4⁺, CD8⁺ e detecção intracelular de Foxp3⁺ (Quadro 3). Após a lavagem das células pós-marcação, 100µL da solução PBS-formol eram adicionados. 1x10⁶ células foram utilizadas para as marcações de superfície e 2x10⁶ células para marcação intracelular.

Seis tubos foram obtidos por animal: tubo 1 – somente células sem marcação; tubo 2 – células marcadas com os isotipos controles; tubo 3 – células marcadas com os anticorpos CD4 FITC, 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 CD4 FITC, PanT APC e Foxp3 PE. 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).

Quadro 3: Anticorpos empregados na técnica de citometria de fluxo, com seus respectivos fluorocromos e volumes.

Anticorpo	Clone	Volume
Rat anti dog CD4 FITC Serotec®	YKIX302.9	1µL
Rat anti dog CD8 PE Serotec®	YCATE55.9	1µL
Anti mouse/rat FOXP3 PE eBioscience®	FJK-16s	2µL
Mouse anti dog PanT APC BD®	LSM 8.358	1µL

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 FlowJo. Anticorpo anti-IgG2a de camundongo foi utilizado como anticorpo isotipo controle para cada fluorocromo.

4.5. Análise estatística dos resultados

Quando comparadas duas variáveis, utilizou-se o teste T de amostras independentes, quando estas atendiam as suposições de normalidade e homogeneidade. Quando não, utilizou-se o teste Mann Whitney. Quando foram comparadas 3 variáveis e essas atendiam as suposições de normalidade e homogeneidade, aplicou-se o teste F da análise de variância. A comparação das médias aos pares foi feita pelo teste de Tukey. Já para as variáveis que não atendiam as suposições de normalidade e homogeneidade, foi feita uma análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) e a comparação aos pares pelo teste de Dunn. 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 E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação das subpopulações de células T no sangue periférico

5.1.1. Animais do grupo controle X animais do grupo linfoma

Cães com linfoma apresentaram porcentagem significativamente maior de Tregs ($18,84 \pm 2,56$), quando comparados aos cães sadios ($4,70 \pm 0,50$) ($p < 0,01$). Todavia, quando as subpopulações de células $CD4^+$ e $CD8^+$ foram avaliadas e comparadas entre os cães do grupo controle ($56,23 \pm 2,53$; $26,33 \pm 2,63$, respectivamente) e os cães do grupo linfoma ($48,22 \pm 3,06$; $25,27 \pm 2,96$, respectivamente), as porcentagens de células $CD4^+$ ($p=0,1$) e $CD8^+$ ($p=0,8$) não diferiram entre os dois grupos. As médias dos grupos, juntamente com os erros padrão das médias, estão apresentadas na Figura 1. Valores individuais encontram-se nos Apêndices G (GLB) e H (GLT). Um fluxograma representando a escolha das *gates* pode ser observado na Figura 2.

Embora no presente estudo não se evidenciou diferença significativa nas subpopulações de células $CD4^+$ e $CD8^+$ no grupo linfoma, quando comparado com o grupo controle, este último apresentou médias maiores de $CD4^+$ e $CD8^+$ que os primeiros. Dados semelhantes também foram encontrados por O'Neill et al. (2009), que avaliaram cães com diversos tipos de neoplasias (sarcoma, carcinoma, linfoma e mastocitoma), e por Mitchell et al. (2012), em cães com linfoma do tipo B. De maneira oposta, outros trabalhos (WINNICKA et al., 2002; WALTER et al., 2006) registraram esta diferença entre cães sadios e doentes, atribuindo-a a fatores relacionados ao tumor e sugerindo haver situações de supressão ligadas ao câncer, sem, no entanto, explicitá-las (WINNICKA et al., 2002).

Alguns fatores podem interferir nesta análise e poderiam explicar essas discrepâncias de resultados. Inicialmente, a forma de expressar os resultados pode ser um deles já que quando os valores relativos de $CD4^+$ e $CD8^+$ foram transformados em valores absolutos (em relação ao número de linfócitos obtidos no hemograma), o trabalho de Winnicka et al. (2002) não evidenciou diferença entre essas populações.

Outro fator seria analisar conjuntamente dados de diferentes tipos tumorais e de diferentes gravidades, como feito por O'Neill et al. (2009). E, por último, avaliar pacientes de um tipo tumoral com várias classificações histológicas e imunofenótipos, como o linfoma, também de uma mesma forma, numa mesma análise.

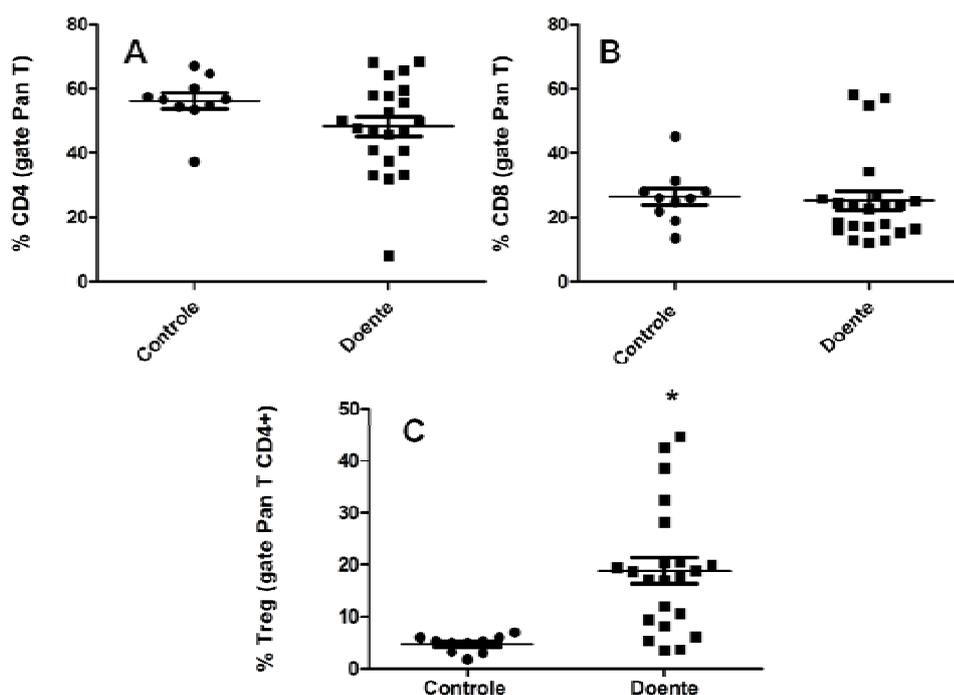


Figura 1: Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (A), CD8⁺ (B) e células T reguladoras (Treg) (C) no sangue periférico de cães saudios (controle) e portadores de linfoma (doente). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média em porcentagem (%). Em A e em B foi utilizado o teste t e em (C) foi utilizado o teste de Mann Whitney. * $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (n= 10 para o grupo controle e 22 para o grupo doente).

De fato, Winnicka et al. (2002) não determinaram o imunofenótipo do linfoma e Mitchell et al. (2012) apenas incluíram os de imunofenótipo B. Obviamente, isso exigiria um número muito maior de animais em uma pesquisa, o que poderia inviabilizá-la. Portanto, essas variações podem ser individuais e referentes ao tipo de tumor

estudado, além de representar a gravidade da doença. Respeitando essas limitações, o presente estudo considerou somente cães com linfoma de imunofenótipos B e T, permitindo a comparação entre esses grupos, garantindo assim maior homogeneidade nos resultados.

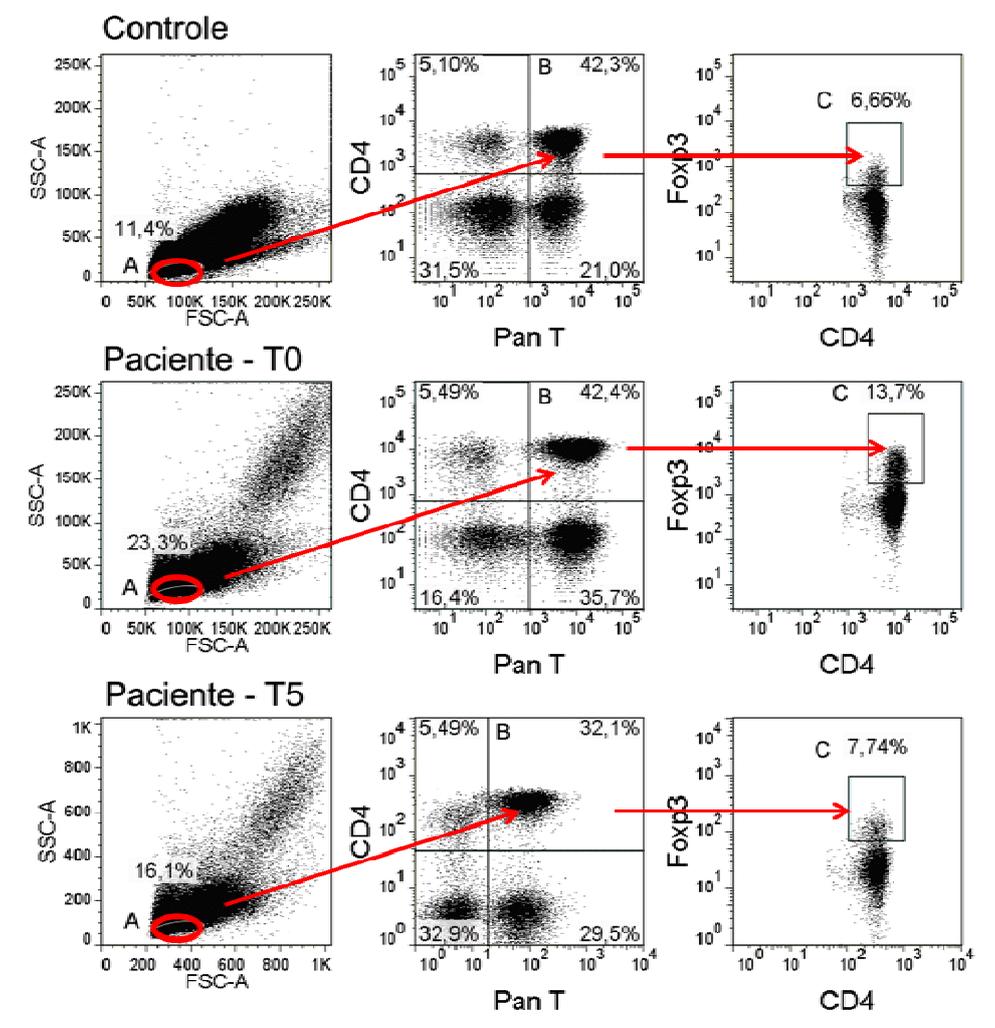


Figura 2: Fluxograma representativo das *gates* de linfócitos (A); a partir dela a *gate* de linfócitos T CD4⁺ (B) e, a partir desta, a *gate* de linfócitos CD4⁺Foxp3⁺ (Treg) (C) de um cão controle (painel superior) e um cão com linfoma em M0 (paciente – T0, painel central) e em M5 (paciente – T5, painel inferior).

Ao se avaliar a população de células Treg, nota-se que esta é aproximadamente 4 vezes maior no grupo linfoma, quando comparada ao controle. Tais resultados condizem com os de outros estudos em cães com câncer (BILLER et al., 2007; HORIUCHI et al., 2009; O'NEILL et al., 2009; MITCHELL et al., 2012), comprovando que essa subpopulação linfocitária encontra-se aumentada nos casos de neoplasia.

Pesquisas mostram consideráveis evidências de que o microambiente tumoral determina a expressão local de citocinas, como também a atividade das células ali presentes. A complexa interdependência entre as células do câncer, o estroma tumoral e as células hematopoiéticas infiltradas determinam o tipo de resposta imune local, induzida, em parte, pelo padrão de citocinas e quimiocinas reguladoras da inflamação no local (TRINCHIERI, 2011). Macrófagos ativados infiltrados e linfócitos oriundos da microcirculação são as maiores fontes de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e fatores angiogênicos. A extensa infiltração de leucócitos em tumores sólidos é controlada, em parte, pela produção local de quimiocinas por células tumorais e essas quimiocinas, em conjunto com as citocinas e os fatores de crescimento influenciam na sobrevivência das células tumorais e na neoangiogênese (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2006). No contexto específico das Tregs, sabe-se que além das quimiocinas favorecerem sua migração para o microambiente tumoral, outros fatores como citocinas imunossupressoras (TGF- β , IL-6) promovem a expansão ou a conversão das células T convencionais em Tregs (ZOU, 2006).

Células CD4⁺ orquestram a resposta imune adaptativa, frente ao padrão de citocinas secretadas. Dependendo de antígeno invasor (bactérias, fungos, células tumorais, etc) IFN- γ e IL-12 direcionam a resposta para o padrão de células Th1; IL-4 para o padrão Th2, TGF- β e IL-6 para Th17. Embora as células Treg sejam células heterogêneas em suas funções, citocinas imunossupressoras (TGF- β , IL-6) determinam sua função supressora (LI; BOUSSIOTIS, 2011). Muitos aspectos da função das células Treg ainda estão sob investigação e os resultados apresentados são, em sua maioria, de experimentos em humanos e animais de laboratório.

Em mulheres com câncer de mama invasivo, evidenciou-se uma elevada expressão de TGF- β e IL-10 em tecido de tumor de mama. Ainda, encontrou-se uma

correlação positiva entre TGF- β e IL-10 e entre IL-10 e Foxp3, sugerindo que a produção de TGF- β no tumor favoreceria a diferenciação de Tregs produtoras de IL-10, reforçando que a indução de Tregs produtoras dessas citocinas seria um dos mecanismos de evasão do tumor da resposta imune do hospedeiro. Também foi mostrado um aumento da quimiocina CCL22 e uma correlação positiva entre a expressão relativa de CCL22 e Foxp3 em tumor de mama, sendo este também um mecanismo responsável pelo recrutamento e acúmulo de Tregs (BENEVIDES, 2012). A carência de estudos em cães com doenças imunossupressoras, como o linfoma, envolvendo a participação de citocinas e quimiocinas, reforça a necessidade de maiores investigações.

Na literatura atual, poucos estudos abordam a questão do que poderia levar ao aumento das Tregs em cães com câncer. Estudos com linfócitos caninos mostraram que um aumento na expressão de mRNA de Foxp3 em linfócitos ativados ocorreu quando estes foram colocados em cultivo com IL-2 e TGF- β . Esses resultados também foram reforçados por aumentos simultâneos na expressão de mRNA de IL-10 e TGF- β em células Tregs adequadamente ativadas (BILLER et al., 2007).

Em cães com melanoma, uma explicação plausível para o aumento das Tregs seria a expressão de TGF- β , de ciclo-oxigenase-2 (COX2) e de prostaglandina E2 pelo tumor, o que levaria a atração e proliferação local de células CD4⁺Foxp3⁺, além da conversão *in situ* de células CD4⁺ em Tregs. Este trabalho também cita a importância de se estudar a participação de CCL22 em tumores caninos (TOMINAGA et al., 2010), justamente para se entender melhor a dinâmica das Tregs nessa espécie.

Por outro lado, o papel que as Tregs desempenham em tumores humanos e caninos já está determinado, levando a situações de imunossupressão via produção de citocinas como IL-10 e TGF- β (CURIEL, 2007), e atenuação da função de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (YANG et al., 2006a; YANG et al., 2006b; HORIUCHI et al., 2009, MITCHELL et al., 2012), podendo justificar o motivo pelo qual se encontram populações reduzidas desses tipos celulares em cães com câncer.

5.1.2. Quantificação de Tregs circulantes nos linfomas tipos B e T

Ao se avaliar a população de Tregs, em porcentagem, nos linfomas B ($17,45 \pm 2,77$) e T ($21,27 \pm 5,27$), não se evidenciou diferença significativa entre elas ($p=0,48$), apesar de a maior média ter sido observada nos linfomas T, conforme observado na Figura 3.

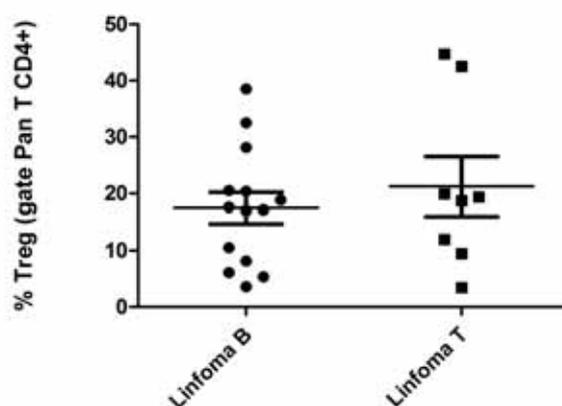


Figura 3: Avaliação da população de células T reguladoras (Treg) no sangue periférico de cães portadores de linfoma tipo B e linfoma tipo T. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média em porcentagem (%). Teste t, $p = 0.48$, ns ($n = 14$ para o grupo linfoma B e 8 para o grupo linfoma T).

O'Neill et al. (2009), pesquisando as Tregs e tentando associá-las a diversos tipos de tumores, observaram que cães com linfoma T apresentaram os maiores valores da razão Treg/CD8 quando comparados com outros tipos de câncer, inclusive com os de linfoma B, gerando a dúvida se o imunofenótipo poderia influenciar a população de Treg. O presente estudo não evidenciou este fato. Este resultado indica que independentemente do imunofenótipo, a sinalização do linfoma poderia ser a mesma para a manipulação e diferenciação das Tregs. Vale ressaltar que o número de parcelas experimentais avaliado por O'Neill et al. (2009) foi pequeno (7 cães com linfoma, sendo 3 de imunofenótipo B, 2 de imunofenótipo T e mais 2 cães com linfoma

não submetidos a imunofenotipagem), o que não reflete uma amostragem significativa. Exceto pelos estudos de O'Neill et al. (2009), não foram encontrados registros de outras pesquisas que investigassem as Treg em subtipos de linfomas caninos.

5.1.3. Quantificação das subpopulações linfocitárias circulantes antes e depois da quimioterapia

Quando comparadas as porcentagens de células CD4⁺ e CD8⁺ antes (48,22±3,06; 25,27±2,96, respectivamente) e após (53,75±3,01; 26,65±2,75, respectivamente) a quimioterapia, não foi observada diferença significativa (p=0,06 e p=0,95, respectivamente) nessas subpopulações. Inversamente, houve redução significativa (p< 0,01) nas porcentagens de células Tregs pós-quimioterapia (7,54±1,08) em relação ao momento do diagnóstico (18,84± 2,56) (Figura 4).

Avaliando as porcentagens das Tregs do grupo controle, e antes e após a quimioterapia nos animais com linfoma, notou-se que após quimioterapia (M5), as Tregs assumiram valores próximos aos dos animais controles (p>0,05), conforme observado na Figura 5.

Os resultados do presente estudo mostraram que as porcentagens das subpopulações de células CD4⁺ e CD8⁺ não se alteram por motivo da quimioterapia, condizente com os resultados de outras pesquisas (WINNICKA et al., 2002; COLETA, 2009; MITCHELL et al., 2012) em cães com linfoma multicêntrico e em cães com linfoma ou osteossarcoma (WALTER et al., 2006). Gauthier et al. (2005), estudando o efeito da quimioterapia na população linfocitária de cães com linfoma, observaram uma significativa redução no valor absoluto da maioria das subpopulações de linfócitos e, um menor grupo com diminuição relativa, comparando cães saudáveis e em tratamento quimioterápico. De forma resumida, os linfócitos CD3⁺, CD90⁺ e TCRαβ⁺ mantiveram suas populações relativas numericamente próximas às dos cães controles, sugerindo que a citorredução promovida pela quimioterapia pouparia as células T numa extensão maior que os outros linfócitos, o que embasaria os achados do presente estudo.

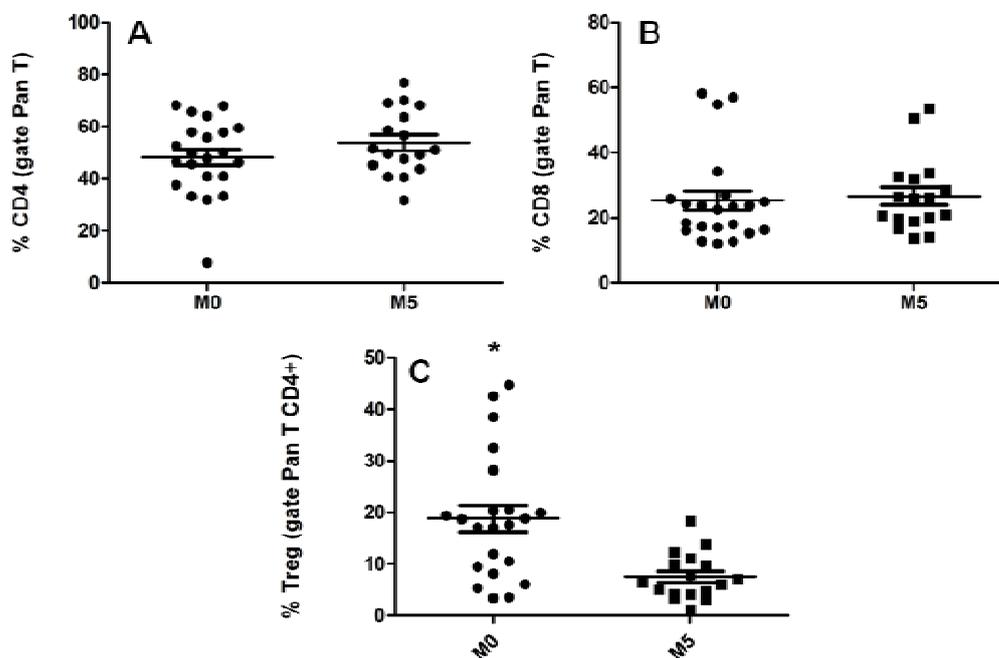
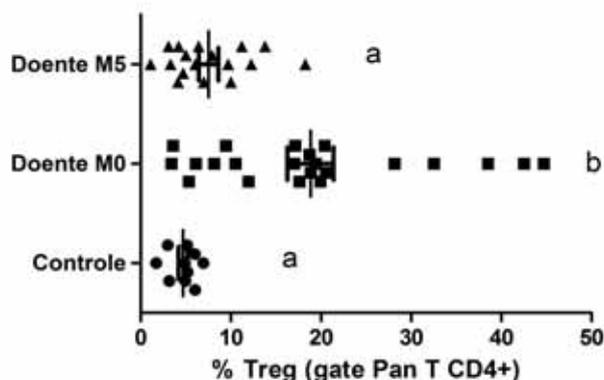


Figura 4: Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (A), CD8⁺ (B) e T reguladores (Treg) (C) no sangue periférico de cães portadores de linfoma antes (M0) e depois (M5) do tratamento quimioterápico. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média em porcentagem (%). Teste t. * $p < 0,01$ quando comparados os grupos M0 e M5 (n= 22 para o grupo M0 e 17 para o grupo M5).

Outro estudo avaliou o efeito da quimioterapia em dois tipos de câncer (linfoma e osteossarcoma) em cães e verificaram que a função das células CD4⁺ permanecia inalterada após o tratamento. Isso foi comprovado pela capacidade de os cães montarem uma resposta IgG específica contra o antígeno KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), resposta esta dependente de linfócitos TCD4⁺ (WALTER et al., 2006).



- . **Figura 5:** Avaliação das subpopulações de linfócitos T reguladores (Treg) no sangue periférico de cães sadios (controle) e de cães com linfoma (doente) antes (M0) e depois (M5) do tratamento quimioterápico. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média em porcentagem (%). Teste de Dunn (comparações múltiplas). ^a $p > 0,05$ ns, ^b $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos (n= 10 para o grupo controle, n = 22 para o grupo M0 e n = 17 para o grupo M5).

No estudo em tela, as Tregs foram as únicas células que sofreram alteração com a quimioterapia, dentre as subpopulações linfocitárias avaliadas. Esse resultado foi semelhante ao de Mitchell et al. (2012), que da mesma forma, também encontraram redução significativa somente nesse tipo celular. Os referidos autores utilizaram somente doxorrubicina para o tratamento do linfoma, diferentemente do presente estudo, em que se empregou uma combinação de 4 fármacos (vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisona). Independentemente, o efeito da quimioterapia parece ter sido seletivo em reduzir apenas a subpopulação de Treg. No caso específico da doxorrubicina, a comprovada restauração da função dos linfócitos CD8⁺ coincidiu com a diminuição significativa no número de Tregs circulantes, quando comparado com as contagens antes do tratamento, sugerindo que a atenuação da imunossupressão mediada pelas Tregs permitiu a restauração das células T citotóxicas (MITCHELL et al., 2012). Esses resultados foram condizentes com os do presente

estudo, pois dos 17 cães que foram avaliados na quinta semana de tratamento, 16 (94%) apresentaram redução da massa tumoral, sendo 6 deles (35%) de forma completa e 10 (59%) de forma parcial.

5.1.4. Avaliação da relação Treg/CD8⁺ na resposta ao tratamento

Avaliando a relação Treg/CD8⁺ nos animais com linfoma nas diferentes respostas ao tratamento, não foi encontrada diferença significativa ($p=0,42$) entre os grupos remissão completa (RC) ($0,16\pm0,06$) e remissão parcial (RP) ($0,24\pm0,06$), como pode ser verificado na Figura 6. Dos 22 cães, 17 completaram 5 semanas de tratamento. Um deles não retornou após a primeira sessão de quimioterapia (T4) e os outros 4 vieram a óbito antes da quinta semana (B13, T3, T7 e T8), por motivo da doença. Nenhum animal se encontrava com a doença estável. Dados referentes à resposta ao tratamento dos animais encontram-se na Tabela 1.

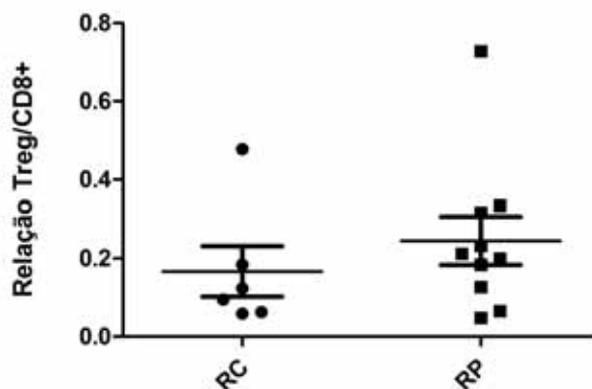


Figura 6: Avaliação da relação das subpopulações de linfócitos T reguladores (Treg) e CD8⁺ no sangue periférico de cães portadores de linfoma em remissão completa (RC) e remissão parcial (MP). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Teste t, $p=0,42$, ns. ($n= 6$ para o grupo RC e $n = 10$ para o grupo RP).

Esta investigação foi realizada para avaliar a resposta ao tratamento dos cães com linfoma na quinta semana, já que alguns estudos mostraram que a relação Treg/CD8⁺ pode ser empregada como marcador prognóstico (O'NEILL et al., 2009; BILLER et al., 2010). Quanto maior a relação, pior o prognóstico dos animais. A não concordância dos resultados do presente estudo comparados aos de O'Neill et al. (2009) e de Biller et al. (2010) pode ser devida ao fato de a maioria dos animais (16 cães) ter apresentado resposta favorável ao tratamento, evidenciada pela redução completa ou parcial do tumor, não proporcionando, portanto, uma comparação com os animais que não responderam de maneira satisfatória ao tratamento que, no caso do presente estudo, foi somente 1 animal (T6).

Tabela 1: Resposta clínica ao tratamento dos animais com linfomas tipo B e T na quinta semana.

Remissão Completa	Remissão Parcial	Doença Progressiva
B2	B1	T6
B4	B3	
B6	B5	
T1	B7	
T2	B8	
T5	B9	
	B10	
	B11	
	B12	
	B14	

Dois cães do grupo linfoma, um em remissão completa (animal B2) e um em remissão parcial (B12) apresentaram as maiores porcentagens de Treg, quando avaliadas na *gate* Pan T (Apêndice G), e uma das menores porcentagens de linfócitos

T CD8⁺, também na mesma *gate*, apontando para a supressão que as Tregs exerceriam nas subpopulações de linfócitos T, corroborando com o descrito na literatura sobre sua função supressora (LI et al., 2011).

Como os linfomas recidivam, de maneira frequente, mesmo após uma resposta inicialmente favorável à quimioterapia, e se tornam resistentes a um amplo espectro de drogas (GERARDI, 2008), uma possibilidade de se verificar, de maneira mais apropriada, a relação Treg/CD8⁺ como marcador prognóstico nos linfomas caninos, seria acompanhar, por um período maior de tempo e não somente na quinta semana de tratamento, a resposta imune desses pacientes e, a partir das respostas clínicas encontradas, ao longo das 19 semanas, obter diferentes grupos para poder compará-los.

Este estudo, nas condições metodológicas que foram adotadas, mostrou que linfomas em cães estão associados ao aumento de células Treg. Isto posto, esses resultados sugerem que a inibição da função reguladora das Tregs em cães com linfoma poderia ser uma potente estratégia terapêutica.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que:

- ✓ Cães com linfoma de imunofenótipos B ou T apresentam aumento na porcentagem de Tregs, em sangue periférico, quando comparados com cães clinicamente normais
- ✓ Os linfomas caninos de imunofenótipos B e T apresentam porcentagens similares de células Treg;
- ✓ O protocolo quimioterápico MW diminui significativamente as células Tregs em sangue periférico, após a 5^a semana de tratamento, alcançando porcentagens semelhantes às dos animais do grupo controle;
- ✓ A relação Treg/CD8⁺, dentro das limitações do presente estudo, não foi útil em prever a resposta clínica do animal frente ao tratamento.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**, 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 576 p.

AKBAR, A. N. et al. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 231-7, 2007.

BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1245-53, 2001.

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. **Vet. Immun. Immunopathol.**, v. 127, p. 376-81, 2009.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 875-88, 2007.

BENEVIDES, L. **Linfócitos T produtores de IL-17 e células T reguladoras em tumor de mama invasivo**. 2012. 132 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Treg cells, life history, and diversity. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 2012; 4: a007021.

BILLER, B.J. et al. Use of Foxp3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 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. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 24, p. 1118-23, 2010.

BOOP, T. et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 1303-10, 2007.

BRUNKER, J.D.; HOOVER, J.P. B-cell lymphoma in a dog with ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) and systemic histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*). **Can. Vet. J.**, v. 48, p. 292-95, 2007.

BURTON, J.H. et al. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 25, p. 920-6, 2011.

CAO, X. et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. **Immunity**, v. 27, p. 635-46, 2007.

CARDOSO, M.J.L. et al. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. **Biosci. J.**, v. 19, n. 3, p. 131-142, 2003.

CHUN, R. et al. Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 14, p. 120-24, 2000.

CHUN, R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? **Top. Comp. Anim. Med.**, v. 24, n. 3, p. 157-62, 2009.

COLETA, F. E. D. **Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma.** 96 f. 2009. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

COOLS, N. et al. Regulatory T cells and human disease. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2007, p. 1-11, 2007.

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

CURIEL, T. J. Regulatory T cells and treatment of cancer. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 20, p. 241-6, 2008.

DALECK, C.R.; CALAZANS, S.G.; De NARDI, A.B. Linfomas. In: DALECK, C.R.; De NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1. ed., São Paulo: Roca, 2008. p. 481-505.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 1257-65, 2007.

DICKINSON, R.M. Canine lymphosarcoma: overcoming diagnostic obstacles and introduction to the latest diagnostic techniques. **Can. Vet. J.**, v. 49, n. 3, p. 305-8, 2008.

DIECKMANN, D. et al. Human CD4+CD25+ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 247-53, 2002.

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

FALLARINO et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 1206-12, 2003.

FIGUERA, R.A.; SOUZA, T.M.; BARROS, C.S.L. Linfossarcoma em cães. **Cienc. Rural**, v. 32, n. 5, p. 895-99, 2002.

FRÁGUAS, M.S. **Estudo de casos de linfoma canino ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006 junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV-UNESP-Jaboticabal**. 2008. 64 f. Trabalho de iniciação científica (modalidade bacharelado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GÁRATE, B.B. et al. Expresión de FOXP3 en linfomas de células T: estudio de 47 casos en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins, EsSalud, Lima, Perú. **Acta Med. Per.**, v. 26, n. 2, p. 74-77, 2009.

GARRETT, L.D. et al. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, p. 704-9, 2002.

GAUTHIER, M. J. The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dogs with lymphoma in remission. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 19, p. 193-99, 2005.

GERARDI, D.G. Mecanismos de resistência aos quimioterápicos. In: DALECK, C.R.; De NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1. ed., São Paulo: Roca, 2008. p. 180-93.

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

HOSOYA, K., et al. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 21, p. 1355-63, 2007.

INFECTIOUS DISEASES AND CANCER. In: The World Health Report 1996. **Fighting disease fostering development**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 59-62.

KARUBE, K. et al. Expression of Foxp3, a key molecule in CD4+CD25+ regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. **Brit. J. Haematol.**, v. 126, p. 81-84, 2004.

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. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 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. **J. Surg. Oncol.**, v. 104, p. 728-33, 2011.

KNUEPPEL, A. et al. Phenotypic and functional characterization of freshly isolated and expanded canine regulatory T cells. **Exp. Anim.**, v. 60, p. 471-9, 2011.

KOSMACZEWSKA, A. et al. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 56, p. 181-91, 2008.

LI, L.; BOUSSIOTIS, V.A. Molecular and functional heterogeneity of T regulatory cells. **Clin. Immunol.**, v. 141, p. 244-52, 2011.

MANSFIELD, A. et al. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1-10, 2009.

MARCONATO, L. The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. **The Vet. J.**, v. 188, p. 34-8, 2011.

MITCHELL, L. et al. Induction of remission results in spontaneous enhancement of anti-tumor cytotoxic T-lymphocyte activity in dogs with B cell lymphoma. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 145, p. 597-603, 2012.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends Mol. Med.**, v. 13, p. 108-16, 2007.

MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 44, p. 46-52, 2007.

MORRISON, W.B. **Lymphoma in dogs and cats**. 1. ed., Jackson: Teton NewMedia, 2004. 124 p.

O'NEILL, K. et al. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 23, p. 875-81, 2009.

PICCIRILLO et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta 1 production and responsiveness. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 237-46, 2002.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. 1. ed., Maio: Paraná, 2004. 307 p.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25) breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-64, 1995.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 18-32, 2001.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory t cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 345-52, 2005.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; HERNANDEZ, J. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. **Vet. Dermatol.**, v. 18, n. 2, p. 101-6, 2007.

SATO et al. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 116, p. 69-78, 2007.

SAVAGE, P.A.; MALCHOW, S.; LEVENTHAL, D. Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. **Trends in Immunol.** 10.1016/j.it.2012.08.005.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. **C. A. Cancer J. Clin.**, v. 56, p. 69-83, 2006.

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

SOJKA, D.K.; HUANG, Y.H.; FOWELL, D.J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, p. 13-22, 2008.

SUEIRO, F.A.R.; ALESSI, A.C.; VASSALLO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **J. Comp. Path.**, v. 131, p. 207-13, 2004.

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

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Vet. Q.**, v. 16, p. 209-19, 1994.

TRINCHIERI, G. Inflammation. In: DEVITA Jr, V.T.; LAWRENCE, T.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 9. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 193-202.

VAIL, D.M.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small animal clinical oncology**. 4. ed., Missouri: Saunders, 2007. p. 699-784.

WALTER, C. U. et al. Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 20, p. 342-47, 2006.

WINNICKA, A. et al. Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. **J. Vet. Med. A**, v. 49, p. 303-6, 2002.

WHITESIDE, T.L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**. v. 27, p. 5904-12, 2008.

YANG, Z. et al. Attenuation of CD8⁺ T cell function by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Res.**, v. 66, p. 10145-52, 2006a.

YANG, Z. et al. Intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediate suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 107, p. 3639-46, 2006b.

ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p.295-307, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A**Quadro A:** Dados referentes aos animais do grupo controle.

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

Apêndice B

Quadro B: Dados referentes aos animais do grupo linfoma B

Animal	Idade	Sexo	Raça	Tipo histológico	Estadia- mento
B1	5 a	M	Rottweiler	Grandes células imunoblástico	III
B2	9 a	F	Poodle	Burkitt <i>like</i>	V
B3	5 a	F	Rottweiler	Difuso de grandes células	III
B4	6 a	M	Rottweiler	Linfoblástico	IV
B5	5 a	M	SRD	Difuso de grandes células	IV
B6	4 a	M	Labrador	Difuso de grandes células	III
B7	8 a	F	Pinscher	Difuso de grandes células	V
B8	12 a	M	SRD	Linfocítico de pequenas células	V
B9	8 a	F	SRD	Difuso de grandes células	IV
B10	4 a	F	Rottweiler	Difuso de grandes células	V
B11	11 a	F	Poodle	Difuso de grandes células	IV
B12	7 a	M	SRD	Difuso de grandes células	IV
B13	10 a	F	Basset	Difuso de grandes células	IV
B14	8 a	F	Bull Terrier	Difuso de grandes células	IV

Apêndice C

Quadro C: Dados referentes aos animais do grupo linfoma T.

Animal	Idade	Sexo	Raça	Tipo histológico	Estadiamento
T1	7 a	F	Dogue Alemão	Linfoblástico	I
T2	7 a	F	Beagle	Sem outra especificação*	IV
T3	8 a	F	Boxer	Linfoma T nodal (linfoma de zona T)	III
T4	5 a	F	Boxer	Linfoblástico	I
T5	6 a	F	Boxer	Linfoblástico	IV
T6	8 a	M	Lhasa Apso	Sem outra especificação*	V
T7	9 a	M	Pit Bull	Linfoblástico	II
T8	8 a	F	Bull Terrier	Sem outra especificação*	I

*Terminologia empregada para linfomas T difusos

Apendice D

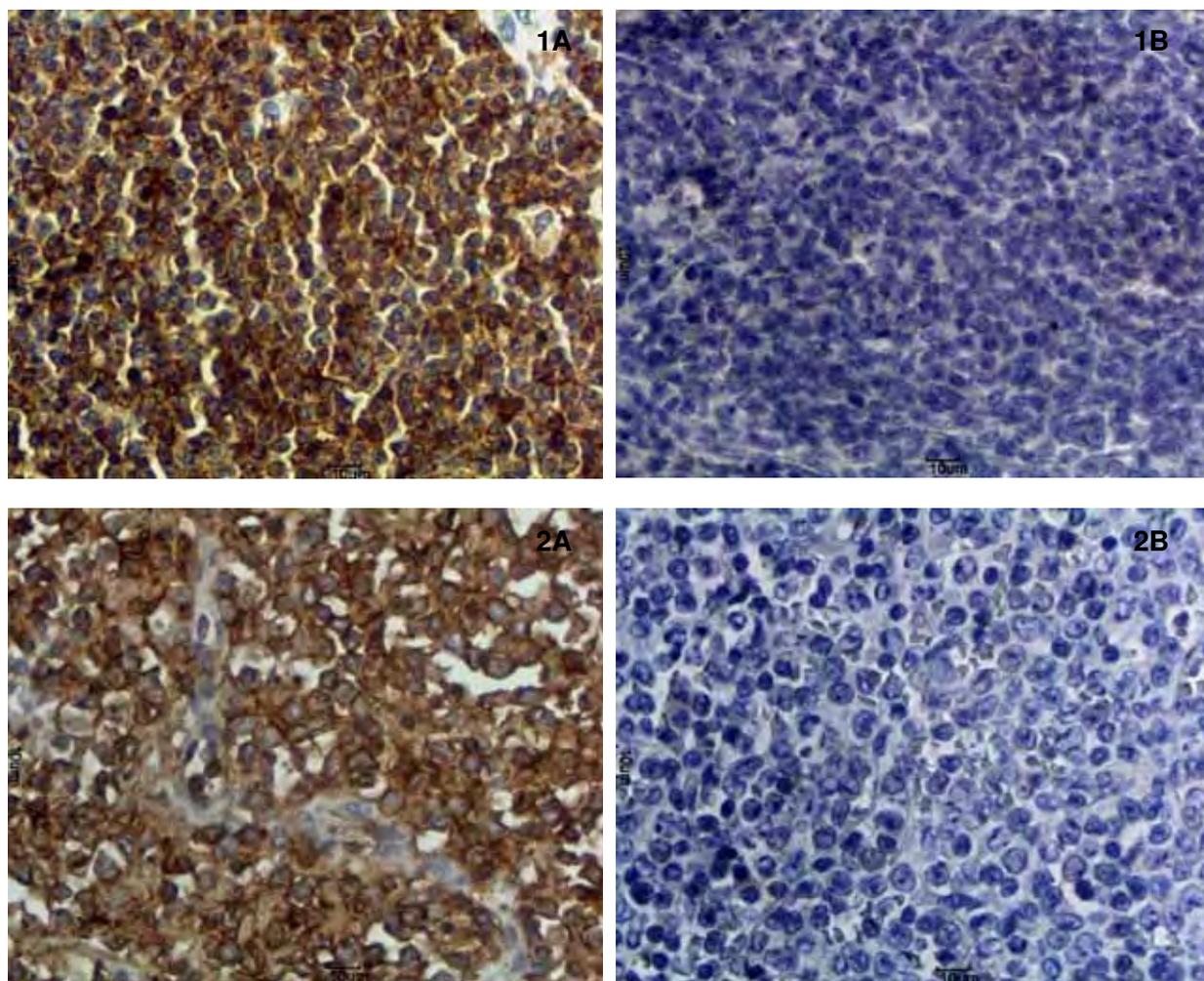


Figura D: Expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti CD79 α em corte de linfonodo (1A) e ausência da expressão do anticorpo anti CD3 em 1B, caracterizando o imunofenótipo B; expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti CD3 em corte de linfonodo (2A) e ausência da expressão do anticorpo anti CD79 α em 2B, caracterizando o imunofenótipo T. Ambas as expressões estão representadas pela coloração acastanhada da membrana das células (Obj. 40X).

Apêndice E

Quadro E: Critérios estabelecidos pela OMS para o estadiamento dos linfomas caninos.

Estadio	Características clínicas
I	envolvimento limitado a um linfonodo ou tecido linfóide (exceto medula óssea)
II	envolvimento de linfonodos regionais
III	aumento generalizado dos linfonodos
IV	envolvimento do fígado e/ou baço, com ou sem os estádios I, II ou III
V	envolvimento do sangue, medula óssea, com ou sem os estádios I, II, III ou IV

Apendice F**Quadro F:** Resposta do paciente à quimioterapia

Tipo de resposta	Características clínicas
Remissão completa	desaparecimento da doença clínica
Remissão parcial	diminuição em 50% do tamanho do tumor, sem evidência de novos focos
Doença estável	diminuição ou aumento em até 50% do tamanho do tumor, sem desenvolvimento de outro foco
Doença progressiva	aumento de pelo menos 50% do tamanho do tumor ou o aparecimento de novos tumores

Fonte: DALECK, C.R. et al., 2009.

Apêndice G

Tabela G: Porcentagens individuais referentes às subpopulações celulares CD4, CD8 e Treg, antes (M0) e após o tratamento quimioterápico (M5), dos animais com linfoma B.

Animais	% Treg (gate CD4)		%Treg (gate linf T)		%CD4 (gate linf T)		%CD8 (gate linf T)		Treg/CD8 (gate linf T)	
	M0	M5	M0	M5	M0	M5	M0	M5	M0	M5
B1	28,16	6,07	11,74	2,6	31,9	31,74	56,97	53,44	0,20	0,04
B2	18,85	12,27	18,77	9,36	45,7	51,56	15,33	19,6	1,22	0,47
B3	17,13	18,25	8,49	9,53	47,66	43,68	23,71	28,51	0,35	0,33
B4	38,5	3,1	16,9	2	40,8	45,3	16,3	33,8	1,03	0,05
B5	10,5	4,2	5,4	2,6	52,6	68,3	34,2	20,5	0,15	0,12
B6	6,12	4,7	4,66	3,2	65,7	63,5	23,4	25,9	0,19	0,12
B7	17	9,7	1,2	4	7,9	49,6	18	20	0,06	0,2
B8	3,6	1,1	2,2	0,9	46,3	76,9	17	13,7	0,12	0,06
B9	17,6	11,2	8,2	5,99	46,5	58,5	22,5	18,9	0,36	0,31
B10	8,15	4,14	4,6	5,99	64,2	69,1	12,8	32,5	0,35	0,18
B11	20,5	6,43	14,9	4,84	68,3	56,6	17,3	20,8	0,86	0,23
B12	32,5	13,8	21	10,2	57,8	70	16,1	14	1,30	0,72
B13	5,35	-	4,28	-	40,9	-	27	-	0,15	-
B14	20,4	3,33	16	6,78	33,1	49,3	58,2	31,9	0,27	0,21

Apêndice H

Tabela H: Porcentagens individuais referentes às subpopulações celulares CD4, CD8 e Treg, antes (M0) e após o tratamento quimioterápico (M5), dos animais com linfoma T.

Animais	% TREG (gate CD4)		%TREG (gate linf T)		%CD4 (gate linf T)		%CD8 (gate linf T)		Treg/CD8 (gate linf T)	
	M0	M5	M0	M5	M0	M5	M0	M5	M0	M5
T1	19,93	7,93	8,63	3,17	33,18	40,48	54,89	50,47	0,16	0,06
T2	19,39	7,01	12,55	3,07	49,7	40,61	24,96	16,64	0,50	0,18
T3	18,71	-	15,88	-	55,68	-	18,42	-	0,86	-
T4	11,96	-	6,2	-	68,04	-	12,11	-	0,51	-
T5	44,72	5	30,49	2,5	57,89	51	12,74	26,3	2,39	0,10
T6	42,5	10	11,4	6,1	50	47,5	25,8	26,1	0,44	0,23
T7	9,47	-	5,1	-	37,6	-	23,8	-	0,21	-
T8	3,44	-	2,59	-	59,4	-	24,3	-	0,11	-