



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FILLIPHE SANTOS BARROS

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE FOXP3 E COX-2 EM
LINFONODOS DE CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO**

DESCALVADO

2018



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FILLIPHE SANTOS BARROS

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE FOXP3 E COX-2 EM
LINFONODOS DE CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da UNIVERSIDADE BRASIL Campus de Descalvado – SP.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Jark

Descalvado

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amiga, companheira e amada esposa Mariana Barros, pois mesmo que distantes em corpos, sempre esteve presente em meu coração. Às minhas queridas e amadas filhas, Polliana e Anabella, que deram um sentido especial à minha existência, além de me proporcionarem grandes momentos de alegria. Aos meus pais e a todos os familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

DEUS, a ti pertence a minha vida, e em ti confio meus sonhos, meus projetos e todos meus anseios. Agradeço por me proporcionar sabedoria, paciência e persistência na realização desse sonho, pois mesmo nos momentos mais difíceis, nunca abandonastes teu filho. Obrigado Senhor!

Agradeço à Espiritualidade de Luz, aos espíritos protetores e ao meu anjo guardião, que sempre estiveram dispostos a ajudar-me quando precisei.

A minha inseparável amiga e esposa Mariana Barros, um agradecimento especial por ter sido minha grande incentivadora, a pessoa que sempre esteve ao meu lado e que nunca me deixou cair, aquela que sempre me falou que daria tudo certo e que sempre teve uma palavra de conforto a me dizer. Eu te amo meu amorzinho! Não posso deixar de te agradecer pelo carinho, pela cumplicidade e principalmente por fazer o papel de mãe e pai para nossas joias mais preciosas.

Às minhas filhas, as princesas do meu castelo, Polliana e Anabella. Obrigado por terem sido pacientes com minha ausência, devido esse projeto, sei que passamos poucos momentos em família, mas saibam que a todo momento vocês estiveram em meu coração e meus pensamentos. Vocês são a razão da minha existência, e é por vocês que busco ser cada dia um ser humano melhor. Peço a Deus que me permita recompensar cada momento adiado.

Agradeço aos meus sogros e segundos pais, Pedro Pereira e Teresa Cristina, sem vocês nada disso seria possível. Vocês foram responsáveis por grande parte dessa conquista, só nós sabemos quão difícil foi manter esse sonho vivo, vocês são o alicerce desse projeto, agradeço pelos constantes sacrifícios que fizeram para que tudo se realizasse. A vida é só alegria.

Em especial aos meus pais, Adilson e Maria Izabel. Se hoje sou um bom homem, devo isso a vocês, pois mesmo nos momentos mais difíceis de nossas vidas, vocês nunca deixaram que a família fosse afetada, sou extremamente grato por me ensinarem valores que levarei para o resto da vida. Se um dia Deus me permitir, pretendo dar aos meus filhos, a mesma educação e amor que recebi de vocês.

Aos meus irmãos Aline, Marcelo e Thiago, aos sobrinhos Anne Caroline, Lucas Marques e Anne Francine, ao meu cunhado Arthur e a todos os meus familiares colaterais, que mesmo distantes seguiram acreditando em meu potencial.

Agradeço ao professor Fabio Gava, meu primeiro orientador, um ser iluminado que mesmo distante, sempre esteve disposto a dar uma palavra amiga e orientações. Muito obrigado por tudo, levarei seus ensinamentos para sempre.

Ao meu amigo, professor, orientador e guia profissional Paulo Jark. Existem pessoas que tem o poder de transforma as nossas vidas, e você é uma destas. Obrigado por abrir minha mente e mostrar-me o tão longe posso chegar. Obrigado pelas incansáveis explicações e até aos mínimos detalhes ensinados em cada caso clinico acompanhado. Você é muito mais do que professor, você é uma pessoa e profissional que inspira a querermos ser a melhor versão de nós mesmos. Obrigado por confiar em nossos objetivos, e espero um dia poder deixa-lo muito orgulhoso com minhas conquistas futuras. Você sempre será para mim, uma referência de ética e amor pela profissão.

Agradeço a minha coorientadora Letícia Abrahão Anai. Obrigado por acreditar neste projeto.

À Universidade Brasil, professores e todos os colaboradores, em especial a minha terceira mãe Fafá. Quero deixar uma palavra de gratidão por terem me recebido de braços abertos e me proporcionado dias de aprendizagem muito ricos.

A empresa Royal Canin e seus colaboradores, obrigado por acreditarem em mim, serei eternamente grato pela oportunidade de estágio ofertada. Foram dois anos de muito aprendizado e dedicação. Muito obrigado!

E por fim, aos meus amigos de sala de aula, companheiros de estágios, residentes, médicos veterinários e a todos que de alguma forma, seja que direta ou indiretamente, contribuíram em uma parte de minha vida e da minha formação, o meu muito obrigado. Serei eternamente grato a todos vocês.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE FOXP3 E COX-2 EM LINFONODOS DE CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO

RESUMO

O linfoma é uma neoplasia caracterizada por proliferação clonal de linfócitos malignos e pode se originar na medula óssea, timo, baço, fígado ou linfonodos. Entretanto, pela contínua migração dos linfócitos pelos diferentes tecidos do organismo, pode desenvolver-se em praticamente qualquer órgão. Trata-se de uma das neoplasias malignas mais comuns em cães, representando de 8,5 a 9% de todos os tumores caninos e aproximadamente 90% das neoplasias hematopoiéticas. Acredita-se que as células T reguladoras (Tregs) regulem as respostas imunes fisiológicas e sua participação já foi descrita em diversas enfermidades como doenças infecciosas, alérgicas, neoplásicas, autoimunes e imunologia dos transplantes. Há evidências que as Tregs sub regulam a função efetora contra tumores, resultando em disfunção de imunológica. O número de Tregs infiltradas no tumor foi correlacionada positivamente com a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) intratumoral em paciente com câncer e a expressão de COX-2 associada a Treg pode contribuir negativamente para o prognóstico dos pacientes. Deste modo, o tratamento com inibidores de COX-2, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) é mais uma estratégia para a supressão das Tregs. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo quantificar a expressão das Tregs e da COX-2 por imunohistoquímica utilizando os marcadores FoxP3 e COX-2 em 29 linfonodos de cães acometidos por linfoma multicêntrico e correlacionar com a sobrevida dos pacientes. Não houve diferença significativa entre expressão de COX-2 e FoxP3 com a sobrevida dos pacientes, porém os linfomas de imunofenótipo T apresentaram maior expressão de FoxP3 em relação aos B. Apesar da expressão de COX-2 e FoxP3 no estudo em tela não apresentar correlação com a sobrevida dos pacientes, a expressão desses marcadores em linfomas multicêntricos torna o estudo do uso de inibidores de COX-2 promissor no tratamento dessa neoplasia em cães.

Palavras-chave: ciclooxigenase-2, imunohistoquímica, neoplasia, Tregs.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. OBJETIVOS	3
3.1. Objetivos gerais.....	3
3.2. Objetivos Específicos	3
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
4.1. Linfomas em cães	4
4.2. Células T reguladoras e COX-2.....	5
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
5.1. Grupos experimentais	9
5.2. Avaliação histopatológica	9
5.3. Técnica da reação de Imunohistoquímica	9
5.3.1. Avaliação do score de COX-2 e FoxP3.....	10
5.4. Análise de Resultados.....	11
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
6.1. Classificação imunofenotípica e sobrevida dos pacientes.....	12
6.2. Expressão de Ciclooxigenase-2 (COX-2) e correlação com sobrevida	14
6.3. Expressão de <i>Forkhead box P3</i> (FoxP3) e correlação com sobrevida.....	16
6.4. Correlação entre FoxP3 e COX-2.....	19
7. CONCLUSÕES	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização de Imunofenótipo celular em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico. Descalvado, 2018.	12
Tabela 2. Dados referentes à classificação imunofenotípica e tempo de sobrevida em semanas dos animais do Grupo Linfoma Multicêntrico. Descalvado, 2018.....	13
Tabela 3. Expressão de COX-2 em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico. Descalvado, 2018.....	14
Tabela 4. Expressão de FoxP3 em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico. Descalvado, 2018.....	17

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de sobrevida dos animais com linfoma multicêntrico positivos e negativos para expressão de COX-2. Não há relação entre a sobrevida e a expressão de COX-2. Descalvado, 2018. 15
- Figura 2.** Valores percentuais obtidos de expressão tecidual de FoxP3 em linfonodos de cães portadores de linfoma multicêntrico de células B (B-cell) e de células T (T-cell). Maior expressão de Tregs nos linfomas T comparado aos linfomas B (P=0.02). Descalvado, 2018. 18
- Figura 3.** Curva de sobrevida dos animais com linfoma multicêntrico positivos e negativos para expressão de FoxP3. Ausência de relação entre a sobrevida e expressão de FOXP3. Descalvado, 2018. 19
- Figura 4.** Curva de correlação entre a expressão de FoxP3 versus expressão de COX-2 em linfonodos de animais com linfoma multicêntrico. Ausência de correlação entre a expressão de FOPX3 e COX-2 Descalvado, 2018. 20

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
®	Símbolo de marca registrada
°C	Grau Celsius
µm	Micrómetro
α	Alpha
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
anti-CD3	Anticorpos marcadores para linfócitos T
anti-CD4	Anticorpos marcadores para linfócitos T
anti-CD79α	Anticorpos marcadores para linfócitos B
anti-FoxP3	Anticorpos marcadores para linfócitos T reguladores
CD25	Receptor da cadeia α da interleucina IL-2
CD4+	Linfócitos T auxiliar
CD4+CD25+	Células T reguladoras
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorubicina (<i>hidroxirrubicina</i>), Vincristina (<i>oncovin</i>), Prednisona
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPNPC	Câncer de pulmão de não pequenas células
Dr.	Doutor
EP2	Receptor 2 de prostaglandinas E2
EP4	Receptor 4 de prostaglandinas E2
EUA	Estados Unidos da América
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FoxP3	Fator de transcrição Forkhead box P3
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina

IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
kg	Quilograma
LM	Linfoma multicêntrico
LNH	Linfoma não-Hodgkin
mg	Miligrama
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>)
n	Número
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
Prof.	Professor
sABC	Complexo streptavidina-biotina
SP	São Paulo
SRD	Sem raça definida
TCR	Receptores de células T (do inglês <i>T cell receptor</i>)
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta (do inglês <i>transforming growth factor</i>)
Th2	Linfócitos T helper-2
Tregs	Células T reguladoras
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

Anualmente, milhares de cães são diagnosticados com os mais diferentes tipos de neoplasia, fazendo com que a casuística na oncologia veterinária venha tornando-se uma área em grande expansão na clínica de pequenos animais, o que está intimamente relacionado com a maior longevidade destes animais, pelos novos métodos de diagnósticos e pela conscientização dos tutores.

Dentre as mais diversas neoplasias que possam acometer cão, o linfoma é comprovadamente uma das principais delas, afetando principalmente cães a partir da meia idade e sem predileção por gênero, porém pode acometer animais de qualquer idade, até mesmo filhotes.

O linfoma canino é considerado o principal modelo experimental no desenvolvimento de novas drogas citotóxicas antineoplásicas em humanos, pois além de possuir grande similaridade anatômica e fisiológica com os seres humanos, o tipo mais comum de linfoma que acomete os cães é também o mesmo visto em humanos. Isso reforça o estudo de suas bases e processos envolvidos no câncer para o desenvolvimento de novos fármacos específicos.

O estudo da carcinogênese é considerado a base para o desenvolvimento de fármacos alvos, e mesmo a COX-2, sendo altamente estudada no câncer atualmente. Infelizmente pouquíssimos dados foram avaliados no linfoma, o que reforça a necessidade da realização de novas pesquisas explorando essa área.

As células Tregs são grandes aliadas do câncer, uma vez que o aumento destas prejudica a atividade antitumoral, o que nos faz pensar sobre a necessidade de maiores pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer que possam levar a inibição da proliferação dessas células.

Portanto, sabe-se que a COX-2 e as células Tregs podem ser suprimidas com uso de inibidores de COX-2 que é um medicamento de fácil acesso na rotina clínica de pequenos animais, portanto o estudo da participação dessas vias no desenvolvimento de linfomas pode abrir espaço para novas associações terapêuticas, além dos protocolos já citados.

2. JUSTIFICATIVA

Embora a quimioterapia padrão com o protocolo CHOP possa prolongar a sobrevida dos cães com linfoma difuso de grandes células B, a cura ainda é rara, fazendo com que o tratamento desses pacientes ainda seja um desafio crescente na rotina oncológica, tornando-se necessária a busca por novas modalidades terapêuticas como as terapias alvos.

A participação das células T reguladoras no desenvolvimento do câncer e sua correlação com a expressão de COX-2 é de suma importância, uma vez que pesquisas recentes sugerem que alguns fármacos são utilizados para extinguir ou suprimir as funções das Tregs, uma vez que o aumento da expressão da COX-2 pela neoplasia ou pelo microambiente tumoral, estimula o desenvolvimento das Tregs. Dessa forma, o tratamento com inibidores dessa enzima, como os anti-inflamatórios não esteroidais, é uma estratégia para a supressão das Tregs e conseqüentemente pode ser uma nova alternativa para o tratamento do linfoma em cães.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Avaliar a expressão de COX-2 e FoxP3 através de imunohistoquímica em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico.

3.2. Objetivos Específicos

- Correlacionar a expressão de COX-2 e FoxP3 com a sobrevida dos pacientes.

- Comparar a expressão de FoxP3 e COX-2 entre diferentes imunofenótipos de linfomas (B e T).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Linfomas em cães

O linfoma é uma neoplasia caracterizada por proliferação clonal de linfócitos malignos, o qual origina-se na medula óssea, timo, baço, fígado e linfonodos, devido à contínua migração dos linfócitos pelos diferentes tecidos do organismo, mas por serem células circulantes, tal afecção pode desenvolver-se em praticamente qualquer órgão (FIGHERA et al., 2002; VAIL & YOUNG, 2007; DALECK et al., 2008).

Nos cães o linfoma é uma das neoplasias mais comuns, representando de 8,5 a 9% de todos os tumores caninos (DOBSON & GORMAN, 1994). Acomete principalmente animais de meia-idade ou idosos (GREENLEE et al., 1990; MOULTON & HARVEY, 1990), não há predileção sexual (VAIL & OGILVIE, 1998) e corresponde a aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hematopoiético nos cães (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; MORRISON, 1998; FAN & LORIMIER, 2005).

A etiologia é multifatorial, sendo que fatores ambientais e genéticos estão entre as suspeitas causas, em seres humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas, está bem documentada a etiologia viral, em alguns tipos de linfoma, porém, no caso do linfoma em cães, não tem sido comprovado tal componente viral (GREENLEE et al., 1990; VALLI, 1993; JONES et al., 1997, MORRISON, 2005).

No Brasil, poucos são os levantamentos feitos sobre a incidência 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 predisposição entre os sexos. Resultados semelhantes também foram obtidos em estudos retrospectivos de cães com linfoma realizados na região de Botucatu – SP (CARDOSO et al., 2003) e na Região Norte do Paraná (MORENO & BRACARENSE, 2007).

Habitualmente o linfoma canino é classificado em multicêntrico, alimentar, mediastinal, cutâneo e extranodal, conforme sua distribuição anatômica (VAIL & OGILVIE, 1998). Em estudo retrospectivo realizado na região de Botucatu (SP) por Sequeira et al. (1999), 91,2% dos animais acometidos por linfoma apresentavam a forma multicêntrica.

Em relação à citomorfologia, as neoplasias linfomatosas podem ser classificadas como sendo de alto, médio ou de baixo grau. De acordo com o esquema de classificação histológica (Kiel ou National Cancer Institute), 80% dos linfomas caninos são similares aos linfomas não-Hodgkin (LNH) humanos de médio e alto grau

e, quanto a imunofenotipagem, podem ser classificados em linfomas T, linfomas B, ou nulos (não B e não T) (MOULTON & HARVEY, 1990; JONES et al., 1997; DE MOURA et al., 1999; SEQUEIRA et al., 1999; VAIL, 2000).

Os sinais clínicos do linfoma variam de acordo com a sua apresentação anatômica e histológica (NELSON & COUTO, 2006). No linfoma multicêntrico normalmente ocorre linfadenopatia bilateral dos linfonodos superficiais (DOBSON & GORMAN, 1994), podendo estar associada à hepatomegalia e esplenomegalia decorrentes da infiltração neoplásica (VAIL, 2000). Além disso, sinais clínicos tais como intolerância ao exercício, taquipneia, dispneia, regurgitação e anorexia, também são descritos em decorrência da compressão provocada pela linfadenopatia mediastinal (CARDOSO et al., 2004).

O diagnóstico está fundamentado no exame físico e nas avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e exames de imagem. Porém, o diagnóstico definitivo é feito por meio da avaliação citológica e/ou histológica do órgão afetado (FAN & KITCHELL, 2002; NELSON & COUTO, 2006).

O tratamento é baseado em protocolos quimioterápicos antineoplásicos, já que o linfoma é a neoplasia que melhor responde a essa modalidade de tratamento (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; OGILVIE & MOORE, 1995). Segundo Macewen & Young (1996), sem o tratamento, muitos cães vão a óbito em quatro a seis semanas. Um dos protocolos mais utilizados é o CHOP, que compreende a utilização das drogas sulfato de vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona (SUSAN & ETTINGER, 2003). Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e o maior tempo de sobrevida para cães com linfoma (MORRISON, 2005).

4.2. Células T reguladoras e COX-2

As células T reguladoras (Tregs) são alvo de intensas pesquisas relacionadas à função como reguladoras das respostas imunes em condições fisiológicas e em diversas enfermidades infecciosas, alérgicas, neoplásicas, autoimunes, bem como no domínio da imunologia dos transplantes (COOLS et al., 2007). Essas células são oriundas do timo normal, como uma população distinta e madura de células T com diversos receptores específicos de células T auto reativos, a ausência dessas está implicada diretamente no surgimento de doenças autoimunes, além de potencializar a resposta imune contra aloantígenos e tumores (SAKAGUCHI et al., 2001; SHEVACH, 2002). A principal função das Tregs é regular negativamente as respostas

imunes, garantindo a manutenção de mecanismos ativos de supressão (CRUVINEL et al., 2008).

Sakaguchi et al. (1995) foi um dos primeiros a relatar as Tregs 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 autoimunes em camundongos. Em 2005, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que essas células T CD4⁺CD25⁺ representavam aproximadamente 10% das células CD4⁺ periféricas em indivíduos saudáveis (SAKAGUCHI, 2005).

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

Do ponto de vista molecular o fator de transcrição *Forkhead box P3* (FoxP3) é predominantemente expresso nas Tregs tímicas e periféricas. 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. Assim, o FoxP3 parece ser um gene de suma importância no desenvolvimento e na função destas células (SAKAGUCHI, 2005; CRUVINEL et al., 2008). Apesar do FoxP3 ser 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 identificadas utilizando-se de 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).

Em humanos, no linfoma Hodgkin o microambiente tumoral é dominado por células *Th2* e por Tregs. O número elevado de células *Th2* está associado com significativo aumento no tempo de remissão da doença e, além disso, que a elevada

razão Tregs/células *Th2* tem resultado em uma redução significativa no tempo de recidiva. Este fato leva a acreditar que as Tregs exercem efeitos inibitórios na resposta imune antitumoral mediada por células *Th2* e que estas últimas podem ter um papel, além do esperado, na imunidade antitumoral (SCHRECK et al., 2009).

Em estudo com linfoma multicêntrico em cães realizado por Munhoz (2016), relatou-se um aumento na porcentagem de Tregs no sangue periférico de cães com linfoma quando comparado ao grupo controle. Pinheiro et al., (2014) demonstraram que o aumento das Tregs em cães acometidos com linfoma multicêntrico de células B, está relacionado a um pior prognóstico, sugeriram também que os cães com linfoma B, em comum com pacientes humanos com Linfoma não-Hodgkin, abrigam um amplo espectro de Tregs nos linfonodos acometidos, incluindo Tregs tímicas.

As prostaglandinas possuem forte atividade moduladora dentro do sistema imunológico, e exercem efeitos autócrino e parácrino. A prostaglandina E2 (PGE2) se liga aos receptores EP2 e EP4, aos quais estão ligados à proteína G, que efetivamente suprimem a resposta imune das células T (NATARAJ et al., 2001; VANG et al., 2003). No sistema imune a ciclooxygenase-2 (COX-2) é induzida durante as reações inflamatórias, e é a responsável pela produção de prostaglandina e tromboxano a partir do ácido araquidônico. A COX-2 é primariamente expressa em monócitos ativados e macrófagos, embora sua expressão também seja induzida em células T ativadas (SIMMONS et al., 2004).

Existem duas isoformas da COX, a COX-1 e a COX-2, a primeira é expressa em vários tipos de células e tecidos, exerce importante atividade enzimática na função renal, na integridade da mucosa gástrica e na agregação plaquetária, já a segunda está ausente em muitas células e tecidos, mas é induzida em resposta às citocinas inflamatórias (DUBOIS et al., 1998), essa é expressa em várias doenças epiteliais malignas, sendo em geral associada a um mau prognóstico (SHIMIZU et al., 2010).

O aumento da PGE2 promove o desenvolvimento neoplásico devido a estimulação do receptor cognato (EP), com subsequente aumento da proliferação celular, promovendo a angiogênese, inibindo a apoptose, estimulando a invasão tumoral, e suprimindo a resposta imune antitumoral (WANG & DUBOIS, 2006).

Shimizu et al. (2010), demonstraram que o número de Tregs infiltradas no tumor está correlacionada positivamente com a expressão de COX-2 intratumoral em paciente com câncer de pulmão de não pequenas células, e a inibição de COX-2 pode suprimir a atividade tumoral por infiltração das Tregs, dessa forma, concluíram que a utilização de um inibidor de COX-2 pode ser benéfico para o tratamento de pacientes

com aumento da expressão de COX-2. Também observaram uma correlação com uma menor sobrevida.

In vitro Mahic et al. (2006) demonstraram que a COX-2 depende da produção de PGE2, representando o mecanismo imunossupressor para Tregs, e que o FoxP3 é induzido de uma maneira autócrina por PGE2. Tais resultados demonstraram um novo mecanismo de imunossupressão pelas Tregs.

Pesquisas recentes sugerem que alguns fármacos são utilizados para extinguir ou suprimir as funções das Tregs, pois o aumento da expressão da COX-2, pela ação das células tumorais e inflamatórias locais, estimula o desenvolvimento das Tregs, dessa forma, o tratamento com inibidores dessa enzima, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), é uma estratégia para a supressão das Tregs (YAQUB et al., 2008).

Lee et al. (2009) demonstraram que a utilização de inibidor de COX-2 (celecoxib) no tratamento de tumores em camundongos levou à diminuição do acúmulo das Tregs, e observaram uma maior diminuição na dose de 100mg/kg quando comparado com o de 10mg/kg. O estudo revelou que os níveis de PGE2 estavam aumentados no carcinoma pulmonar de Lewis nos camundongos controles, e este alto nível, diminuiu com o tratamento com inibidor de COX-2, da mesma forma, a expressão do FoxP3 que estava aumentada no grupo controle diminuiu no grupo tratado com celecoxib. Além disso, o número de metástases reduziu significativamente nos camundongos tratados com celecoxib.

Portanto, é de suma importância quantificar a expressão das Tregs e da COX-2 por imunohistoquímica em linfonodos de cães acometido por linfoma multicêntrico, correlacionando a sobrevida dos pacientes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Grupos experimentais

Foram utilizadas 29 amostras de linfomas multicêntricos provenientes do banco de tumores da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) – Campus de Jaboticabal. Essas amostras foram provenientes de pacientes com diagnóstico citológico de linfoma multicêntrico que foram submetidos à biopsia e confirmação através do exame histopatológico em projeto anterior aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA – protocolo 027665/10).

O material foi coletado e fixado em solução tamponada de formol 10% por 24 horas e, posteriormente em álcool 70% para realização do exame histopatológico e de imunohistoquímica.

5.2. Avaliação histopatológica

Com o objetivo de classificar as lesões, foram realizados cortes histológicos em micrótomo automático (Leica 2155) com espessuras de 3µm, colocados em estufa para desparafinizar e posteriormente corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), para serem avaliadas de acordo com critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 2002.

5.3. Técnica da reação de Imunohistoquímica

Para realização da imunofenotipagem dos linfomas, foram utilizados os anticorpos primários anti-CD3 (DAKO *polyclonal rabbit anti-human*) para linfócitos T e anti-CD79a (DAKO *monoclonal mouse anti-human* HM57) para linfócitos B, realizada no Laboratório VetPat, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Felipe A. Ruiz Sueiro que adota os critérios estabelecidos pela OMS. Para avaliar a expressão de Tregs foi utilizado o anti-FoxP3 (*Everest Biotech* EB05294), e para expressão de COX-2 utilizou-se o anti-COX-2 (DAKO - clone cx-294), estes realizados pelo Serviço de Patologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) UNESP/Jaboticabal e também no Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP/Botucatu.

O método de imunohistoquímica empregado foi o complexo streptavidina-biotina (sABC) desenvolvido por HSU et al. (1981). As lâminas com os cortes em parafina foram colocadas em estufa a 56°C durante uma hora. A desparafinização e a desidratação foram realizadas em baterias de xilóis e alcoóis em concentrações

decrecentes. Para a recuperação antigênica, os anticorpos anti-FoxP3, anti-CD3, anti-CD79a e anti-COX-2 foram submersos em tampão Citrato (pH 6,0) em panela de pressão (PASCAL® - DAKO) ajustada a 125°C por 30 minutos.

Posteriormente a recuperação antigênica e resfriamento dos cortes, as lâminas receberam tratamento com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (metanol + H₂O₂ 8%) para bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem dos cortes, estes foram incubados em leite desnatado (Molico®), durante 60 minutos para bloqueio das proteínas inespecíficas. Transcorridos os tempos de incubação, os cortes receberam os anticorpos primários diluídos em *Antibody Diluent with Background Reducing* (Dako - REF S3022-1), sendo que para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79a e anti-COX-2 por 18 horas a 4°C e para o anticorpo anti-FoxP3 por 2 horas a 27°C em câmara úmida. Seguindo a utilização do kit LSAB (Sistema de Detecção Ultra Estreptavidina Universal, Dako Cytomation, Ref. K0690), por 30 minutos para o anticorpo anti-FoxP3 e *Envision+Dual Link System HRP* (Dako – REF K4061-1) para os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79a e para o anti-COX-2, *Advanced® System* (Dako Cytomation, Inc., Carpinteria, CA) por 30 minutos.

Após cada um dos tratamentos recebidos, as lâminas foram lavadas em solução TRIS, pH 7,4 três vezes por cinco minutos cada, excetuando-se a etapa entre o bloqueio das proteínas inespecíficas e a incubação com o anticorpo primário. As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (Cód. SK-4100- DAB Vector Laboratórios, Burlingame, CA, EUA), e contra corados pela Hematoxilina de Harris por 60 segundos, e então lavados em água corrente por 10 minutos. A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de alcoóis e xilóis, seguidas pela montagem em lamínula em meio permanente Entelan (Ref. 1079610100, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). As lâminas foram lidas em cinco campos representativos do corte com microscópio em aumento de 40x e coloração de Hematoxilina de Harris. Cinco campos foram lidos e 100 células marcadas e não marcadas contadas, onde ao final se extraíram as médias que representaram as porcentagens de expressão de células T reguladoras, células B, células T e COX-2, este último em aumento de 10x.

5.3.1. Avaliação do score de COX-2 e FoxP3

Para análise da expressão de COX-2, foram criados scores de 0 a 4, sendo 0 negativo para expressão, 1 quando expresso até 25%, 2 para 26 a 50% de expressão, 3 de 51 a 75% e 4 para aqueles que possuísem expressão maior que 75%. Para

análise de expressão de FoxP3 foi utilizada a mesma escala de score adotada para classificação da expressão de COX-2.

5.4. Análise de Resultados

Para as análises dos dados numéricos obtidos da avaliação imunohisquímica de COX-2 e FoxP3 assim como dados relacionados ao tempo de sobrevida e imunofenótipo dos pacientes, utilizou-se o teste de Spearman com valor de $p < 0,05$ considerado significativo (ZAR, 1999). O programa utilizado para obtenção dos resultados foi o *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Prim5 software package, GraphPad Software, San Diego, CA, USA*).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Classificação imunofenotípica e sobrevida dos pacientes

Das 29 amostras de linfomas multicêntricos avaliados, 20/29 (69%) foram diferenciadas em linfomas B e 9/29 (31%) em linfomas T, nenhuma amostra foi diferenciada em linfócito misto ou *null cell* conforme pode ser observado na Tabela 1. A maior prevalência de linfomas B em estudos com cães é algo consolidado dentro da oncologia veterinária. Dados epidemiológicos de estudos realizados nos EUA com 175 casos de linfoma apontaram para maior prevalência dos linfomas B (76% dos casos), seguidos dos linfomas T (22%) e linfomas não B não T (2%) (RUSLANDER et al. 1997). Ponce et al. (2010) avaliaram o perfil imunofenotípico do linfoma canino na França. Os autores avaliaram 608 casos de linfoma, sendo a ocorrência de linfomas B a mais prevalente (63,8%) seguida de linfomas T (35,4%). No Brasil, recentemente foi realizado um estudo com 203 casos de linfomas multicêntricos caracterizados seguindo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), e os linfomas de tipo B também foram mais prevalentes (71,92%), seguidos de linfomas T (26,6%) e linfomas não B não T (1,48%) assim como já havia sido demonstrado em outros estudos (FRACÁCIO et al. 2017).

Tabela 1. Caracterização de Imunofenótipo celular em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico. Descalvado, 2018.

IMUNOFENÓTIPO	CARACTERIZAÇÃO DE IMUNOFENÓTIPO	
	(n)	(%)
LINFÓCITOS B	20	68,97
LINFÓCITOS T	9	31,03
LINFÓCITOS NÃO B NÃO T	0	0
TOTAL	29	100%

Em relação a sobrevida dos pacientes com linfoma multicêntrico, que foi calculado a partir do diagnóstico da neoplasia até o óbito do animal, obteve-se uma média de 52,8 semanas para aqueles classificados com imunofenótipo B e 26,13 semanas para os classificados como T, conforme observado em Tabela 2. Um dos animais estudados não retornou para atendimento e seu tutor não atendeu às ligações telefônicas, não sendo possível determinar sua sobrevida. A maior prevalência de

linfomas de imunofenótipo B associado ao fato de esses apresentarem maiores sobrevidas é algo bem consolidados na oncologia veterinária.

Tabela 2. Dados referentes à classificação imunofenotípica e tempo de sobrevida em semanas dos animais do Grupo Linfoma Multicêntrico. Descalvado, 2018.

ANIMAL	SOBREVIDA (SEMANAS) IMUNOFENÓTIPO B	SOBREVIDA (SEMANAS) IMUNOFENÓTIPO T
LM1	37	-
LM2	56	-
LM3	70	-
LM4	51	-
LM5	-	4
LM6	51	-
LM7	49	-
LM8	-	10
LM9	-	16
LM10	79	-
LM11	-	9
LM12	27	-
LM13	76	-
LM14	12	-
LM15	140	-
LM16	54	-
LM17	42	-
LM18	60	-
LM19	19	-
LM20	92	-
LM21	19	-
LM22	-	12
LM23	-	139
LM24	21	-
LM25	21	-

LM26	80	-
LM27	-	1
LM28	-	18
LM29	-	*
MÉDIA	52,8	26,13

*Não retornou para atendimento e seu tutor não atendeu às ligações, não sendo possível determinar sua sobrevida.

A determinação do imunofenótipo apresenta características importantes devido ao fato de ser considerado fator prognóstico independente uma vez que estudos sugerem que os linfomas de origem T apresentam menores taxas de sobrevida quando comparados aos de imunofenótipo B. No estudo de Ruslander et al. (1997) o tempo livre de doença e a sobrevida média dos pacientes com linfomas B foi respectivamente de 160 e 330 dias, enquanto que nos animais com linfomas T essas variáveis foram respectivamente de 52 e 153 dias.

6.2. Expressão de Ciclooxygenase-2 (COX-2) e correlação com sobrevida

De acordo com a avaliação da expressão de COX-2, 12/29 (41,4%) foram negativos para expressão de COX-2, em que 8 (66,7%) eram linfomas do tipo B e 4 (33,3%) linfomas T. Dos 17/29 (58,6%) que foram positivos para COX-2, 12 (70,6%) foram do tipo B e apenas 5 (29,4%) eram linfomas T. De acordo com a classificação em score para aqueles que foram positivos para COX-2, 8 (47,1%) foram classificados em score 2 (7 de imunofenótipo B e apenas 1 T), 4 (23,5%) em score 3 (1 de imunofenótipo B e 3 do imunofenótipo T) e 5 (29,4%) foram classificados em score 4 (4 imunofenótipo B e 1 T). Nenhuma amostra apresentou score 1 (tabela 3).

Tabela 3. Expressão de COX-2 em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico. Descalvado, 2018.

IMUNOFENÓTIPO	EXPRESSÃO DE COX-2 DE ACORDO COM IMUNOFENÓTIPO				
	0	1	2	3	4
LINFÓCITOS B	8	0	7	1	4
LINFÓCITOS T	4	0	1	3	1
TOTAL	12	0	8	4	5

0=negativo; 1=1-25%; 2=26-50%; 3=51-75%; 4>75%.

Embora diversos trabalhos tenham demonstrado a correlação entre a alta

expressão de COX-2 com sobrevida dos pacientes, no estudo em tela não houve diferença estatística ($p=0,95$) entre os pacientes com COX-2 positiva ou negativa. Curvas representativas da sobrevida com relação aos parâmetros de COX-2 positiva e negativa encontram-se na Figura 1. Porém é importante observar que apesar de não haver diferença de sobrevida entre os pacientes, 17 destes, foram positivos para expressão de COX-2 no linfonodo, o que torna o uso de inibidores de COX-2 no tratamento do câncer algo promissor a ser estudado no tratamento de linfomas.

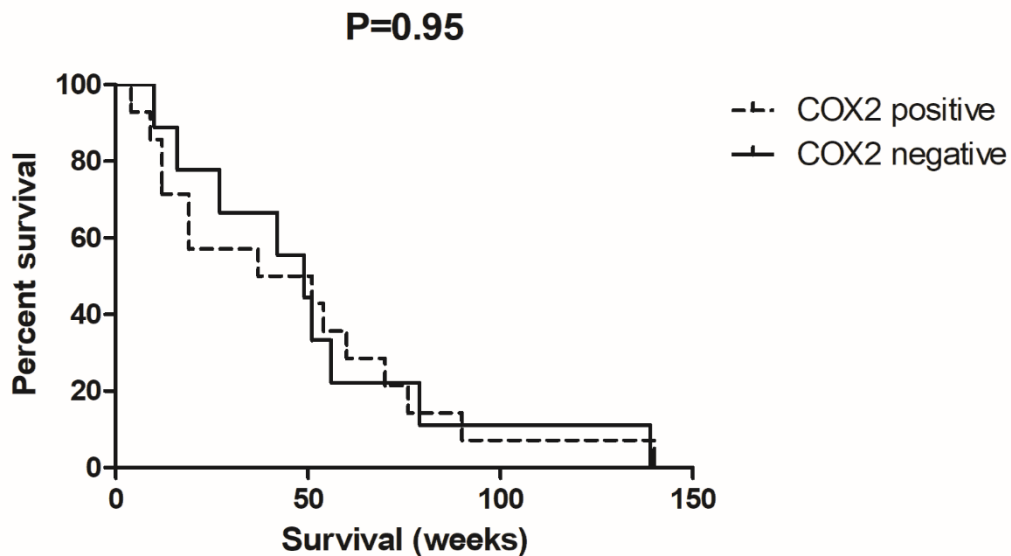


Figura 1. Curva de sobrevida dos animais com linfoma multicêntrico positivos e negativos para expressão de COX-2. Não há relação entre a sobrevida e a expressão de COX-2. Descalvado, 2018.

Foram propostos vários mecanismos pelos quais a expressão de COX-2 e consequentemente a superprodução de prostaglandinas nas células tumorais contribuem para a carcinogênese. Dentre estes mecanismos, podem ser citados a inibição da apoptose, a indução de angiogênese, o estímulo à proliferação celular, o aumento na capacidade de invasão tumoral (favorecendo os mecanismos de metástase) e a supressão do sistema imune, que tem papel fundamental no combate a células tumorais (YU et al., 2003; MOHAMMED et al., 2004; HELLER et al., 2005; GROSCHE et al. 2006; KANAOKA et al., 2007; DHAWAN et al., 2008).

A diminuição da apoptose, que ocorre devido à expressão de COX-2 nas células neoplásicas, faz com que aumente o tempo de sobrevida das células e consequentemente favoreça o acúmulo de mutações genéticas sucessivas, contribuindo para a progressão do tumor (KANAOKA et al., 2007). Diversos estudos

correlacionam a expressão de COX-2 e seus efeitos sobre o mecanismo de apoptose. Um estudo em carcinomas de células de transição de bexiga em humanos demonstrou correlação entre a expressão de COX-2 e a expressão de survivina, uma proteína membro da família das proteínas inibidoras de apoptose (JANG e LEE, 2009).

A superexpressão de COX-2 também está relacionada com o aumento na expressão de fatores de crescimento vascular, e conseqüentemente com o processo de angiogênese, que é considerado um mecanismo fundamental para o desenvolvimento tumoral uma vez que contribui para a nutrição das células neoplásicas e é uma importante via para disseminação destas células durante o processo de metástase (GROOT et al. 2007; KANAOKA et al., 2007).

Demonstrou-se uma correlação positiva entre a expressão de COX-2 e a expressão de fator de crescimento endotelial vascular em tumores de mama em humanos (GROOT et al., 2007). Jones et al. (1999) demonstraram que tanto o uso de inibidores seletivos de COX-2 como os não seletivos inibem a angiogênese por meio de efeitos diretos no endotélio celular.

Outro mecanismo fundamental para o desenvolvimento de metástase e progressão de um tumor, é a capacidade de invasão das células neoplásicas em outros órgãos. Para que isso ocorra, é necessário que haja uma perda da adesão celular ao tecido de origem permitindo a mobilidade e invasão em outros tecidos. Estudos demonstraram que o aumento na expressão de COX-2 está relacionado ao aumento na atividade de determinadas proteínas, como é o caso da metaloproteinase, enzima responsável pela digestão do colágeno na matriz intercelular, permitindo o rompimento das barreiras e invasão tecidual (KANAOKA et al., 2007). No estudo de câncer de cólon, foi observado que células que expressavam maior quantidade de COX-2 apresentavam maior potencial de invasão celular e metástase quando comparadas com células que expressavam uma menor quantidade de COX-2 (GROOT et al., 2007).

Apesar do estudo em tela não demonstrar a expressão de COX-2 como fator prognóstico o fato de 58,6% das amostras serem positivas para a marcação, torna o estudo do uso de inibidores de COX-2 no tratamento do linfoma algo promissor.

6.3. Expressão de *Forkhead box P3* (FoxP3) e correlação com sobrevida

Em relação a expressão de FoxP3, 13/23 (56,5%) foram negativos e classificadas em score 0, sendo que 10 (76,9%) eram de imunofenótipo B e 3 (23,1%) de tipo T. Apenas 10/23 (43,5%) dos casos tiveram classificação positiva para FoxP3,

sendo 9/10 (90%) classificadas em score 1 (7 de imunofenótipo B e 2 do tipo T), 1/10 (10%) foi classificado em score 2 (imunofenótipo T), nenhuma amostra foi classificada como scores 3 e 4 (tabela 4). Seis amostras não tiveram análise da expressão de FoxP3.

Tabela 4. Expressão de FoxP3 em linfonodos de cães com linfoma multicêntrico. Descalvado, 2018.

IMUNOFENÓTIPO	EXPRESSÃO DE FOXP3 DE ACORDO COM IMUNOFENÓTIPO				
	0	1	2	3	4
LINFÓCITOS B	10	7	0	0	0
LINFÓCITOS T	3	2	1	0	0
TOTAL	13	9	1	0	0

0= negativo; 1= 1-25%; 2= 26-50%; 3= 51-75%; 4>

A expressão de FoxP3 é um dos marcadores mais fidedignos para avaliação da expressão de células Tregs. 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 relatadas em cães com carcinoma, seguidas de sarcoma, linfoma e mastocitoma. Outros ensaios mostraram que as células Tregs apresentaram-se numericamente aumentadas no sangue periférico de cães com metástases quando comparados àqueles sem metástases, sendo que nos pacientes com tumores em estágios mais avançados há um aumento das células T, isso sugere que as Tregs são capazes de promover imunotolerância às células tumorais por suprimirem a imunidade tipo 1, o que poderia favorecer o aparecimento de metástases (HORIUCHI et al., 2009).

No presente estudo foi possível observar que a alta expressão de FoxP3 foi maior em linfomas T (figura 2). Alguns autores discutem que esse é um marcador indireto para pior sobrevida, uma vez que quanto maior a expressão de FoxP3, maior será o infiltrado de Tregs. Schreiber (2007) demonstraram que o FoxP3 em câncer de cólon em humanos pode predizer um pior prognóstico, devido a maior invasão local por provável modulação da capacidade do sistema imune em identificar as células neoplásicas. Pesquisas tem observado que o FoxP3 possui um fator importante para inicialização do câncer, e que esse também teria um papel na evolução, sendo adotado como um indicador de mau prognóstico também no carcinoma papilífero de

tireoide em humanos (LADOIRE et al., 2010; NEVES JUNIOR et al., 2013).

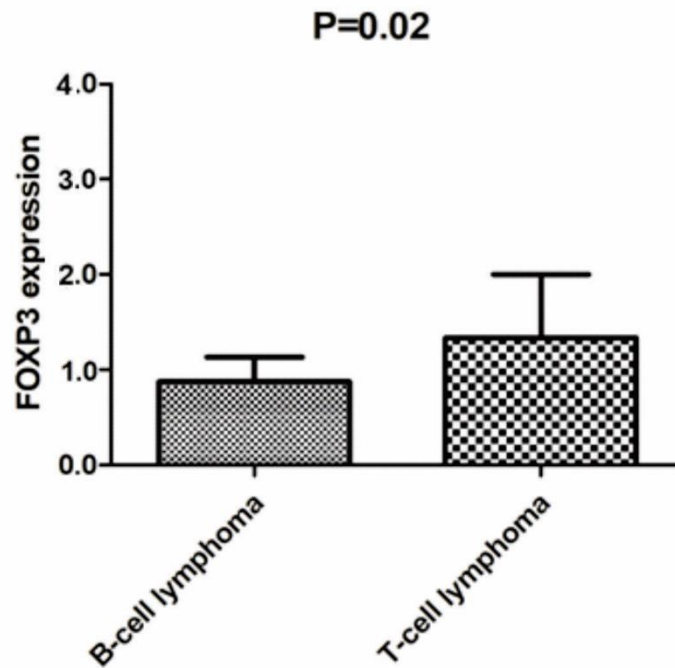


Figura 2. Valores percentuais obtidos de expressão tecidual de FoxP3 em linfonodos de cães portadores de linfoma multicêntrico de células B (*B-cell*) e de células T (*T-cell*). Maior expressão de Tregs nos linfomas T comparado aos linfomas B ($P=0.02$). Descalvado, 2018.

Apesar do aumento de FoxP3 estar correlacionado com aumento de células Tregs e isso estar associado a pior sobrevida, no presente estudo não houve diferença entre a expressão de FoxP3 em linfonodo e a sobrevida dos pacientes conforme demonstrado em Figura 3.

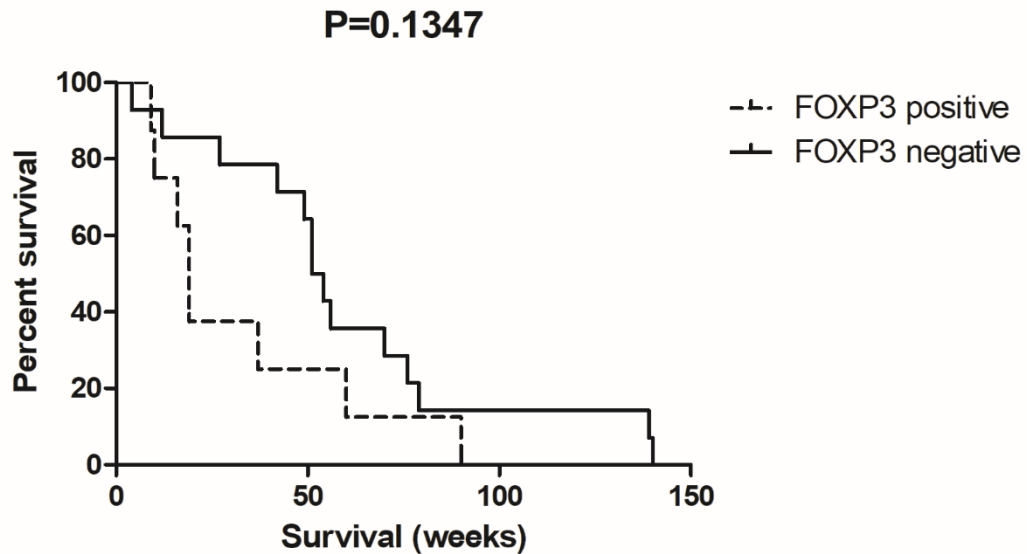


Figura 3. Curva de sobrevida dos animais com linfoma multicêntrico positivos e negativos para expressão de FoxP3. Ausência de relação entre a sobrevida e expressão de FOXP3. Descalvado, 2018.

Alguns autores associam fatores prognósticos como tempo livre de doença, resposta ao tratamento e sobrevida do paciente aos valores de Tregs e relação Treg/CD8+ expressados (O'NEILL et al., 2009; BILLER et al. 2010). Munhoz et al. (2016) também não encontraram valor prognóstico quando correlacionaram valores de Treg/CD8+ e resposta terapêutica em cães com linfoma multicêntrico submetidos à tratamento quimioterápico. Portanto, a não observação desses resultados em nosso estudo pode estar relacionado com o baixo número de animais.

6.4. Correlação entre FoxP3 e COX-2

Existem poucos trabalhos que correlacionam a COX-2 e FoxP3, e ainda que esses tenham demonstrado a correlação positiva entre COX-2 e a expressão FoxP3, em nosso estudo não foi possível encontrar os mesmos resultados, conforme pode ser observado na Figura 4.

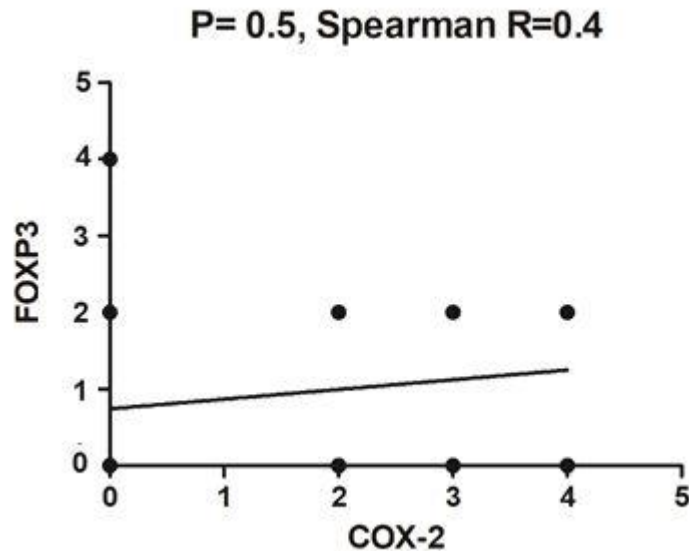


Figura 4. Curva de correlação entre a expressão de FoxP3 versus expressão de COX-2 em linfonodos de animais com linfoma multicêntrico. Ausência de correlação entre a expressão de FOPX3 e COX-2 Descalvado, 2018.

Tominaga et al. (2010) sugere em seu estudo realizado com melanoma canino, que o aumento da expressão de TGF- β , de ciclooxigenase-2 (COX-2) e de prostaglandina E2 produzidas pelo tumor levaria a atração e proliferação local de células CD4+ FoxP3+, além da conversão in situ de células CD4+ em Tregs, gerando assim a expansão seletiva de Tregs em tecidos infiltrados promovendo o crescimento de células tumorais. Em estudo realizado com pacientes portadores de câncer de pulmão, os autores demonstraram que a alta infiltração de FoxP3 e Tregs intratumoral estavam positivamente correlacionados com a expressão intratumoral de COX-2 (SHIMIZU et al.,2010). Estudo realizado com camundongos demonstrou que há uma rede imunossupressora dependente de COX-2 no microambiente em câncer de pulmão de não pequenas células humanas (CPNPC), e que a COX-2/PG2 induzida por tumores levou a indução da expressão de FoxP3, resultando em um aumento na atividade das células Tregs (SHARMA et al, 2005).

A correlação de COX-2 e FoxP3 é bem estabelecida em tumores sólidos, porém não foi observado correlação no estudo com linfoma multicêntrico canino, sugerindo que talvez existam mecanismos diferentes na patogenia entre tumores sólidos e hematopoiéticos e que, a dosagem de células Tregs no sangue periférico de cães com linfoma podem sugerir resultados diferentes ao encontrado no linfonodo, tornando esse campo de estudo promissor para pesquisas futuras.

7. CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste ensaio e em função dos resultados aqui encontrados, conclui-se que:

- ✓ O linfoma multicêntrico canino de células B tem maior prevalência (69%) quando comparados aos de células T e a sobrevida média para estes pacientes é superior aos cães com linfoma T
- ✓ Mais da metade dos cães acometidos por linfoma multicêntrico expressam COX-2, porém, mesmo com a alta expressão de COX-2, não foi possível correlacionar com a sobrevida dos pacientes neste estudo.
- ✓ Embora a maior parte das amostras não tenham sido positivas para expressão de FoxP3 no presente estudo, foi possível observar que, quando expressado, os linfomas de células T possuem maior expressão do que B. Mesmo o FoxP3 sendo correlacionado com o aumento de Tregs e conseqüentemente uma pior sobrevida, em nosso estudo não foi demonstrado tal correlação, podendo este fato estar relacionado ao baixo número de animais.
- ✓ Não foi demonstrado positivamente a correlação entre COX-2 e a expressão de FoxP3, sugerindo possíveis mecanismos diferentes em sua patogenia e a dosagem de células Tregs no sangue periférico podem também diferenciar-se dos obtidos em linfonodos.
- ✓ Apesar da expressão de COX-2 e FoxP3 no estudo em tela não apresentar correlação com a sobrevida dos pacientes, a expressão desses marcadores em linfomas multicêntricos torna o estudo do uso de inibidores de COX-2 promissor no tratamento dessa neoplasia em cães.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. Immunol. Immunopathol.**, v. 127, n. 3-4p. 376-381, Feb, 2009.
- BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25+ regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, n. 3, p. 1245-1253, Aug, 2001.
- 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, n. 1-2, p. 69-78, Mar, 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, n.5, p. 1118-1123, Sep/Oct, 2010.
- CARDOSO, M. J. L. et al. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.19, n. 3, p.131-142, Sep/Dec, 2003.
- CARDOSO, M. J. L. et al. Linfoma canino - achados clínico-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.25-29, Sep, 2004.
- COOLS, N. et al. Regulatory T cells and human disease. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2, n. p. 1-11, Jan, 2007.
- CRUVINEL, W. M. et al. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n. 6, p. 342-355, Nov/Dec, 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**. São Paulo: Roca, 2008. p.481-505.
- DE MOURA, V. M. B. D. et al. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.
- DHAWAN, D. et al. Cyclooxygenase-2 dependent and independente antitumor effects induced by celecoxib in urinary bladder cancer cells. **Mol. Cancer Ther.**, v. 7, n. 4, p. 897-904, Apr, 2008.
- DOBSON, J. M.; GORMAN, N. T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response to two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, n.1, p. 9-15, Jan, 1994.
- DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.** v. 12, n. 12 p. 1063-1073, Sep, 1998.
- FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphossarcoma. **Veterinary Medicine**, v. 97, n. 1, p.58-67, Jan, 2002.
- FAN, T. M.; DE LORIMIER, L. P. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, v. 100, n.4 p.285-294, Apr, 2005.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Linfossarcoma em cães. **Ciênc. Rural**, v.32, n.5, p.895-899, 2002.

FRACÁCIO, C. P. et al. Caracterização histopatológica e imunofenotípica segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 203 casos de linfoma multicêntrico canino no Brasil. In: IX ONCOVET - CONGRESSO BRASILEIRO DE ONCOLOGIA VETERINÁRIA, Mai, 2017, São Paulo. **Anais eletrônicos**. São Paulo, 2017: ABROVET - Associação Brasileira de Oncologia Veterinária, 2017. p. 34. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/0B3KSGMnjD7jSMkVwV043WEh6MzQ/view?usp=sharing>. Acesso em 12 de jun. 2018.

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.

GREENLEE, P. G. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, v. 66, n. 3, p.480-490, Aug, 1990.

GROOT, D. J. A.; VRIES, E. G. E.; GROEN, H. J. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. **Criti. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 61, n. 1, p. 52-69, Jan, 2007.

GRÖSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMANN, S. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) - independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **J. Nati. Cancer Inst.**, v. 98, n. 11, p. 736-747, Jun, 2006.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Vet. Pathol.**, v. 42, n. 6, p. 776–780, Nov, 2005.

HORIUCHI, Y. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. **Microbiol. Immunol.**, v. 53, n. 8, p. 468-474, Aug, 2009.

JANG, T. J.; LEE, K. S. The expression of cyclooxygenase-2 and survivin in urinary bladder transitional cell carcinoma. **The Korean Journal of Pathology.**, v. 43, n. 3, p. 206-211, Mar, 2009.

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

KANAOKA, S.; TAKAI, T.; YOSHIDA, K. Cyclooxygenase-2 and tumor biology. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 43, n. 59, p. 59-78, Jan, 2007.

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, n. 3-4, p. 337-344, Jun, 2008.

LADOIRE, S.; ARNOULD, L.; MIGNOT, G. et al. Presence of FOXP3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients

treated with neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 125, n. 1, p. 65-72, Jan, 2010.

LEE, S. Y. et al. The Immune Tolerance of Cancer is Mediated by IDO That is Inhibited by COX-2 Inhibitors Through Regulatory T Cells. **J. Immunother.**, v. 32, n. 1, p. 22-28, Jan, 2009.

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**, 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. p. 451-479.

MAHIC, M. et al. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. **J. Immunol.**, v. 177, n. 1, p. 246-254, Jul, 2006.

MOHAMMED, S. I.; KHAN, K. N. M.; SELLERS, R.S. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally occurring canine cancer. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 70, n. 5, p. 479-483, May, 2004.

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, n. supl., p. 46-52, Dec, 2007.

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. Berkeley: University of California Press. 1990, p. 231.

MUNHOZ et al. Regulatory T cells in dogs with multicentric lymphoma: peripheral blood quantification at diagnosis and after initial stage chemotherapy. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.1, p.1-9, Jan/Feb, 2016.

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

NATARAJ, C. et al. Receptors for prostaglandin E2 that regulate cellular immune responses in the mouse. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 8, p. 1229-1235, Oct, 2001.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1087-1096.

NEVES JUNIOR, M. P., et al. FOXP3 expression in papillary thyroid carcinoma with and without Hashimoto's thyroiditis. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 49, n. 4, p. 283-287, Aug, 2013.

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, n.4, p. 875-81, Aug, 2009.

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

PICCIRILLO et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate supressor function in the absence of transforming growth factor beta 1 production and responsiveness. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 2, p. 237-46, Jul, 2002.

PINHEIRO 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, p. 1-15, Aug, 2014.

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

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

RUSLANDER, D. A. et al. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. **In Vivo**., v. 11, n. 2, p. 169-172, Mar/Apr, 1997.

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, n. 3, p. 1151-1164, Aug, 1995.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self tolerance maintained bt T cellmediated control of self-reactive T cells: implications for autoimmunity and tumor immunity. **Microbes Infect.** v. 3, n. 11, p. 911-918, Sep, 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. 345-352, Apr, 2005.

SCHRECK, S. et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. **Hemat. Oncol.**, v. 27, n. 1, p. 31-39, Mar, 2009.

SCHREIBER, T. H. The Use of FOXP3 as a Biomarker and Prognostic Factor for Malignant Human Tumor. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 16, n. 10, p. 1931-1934, Oct, 2007.

SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P. et al. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.**, v.51, n.3, p.1-11, 1999.

SHARMA, S.; YANG, S. C.; ZHU, L. et al. Tumor Cyclooxygenase-2/Prostaglandin E2-Dependent Promotion of FOXP3 Expression and CD4+CD25+ T Regulatory Cell Activities in Lung Cancer. **Cancer Res.**, v. 65, n. 12, p. 5211-5220, Jun, 2005.

SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ suppressor T cells: more question than answers. **Nat. Rev. Immunol.** v. 2, n. 6, p. 389-400, Jun, 2002.

SHIMIZU et al. Tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. **J. Thorac. Oncol.**, v. 5, n. 5, p. 585-590, May, 2010.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition, **Pharmacol. Rev.**, v. 56, N. 3, p. 387-437, Sep, 2004.

SUSAN, N.; ETTINGER, D. V. M. Principles of treatment of canine lymphoma, **Clin. Tech. Small Anim. Pract.**, v. 18, n. 2, p. 92-97, May, 2003.

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, n. 3, p. 438-41, May, 2010.

VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfóides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1998. p. 218-225.

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4 ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2007. p. 699-784.

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

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

VANG, T. et al. Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein kinase a inhibits T cell receptor signaling. **J. Biol. Chem.** v. 278, n. 20, p. 17597-17600, May 2003.

WANG, D.; DOBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. **GUT**, v. 55, n. 1 p.115-122, Jan, 2006.

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

YAQUB, S. et al. Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress antitumor immune activity in a COX-2 dependent manner. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 57, n. 6, p. 813-821, Jun, 2008.

YU, D.S.; CHEN, H.I.; CHANG, S.Y. The expression of cyclooxygenase in transitional cell carcinoma cell lines: its correlation with tumor differentiation, invasiveness and prostanoids production. **Eur. Urol.**, v. 44, n. 4, p. 491-494, Oct, 2003.