VALTER DE MEDEIROS WINKEL

**Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos
do sistema imune em felinos com linfoma gastrointestinal**

São Paulo
2016

VALTER DE MEDEIROS WINKEL

**Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos do sistema imune
em felinos com linfoma gastrointestinal**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3388
FMVZ

Winkel, Valter de Medeiros
Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos do sistema imune em felinos com linfoma gastrointestinal / Valter de Medeiros Winkel. -- 2016.
135 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas.

1. Gatos. 2. Linfoma gastrointestinal. 3. Sistema imune. 4. Imunoistoquímica. 5. Células T regulatórias. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos do sistema imune em felinos com linfoma digestório", protocolado sob o nº 3106/2013, utilizando 40 (quarenta) gatos, sob a responsabilidade do(a) Silvia Regina Ricci Lucas, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Study of immune system immunohistochemical markers in cats with alimentary lymphoma", protocol number 3106/2013, utilizing 40 (forty) cats, under the responsibility Silvia Regina Ricci Lucas, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WINKEL, Valter de Medeiros

Título: **Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos do sistema imune em felinos com linfoma gastrointestinal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Este trabalho eu dedico em especial ao
meu cãozinho Toby (in memoriam), que me
conquistou com a sua forma singela de ser e por me
amar incondicionalmente, e ao meu grande ídolo do
esporte a motor Michael Schumacher, que sempre
foi uma grande inspiração na minha vida*

*“Life is about passions
Thank you
for sharing mine”
Michael Schumacher*

DEDICATÓRIAS

À minha querida mãe, Cidinha, pelo amor, dedicação e por tudo que me ajudou nesta longa jornada, sempre me apoiando em todos os momentos. É nela que me inspiro, pelo seu exemplo de vida e qualidade como profissional.

Ao meu querido pai, Valter Winkel, que com seu exemplo de caráter, integridade e profissionalismo, me inspira a seguir seus passos.

Ao Félix de Medeiros Winkel, meu querido irmão (“blodi”) e amigo, pelas saudosas lembranças dos anos de infância e adolescência.

Ao meu querido tio José Edson de Medeiros, pelo apoio, incentivo e amor a mim dedicado durante toda essa trajetória.

À tia Cidinha de Medeiros e aos primos, Andréa, Juliano e Luciano, pela força, carinho e amizade.

Ao meu padrinho Luís Carlos Rossato e às madrinhas Jeanete Rossato e Mariângela Lampi, pela atenção e carinho;

À minha querida orientadora, prof^a Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas, por todas as oportunidades concedidas a mim. Não tenho palavras que possam descrever a admiração e gratidão que tenho por você. Tornou-se realmente a minha mãe científica!!!

À minha ex-orientadora e amiga, prof. Dra. Viviani De Marco, que me concedeu a primeira oportunidade na iniciação científica e me indicou para seguir meu caminho na pesquisa científica em nível de mestrado e doutorado na USP.

Aos prof. Dr Bruno Cogliati e Dr Archivaldo Reche Jr, pela colaboração extremamente importante neste projeto de pesquisa. Sem a ajuda de vocês este trabalho não teria se concretizado.

À minha querida amiga Mariana Brito dos Santos, companheira desde os tempos de ensino fundamental e médio, sempre presente e me incentivando em todos os momentos.

À minha querida amiga Tatiana Liliane Rossi Pavan, amiga e companheira durante todo o mestrado e doutorado, fruto de várias gargalhadas, histórias, cafés, almoços... Ganhei não apenas uma colega de pós-graduação, mas uma verdadeira amiga.

Às minhas queridas amigas de pós-graduação Jéssica Soares Garcia e Ana Luiza Nairismagi Alves, fiéis companheiras desde o tempo de mestrado e durante todo o doutorado, pelas quais tenho uma admiração e ligação incomensurável. Como “funcionamos” bem juntos!!!

À minha amiga Adriana Silva Santos, pela amizade e companheirismo nestes anos.

Aos amigos da pós-graduação Dóris Halfen, Eduardo Braghirolli, Paulo Jark, Cíntia Martorelli e Verônica Mollica Govoni, pela amizade e companheirismo durante o doutorado.

Aos meus queridos amigos de São José dos Campos, Antônio Faleiros, Cláudia Alejandra, Marcela Gonçalves, Renato Franco, Daniel Oliveira e Marino Alves, pelo companheirismo e amizade desde sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora prof. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas, pela orientação, confiança, amizade e oportunidade de realizar o meu mestrado e doutorado. Minha eterna gratidão pela confiança depositada em mim, abrindo as portas da FMVZ/USP e me oportunizando ingressar no mundo da pesquisa oncológica. Nestes vários anos de aprendizado ao seu lado me tornei um profissional muito mais competente e íntegro.

Ao prof. Dr. Bruno Cogliati, minha imensa admiração como professor e pesquisador. Primeiramente, por abrir as portas do LapMol (Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular). Sua colaboração foi crucial na execução de todo experimento, desde a padronização dos anticorpos até na determinação da forma de análise das marcações, na confirmação do diagnóstico de alguns casos em que havia dúvida e no subsídio de materiais para a realização das provas específicas deste experimento.

Ao prof. Dr. Archivaldo Reche Jr, pela doação dos blocos parafinados provenientes de biópsia intestinal de felinos com diagnóstico de linfoma gastrointestinal e pela colaboração neste projeto de pesquisa. Agradeço também a participação na banca de qualificação e pelo esclarecimento de dúvidas sempre que necessário.

À Ana Luiza Nairismagi Alves, pela amizade e companheirismo durante o doutorado, auxiliando diretamente nos atendimentos, na execução das provas laboratoriais e análise das lâminas, tendo sido fundamental para que este trabalho fosse executado com sucesso. Não há palavras que possam descrever a gratidão que tenho por tudo que me ajudou.

À Tatiana Liliane Rossi Pavan, companheira fiel durante todo o mestrado e doutorado, compartilhando nossos atendimentos, estudos, disciplinas, etceteras. Agradeço imensamente pelo auxílio na triagem dos casos clínicos deste projeto e na colaboração nos atendimentos;

À prof. Dra. Erika Krick, da University of Pennsylvania, que me oportunizou acompanhá-la nos atendimentos de oncologia clínica, especialmente na espécie felina, e no serviço de Oncologia clínica do Mathew J. Ryan Veterinary Hospital da mesma universidade durante 2 meses;

Ao prof. Dr. David Vail, da University of Wisconsin-Madison, que me oportunizou a realização de um programa de treinamento no serviço de oncologia clínica da UW Veterinary Care durante 2 meses;

À prof. Dra. Alison Banham, da University of Oxford, pela doação dos clones de anticorpos anti-FOXP3 E ANTI-FOXP1, fundamentais nesta pesquisa;

À FAPESP, processos nº 2012/25485-4 (auxílio à pesquisa) e nº 2013/01970-3 (bolsa), pelo auxílio fundamental para realização desta pesquisa;

Aos professores Maria Cláudia Araripe Sucupira, Raquel Baccarin, Carlos Eduardo Larsson, Márcia Mery Kogika, Denise Saretta Schwartz, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Maria Helena Matiko Akao Larsoon, Wilson Roberto Fernandes, Fernando José Benesi, Cristina de Oliveira Massoco Salles e Maria Lúcia Zaidan Dagli, pelos ensinamentos e exemplos como profissionais;

À prof. Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli e a Marguiti Soares, por abrir as portas do seu laboratório em vários momentos para cortar blocos para confecção de lâminas para imunoistoquímica, uso do microscópio para fotografar as lâminas do experimento, empréstimo de anticorpos para teste, dentre outros vários auxílios no desenvolver do projeto;

À querida professora Viviani De Marco, pela amizade de sempre e por fazer parte da minha banca de qualificação;

À Elza Maria Rosa Faquim, pela essencial correção técnica desta tese;

Aos colegas do VPT e LapMol Verônica Mollica Govoni, Isabel Veloso, Shirlei Silva, Teresa Cristina da Silva, Marguiti Soares, Elisângela Anjos e Isis

Paixão, pela amizade, auxílio no experimento e consideração durante todo o doutorado;

Às funcionárias do serviço de hematologia Samantha Ive Miyashiro, Maria Luisa Franchini e Maria Helena da Silva Pelissari, pela amizade, companheirismo, conversas e por terem agilizado todos os resultados de exames que precisávamos;

Às funcionárias do setor de Laboratório Clínico, Marly Elisabete Ferreira de Castro, Cláudia Regina Stricagnolo, Clara Satsuki Mori, Edna Santana dos Santos e Creide Donizete da Costa, pela boa disposição em agilizar tudo que fosse possível;

Às médicas veterinárias do HOVET, Vera Assunta Battistini Fortunato Wirthl, Bruna Maria Pereira Coelho, Khadine Kazue Kanayama, Denise Maria Nunes Simões, Paula Romy Gonçalves Pereira, Andréia Ferreira, Silvana Lima Gorniak (radiologia), Luciane Kanayama (ultrasom) e Viviane Galeazzi (cirurgia), pela constante paciência na triagem dos casos, assistência durante as quimioterapias, sedações, anestésias, cirurgias para biópsia intestinal, citologias guiadas por ultrassom, encaixes para raio-X e ultrassom abdominal, que contribuíram fundamentalmente para conclusão deste trabalho;

Aos auxiliares de enfermagem Carlito dos Santos Belau, Antônio Carlos Malaquias, Milton Gregório dos Santos, Gilberto Pereira da Cruz e Geraldo Natalino Tezzi, pelas incomensuráveis colheitas de sangue e auxílio durante as quimioterapias, além das boas conversas e histórias...

Às secretárias da graduação e pós-graduação Aparecida Freitas, Silvana Rossi Guedes e Adelaide Borges;

Aos animais que fizeram parte deste experimento e seus proprietários;

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram na conclusão desta dissertação.

RESUMO

WINKEL, V. M. **Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos do sistema imune em felinos com linfoma gastrointestinal.** [Study of immune system markers by immunohistochemistry in cats with gastrointestinal lymphoma]. 2016. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Linfomas pertencem a um grupo de neoplasias que tem em comum a origem em células linforreticulares, sendo a forma anatômica gastrointestinal a mais prevalente na espécie felina. A maioria dos animais responde inicialmente ao tratamento, contudo, sabe-se que o desequilíbrio no sistema imune, de modo geral, pode facilitar a ocorrência e a disseminação das neoplasias. Para equilibrar a atividade do sistema imune, as células com função regulatória (Tregs) são fundamentais e por isso, alvo de diversas pesquisas isoladamente ou associadas a outros marcadores, como a IL-17A e o CD8, já que tanto as Tregs quanto os linfócitos Th17 originam-se de uma mesma célula T progenitora. Assim, alterações na relação Treg/Th17 podem levar à supressão na produção de linfócitos T CD8, invertendo a relação Tregs/CD8. Também há indícios de que as Tregs alterem a função efetora de células T contra neoplasias em seres humanos e em cães. Foram objetivos deste estudo avaliar as características do linfoma gastrointestinal em felinos, a proliferação celular por meio do índice mitótico e do marcador Ki-67, a expressão imunoistoquímica de CD4, CD8, CD25 (IL-2R), FOXP3 e IL-17A e correlacionar a expressão desses marcadores com o tipo celular, imunofenótipo, resposta ao tratamento e sobrevida global. Para análise estatística foram utilizados os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Qui-quadrado de Pearson, de correlação de Spearman e a curva Kaplan-Meier. Dos 47 gatos, 85% apresentaram a forma linfocítica de células T, com mediana de sobrevida de 24 meses; 15% apresentaram a forma linfoblástica de células B ou T, com mediana de sobrevida de 5 meses. A expressão de Ki-67 foi mais evidente naqueles pacientes com linfoma linfoblástico de células B ou T se comparado ao linfocítico de células T, com mediana de 40,5% e 8,2%, respectivamente e $p=0,002$. Na análise dos marcadores do sistema imune, não foi observada marcação de IL-2R. Não houve diferença significativa na expressão de IL-17 e FOXP3 entre os tipos celulares e imunofenótipo, bem como não houve correlação entre FOXP3 e IL-17 e entre FOXP3 e CD8. Considerando somente os casos de linfoma linfocítico de

células T, na análise do padrão de remissão parcial (n=12) *versus* completa (n=27), constatou-se diferença significativa quanto à sobrevida ($p<0,0001$) e CD8 ($p=0,015$). Na análise de sobrevida, o tratamento com L-asparaginase, clorambucil e prednisona, os níveis de albumina sérica iguais ou maiores que 2,5g/dL e o ganho de peso no início do tratamento foram preditores de maior tempo de sobrevida. Pode-se concluir que o linfoma linfocítico de células T foi o mais prevalente na espécie felina, envolvendo principalmente o intestino delgado e com um tempo mediano de sobrevivência de 24 meses; a expressão de ki-67 foi melhor marcador para determinar a proliferação celular se comparada ao índice mitótico; a expressão de FOXP3 foi baixa e não se relacionou à resposta terapêutica e ao tempo de sobrevida. Na análise específica dos casos de linfoma linfocítico de células T, não houve correlação entre FOXP3/IL-17 e FOXP3/CD8, enquanto que a baixa expressão de CD8 correlacionou-se a maior sobrevida naqueles pacientes em remissão completa.

Palavras-chave: Gatos. Linfoma gastrointestinal. Sistema imune. Imunoistoquímica. Células T regulatórias.

ABSTRACT

WINKEL, V. M. **Study of immune system markers by immunohistochemistry in cats with gastrointestinal lymphoma.** [Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos do sistema imune em felinos com linfoma gastrointestinal]. 2016. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Lymphomas belong to a group of neoplasia that have in common the origin in lymphoreticular cells, and gastrointestinal is the most prevalent anatomical form in feline species. Most animals initially respond to treatment, however, it is known that the imbalance in the immune system generally may facilitate the occurrence and spread of tumors. To balance the activity of immune system, cells with regulatory function (Treg) are essential and therefore the target of many researches, alone or in combination with other markers such as IL-17A and CD8, as well Tregs as Th17 lymphocytes originate from a same progenitor T-cell. Thus, the relation between Treg / Th17 is important since changes in this relation can lead to suppressed production of CD8+ T lymphocytes, inverting the relation Treg/CD8. There is also evidence that Tregs alter the effector function of T cells against tumors in human beings and dogs. The objectives of this study was to evaluate the characteristics of gastrointestinal (GI) lymphoma in cats, cell proliferation by mitotic index and Ki-67 marker, immunohistochemical expression of CD4, CD8, CD25 (IL-2R), FOXP3 and IL-17A and correlate the expression of these markers on the cell-type, immunophenotype, response to treatment and overall survival. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, Pearson's Chi-squared test, Spearman correlation and Kaplan-Meier curve. Of the 47 cats, 85% showed lymphocytic T cells, with a median survival of 24 months; and 15% had lymphoblastic B or T cells, with a median survival of 5 months. Ki-67 expression was most evident in patients with lymphoblastic B- or T-cell lymphoma compared to lymphocytic T cell lymphoma, with a median of 40.5% and 8.2%, respectively and $p = 0.002$. In the analysis of immune system markers, immunostaining was not observed IL-2R. There was no significant difference in IL-17A and FOXP3 expression between cell-type and immunophenotypes, as well as no correlation between FOXP3 and IL-17A and between FOXP3 and CD8. Considering only the cases of lymphocytic T-cell lymphoma, there was a significant difference in survival time ($p < 0.0001$) and CD8 expression ($p = 0.015$) considering partial ($n = 12$) versus complete remission ($n =$

27). In survival analysis, treatment A (L-asparaginase, chlorambucil and prednisolone), as well as serum albumin levels equal or higher than 2.5g/dL and weight gain after 30 days of treatment were predictive of increased survival time. As conclusion, lymphocytic T-cell lymphoma was more prevalent in feline species, mainly involving the small intestine and with a median survival of 24 months. Ki-67 expression was better marker to determine cell proliferation than mitotic index. FOXP3 expression was low and did not correlate to therapeutic response and survival time in GI lymphoma. In the specific analysis of lymphocytic T-cell lymphoma, there was no correlation between FOXP3/IL-17A and FOXP3/CD8, while low CD8 expression was correlated with increased survival in patients in complete remission.

Keywords: Cats. Gastrointestinal lymphoma. Immune system.
Immunohistochemistry. Regulatory-T cells.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados categóricos de imunofenótipos, tipo histológico, tratamentos, padrão de remissão e utilização de tratamento anterior ao diagnóstico em 47 felinos com linfoma gastrointestinal - São Paulo - 2016	55
Tabela 2 - Análise dos imunofenótipos (B e T) dos dados categorizados quanto ao tipo histológico, tratamentos utilizados, padrão de remissão e tratamento anterior ao diagnóstico, dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal - São Paulo – 2016	56
Tabela 3 - Análise dos tipos histológicos (linfoblástico e linfocítico) dos dados categorizados quanto ao imunofenótipo, tratamentos, tipo de remissão e tratamento anterior dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal - São Paulo - 2016	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imunoexpressão de CD3 em tecido linfoide em aumento de 20X (A) e 40X (B) - São Paulo – 2016.....	40
Figura 2 - Imunoexpressão de Pax5 em tecido linfoide em aumento de 20X (A) e 40X (B) - São Paulo - 2016	40
Figura 3 - Imunoexpressão de Ki-67 em tecido linfóide em aumento de 40X (A e B) - São Paulo - 2016.....	41
Figura 4 - Imunoexpressão de FOXP3 em tecido linfoide felino em aumentos de 40X (A e B) - São Paulo - 2016	41
Figura 5 - Imunoexpressão de CD8 em tecido linfóide em aumento de 20X (A) e 40X (B) pela técnica de imunofluorescência com TSA - São Paulo - 2016	41
Figura 6 - Imunoexpressão de IL-2R em tecido linfóide em aumento de 20X (A) e 40X (B) pela técnica de imunofluorescência com TSA - São Paulo - 2016	42
Figura 7 - Imunoexpressão de IL17A em aumento de 20X (A) e 40X (B) pela técnica de imunofluorescência com TSA - São Paulo - 2016.....	42
Figura 8 - Análise histopatológica de amostras de biópsia de tecido intestinal de felinos com linfoma gastrointestinal (A e B). Nota-se nas figuras a infiltração de linfoblastos com a presença de diversas figuras de mitose típicas e atípicas (aumentos de 40X) - São Paulo - 2016	53
Figura 9 - Marcação de CD3 em tecido intestinal em aumentos de 20X (A) e 40X (B) pela técnica convencional de imunoistoquímica - São Paulo - 2016	53
Figura 10 - Marcação de Pax5 em tecido intestinal em aumentos de 20X (A) e 40X (B) pela técnica convencional de imunoistoquímica - São Paulo - 2016	53
Figura 11 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação ao imunofenótipo - São Paulo - 2016	58
Figura 12 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação ao tipo histológico - São Paulo - 2016	59

Figura 13 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação ao tipo de tratamento utilizado - São Paulo - 2016.....	60
Figura 14 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação à concentração sérica de albumina. - São Paulo - 2016	61
Figura 15 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação à variação do peso - São Paulo - 2016	62
Figura 16 - Imunoexpressão de Ki-67 em linfonodo (A) e em vilosidade intestinal (B) de um gato-controle positivo na reação (aumentos de 20X e 40X, respectivamente) - São Paulo - 2016.....	77
Figura 17 - Baixa expressão de Ki-67 no microambiente tumoral com infiltração linfocítica: 5% (A) e 19% (B) - São Paulo – 2016.....	79
Figura 18 - Moderada e alta expressão de Ki-67 no microambiente tumoral com infiltração linfocítica: 30% (A) e 68% (B) - São Paulo – 2016	80
Figura 19 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação, dos felinos com linfoma gastrointestinal na comparação entre as formas linfoblástica e linfocítica ($p=0,002$) e entre os imunofenótipos B e T ($p=0,001$) - São Paulo - 2016.....	80
Figura 20 - Imunoexpressão de FOXP3 em linfonodo de gato como controle negativo (A) e positivo (B) da reação (aumentos de 40X) - São Paulo - 2016	94
Figura 21 - Imunoexpressão de FOXP3 em tecido intestinal de felinos com linfoma gastrointestinal: negativo (A) e positivo (B) (aumentos de 40X) - São Paulo – 2016	94
Figura 22 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação dos felinos com linfoma gastrointestinal na comparação entre as formas linfoblástica e linfocítica ($p=0,315$) e entre os imunofenótipos B e T ($p=0,300$) - São Paulo - 2016.....	96
Figura 23 - Imunoexpressão de CD8 (A) e IL-17A (B) em tecido intestinal de felinos com linfoma linfocítico de células T (aumentos de 40X) - São Paulo - 2016	112

Figura 24 - Imunoexpressão de FOXP3 em tecido intestinal de felinos com linfoma linfocítico de células T: negativo (esquerda) e positivo (direita) (aumentos de 40X) - São Paulo – 2016	113
Figura 25 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação dos felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T na comparação da sobrevida de acordo com a resposta terapêutica: remissão completa e parcial ($p<0,0001$) - São Paulo - 2016	116
Figura 26 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação dos felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T na comparação entre a imunoexpressão de CD8 (em porcentagem) de acordo com a resposta terapêutica: remissão completa e parcial ($p=0,015$) - São Paulo - 2016	117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema de estadiamento clínico adaptado ao linfoma gastrointestinal felino.....	26
Quadro 2 - Anticorpo, diluição usada, diluições a serem testadas, tampão utilizado e tecidos testados na primeira etapa de padronização - São Paulo – 2016.....	34
Quadro 3 - Anticorpo, diluição testada, diluição padronizada, tampão utilizado e tecidos testados na segunda etapa de padronização dos anticorpos - São Paulo – 2016	35
Quadro 4 - Caracterização dos animais, da neoplasia, da resposta ao tratamento e sobrevida dos 47 animais do grupo experimental - São Paulo – 2016.....	54
Quadro 5 - Caracterização dos animais, sobrevida e imunoexpressão de CD8 (grau* e %), IL-17A (grau**) e FOXP3 (%) dos 40 animais do grupo experimental - São Paulo - 2016.....	115

LISTA DE ABREVIATURA

FeLV – Vírus da Leucemia felina
FIV – Vírus da Imunodeficiência felina
WHO – World Health Organization
PCR – Reação em cadeia de polimerase
Tregs – Células T Regulatórias
NK – Natural killer
IL-2 – Interleucina 2
IL-2R – Receptor de interleucina 2
IL-17 – Interleucina 17
IL – interleucina
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
DAB – Diaminobenzidina
pH – potencial Hidrogeniônico
TSA - Tyramide Signal Amplification
PBS – Solução salina tamponada com fosfatos
TNB – Tris NaCl Blocking
NaCl – Cloreto de sódio
ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
RC – Remissão completa
RP – Remissão parcial
AR – Ausência de Resposta
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
M – Mitose
S – Síntese
G1 – Gap 1
G2 – Gap 2
FOXP3 – *Forkhead* box P3
HRP – Horseradish peroxidase
TGF-beta – Transforming growth factor beta
SRD – Sem raça definida
p – nível de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO: LINFOMA GASTROINTESTINAL FELINO E O SISTEMA IMUNOLÓGICO	24
2	PADRONIZAÇÃO DOS ANTICORPOS, ANTICORPOS SECUNDÁRIOS, TÉCNICAS IMUNOISTOQUÍMICAS, MÉTODOS DE ANÁLISE DAS MARCAÇÕES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO E GRUPO CONTROLE	34
3	AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOFENOTÍPICA E TERAPÊUTICA DE FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL	45
3.1	INTRODUÇÃO.....	47
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
3.4	RESULTADOS	52
3.5	DISCUSSÃO	63
3.6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
4	MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 E ÍNDICE MITÓTICO EM FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL	72
4.1	INTRODUÇÃO.....	74
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	76
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
4.4	RESULTADOS	78
4.5	DISCUSSÃO	81
4.6	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85
5	MARCADOR NUCLEAR DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS - FOXP3, EM FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL	89
5.1	INTRODUÇÃO.....	90
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	93
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
5.4	RESULTADOS	96
5.5	DISCUSSÃO	97
5.6	CONCLUSÃO	100

	REFERÊNCIAS	101
6	IMUNOEXPRESSÃO DE CD8, CD25 (IL-2R), IL-17A E FOXP3 EM FELINOS COM LINFOMA INTESTINAL LINFOCÍTICO DE CÉLULAS T	105
6.1	INTRODUÇÃO.....	107
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	110
6.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	114
6.4	RESULTADOS	114
6.5	DISCUSSÃO	117
6.6	CONCLUSÃO.....	121
	REFERÊNCIAS	122
	ANEXO	127
7	LIMITAÇÕES GERAIS	128
8	CONCLUSÕES GERAIS	129
	REFERÊNCIAS	130

INTRODUÇÃO:
LINFOMA GASTROINTESTINAL FELINO E O
SISTEMA IMUNOLÓGICO

1 INTRODUÇÃO: LINFOMA GASTROINTESTINAL FELINO E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

Linfomas, também conhecidos pelos sinônimos Linfossarcomas ou Linfomas malignos, representam um grupo de neoplasias que têm em comum a origem em células linforreticulares, manifestando-se geralmente em tecidos linfóides sólidos, a exemplo do baço, linfonodos e fígado, entretanto, podem ocorrer em quase todos os tecidos do organismo (VAIL, 2013), sendo uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas em felinos, respondendo por cerca de 30% de todas as neoplasias nessa espécie (ETTINGER, 2003).

Até os anos de 1980, a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) era a causa mais frequentemente relacionada com o desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas em gatos, sendo que 70% dos animais eram positivos ao FeLV (BARRS; BEATTY, 2012). As formas anatômicas mais comumente observadas eram a mediastinal e a multicêntrica, afetando principalmente felinos jovens (ETTINGER, 2003). Contudo, com o advento da vacina contra o FeLV, por volta de 1985, a incidência de linfomas relacionados com o vírus diminuiu drasticamente, representando, nos últimos anos, cerca de 10 a 25% dos casos (PINTO, 2010; VAIL, 2013). Atualmente, a forma anatômica mais frequente é a gastrointestinal, afetando principalmente gatos idosos, FeLV-negativos, com idade média em torno de 9 a 12 anos, não havendo franca predisposição sexual ou racial (STEIN et al., 2010; BARRS; BEATTY, 2012; MOORE et al., 2012).

Evidências também indicam que o vírus da imunodeficiência felina (FIV) pode aumentar a incidência de linfoma em gatos. Em contraste com o FeLV, que exerce papel direto na oncogênese por se tratar de um oncovírus (BARR et al., 1995), o FIV exerce um papel indireto, secundário à imunossupressão (VAIL, 2013).

Além das retrovíroses, os processos inflamatórios crônicos podem estar associados com a ocorrência de linfomas. Em humanos já se reconhece que infecções crônicas por *Helicobacter pylori* podem desencadear gastrite e câncer gástrico. Bridgeford et al. (2008) relataram a associação de infecção crônica por *H. Heilmannii* com gastrite crônica e linfoma em gatos.

Fatores dietéticos têm sido relacionados com a maior ocorrência de linfomas gastrointestinais e ainda, com relação às condições ambientais, estudos indicam

aumento significativo na probabilidade de desenvolvimento de linfomas e outras neoplasias em felinos expostos cronicamente à fumaça de cigarros (BERTONE et al., 2002). Outros fatores que podem estar relacionados com o desenvolvimento de linfoma em felinos são as alterações genéticas, como já descrito em gatos de raças orientais, indicando riscos hereditários (LOUWERENS et al., 2005; VAIL, 2013).

A classificação do linfoma felino pode ser feita com base em sua forma anatômica (nodal, extra-nodal, gastrointestinal e mediastinal), estadiamento clínico preconizado pela World Health Organization (WHO), análise histopatológica e em características imunofenóticas (VAIL; THAMM, 2005; HAYES, 2006).

O linfoma gastrointestinal, forma mais frequente, acomete animais idosos, com idade média de 10 a 12 anos, FeLV negativos e pode manifestar-se exclusivamente por infiltração intestinal ou por combinação de envolvimento intestinal, de linfonodos mesentéricos e do fígado. Não há uma franca predisposição sexual e, no que diz respeito às raças, alguns autores referem as orientais como mais suscetíveis (RISSETTO et al., 2011; BARRS; BEATTY, 2012). O local mais comum de acometimento no trato gastrintestinal é o intestino delgado (50 a 80% dos casos), seguido do estômago (cerca de 25%), junção íleo-ceco-cólica e cólon, podendo apresentar-se de forma única ou difuso, infiltrando as camadas do intestino e causando ou não obstrução da luz intestinal (ETTINGER, 2003; PINTO, 2010; VAIL, 2013).

Dentre as formas celulares do linfoma gastrointestinal, a mais comumente diagnosticada é a linfocítica ou de pequenas células, caracterizada por infiltração de pequenos linfócitos neoplásicos nas vilosidades intestinais. Menos frequentemente, os gatos podem ser acometidos pela forma linfoblástica, de células intermediárias ou de grandes células, em que há infiltração de linfoblastos nas vilosidades intestinais que geralmente evolui para submucosa e transmural, ou seja, por todas as camadas do intestino (LINGARD et al., 2009).

No que diz respeito à apresentação clínica, no linfoma gastrointestinal linfocítico, a evolução da doença é mais lenta e progressiva, ao longo de semanas a meses. Os gatos apresentam hiporexia ou anorexia, perda de peso, diarreia, vômitos e/ou letargia, podendo apresentar um ou mais desses sintomas (HAYES, 2006; RECHE et al., 2010; BARRS; BEATTY, 2012). Ao exame físico, cerca de 20% podem apresentar neoformação abdominal palpável, podendo esta relacionar-se ao

aumento de linfonodos mesentéricos e/ou comprometimento intestinal, contudo, alguns pacientes podem apresentar-se assintomáticos (GIEGER, 2011).

Na forma linfoblástica ou de grandes células do linfoma gastrointestinal, a evolução clínica tende a ser mais rápida, em dias a semanas, com notável perda de peso, anorexia, vômitos e/ou diarreia, sendo as alterações à palpação abdominal frequentemente constatadas, com presença de neoformação intestinal e linfonodomegalia mesentérica e, menos comumente, hepatomegalia por infiltração hepática (HAYES, 2006; BARRS; BEATTY, 2012). Ressalta-se que o linfoma gastrointestinal tem como diagnósticos diferenciais a doença intestinal inflamatória e intolerância alimentar, sendo necessários, ao menos, biópsia intestinal e exame histopatológico para confirmação do diagnóstico (VAIL, 2013).

O sistema de estadiamento clínico da WHO existente para gatos é o mesmo usado para cães, contudo, devido à alta incidência de envolvimento visceral na espécie, um outro sistema foi adaptado (tabela 1) e é mais frequentemente utilizado, apesar de seu baixo valor em prever a resposta terapêutica (VAIL, 2013).

Quadro 1 - Sistema de estadiamento clínico adaptado ao linfoma gastrointestinal felino

Estágio	Extensão do linfoma no organismo
1	- massa única gastrointestinal sem envolvimento de linfonodo regional
2	- massa primária gastrointestinal passível de ressecção com envolvimento do linfonodo regional; - massa primária em região íleo-ceco-cólica com ou sem envolvimento de linfonodo mesentérico
3	- duas ou mais áreas do trato gastrointestinal envolvida; - massa primária gastrointestinal não passível de ressecção
4	1, 2 ou 3 mais o envolvimento de fígado e/ou baço
5	1, 2 3 ou 4 mais o envolvimento inicial do sistema nervoso central e/ou da medula óssea

Fonte: (WITHROW, S. J.; VAIL, D. M., 2013)

Para o diagnóstico do linfoma gastrointestinal, além da anamnese, das manifestações clínicas e dos achados de exame físico, faz-se necessário a realização de exames complementares, tais como exames laboratoriais, de imagem, além de análise histopatológica e imunofenotipagem (VAIL, 2013).

Os exames laboratoriais podem revelar alterações inespecíficas no hemograma, como anemia (usualmente anemia não regenerativa da doença crônica), leucocitose por neutrofilia (secundária à inflamação ou por estresse), linfocitose ou linfopenia, enquanto alterações na atividade de enzimas hepáticas são vistas quando do envolvimento deste órgão (GIEGER, 2011). Hipoalbuminemia é observada em até 50% dos casos (FONDACARO et al., 1999). Testes sorológicos para FIV e FeLV são recomendados, contudo sabe-se que a incidência de retrovíroses nesta forma anatômica do linfoma é baixa (LOUWERENS et al., 2005).

Achados ultrassonográficos em felinos com a forma linfocítica da doença são indistinguíveis da doença intestinal inflamatória e consistem de espessamento da parede intestinal com ou sem preservação das camadas intestinais e/ou linfonodomegalia mesentérica (GIEGER, 2011; DANIAUX et al., 2014). Zwingenberger et al. (2010) avaliaram diferentes achados ultrassonográficos e constataram linfonodomegalia em metade dos casos e que o espessamento da camada muscular esteve presente em cerca de 50% dos casos de linfoma gastrointestinal linfocítico contra 4% dos casos de doença intestinal inflamatória, sendo este um importante parâmetro na diferenciação entre as duas doenças. Na forma linfoblástica, os achados incluíram espessamento intestinal transmural, perda da estratificação de camadas, diminuição da ecogenicidade da parede, hipomotilidade localizada, linfonodomegalia abdominal e/ou presença de neoformação intestinal (GIEGER, 2011).

A abordagem diagnóstica do linfoma gastrointestinal varia de acordo com as alterações ultrassonográficas. Quando da presença de neoformação intestinal ou considerável linfonodomegalia mesentérica pode-se utilizar de punção aspirativa por agulha fina guiada por ultrassom e análise citológica, contudo, a presença de inflamação e/ou linfonodos reativos pode impedir o diagnóstico conclusivo (BARRS; BEATTY, 2012). Assim, a biópsia intestinal e análise histopatológica são necessárias (GIEGER, 2011).

Histologicamente, o linfoma é caracterizado por infiltração de linfócitos neoplásicos com distribuição irregular nas vilosidades intestinais e, com a progressão, infiltração submucosa e transmural, não estando associado com edema de mucosa ou inflamação, tipicamente vista na doença intestinal inflamatória (FONDACARO et al., 1999; WALY et al., 2005; LINGARD et al., 2009). Linfoma intestinal epiteliotrópico é um subtipo do linfoma linfocítico e que caracteriza-se por

infiltração de células T malignas no epitélio da mucosa do trato intestinal (CARRERAS et al., 2003).

A análise imunofenotípica de linfócitos T e B pode contribuir na diferenciação de doença intestinal inflamatória do linfoma linfocítico, já que o linfoma é caracterizado por uma população monoclonal de linfócitos T ou B (BRISCOE et al., 2011; GIEGER, 2011), lembrando que os linfomas linfocíticos frequentemente consistem de células T, enquanto na forma linfoblástica predominam os de células B (LINGARD et al., 2009). Contudo, caso as análises histopatológica e imunofenotípica não sejam suficientes para determinar o diagnóstico de linfoma, é indicado o teste de clonalidade por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção da expansão clonal de linfócitos T ou B, já que uma população mista de células linfoides favorece o diagnóstico de doença intestinal inflamatória (MOORE et al., 2005).

Linfoma é uma doença sistêmica, assim, o tratamento mais indicado é a quimioterapia antineoplásica. No caso dos linfomas gastrointestinais, a escolha do protocolo de tratamento depende do tipo celular envolvido, sendo que para a forma linfoblástica são indicados protocolos com múltiplos agentes antineoplásicos, como o preconizado pela Universidade Wisconsin-Madison (VAIL, 2013), enquanto a forma linfocítica é tratada com o uso combinado de clorambucil e prednisolona (RECHE et al., 2010; STEIN et al., 2010). A resposta ao tratamento é bastante variável na espécie felina, entretanto sabe-se que a forma linfocítica apresenta melhor resposta e maior tempo de sobrevida se comparada à forma linfoblástica, sendo que a mediana de sobrevida referida em estudos está em torno de 24 e 6 meses, respectivamente (KISELOW et al., 2008; LINGARD et al., 2009; MOORE et al., 2012).

Na evolução do linfoma, assim como pode ocorrer em outros processos neoplásicos, o desequilíbrio no sistema imune é uma das principais alterações que pode facilitar a ocorrência e a disseminação da doença e, conseqüentemente, contribuir para o insucesso do tratamento quimioterápico. O sistema imune é constituído por uma rede complexa e articulada por inúmeros componentes integrados, como células e seus receptores, moléculas mediadoras de reações, vias bioquímicas, etc., que permitem ao organismo interagir com os diferentes estímulos antigênicos. Essa interação deve ser regulada de modo que as respostas não

atingam amplitudes patológicas e que o sistema não gere respostas auto-imunes (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Cabe aos linfócitos a atividade de combater as células do organismo infectadas por vírus oncogênicos (capazes de causar câncer) ou as células em transformação maligna, bem como de secretar substâncias (linfocinas), as quais regulam o crescimento e o amadurecimento de outras células e do próprio sistema imune. Acredita-se que mudanças na produção de diferentes subpopulações de linfócitos sejam causas de doenças, principalmente do câncer (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Dentre as populações de linfócitos, as células T regulatórias (Tregs) representam uma subpopulação que expressa as moléculas CD4+CD25+FOXP3+ e que são produzidas nos corpúsculos de Hassal ou timo, funcionalmente distintas e maduras, e representam aproximadamente 5 a 10% das CD4+ periféricas em indivíduos saudáveis (SAKAGUCHI, 2005). Sakaguchi et al. (2011) foram os primeiros a incitar o interesse nas Tregs após a identificação de uma população de células T CD4+ com elevada expressão de CD25 que impediam reações auto-imunes em um modelo murino. Nos anos seguintes, estudos elucidaram os principais aspectos da biologia celular das Tregs, caracterizando diferentes subpopulações de células T que apresentavam propriedades reguladoras, incluindo células Tregs CD4+CD25+FOXP3+ de ocorrência natural, células Tregs induzidas, bem como células Tregs CD4+CD25^{high}, presentes no sangue periférico pela conversão de Tregs CD4+CD25-. Essas diferentes subpopulações de células T com função regulatória coexistem e sua principal função é de suprimir as células T efetoras, bloqueando a ativação e a função dos linfócitos, sendo assim importantes no controle de respostas imunes contra antígenos (VIGOUROUX et al., 2004; SAKAGUCHI, 2005; BEYER; SCHULTZE, 2006; CRUVINEL et al., 2008), portanto, são alvo de pesquisas sobre sua função fisiológica e participação em diversas enfermidades, como doenças infecciosas, alérgicas, neoplásicas, imunomediadas e no campo da imunologia dos transplantes (CRUVINEL et al., 2008).

De acordo com Cruvinel et al. (2008), em humanos, as células T CD4+ apresentam diferentes intensidades de expressão do receptor CD25, sendo possível observar, dentro da população CD4+CD25+, uma população mais abundante expressando baixos níveis de CD25 e uma outra menos numerosa com elevada expressão desse receptor, sendo esta última população corresponde ao *pool* de

Tregs. CD25 representa, ainda, na fisiologia dessa célula, componente indispensável para sua geração e manutenção no organismo. Do ponto de vista molecular, Hori et al. (2003) demonstraram que o fator de transcrição nuclear FOXP3 é predominantemente expresso nas células Tregs tímicas e periféricas, sendo um gene de grande importância no desenvolvimento e na função das Tregs, tanto em modelos animais quanto em humanos.

O controle da produção de Tregs a partir de células T *naïve* é mediado por FOXP3 (SAKAGUCHI, 2005), que é membro da subfamília P das proteínas FOX e, assim, como os demais fatores de transcrição dessa família, é composto por três domínios (repressor, central e ligante de DNA ou *forkhead*) (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007). A partir de sua ação, as células T adquirem características que as tornam anérgicas e supressoras, além de produzir citocinas ligadas a essas atividades. Por suas características, FOXP3 tornou-se o melhor marcador proteico para identificação de Tregs (BANHAM et al., 2009).

Segundo Banham et al. (2009), FOXP3 apresenta mais de 90% de homologia em mamíferos, podendo ser identificado em várias espécies a partir de diferentes clones do anticorpo anti-FOXP3. Há evidências que as Tregs alteram a função efetora contra neoplasias, resultando em disfunção de células T em humanos (KARUBE et al., 2004; GÁRATE et al., 2009) e em cães com câncer (HORIUCHI et al., 2009). Biller et al. (2007) verificaram que o número de Tregs foi significativamente maior no sangue periférico de cães com neoplasia, sugerindo que as Tregs possam exercer efeitos inibitórios na resposta imune antitumoral (SCHRECK et al., 2009).

Em medicina humana, estudos sugerem que o aumento na atividade das Tregs associa-se à menor atividade antitumoral, havendo co-estimulação deficiente das células T CD4+ sobre as células CD8+, bem como alteração na citotoxicidade mediada por células natural killer (NK) contra antígenos tumorais (TAAMS et al., 2006; MELO; CARVALHO, 2009). Aumento do número de células Tregs CD4+CD25+FOXP3+ tem sido visto em pacientes humanos com câncer de pulmão, pâncreas, mama, fígado e pele, tanto no sangue periférico quanto na própria neoplasia (TAAMS et al., 2006). Um estudo em pacientes humanos com carcinoma ovariano demonstrou que a elevada presença de Tregs CD4+CD25+FOXP3 representa um mecanismo com o qual os tumores podem obter privilégio imunológico, estando inversamente relacionado com o tempo de sobrevida, sendo

assim, o bloqueio da migração ou da função das Tregs pode ajudar no controle do câncer (CURIEL et al., 2004).

Além de FOXP3, a análise da expressão do receptor interleucina 2 (IL-2) e/ou da IL-2 é um método indireto de determinar a presença de Tregs, já que é uma proteína expressa na superfície de linfócitos T, sendo um marcador indireto de CD25 (KE et al., 2008). O aumento da expressão deste receptor tem sido demonstrado em diversos neoplasias em humanos, incluindo cânceres do pulmão, pele, próstata e leucemias (KUNH et al., 2005; KASPRAZ et al., 2007), podendo estar associada a proliferação celular mais rápida e instabilidade cromossomal, que pode promover aumento da agressividade neoplásica, resistência à múltiplas drogas e mau prognóstico

Por outro lado, as células T CD3+CD8+ são um subtipo de linfócitos citotóxicos que expressam marcador CD8 na superfície, produzindo citocinas citotóxicas como a perforina e granzima B (MA; DONG, 2011), havendo evidências que indicam seu papel importante na supressão do crescimento tumoral, ou seja, defeitos na função e/ou supressão destas células poderiam contribuir com o crescimento tumoral (RAMANATHAN et al., 2008). Pesquisas realizadas em pacientes humanos com câncer demonstraram associação entre o alto grau de infiltração de Tregs nos tumores e a supressão da resposta de células CD8+ relacionando-se a um pior prognóstico (SATO et al., 2005; MA; DONG, 2011).

Por fim, sabe-se que as Tregs e as células Th17 diferenciam-se a partir de uma mesma progenitora T, assim, durante a inflamação, a liberação de IL-6 inibe a indução de FOXP3, impedindo a geração de Tregs e dirigindo a proliferação de T para Th17, invertendo a relação Treg/Th17 (BOUDREAUX et al., 2012), sendo esta linhagem Th17 completamente independente da Th1 e Th2 (AUJLA et al., 2007). Assim, os linfócitos Th17 têm demonstrado importante papel na patogênese de doenças inflamatórias e auto-imunes, incluindo a doença intestinal inflamatória (KITANI; XU, 2008), porém, no câncer, o impacto clínico das células Th17 permanece não definido, podendo a alta expressão de interleucina 17 (IL-17) contribuir na tumorigênese, progressão tumoral e levar a pior prognóstico (PUNT et al., 2015). O reconhecimento de Th17 é feito de forma indireta, por meio da detecção do receptor IL-17A, interleucina com alto potencial inflamatório. (WAITE; SKOKO, 2012).

Sendo assim, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a expressão de diferentes proteínas relacionada à atividade imunológica, tais como CD4, CD8, CD25 (IL-2R), FOXP3 e IL-17A em felinos com linfoma gastrointestinal e a sua relação com a resposta ao tratamento quimioterápico e ao tempo de sobrevida global do paciente. Os resultados do estudo foram organizados em capítulos, os quais serão apresentados a seguir.

Padronização dos anticorpos primários, anticorpos secundários, técnicas imunoistoquímicas, métodos de análise das marcações e grupo controle

2 PADRONIZAÇÃO DOS ANTICORPOS, ANTICORPOS SECUNDÁRIOS, TÉCNICAS IMUNOISTOQUÍMICAS, MÉTODOS DE ANÁLISE DAS MARCAÇÕES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO E GRUPO CONTROLE

Quando da confirmação do diagnóstico de linfoma gastrointestinal por meio de exame histopatológico de material colhido por biópsia, o animal foi selecionado e adentrou ao atendimento oncológico para acompanhamento clínico e instituição de tratamento quimioterápico. O mesmo material utilizado para o diagnóstico foi separado para as provas imunoistoquímicas realizadas no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os materiais emblocados em parafina foram seccionados em cortes de 5µm, apostos em lâminas silanizadas e, após a padronização dos anticorpos, foram submetidos às provas específicas de imunoistoquímica.

Para a padronização dos anticorpos, inicialmente, utilizou-se a diluição recomendada pelo fabricante para alguns anticorpos ou, em virtude de que parte dos anticorpos adquiridos não possuíam reação específica com a espécie felina, buscou-se em artigos científicos, diluições utilizadas por outros pesquisadores. Desta forma, estabeleceu-se a primeira etapa da padronização. Para o caso dos anticorpos IL-2R, CD4 e CD8, cuja expressão por imunoistoquímica em material parafinado na espécie felina não havia sido estudada, optou-se pela aquisição de dois tipos de anticorpos para testes. O quadro 2 representa a primeira etapa da padronização.

Quadro 2 - Anticorpo, diluição usada, diluições a serem testadas, tampão utilizado e tecidos testados na primeira etapa de padronização - São Paulo – 2016

(continua)

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição usada</i>	<i>Diluições a serem testadas</i>	<i>Tampão utilizado</i>	<i>Tecidos testados</i>
CD3	1:500; 1:1000	1:2000; 1:4000	Tris/EDTA 9,0	Linfonodo / linfoma
Pax5	1:100	1:200 / 1:500	Tris/EDTA 9,0	Linfonodo / linfoma
CD4 human	1:50	sem marcação	Citrato 6,0	-
CD4 nacional	1:20 e 1:50	sem marcação	EDTA 9,0	Linfonodo / linfoma

(conclusão)

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição usada</i>	<i>Diluições a serem testadas</i>	<i>Tampão utilizado</i>	<i>Tecidos testados</i>
CD4 <i>cat</i>	1:50	sem marcação	Citrato 6,0	-
IL-2R <i>cat</i>	1:50	1:100	Citrato 6,0	Linfonodo / linfoma
IL-2R <i>feline goat</i>	1:50	1:100	Citrato 6,0	Fígado, adrenal, tubule renal
CD8 <i>human</i>	1:50	Sem marcação	Tris/EDTA 8,0	-
CD8 <i>feline goat</i>	1:50	1:100 / 1:200	Citrato 6,0	Linfonodo
IL-17A <i>human</i>	1:100 / 1:200	1:400 / 1:800	Citrato 6,0	Fígado, adrenal, rim -tubulo, baço
FOXP3 (clone 236A/E7)	1:50	Sem marcação	Citrato 6,0	-

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Com base nestes primeiros resultados, detectou-se imunoexpressão dos seguintes anticorpos: CD3, Pax5, IL-2R *cat*, IL-2R *feline goat*, CD8 *feline goat* e IL-17 *human*. Não houve marcação, nas diluições utilizadas, para CD4 *cat*, CD4 *human*, CD4 nacional, CD8 *human* e FoxP3 clone 236A/E7.

Após esta primeira etapa, testou-se novamente os anticorpos para reavaliar a sua imunoexpressão tecidual em outras diluições e tampões. Os resultados estão expressos no quadro 3.

Quadro 3 - Anticorpo, diluição testada, diluição padronizada, tampão utilizado e tecidos testados na segunda etapa de padronização dos anticorpos - São Paulo – 2016

(continua)

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição testada</i>	<i>Diluição padronizada</i>	<i>Tampão utilizado</i>	<i>Tecidos testados</i>
CD3	1:2000; 1:4000	1:2000	Tris/EDTA 9,0	Linfonodo / linfoma
Pax5	1:200 e 1:500	1:500	Tris/EDTA 9,0	Linfonodo / linfoma
CD4 <i>human</i>	1:10 e 1:20	sem marcação	Citrato 6,0 e Tris/EDTA 9,0	-
CD4 nacional	1:100 e 1:500	sem marcação	Tris/EDTA 9,0	Linfonodo / linfoma
CD4 <i>cat</i>	1:10 e 1:20	sem marcação	Citrato 6,0 e Tris/EDTA 9,0	-

(conclusão)

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição testada</i>	<i>Diluição padronizada</i>	<i>Tampão utilizado</i>	<i>Tecidos testados</i>
IL-2R <i>cat</i>	1:100	1:50	Citrato 6,0	Linfonodo / linfoma
IL-2R <i>feline goat</i>	1:100	1:100	Citrato 6,0	Fígado, adrenal, tubule renal
CD8 <i>feline goat</i>	1:100 e 1:200	1:200	Citrato 6,0	Linfonodo
IL-17A <i>human</i>	1:400 / 1:800	1:400	Citrato 6,0	Fígado, adrenal, rim -tubulo, baço
FOXP3	1:10 e 1:20	sem marcação	Citrato 6,0 e EDTA 9,0	-

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

No que diz respeito ao anticorpo FOXP3, após constatar-se a ausência de expressão deste clone de anticorpo, buscou-se a substituição por um outro. O clone substituto (157B/F4) havia sido testado e padronizado na espécie felina para material parafinado, sendo que o material foi cedido pela Profa. Dra. Alison Banham, da University of Oxford/UK e padronizado na diluição de 1:2.

Entretanto, no momento do processamento do tecido intestinal dos animais do grupo experimental, verificou-se mudanças na expressão de determinados anticorpos, dificultando a análise. Foram eles: IL-2R *feline goat*, IL-17A *human*, CD4 nacional e importado, e CD8 *feline goat*. Optou-se então, por testá-los pela técnica de imunofluorescência pelo sistema TSA (Tyramide Signal Amplification) que, segundo o fabricante, amplifica o sinal de marcação. A diluição estabelecida para estes anticorpos foram: CD8 *feline goat* 1:200, IL-2R *feline goat* 1:200 e IL-17A *human* 1:300. Infelizmente, mesmo com este kit amplificador de sinal, não foram obtidas marcações para os três diferentes anticorpos anti-CD4 adquiridos para este estudo, sendo que dois eram específicos para a espécie felina.

Desta forma, os anticorpos foram utilizados obedecendo à seguinte padronização:

IMUNOFENOTIPAGEM:

expressão de CD3 (figura 1): por meio do anticorpo policlonal de coelho anti-CD3 (1:2.000; DAKO; Carpinteria, CA, USA);

expressão de Pax5 (Figura 2): por meio do anticorpo monoclonal de camundongo anti-Pax5 (1:500; clone 24; Invitrogen, Life Technologies, New York, USA);

MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR:

expressão de KI-67 (Figura 3): anticorpo monoclonal de camundongo anti-KI67 (1:200; clone MIB-1; DAKO, Carpinteria, CA, USA);

MARCADORES IMUNOLÓGICOS:

expressão de CD4: não se obteve marcação;

expressão de FOXP3 (Figura 4): caracterização de atividade Treg (1:2; clone 157B/F4 – anticorpo produzido e cedido gentilmente pela Profa. Dra. Alison Banham – University of Oxford / UK);

expressão de CD8 (figura 5): anticorpo policlonal de cabra anti-CD8-alpha felino (1:200; R&D Systems, Minneapolis, USA);

expressão de CD25 (figura 6): anticorpo policlonal de cabra anti - IL-2R felino (1:200; R&D Systems, Minneapolis, USA);

expressão de IL-17 A (figura 7): anticorpo monoclonal de camundongo anti-human IL-17A humano (1:300; AbD Serotec, Raleigh, NC, USA).

ANTICORPOS SECUNDÁRIOS:

A técnica do polímero, realizada por meio do uso do SuperPicTure™ HRP Polymer Detection Kit (Invitrogen, Life Technologies, New York, USA) foi utilizada para detecção de anticorpos primários produzidos em camundongos, coelhos e ratos e, neste estudo, tal técnica foi utilizada para os anticorpos anti-CD3, anti-PAX5 e anti-Ki-67.

A técnica biotina / streptavidina HRP foi realizada por meio da utilização dos anticorpos biotinylated link universal (DAKO Corporation, CA, USA) e HRP Streptavidina (NEL750 1:100, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) nos anticorpos primários anti-CD8, anti-IL-2 e anti-IL17A por imunofluorescência.

A técnica DAKO Envision, realizada por meio do kit ADVANCE™ DAKO Envision HRP detection system, foi utilizada na detecção do anticorpo primário anti-

FOXP3, como recomendado pela Profa. Dra. Alison Banham, que produziu este anticorpo.

DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS DE IMUNOISTOQUÍMICA

1- Imunoistoquímica convencional utilizada durante a execução das provas laboratoriais específicas para os anticorpos CD3, PAX5, Ki-67 e FOXP3:

Iniciou-se a reação com a desparafinização e hidratação das amostras cortadas em lâminas de microscopia previamente silanizadas com o uso de xilol e álcool (xilol I por 30 minutos – xilol II por 30 minutos – xilol + álcool por 30 minutos – álcool 100% I por 5 minutos – álcool 100% II por 5 minutos – álcool 95% por 5 minutos - álcool 70% por 5 minutos, respectivamente). Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente (5 minutos) e água destilada (5 minutos) e realizou-se a recuperação antigênica (desmascaramento) em panela de pressão científica Pascal com o uso de tampão específico (Tris-EDTA pH 9,0 ou Citrato pH 6,0) para cada tipo de anticorpo. Repetiu-se o procedimento de lavagens e, então, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena por meio de peróxido de hidrogênio a 6% por 30 minutos, protegido da luz. Procedeu-se novamente com as lavagens em água corrente e destilada acrescidas de três lavagens em PBS (solução salina tamponada com fosfato) por 5 minutos e, então, aplicou-se o anticorpo primário diluído nos títulos adequados, por sobre o material por 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida e escura. Após o *overnight*, realizou-se a lavagem das lâminas com PBS por 3 ciclos e aplicou-se o anticorpo secundário (polímero Super Picture (CD3, Pax5 e Ki-67) ou biotina – estreptavidina (IL-2R feline goat e CD8 feline goat) ou DAKO EnVision HRP (FOXP3), na dependência da espécie animal na qual foi produzido o anticorpo) e incubou-se em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Então, realizou-se novamente as três lavagens das lâminas com solução PBS por 5 minutos e procedeu-se com a aplicação do substrato 3,3' diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos, protegido da luz, a 37°C, sendo realizada novamente a lavagem das lâminas em água corrente (5 minutos) e água destilada (5 minutos). Após esta etapa, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 1 minuto, lavadas novamente e posteriormente as amostras foram desidratadas e diafanizadas

(método reverso álcool – xilol) para a montagem das lâminas com lamínulas coladas por Permout.

2- Imunofluorescência - utilizada para os anticorpos IL-2R feline goat, CD4 nacional e importado, CD8 feline goat e IL-17A human, para amplificação do sinal através do uso do kit TSA (Tyramide Signal Amplification):

Iniciou-se a reação com a desparafinização e hidratação das amostras cortadas em lâminas de microscopia previamente silanizadas com o uso de xilol e álcool (xilol I por 30 minutos – xilol II por 30 minutos – xilol + álcool por 30 minutos – álcool 100% I por 5 minutos – álcool 100% II por 5 minutos – álcool 95% por 5 minutos - álcool 70% por 5 minutos, respectivamente). Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente (5 minutos) e água destilada (5 minutos) e realizou-se a recuperação antigênica (desmascaramento) em panela de pressão científica Pascal com o uso de tampão específico (Tris-EDTA pH 9,0) durante 15 minutos. Repetiu-se o procedimento de lavagens e, então, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena por meio do uso de peróxido de hidrogênio a 6% por 30 minutos, protegido da luz. Procedeu-se novamente com as lavagens em água corrente e destilada acrescidas de três lavagens em PBS (solução salina tamponada com fosfatos) por 5 minutos. Então, fez-se o bloqueio de reações inespecíficas com TNB (Tris NaCl Blocking) durante 20 minutos em câmara úmida e em temperatura ambiente. Após essa etapa, aplicou-se o anticorpo primário diluído em TNB (na diluição adequada), por 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida e escura. Após o *overnight*, realizou-se a lavagem das lâminas com PBS por três ciclos e aplicou-se o anticorpo secundário biotilado diluído em TNB e incubou-se em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após esta etapa, procedeu-se com três lavagens das lâminas com solução PBS por 5 minutos e incubou-se com o complexo estreptavidina-peroxidase diluída em TNB, durante mais 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Em seguida, foram realizadas novamente três lavagens das lâminas em PBS por 5 minutos cada. A partir deste momento, as etapas foram realizadas em ambiente de baixa luminosidade. Incubou-se com tiramida diluída (1:100) no tampão de amplificação que acompanha o kit TSA, durante 10 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, e procedeu-se com três lavagens das lâminas em PBS por 5 minutos cada. Na sequência, incubou-se com iodeto de propídeo, diluído em PBS

(1ul + 1000ul de PBS) durante 10 minutos, sendo realizadas novamente três lavagens das lâminas em PBS por 5 minutos cada. Por fim, realizou-se a montagem das lâminas com 20ul de Vectashield, aguardou-se a secagem, sendo as lâminas vedadas com esmalte e observadas em microscópio de fluorescência. As lâminas foram analisadas o mais rapidamente possível, sendo armazenadas no escuro e na geladeira.

Os resultados da padronização dos anticorpos podem ser visualizados nas figuras de 1 a 7 a seguir:

Figura 1 - Imunoexpressão de CD3 em tecido linfóide em aumento de 20X (A) e 40X (B) - São Paulo – 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 2 - Imunoexpressão de Pax5 em tecido linfóide em aumento de 20X (A) e 40X (B) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 3 - Imunoexpressão de Ki-67 em tecido linfóide em aumento de 40X (A e B) - São Paulo - 2016

A

B

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 4 - Imunoexpressão de FOXP3 em tecido linfóide felino em aumentos de 40X (A e B) - São Paulo - 2016

A

B

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 5 - Imunoexpressão de CD8 em tecido linfóide em aumento de 20X (A) e 40X (B) pela técnica de imunofluorescência com TSA - São Paulo - 2016

A

B

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 6 - Imunoexpressão de IL-2R em tecido linfóide em aumento de 20X (A) e 40X (B) pela técnica de imunofluorescência com TSA - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 7 - Imunoexpressão de IL17A em aumento de 20X (A) e 40X (B) pela técnica de imunofluorescência com TSA - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

MÉTODOS PARA ANÁLISE DAS MARCAÇÕES

As análises das marcações variaram de acordo com o padrão de marcação expresso no tecido. Para todos os animais do grupo experimental foram consideradas somente as marcações em tecido intestinal.

1- PAX5, CD3 e CD8:

Para imunofenotipagem

Análise subjetiva da expressão destes marcadores no tecido como um todo expresso da seguinte forma:

0= 0%

1= <10%

2= 10 a 50%

3= > 51%

2- IL-2R e IL-17A:

Análise subjetiva da intensidade de expressão destes marcadores no tecido intestinal e expressa da seguinte forma:

Intensidade

0 = sem marcação

1 = fracamente positiva

2 = moderadamente positiva

3 = fortemente positiva

3- FOXP3 e KI-67

As lâminas estão sendo fotografadas em microscópio em um aumento de 40 vezes e as células serão contadas num total de 1.000 e, então, será determinada a porcentagem de marcação.

Para os casos em que a marcação foi analisada de forma subjetiva, seja pela porcentagem de células marcadas ou pela intensidade da marcação, as análises foram realizadas por duas pessoas previamente treinadas e os resultados confrontados. Quando da divergência destes, as lâminas foram submetidas à análise de um terceiro avaliador (patologista).

GRUPO CONTROLE

Foram avaliadas amostras de segmentos intestinais de 5 gatos que vieram a óbito por causas não associadas a neoplasias ou doenças intestinais e cujos intestinos foram considerados normais macro e microscopicamente. Não se observou marcação em células linfoides presentes no tecido intestinal para os anticorpos anti- IL-17, CD8, FOXP3 e KI-67, havendo apenas marcação em região de vilosidades intestinais e que foram desconsideradas durante a análise dos materiais do grupo experimental.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOFENOTÍPICA E TERAPÊUTICA DE FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL

3 AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOFENOTÍPICA E TERAPÊUTICA DE FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL

RESUMO

Linfoma gastrointestinal representa uma das neoplasias mais comuns em gatos domésticos. O objetivo deste estudo foi avaliar as características, evolução clínica, terapêutica e sobrevida de 47 gatos com linfoma gastrointestinal sob tratamento. Para análise estatística foram utilizados os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Qui-quadrado de Pearson, de correlação de Spearman e a curva Kaplan-Meier. No grupo analisado, não foram detectadas predisposição sexual ou racial e a neoplasia afetou principalmente gatos idosos (mediana de 12 anos). Por meio de análise histológica e imunofenotípica, constatou-se que o linfoma linfocítico de células T foi o mais prevalente, em 85% dos casos; linfoma linfoblástico de células B em 10,7%; e linfoma linfoblástico de células T em 4,3%. Diferença significativa ($p < 0,0001$) com relação ao tipo e ao tamanho celular foi observada, isto é, tenderam a ser linfoblásticos os de células B e linfocíticos os de células T. No que tange à localização no trato gastrointestinal, por meio de exame ultrassonográfico, constatou-se o envolvimento do intestino delgado em 85% dos casos, seguido pela junção-íleo-ceco cólica e cólon em 12,8% e estômago em 2,2% dos animais. Também foi observado que os linfomas de células B estão relacionados com infiltrado trans-mural, em 100% dos casos, enquanto que os de células T em 31% ($p = 0,003$). Para o tratamento foram utilizados dois protocolos terapêuticos diferentes e o protocolo A (L-asparaginase, clorambucil e prednisolona) relacionou-se à remissão completa em 85,7%, enquanto que o protocolo B (clorambucil e prednisolona acrescido ou não de sulfato de vincristina) em apenas 31,5% dos casos tratados. Na análise de sobrevida relacionada ao tipo celular e imunofenótipo, mesmo a mediana de sobrevida tendo sido bastante diferente entre os grupos (5 e 24 meses para B e T, respectivamente), não houve diferença significativa, enquanto que a menor variação do peso ($p = 0,013$), ou seja, a perda de peso ou o pouco ganho de peso nos 30 dias iniciais de tratamento, o uso do protocolo terapêutico B ($p = 0,004$) e concentração de albumina sérica menor que 2,5g/dL ($p = 0,032$)

relacionaram-se à menor tempo de sobrevida. Em conclusão, o linfoma linfocítico de células T foi o mais prevalente entre os gastrointestinais dos gatos, envolveu principalmente o intestino delgado e com a mediana de tempo de sobrevida global de 24 meses. Quanto à análise de sobrevida, o tratamento A, concentrações normais de albumina sérica e o ganho de peso foram preditores de maior tempo de sobrevida.

ABSTRACT

Gastrointestinal lymphoma comprises one of the most common malignancies in domestic cats and the clinical outcome may interfere with overall survival. The goal of this study was to evaluate the clinical outcome, response to treatment and survival of 47 cats with gastrointestinal lymphoma undergoing chemotherapy. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, Pearson's chi-squared test, Spearman correlation and Kaplan-Meier curve. There was no sexual or racial predisposition, while affected mainly elderly cats (median 12 years). By histological and immunophenotyping analysis it was found that lymphocytic T-cell lymphoma as the most prevalent in 85% of cases; lymphoblastic B-cell lymphoma in 10.7%; and lymphoblastic T-cell lymphoma in 4.3%. A significant difference ($p < 0.0001$) about cell-type and cell-size was seen, i.e., lymphoblastic tend to be B-cell whereas lymphocytic T-cell type. As for the location in the gastrointestinal tract by ultrasound examination, it can be seen as the primary location of the small intestine in 85% of cases, followed by the ileum-cecum-colic junction and colon in 12.8% and stomach in 2.2%, and can also be seen that B-cell lymphomas are related to transmural infiltrate in 100% of cases whereas in 31% T-cell, $p=0.003$. Two different therapeutic protocols were choose for treatment and the protocol A (L-asparaginase, chlorambucil and prednisolone) was related with complete remission in 85.7%, while the protocol B (chlorambucil and prednisolone with or without vincristine sulfate) in only 31.5% of cases. Survival analysis was made comparing the immunophenotype and histological cell-type and even the median survival being very different between the groups (5 and 24 months for B and T, respectively) due to the small number of cases with B-cell lymphoma, there was no significant difference. In survival analysis,

a smaller variation in weight ($p = 0.013$), ie, weight loss or lower weight gain in the first 30 days of treatment, cats treated with protocol B ($p = 0.004$) and albumin concentration less than 2.5g/dL ($p = 0.032$) were related with lower survival time. In conclusion, lymphocytic T-cell lymphoma was the most prevalent gastrointestinal lymphoma in cats, involving specially the small intestine and with a median survival time of 24 months. Regarding survival analysis, treatment A, normal concentrations of serum albumin and weight gain were predictors of longer survival.

3.1 INTRODUÇÃO

O linfoma gastrointestinal é a principal forma anatômica de linfoma na espécie felina, representando cerca de 50% dos casos (BARRS; BEATTY, 2012). Acomete principalmente animais idosos, com idade média de 10 a 12 anos e negativos para retrovírus (VAIL, 2013). Pode manifestar-se exclusivamente por infiltração intestinal ou por combinação de envolvimento intestinal, de linfonodos mesentéricos e do fígado, sendo o intestino delgado o local mais comum de acometimento do trato gastrintestinal (50 a 80% dos casos), seguido do estômago (cerca de 25%), junção íleo-ceco-cólica e cólon, podendo ainda apresentar-se de forma única ou difuso, infiltrando as camadas do intestino e causando ou não obstrução parcial ou total da luz intestinal (BARRS; BEATTY, 2012; VAIL, 2013). A forma celular linfocítica ou de pequenas células é a mais comumente diagnosticada, representando 80% dos casos, enquanto a forma linfoblástica ou de grandes células corresponde aos restantes 20% (MOORE et al., 2012).

No que tange às manifestações clínicas e os achados de exame físico, os gatos com a forma linfocítica ou de pequenas células apresentam evolução mais lenta e sintomas mais brandos, evoluindo ao longo de semanas a meses, com apenas 20% apresentando alteração à palpação abdominal, como linfonodomegalia mesentérica e/ou presença de massa intestinal, enquanto na forma linfoblástica, a evolução clínica é mais rápida, variando de dias a poucas semanas, com presença de neoformação intestinal palpável em até 100% dos casos (KISELOW et al., 2008; GIEGER, 2011; BARRS; BEATTY, 2012). Os sintomas mais comumente observados são perda de peso, anorexia, diarreia e/ou vômitos, mas hematoquezia e tenesmo

podem estar presentes nos casos de envolvimento do cólon (VAIL; THAMM, 2005; HAYES, 2006). Vale lembrar que alguns pacientes com a forma linfocítica podem apresentar-se assintomáticos (GIEGER, 2011).

Para o diagnóstico preciso faz-se necessário a utilização de biópsia intestinal, seguida de exame histopatológico e análise imunoistoquímica, já que a forma linfocítica de células T predomina em mais de 80% dos casos e precisa ser diferenciada da doença intestinal inflamatória e intolerância alimentar (HAYES, 2006; MOORE et al., 2012; BARRS; BEATTY, 2012; BARRIGA, 2013). Na análise histopatológica, o linfoma é caracterizado por infiltração de linfócitos neoplásicos que apresentam distribuição irregular nas vilosidades intestinais e, com a progressão, infiltração na submucosa e transmural, não estando associado à edema de mucosa ou inflamação vista na doença inflamatória intestinal (WALY et al., 2005; LINGARD et al., 2009). A análise do imunofenótipo é fundamental para determinar qual a linhagem celular, já que o linfoma é caracterizado por uma população monoclonal de linfócitos T ou B (BRISCOE et al., 2011; GIEGER, 2011). Para alguns casos, quando estes exames não são suficientes para estabelecer o diagnóstico, indica-se a realização de teste de clonalidade por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) para avaliar a expansão clonal de linfócitos T ou B (MOORE et al., 2005).

Para o tratamento, dentre as modalidades terapêuticas, a mais indicada é a quimioterapia antineoplásica, e o protocolo a ser utilizado depende da forma celular envolvida, sendo que na forma linfoblástica indica-se protocolos com múltiplos agentes antineoplásicos como o preconizado pela Universidade de Winconsin-Madison (VAIL, 2013), enquanto para a forma linfocítica utiliza-se do uso combinado de l-asparaginase, clorambucil e prednisolona (RECHE et al., 2010; STEIN et al., 2010). A resposta individual dos gatos ao tratamento e a duração da remissão dependem de determinados fatores, contudo estudos apontam que gatos com a forma linfocítica de células T apresentam maior tempo de sobrevida e melhor resposta terapêutica se comparados àqueles pacientes com a forma linfoblástica, seja de células B ou T (RECHE et al., 2010; STEIN et al., 2010;; MOORE et al., 2012).

Em um estudo recente, Moore et al. (2012) descreveram que 70% dos animais com linfoma gastrointestinal apresentavam a forma linfocítica de células T (84/120) com mediana de sobrevida de 29 meses, enquanto os gatos com a forma linfoblástica transmural de células T (17/120) tiveram uma mediana de sobrevida de

apenas 1,5 meses e os animais com a forma linfoblástica tras mural de células B (19/120) apresentaram mediana de sobrevida de 3,5 meses, ou seja, dentre as formas celulares do linfoma gastrointestinal, a de melhor prognóstico foi a linfocítica de células T. Por sua vez, Kiselow et al. (2008) observaram que 94% dos gatos com linfoma intestinal linfocítico atingiram remissão, sendo que 55% com remissão completa e 39% com remissão parcial e mediana de sobrevida global de 23 meses, enquanto Stein et al. (2010) mostraram resultados ainda mais expressivos, com 100% de taxa de resposta e mediana de primeira remissão de 26 meses.

Como nem sempre os dados de literatura estrangeira são aplicáveis à realidade da casuística oncológica brasileira e devido à escassez de dados de linfoma felino no Brasil, foram objetivos deste estudo avaliar as manifestações clínicas, a resposta terapêutica e sobrevida correlacionando-as com a forma celular do linfoma e a imunofenotipagem de felinos com linfoma gastrointestinal.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/VCM-FMVZ-USP) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da referida Instituição. O projeto também recebeu a doação de material de uma clínica particular especializada no atendimento de felinos (Vetmasters – São Paulo/SP).

Foram estudadas as amostras provenientes de 50 animais da espécie felina com linfoma gastrointestinal, não havendo restrições sexuais, etárias ou raciais. Foram excluídos do grupo experimental três animais que apresentavam infecção pelo vírus da leucemia felina e que vieram a óbito pela doença infecciosa e, desta forma, não poderiam ser avaliados quanto à resposta terapêutica e ao tempo de sobrevida.

Os animais atendidos foram submetidos a exame clínico e material biológico foi colhido para as análises laboratoriais de rotina (hemograma, avaliação

laboratorial de fígado e rins), incluindo os testes sorológicos para FIV/FeLV, por meio do kit comercial ELISA (Snap® FIV/FeLV Combo Test IDEXX).

A confirmação do diagnóstico de linfoma gastrointestinal foi realizada por meio de exame histopatológico de material colhido por biópsia, sendo que o mesmo material foi utilizado para as análises imunoistoquímicas referentes ao estudo. As análises foram realizadas no Serviço de Patologia Animal (HOVET/VPT-FMVZ/USP). Para tal avaliação utilizaram-se anticorpos monoclonal mouse anti-PAX5 (1:500; Clone 24; Invitrogen, Life Technologies, New York, USA) e policlonal rabbit anti-CD3 (1:2.000; DAKO; Carpinteria, CA, USA). Após o procedimento de desparafinização e do desmascaramento, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena e, então, incubaram-se os anticorpos por 30 minutos a 37°C, seguido de *overnight*. Na sequência, utilizou-se anticorpo secundário acoplado a um polímero (SuperPicTure™ HRP Polymer Detection Kit; Invitrogen, Life Technologies, New York, USA), sendo feita a revelação por meio do uso de diaminobenzidina, seguido de coloração com hematoxilina, desidratação e montagem das lâminas. A análise foi realizada em microscópio num aumento de 40 vezes.

Para o tratamento dos animais, dois tipos de protocolo foram utilizados:

A – associação de L-Asparaginase (10.000UI/m², SC, duas aplicações com intervalo de 15 dias), clorambucil (2mg/gato, 2 a 3 vezes por semana) e prednisolona (40mg/m², SID, 7 dias; então, em dias alternados);

B - Clorambucil (2mg/gato, 2 a 3 vezes por semana) e prednisolona (40mg/m², SID, 7 dias; então, em dias alternados) associado ou não ao sulfato de vincristina (0,5mg/m² a cada 7 a 14 dias), por via intravenosa.

Avaliação da resposta ao tratamento:

A avaliação da resposta ao tratamento antineoplásico foi realizada mensalmente por meio de histórico clínico, exame físico, exames laboratoriais (hemograma, perfil renal e hepático) e ultrassonografia abdominal para determinar o estado de remissão da neoplasia (se completa, parcial ou ausência de resposta) durante os seis primeiros meses. Após esse período, o tempo de reavaliação aumentava para cada dois meses, sendo realizados os mesmos procedimentos.

O padrão utilizado para avaliar a resposta ao tratamento incluía a melhora dos sintomas (normorexia, ganho de peso e/ou ausência de vômitos e diarreia),

exames laboratoriais para acompanhar possíveis efeitos inerentes ao tratamento antineoplásico como supressão medular (leucopenias, anemia e/ou trombocitopenia) e os perfis renal e hepático (para aqueles pacientes com hipoalbuminemia ao diagnóstico, avaliava-se se havia normalização dos níveis séricos) e ultrassonografia abdominal para avaliar o estado de remissão da doença, por meio da mensuração da espessura das camadas intestinais, se havia perda ou não da estratificação destas e se os linfonodos mesentéricos estavam ou não dentro do considerado normal para a espécie.

Assim, estabeleceu-se os seguintes parâmetros na avaliação (KISELOW et al., 2008; VAIL et al., 2009):

→ remissão completa: 100% de resolução dos sintomas clínicos por mais de 30 dias e normalização da avaliação dos intestinos e linfonodos mesentéricos pela ultrassonografia abdominal;

→ remissão parcial: melhora de mais de 50% dos sintomas clínicos e ultrassonográfica de intestinos e linfonodos mesentéricos por mais de 30 dias;

→ ausência de resposta: não melhora ou melhora de menos de 50% dos sintomas clínicos e não melhora ou progressão da doença avaliada por meio ultrassonográfico.

Os animais que haviam recebido tratamento prévio com glicocorticoides foram comparados aos que não haviam recebido tratamento, tanto com relação à resposta terapêutica quanto ao tempo de sobrevida.

Para análise do tempo de sobrevida dos gatos, considerou-se o período compreendido entre o momento do diagnóstico até o óbito do animal.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos e semi-contínuos das variáveis foram determinados como não paramétricos pelo teste Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de Shapiro-Wilks e por isso puderam ser representados por mediana e percentis 25 e 75.

Para a comparação de dois grupos independentes foi utilizado o Teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni e, quando comparados três ou mais

grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com a correção de Bonferroni e o teste de contraste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Os dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e relativa (%), sendo que as matrizes de contingências foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. As matrizes complexas (2x3, 3x4, ...) foram particionadas em matrizes simples (2x2) para melhor determinação da causalidade.

Na análise da sobrevivência destes pacientes utilizou-se da curva de Kaplan-Meyer enquanto que, para avaliar se havia correlação entre as variáveis estudadas, fez-se uso do teste de correlação não paramétrico de Spearman.

Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5%.

3.4 RESULTADOS

Dos 47 animais do grupo estudado (quadro 4), 61,7% eram machos (29/47), sendo 87,2% (41/47) felinos sem definição racial (SRD), com mediana de idade de 12 anos (variando de 7 a 16 anos). No que diz respeito ao padrão de remissão da doença, 64% (30/47) dos animais apresentaram remissão completa, 26% (12/47) remissão parcial e 11% (5/47) ausência de resposta ao tratamento. A mediana de sobrevida do grupo foi de 24 meses.

Na análise histopatológica e imunofenotípica (figuras 8 a 10) constatou-se linfoma linfocítico de células T como o mais prevalente, presente em 85% dos casos (40/47), linfoma linfoblástico de células T em 4,3% dos casos (2/47) e linfoma linfoblástico de células B em 10,7% dos casos (5/47). Quanto à localização no trato digestório, pode-se constatar como principal local de acometimento o intestino delgado em 85% dos casos (40/47), seguido da junção íleo-ceco-cólica e cólon em 12,8% (6/47) e estômago em 2,2% (1/47). Quando considerou-se somente os animais com linfoma de células T, a mediana do tempo de sobrevida do grupo manteve-se em 24 meses, enquanto que para os felinos com linfoma de células B foi de 5 meses.

Figura 8 - Análise histopatológica de amostras de biópsia de tecido intestinal de felinos com linfoma gastrointestinal (A e B). Nota-se nas figuras a infiltração de linfoblastos com a presença de diversas figuras de mitose típicas e atípicas (aumentos de 40X) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 9 - Marcação de CD3 em tecido intestinal em aumentos de 20X (A) e 40X (B) pela técnica convencional de imunoistoquímica - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 10 - Marcação de Pax5 em tecido intestinal em aumentos de 20X (A) e 40X (B) pela técnica convencional de imunoistoquímica - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Dentre os tratamentos estabelecidos, 60% dos animais (28/47) foram tratados com o protocolo A, sendo que 85,7% (24/28) apresentaram remissão completa da doença, 3,5% (1/28) remissão parcial e 10,7% (3/28) ausência de resposta, enquanto que dos restantes 40% (19/47) tratados com o protocolo B, 52,6% (10/19) apresentaram remissão parcial da doença, 31,5% (6/19) remissão completa e 15,9% (3/19) ausência de resposta. Dos cinco animais com linfoma de células B, três foram tratados com o protocolo B, uma vez que frequentemente faz-se necessário associar o sulfato de vincristina no protocolo de tratamento, já que uma resposta terapêutica durável ocorre para uma minoria dos casos. Já os linfomas linfocíticos de células T foram tratados com o protocolo A em 60% (24/40) dos casos e o protocolo B nos restantes 40%, tendo uma taxa de remissão completa em 67% dos casos (28/42), remissão parcial em 26% (11/42) e ausência de resposta em 7% restantes (3/42).

Quadro 4 - Caracterização dos animais, da neoplasia, da resposta ao tratamento e sobrevivência dos 47 animais do grupo experimental - São Paulo – 2016

(continua)

<i>Animal</i>	<i>Raça</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Imunof enótipo</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Sobrevida (meses)</i>	<i>Padrão de Remissão</i>
1	SRD	Macho	8 anos	T	linfocítico	27	parcial
2	SRD	Macho	10 anos	T	linfocítico	24	completa
3	SRD	Fêmea	11 anos	B	linfoblástico	5	ausência
4	SRD	Macho	9 anos	T	linfocítico	27	completa
5	SRD	Fêmea	13 anos	T	linfocítico	37	completa
6	SRD	Macho	13 anos	T	linfocítico	27	completa
7	SRD	Fêmea	12 anos	T	linfocítico	10	parcial
8	SRD	Macho	15 anos	T	linfocítico	30	completa
9	SRD	Macho	12 anos	T	linfocítico	60	completa
10	SRD	Macho	13 anos	T	linfocítico	7	parcial
11	SRD	Macho	12 anos	T	linfocítico	50	completa
12	SRD	Macho	10 anos	T	linfocítico	20	parcial
13	SRD	Macho	13 anos	T	linfocítico	22	completa
14	SRD	Fêmea	16 anos	T	linfoblástico	1	ausência
15	SRD	Fêmea	11 anos	T	linfocítico	26	completa
16	SRD	Macho	8 anos	B	linfoblástico	29	completa
17	Siamês	Macho	9 anos	T	linfocítico	23	completa
18	SRD	Macho	12 anos	T	linfocítico	29	completa
19	SRD	Macho	12 anos	T	linfocítico	2	parcial
20	Siamês	Macho	13 anos	T	linfoblástico	5	completa
21	SRD	Macho	10 anos	T	linfocítico	4	parcial
22	SRD	Macho	9 anos	B	linfoblástico	< 1	ausência
23	SRD	Macho	12 anos	B	linfoblástico	4	ausência
24	SRD	Fêmea	7 anos	T	linfocítico	60	completa
25	SRD	Fêmea	10 anos	B	linfoblástico	30	completa
26	SRD	Fêmea	15 anos	T	linfocítico	7	parcial

(conclusão)

<i>Animal</i>	<i>Raça</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Imunofenótipo</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Sobrevivida (meses)</i>	<i>Padrão de Remissão</i>
27	SRD	Fêmea	10 anos	T	linfocítico	5	parcial
28	SRD	Macho	12 anos	T	linfocítico	15	completa
29	SRD	Macho	15 anos	T	linfocítico	19	completa
30	SRD	Fêmea	12 anos	T	linfocítico	25	completa
31	SRD	Macho	12 anos	T	linfocítico	22	parcial
32	SRD	Macho	10 anos	T	linfocítico	48	completa
33	SRD	Macho	11 anos	T	linfocítico	22	completa
34	SRD	Macho	10 anos	T	linfocítico	26	completa
35	SRD	Macho	10 anos	T	linfocítico	28	completa
36	Persa	Fêmea	15 anos	T	linfocítico	1	ausência
37	Siamês	Fêmea	14 anos	T	linfocítico	14	parcial
38	Siamês	Fêmea	13 anos	T	linfocítico	29	completa
39	SRD	Fêmea	8 anos	T	linfocítico	32	completa
40	SRD	Fêmea	13 anos	T	linfocítico	38	completa
41	SRD	Macho	14 anos	T	linfocítico	18	parcial
42	SRD	Fêmea	12 anos	T	linfocítico	40	completa
43	SRD	Macho	15 anos	T	linfocítico	29	completa
44	SRD	Macho	13 anos	T	linfocítico	24	parcial
45	SRD	Fêmea	12 anos	T	linfocítico	21	completa
46	SRD	Fêmea	14 anos	T	linfocítico	16	completa
47	Himalaio	Macho	10 anos	T	linfocítico	25	completa

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na tabela 1 observa-se o número de casos e as porcentagens respectivas dos dados categóricos (imunofenótipos, tipo histológico, tratamentos utilizados, padrão de remissão e utilização de tratamento anterior).

Tabela 1 - Dados categóricos de imunofenótipos, tipo histológico, tratamentos, padrão de remissão e utilização de tratamento anterior ao diagnóstico em 47 felinos com linfoma gastrointestinal - São Paulo - 2016

		n	%
Imunofenótipos	B	5	11%
	T	42	89%
Tipo histológico	Linfoblástico	6	13%
	Linfocítico	41	87%
Tratamentos	A	28	60%
	B	19	40%
Remissão	AR	5	11%
	RC	30	64%
	RP	12	26%
Tratamento anterior	não	39	83%
	sim	8	17%

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise dos imunofenótipos dos dados categóricos (tabela 2) pode-se observar que houve diferença significativa com relação ao tipo histológico, ou seja, os linfomas linfoblásticos tendem a ser de imunofenótipo tipo B, enquanto os linfomas linfocíticos, de tipo celular T. Quanto às demais variáveis analisadas (tratamentos, tipo de resposta e tratamento anterior) não houve diferença significativa. Considerando o padrão de remissão, houve tendência ($p=0,05$) das remissões completa (RC) e parcial (RP) estarem associadas aos casos de linfomas de células T, porém, provavelmente devido ao número pequeno de casos de gatos com linfoma de células B, não houve diferença significativa.

Tabela 2 - Análise dos imunofenótipos (B e T) dos dados categorizados quanto ao tipo histológico, tratamentos utilizados, padrão de remissão e tratamento anterior ao diagnóstico, dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal - São Paulo – 2016

		Imunofenótipos				Qui-Quadrado de Pearson Sig.
		B		T		
		n	%	n	%	
Imunofenótipos	B	5	100%	0	0%	-
	T	0	0%	42	100%	
Tipo histológico	Linfoblástico	4	80%	2	5%	<0,001
	Linfocítico	1	20%	40	95%	
Tratamentos	A	3	60%	25	60%	0,984
	B	2	40%	17	40%	
	AR	2	40%	3	7%	
Remissão	RC	3	60%	27	64%	0,050
	RP	0	0%	12	29%	
	não	4	80%	35	83%	
Tratamento anterior	sim	1	20%	7	17%	0,851

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise dos tipos histológicos (linfoblástico e linfocítico) (tabela 3), houve diferença significativa com relação ao imunofenótipo, sendo assim, os linfomas linfoblásticos estão relacionados ao tipo celular B, enquanto que os linfocíticos ao imunofenótipo T ($p<0,001$). No que tange a resposta à terapia, os linfomas linfoblásticos apresentaram comportamento bastante peculiar, sendo que houve remissão completa em 50% dos casos e ausência de resposta nos 50% restantes, enquanto que os linfomas linfocíticos tiveram uma taxa de remissão completa maior (66%) e uma porcentagem significativa de resposta parcial (29%) e os casos de ausência de resposta (AR) baixos, representando apenas apenas 5% dos pacientes. Nas demais variáveis não houve diferença.

Tabela 3 - Análise dos tipos histológicos (linfoblástico e linfocítico) dos dados categorizados quanto ao imunofenótipo, tratamentos, tipo de remissão e tratamento anterior dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal - São Paulo - 2016

		Tipo histológico				Qui-Quadrado de Pearson Sig.
		Linfoblástico		Linfocítico		
		n	%	n	%	
Imunofenótipos	B	4	67%	1	2%	<0,001
	T	2	33%	40	98%	
Tratamentos	A	3	50%	25	61%	0,609
	B	3	50%	16	39%	
Remissão	AR	3	50%	2	5%	0,003
	RC	3	50%	27	66%	
	RP	0	0%	12	29%	
Tratamento anterior	não	5	83%	34	83%	0,980
	sim	1	17%	7	17%	

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Com a finalidade de se estabelecer um tempo de seguimento dos gatos para análise de sobrevida, definiu-se como padrão o tempo em que pelo menos 80% dos indivíduos foram acompanhados. Avaliando-se a amostra, o tempo adequado para essa avaliação foi de 30 meses. Para construção da tabela, todos os animais que foram a óbito após o trigésimo mês foram considerados como sobreviventes até aquele momento. Assim, foram censurados dez animais (21%) com sobrevida superior a 30 meses, sendo a mediana do grupo experimental de 24 meses. Desta forma, na análise de sobrevida, os animais foram comparados quanto ao imunofenótipo (B e T) e mesmo a mediana sendo bastante diferente entre os grupos (5 e 24 meses para B e T, respectivamente), devido ao pequeno número de animais com linfoma de células B (n=5), não houve diferença significativa (figura 11). Seguindo na análise quanto ao tipo histológico (linfocítico e linfoblástico) (figura 12), não houve diferença, provavelmente pelo mesmo motivo citado na análise do imunofenótipo.

Figura 11 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação ao imunofenótipo - São Paulo - 2016

Imunofenótipos	Total	nº de eventos	censurados		Imunofenótipos	mediana estimada	erro padrão	intervalo de confiança de 95%		Log Rank Sig.
			n	porcentagem				inferior	superior	
B	5	4	1	20%	B	5,0	2,68	0,00	10,26	0,690
T	42	33	9	21%	T	24,0	1,62	20,83	27,17	
Todos	47	37	10	21%	Todos	24,0	1,71	20,65	27,35	

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 12 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação ao tipo histológico - São Paulo - 2016

Histologia	Total	nº de eventos	censurados		Histologias	mediana estimada	erro padrão	intervalo de confiança de 95%		Log Rank Sig.
			n	percentagem				inferior	superior	
Linfoblástico	6	5	1	17%	Linfoblástico	4,00	2,51	0,00	8,92	0,308
Linfofítico	41	32	9	22%	Linfofítico	24,00	1,92	20,24	27,76	
Todos	47	37	10	21%	Todos	24,00	1,71	20,65	27,35	

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise de sobrevida quanto ao tipo de tratamento utilizado (figura 13), pode-se constatar uma diferença significativa ($p=0,004$) entre os animais que receberam o tratamento A *versus* tratamento B, sendo a mediana de sobrevida de 27 e 18 meses, respectivamente. Portanto, os animais que receberam o tratamento A (com l-asparaginase) apresentaram maior tempo de sobrevida quando comparados ao que receberam o tratamento B.

Figura 13 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação ao tipo de tratamento utilizado - São Paulo - 2016

Tratamentos	Total	nº de eventos	censurados n	percentagem	Tratamentos	mediana estimada	erro padrão	intervalo de confiança de 95%		Log Rank Sig.
A	28	19	9	32%	A	27,00	1,98	23,12	30,88	0,004
B	19	18	1	5%	B	18,00	7,25	3,78	32,22	
Todos	47	37	10	21%	Todos	24,00	1,71	20,65	27,35	

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise de sobrevida e sua relação com o nível sérico de albumina (figura 14), pode-se constatar uma diferença significativa ($p=0,032$) entre os animais que apresentaram mediana $<2,5\text{g/dL}$ versus aqueles que tiveram valor igual ou maior que $2,5\text{g/dL}$. Portanto, os animais que apresentaram albumina sérica menor que $2,5\text{g/dL}$ tiveram pior prognóstico e menor tempo de sobrevida.

Figura 14 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação à concentração sérica de albumina. - São Paulo - 2016

Albumina Categ.	Total	nº de eventos	censurados		mediana estimada	erro padrão	IC de 95%		LogRank Sig.
			n	%			inferior	superior	
< 2.5	19	17	2	11%	15,26	2,60	10,16	20,36	0,032
>= 2.5	28	20	8	29%	23,14	1,48	20,24	26,04	
Overall	47	37	10	21%	19,96	1,48	17,05	22,87	

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise de sobrevida quanto à variação do peso (figura 15), pode-se constatar uma diferença significativa ($p=0,013$). Os felinos que perderam peso quando comparados o momento do diagnóstico e 30 dias do início do tratamento, tiveram menor tempo de sobrevida, sendo que sete animais apresentaram linfoma linfocítico de células T e 3 felinos com a forma linfoblástica de células B.

Figura 15 - Representação gráfica da curva de sobrevida dos 47 felinos com linfoma gastrointestinal com relação à variação do peso - São Paulo - 2016

Var. de Peso Categ. (%)	Total	nº de eventos	censurados		mediana estimada	erro padrão	IC de 95%		LogRank Sig.
			n	%			inferior	superior	
< 9.0	43	33	10	23%	20,84	1,48	17,94	23,74	0,013
>= 9.0	4	4	0	0%	10,48	5,87	0,00	21,97	
Overall	47	37	10	21%	19,96	1,48	17,05	22,87	

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Quando comparou-se o tipo de resposta ao tratamento e os dados contínuos, constatou-se diferença significativa para o tempo de sobrevida relacionado à ausência de remissão (AR) *versus* remissão parcial (RP) ($p < 0,0001$), ausência de remissão (AR) *versus* resposta completa (RC) ($p < 0,0001$) e resposta completa (RC) *versus* resposta parcial (RP) ($p = 0,006$), sendo assim a resposta apresentada ao tratamento foi diretamente relacionada ao tempo de sobrevida dos animais.

Na comparação do tipo de resposta ao tratamento e dos dados categóricos, observou-se diferença significativa com relação ao imunofenótipo, quando analisou-se a ausência de resposta *versus* resposta parcial ($p = 0,020$), ou seja, a ausência de resposta foi relacionada aos linfomas de células B e a resposta parcial aos de células T, e para o tipo histológico, quando comparada a ausência de resposta *versus* resposta completa ($p = 0,006$) e ausência de resposta *versus* resposta parcial ($p = 0,003$), portanto, a ausência de resposta ao tratamento foi relacionada ao linfoma linfoblástico e respostas parciais ou completas aos linfomas linfocíticos.

Com relação ao tratamento instituído, o tratamento A relacionou-se à remissão completa ($p=0,0001$), enquanto que a remissão parcial com o tratamento B ($p=0,022$). Na outra variável estudada, utilização de tratamento anterior, não houve diferença.

Também foi realizada análise de correlação de Spearman de todas as variáveis estudadas, não sendo encontrada correlação negativa ou positiva.

3.5 DISCUSSÃO

Os linfomas representam a principal neoplasia hematopoiética na espécie felina, sendo que a forma anatômica gastrointestinal é a mais prevalente, representando mais de 50% dos casos. Nas últimas décadas, a prevalência do linfoma gastrointestinal aumentou significativamente, acompanhando o advento das dietas comerciais, a melhora nos protocolos vacinais e a manutenção dos gatos em ambientes restritos, com consequente aumento da expectativa de vida desta espécie (VAIL, 2013). Desta forma, nos dias atuais, observa-se mais comumente o linfoma gastrointestinal em gatos idosos e negativos para retrovíruses (LOUWERENS et al., 2005; RISSETTO et al., 2011).

Neste estudo mais de 83% dos gatos tinham idade superior a 10 anos, com mediana de 12 anos, não havendo predileção sexual e racial, e tais achados foram condizentes com a literatura (FONDACARO et al., 1999; LOUWERENS et al., 2005; GIEGER, 2011). As manifestações clínicas e os achados de exame físico estiveram de acordo com os citados por Kiselow et al. (2008), Lingard et al. (2009) e Krick et al. (2011) e incluíram vômitos, diarreia com ou sem a presença de sangue, perda do apetite e/ou emagrecimento, como sintomas mais frequentes.

Corroborando dados de literatura, os fatores prognósticos considerados negativos incluíram a perda de peso durante o primeiro mês de tratamento (KRICK et al., 2011) e a ocorrência de hipoalbuminemia (GEROU-FERRIANI et al., 2011) que, neste estudo, relacionou-se a um menor tempo de sobrevida.

Russel et al. (2012) constataram hipoalbuminemia somente naqueles gatos com a forma celular intermediária ou de grandes células, assim como Lingard et al. (2009), que não observaram tal alteração em gatos com linfoma gastrointestinal de

baixo grau. Esses achados diferiram dos descritos neste estudo, no qual a hipoalbuminemia esteve presente em 32% dos animais com a forma linfocítica de células T, contudo, ainda assim, os casos de hipoalbuminemia mais importantes ($<2,0\text{mg/dL}$) afetaram os animais com a forma celular linfoblástica ou de células B e tal achado relacionou-se a menor tempo de sobrevida dos pacientes. Uma possível explicação para maior incidência de felinos com linfoma linfocítico apresentando hipoalbuminemia é a possibilidade do diagnóstico ter sido realizado em estágio mais avançado da neoplasia, já que todos os animais do experimento apresentavam-se sintomáticos ao diagnóstico, enquanto que Russell et al. (2012) observaram sintomas em cerca de 60% dos casos e Kiselow et al. (2008) em 80% dos casos. De qualquer forma, esses achados corroboram a importância dos exames laboratoriais iniciais quando da suspeita diagnóstica de linfoma gastrointestinal, principalmente a determinação dos níveis de albumina sérica.

No que diz respeito à variação do peso, Krick et al. (2011) descreveram que gatos com linfoma de grandes células que perdem peso corpóreo nos 30 dias iniciais do tratamento apresentam menor tempo de sobrevida e tais achados são similares ao do presente estudo, no qual tanto aqueles pacientes que perderam peso nos 30 dias iniciais do tratamento, quanto os que ganharam pouco peso (menos de 9% de ganho de peso comparado ao início do tratamento) apresentaram menor tempo de sobrevida. Isso reforça a conclusão de estudos ambientados fora do Brasil e a recomendação de que o escore de condição corpórea e o ganho de peso dos animais sejam monitorados atentamente tanto ao diagnóstico quanto no período inicial do tratamento.

Quanto aos achados do exame físico, massa palpável foi constatada em apenas seis pacientes, incluindo todos os animais com linfomas de células B e um único paciente com linfoma linfocítico de células T, em concordância com os achados de Fondacaro et al. (1999) e Gieger (2011) que haviam descrito a presença de massa intestinal palpável principalmente em felinos com linfoma linfoblástico ou de células B. Assim, esse achado por si pode levar a alto grau de suspeição do tipo celular e imunofenótipo envolvido no processo e sugerir pior prognóstico, tanto em relação à resposta terapêutica quanto ao tempo de sobrevida.

No que tange à localização no trato gastrointestinal, pode-se constatar como local principal de acometimento, o intestino delgado, seguido da junção íleo-cecócólica e cólon e estômago, com perda de estratificação de camadas em 36% e

linfonodomegalia mesentérica em 100% dos casos, sendo estes achados similares aos descritos por Kiselow et al. (2008) e Moore et al. (2012) e contrastando com aqueles referidos por Fondacaro et al. (1999) e Lingard et al. (2009) no que diz respeito à frequência de linfomas gástricos, descritos em aproximadamente 25% dos casos e observado neste estudo em apenas um paciente. Uma explicação possível para tal diferença diz respeito à análise histopatológica de biópsia de diversas regiões do trato gastrointestinal incluindo estômago, pâncreas e fígado, o que aumenta a acurácia do diagnóstico e indica a infiltração da neoplasia em outros sítios que não intestinais. Essa observação ressalta a importância e a necessidade da biópsia de diversos sítios do trato gastrointestinal, mesmo que os sintomas limitem-se a disfunção de uma região específica.

No tocante às retrovirose, dos 50 casos iniciais, três gatos (6%) apresentaram testes sorológicos positivos para leucemia felina (FeLV). Considerando que estes três animais infectados por FeLV vieram a óbito em decorrência da doença viral e por se tratar de um oncovirus capaz de induzir doenças linfo/mieloproliferativas (LEVY et al., 2008), estes animais foram excluídos do grupo experimental. Como o linfoma gastrointestinal é uma doença que afeta principalmente gatos idosos e domiciliados, justifica-se menor ocorrência da associação desta forma anatômica com a leucemia viral felina, infecção frequentemente relacionada a gatos mais jovens e não domiciliados (LOUWERENS et al., 2005), entretanto, neste estudo não é possível afirmar que a ocorrência de animais positivos a retrovirose seja baixa, uma vez que não existem estudos recentes na cidade de São Paulo que referenciem a ocorrência das retrovirose na população felina. Além disso, uma possível limitação deste estudo foi a não realização do teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção do DNA pró-viral do FeLV para determinar precisamente se houve ou não a inclusão do pró-vírus à célula, já que Weiss et al. (2010) apontaram alta porcentagem de casos de linfoma felino positivos para o DNA pró-viral do FeLV e uma possível relação entre estas infecções regressivas e o desenvolvimento do linfoma nestes pacientes sorologicamente negativos.

Segundo Hayes (2006); Moore et al. (2012); Barrs e Beatty (2012) e Barriga (2013), para o diagnóstico do linfoma gastrointestinal é imprescindível a realização de biópsia intestinal, análise histopatológica e imunoistoquímica, já que faz-se necessário um diagnóstico diferencial da doença intestinal inflamatória. Esses

procedimentos foram realizados em todos os animais estudados e constatou-se que o linfoma linfocítico de células T foi o mais prevalente, seguido do linfoma linfoblástico de células B e linfoma linfoblástico de células T, estando esses resultados em concordância com os descritos por Moore et al. (2012). De forma similar, Barriga (2013) descreveu em sua pesquisa, na cidade de São Paulo, predomínio do linfoma linfocítico de células T em 80% dos casos e 12,5% de linfoma de células B em 40 animais avaliados e estes achados diferiram dos encontrados por Russell et al. (2012), que relatou a ocorrência de linfoma de baixo grau ou linfocítico em apenas 28% dos casos, contudo, os autores sugeriram que esta menor prevalência deveu-se à inclusão de animais diagnosticados por citologia aspirativa guiada por ultrassom, aumentando o número de casos de linfoma de alto grau. Quando excluiu-se este método de diagnóstico, a prevalência de linfoma de baixo grau praticamente dobrou. Desta mesma forma, considerando que uma parte dos pacientes com linfoma de alto grau são diagnosticados por exame citológico e o tempo de sobrevida é curto, justifica-se uma prevalência ainda mais expressiva do do linfoma linfocítico de células T em nossa casuística.

Dentre as opções de tratamento geralmente propostas (ETTINGER, 2003; LINGARD et al., 2009; RECHE et al., 2010; STEIN et al., 2010; BARRS; BEATTY, 2012) adotaram-se dois tratamentos antineoplásicos. O protocolo A, como descrito por Reche et al. (2010), foi o tratamento preconizado para gatos que apresentavam linfoma gastrointestinal linfocítico ou de células T, enquanto que o protocolo B foi utilizado naqueles pacientes diagnosticados com a forma linfoblástica ou de células B e para parte dos pacientes com a forma linfocítica.

Dos animais com linfoma linfoblástico de células B ou T, a baixa resposta ao tratamento e menor tempo de sobrevida condiz com o citado em literatura (BARRS; BEATTY, 2012; MOORE et al., 2012), uma vez que frequentemente faz-se necessário associar o sulfato de vincristina ao protocolo de tratamento destes pacientes já que uma resposta terapêutica durável ocorre para uma minoria dos casos, sendo o insucesso comum. No que tange ao tratamento dos linfomas linfocíticos de células T, em concordância com Reche et al. (2010), a adição da L-asparaginase trouxe evidente benefício quanto à resposta ao tratamento e ao tempo de sobrevida, com taxa de remissão completa de 67% dos animais e maior tempo de sobrevida se comparado aos animais tratados com o protocolo B. Devido à descontinuidade da comercialização da L-asparaginase, parte dos animais com este

tipo celular de linfoma foram tratados com o protocolo B, sendo que a taxa de remissão completa caiu drasticamente (apenas 20%) e predominaram aqueles pacientes com resposta parcial (em 73% dos casos) e menor tempo de sobrevida. Tais achados diferem dos constatados por Fondacaro et al. (1999); Lingard et al. (2009) e Stein et al. (2010) em animais tratados somente com a associação de clorambucil e prednisolona. Na bibliografia estrangeira compulsada, apenas Kiselow et al. (2008) descreveram frequência de remissão completa menor (36%) em 25 animais tratados com este protocolo, sendo que nos demais estudos citados, a taxa foi superior a 70%. Sendo assim, com a possibilidade de um diagnóstico mais tardio de linfoma gastrointestinal nos animais deste experimento, refletindo as condições que possivelmente são as encontradas na cidade de São Paulo e quiçá em outros Estados, a adição de L-asparaginase ao protocolo quimioterápico parece trazer reais benefícios em termos de resposta ao tratamento e sobrevida dos pacientes.

Quanto ao tempo de sobrevida dos pacientes, apesar de haver diferença considerável entre os animais com linfoma de células B (mediana de 5 meses) e os de células T (mediana de 24 meses), não houve diferença significativa, provavelmente devido ao pequeno número de animais com linfoma linfoblástico e/ou de células B, o que comprometeu esta análise. Contudo, como descrito por outros pesquisadores (LINGARD et al., 2009; STEIN et al., 2010; MOORE et al., 2012), a resposta ao tratamento e a sobrevida de pacientes com linfoma de células T e/ou linfocítica parece ser realmente superior aos que apresentam a forma linfoblástica e/ou de células B.

3.6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o linfoma gastrointestinal mais prevalente em gatos foi do tipo linfocítico de células T, envolvendo principalmente o intestino delgado e com mediana de sobrevida de 24 meses. Na análise da curva de sobrevida, o tratamento com clorambucil, prednisolona e l-asparaginase, níveis de albumina sérica iguais ou maiores que 2,5g/dL e ganho de peso superior a 9% no início do tratamento foram preditores de maior tempo de sobrevida dos animais.

REFERÊNCIAS

BARRIGA, V. M. **Avaliação citológica, histológica e imunistoquímica do linfoma alimentar em felinos domésticos** [Cytological, histopathological and immunohistochemical evaluation of feline alimentary lymphoma]. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BARRS, V.; BEATTY, J. Feline alimentary lymphoma: further diagnostics, therapy and prognosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 14, p. 191–201, 2012.

BRISCOE, K. A.; KROCKENBERGER, M.; BEATTY, J. A.; CROWMEY, A.; DENNIS, M. M.; CANFIELD, P. J.; DHAND, N.; LINGARD, A. E.; BARRS, V. R. Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. **Journal of Comparative Pathology**. v. 145, p. 187-198, 2011.

ETTINGER, S. N. Principles of treatment for feline lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 98-102, 2003.

FONDACARO, J. V.; RICHTER, K. P.; CARPENTER, J. L. Feline gastrointestinal lymphoma: 67 cases (1988 – 1996). **European Journal of Comparative Gastroenterology**, v. 4, p. 5-11, 1999.

GEROU-FERRIANI, M.; MCBREARTY, A. R.; BURCHMORE, R. J. Agarose gel serum protein electrophoresis in cats with and without lymphoma and preliminary results of tandem mass fingerprinting analysis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, p. 159-173, 2011.

GIEGER, T. Alimentary lymphoma in cats and dogs. **Veterinary Clinics of the North American: Small Animal Practice**, v. 41, p. 419–432, 2011.

HAYES, A. Feline lymphoma – principles of diagnosis and management. **In practice**, v. 28, p. 516–524, 2006.

KISELOW, M. A.; RASSNICK, K. M.; MCDONOUGH, S. P. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995 – 2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 405–410, 2008.

KRICK, E. L.; MOORE, R. H.; COHEN, R. B.; SORENMO, K. U. Prognostic significance of weight changes during treatment of feline lymphoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 12, p. 976-83, 2011.

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners': Feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medical and Surgery**, v. 10, p. 300-316, 2008.

LINGARD, A. E.; BRISCOE, K.; BEATTY, J. A. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 692-700, 2009.

LOUWERENS, M.; LONDON, C. A.; PEDERSEN, N. C. Feline lymphoma in the post-feline leukemia era. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 329-335, 2005.

MOORE, P. F.; WOO, J. C.; VERNAU, W.; KOSTEN, S.; GRAHAM, P. S. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, p. 167-178, 2005.

MOORE, P. F.; RODRIGUES-BERTOS, A.; KASS, P. H. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype and molecular clonality. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 658-668, 2012.

RECHE JR, A.; CHALITA, M. C. C.; GERALDO JR, C. A.; SANTOS, C. F.; FREITAS, M. F. Uso da L-Asparaginase (Elspar), prednisona (meticorten) e clorambucil (leukeran) no tratamento de gatos com linfoma alimentar: 32 casos (2004 – 2009). **A Hora Veterinária**, v. 29, n. 173, p. 9-16, 2010.

RISSETTO, K.; VILLAMIL, J. A.; SELTING, K. A. Recent trends in feline intestinal neoplasia: an epidemiologic study of 1,129 cases in the veterinary medical database from 1964 to 2004. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 47, p. 28-36, 2011.

RUSSELL, K. J.; BEATTY, J. A.; DHAND, N.; GUNEW, M.; LINGARD, A. E.; BARAL, R. M. Feline low-grade alimentary lymphoma: how common is it? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 12, p. 910-912, 2012.

STEIN, T. J.; PELLIN, M.; STEINBERG, H.; CHUN, R. Treatment of feline gastrointestinal small-cell lymphoma with chlorambucil and glucocorticoids. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 6, p. 413-417, 2010.

VAIL, D. M.; MICHELS, G. M.; KHANNA, C.; SELTING, K. A.; LONDON, C. A. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) – a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus group. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 28–37, 2009.

VAIL, D. M. Feline Lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. cap. 32, p. 638-653.

VAIL, D. M.; THAMM, D. H. Hematopoietic tumors. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. v. 1, cap. 181, p. 732-747.

WALY, N. E.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; STOKES, C. R.; DAY, M. J. Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 253–260, 2005.

WEISS, A. A.; KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 929–935, 2010.

CAPÍTULO 2

MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 E ÍNDICE MITÓTICO EM FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL

4 MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 E ÍNDICE MITÓTICO EM FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL

RESUMO

Linfoma gastrointestinal é a principal forma anatômica de linfoma diagnosticada na espécie felina, representando mais de 50% dos casos, sendo que indicadores de proliferação celular como a expressão de Ki-67 ou o índice mitótico podem ser importantes na avaliação do comportamento clínico da neoplasia, sendo estes índices mais conclusivos em determinar o grau de malignidade tumoral do que a análise histopatológica. Os objetivos deste estudo foram determinar a expressão de Ki-67 e o índice mitótico de felinos com linfoma gastrointestinal e, na dependência do resultado, correlacionar com o tempo de sobrevida global. Foram estudadas 47 amostras de felinos com linfoma gastrointestinal e realizadas provas imunoistoquímicas para os seguintes marcadores: CD3, PAX5 e Ki-67. A determinação da imunoexpressão de Ki-67 foi feita pela contagem de 1.000 linfócitos infiltrados no microambiente tumoral e o índice mitótico foi classificado em discreto, moderado ou alto na avaliação de 10 campos de microscopia em aumento de 40 vezes. Para análise estatística foram utilizados os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e de correlação de Spearman. Na análise comparativa dos imunofenótipos pode-se constatar diferença significativa para a imunoexpressão de Ki-67 ($p=0,001$) quando analisados o tipo celular (B e T), com mediana de 47,2% e 8,5%, respectivamente, caracterizando maior expressão deste marcador naqueles pacientes com linfoma de células B em relação aos de células T e o mesmo observou-se quando foi analisado o tipo histológico (linfoblástico e linfocítico), com mediana de 40,5% e 8,2%, respectivamente, e $p=0,002$. Quanto ao índice mitótico, dois animais com linfoma linfoblástico de células B e um animal com linfoblástico de células T apresentaram alta expressão, enquanto três animais tiveram uma expressão moderada e a maioria, 41 animais (87,2%) apresentaram expressão discreta. Em conclusão, a expressão de Ki-67 foi uma metodologia superior para determinar o índice proliferativo se comparado ao índice mitótico nos gatos com linfoma gastrointestinal. Maior expressão de Ki-67 foi observada naqueles animais acometidos pela forma linfoblástica ou de células B e relacionou-se a baixa resposta terapêutica e menor tempo de sobrevida.

ABSTRACT

Gastrointestinal lymphoma is the main anatomical form of lymphoma diagnosed in cats, representing more than 50% of cases. Cell proliferation indicators as expression of Ki-67 and mitotic index may be important in assessing the clinical behavior of the tumor; these indices are more conclusive to determine the degree of malignancy than the histopathological analysis. The objectives of this study were to determine the expression of Ki-67 and mitotic index of cats with gastrointestinal lymphoma and, depending on the results, correlate with overall survival time. Forty-seven samples of cats with gastrointestinal lymphoma were studied and performed immunohistochemical for the following markers: CD3, PAX5 and Ki-67. Determination of the Ki-67 immunostaining was made by counting 1,000 infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment and mitotic index was ranked as mild, moderate or high by the evaluation of 10 microscopic fields at 40X. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test and Spearman correlation. We observed significant difference in the immunohistochemical expression of Ki-67 ($p = 0.001$) when analyzed the cell-type (B and T), with a median of 47.2% and 8.5%, respectively, featuring higher expression of this marker in patients with B cell lymphoma in relation to T cells. The same was observed when comparing the histological type (lymphoblastic and lymphocytic), with a median of 40.5% and 8.2%, respectively, $p = 0.002$. Regarding mitotic index, two animals with lymphoblastic B-cell and one with lymphoblastic T-cell lymphoma showed high expression, while three animals showed moderate expression and, for the majority of cases, 41 animals (87.2%) had mild expression. In conclusion, the expression of Ki-67 was a better method to determine the proliferation index when compared to mitotic index in cats with gastrointestinal lymphoma. Higher expression of Ki-67 was observed in those animals affected by lymphoblastic form or B cells and is related to low therapeutic response and shorter survival.

4.1 INTRODUÇÃO

Linfomas representam um grupo altamente heterogêneo de neoplasias hematopoiéticas que acometem a espécie felina, sendo a forma anatômica gastrointestinal a mais prevalente, respondendo por mais de 50% dos casos (VAIL, 2013). A apresentação clínica pode ser bastante variável, na dependência do tempo de evolução da doença e do tipo celular envolvido (HAYES, 2006). O diagnóstico é estabelecido por meio de biopsia, análises histopatológica e imunofenotípica, sendo a forma linfocítica e de células T a mais frequente, acometendo 80 a 90% dos casos (MOORE et al., 2012). Por se tratar de uma doença sistêmica, a quimioterapia antineoplásica é o tratamento de escolha e o protocolo a ser estabelecido depende do tipo celular e da imunofenotipagem (VAIL, 2013). O prognóstico é variável, bem como a sobrevida (MOORE et al., 2012), sendo que a avaliação de marcadores de proliferação celular pode ser importante no que tange a escolher o melhor protocolo quimioterápico e estabelecer o prognóstico do paciente.

Na avaliação do comportamento biológico de neoplasias, indicadores de proliferação celular como a expressão de Ki-67 e índice mitótico são mais conclusivos na determinação do grau de malignidade tumoral do que a análise histopatológica isoladamente (SOKOLOWSKA et al., 2012). O marcador nuclear Ki-67 é uma proteína nuclear não histona sintetizada no início da proliferação celular e que está presente em todas as fases do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e M), exceto na fase G_0 (repouso), cujo papel é a manutenção da estrutura do DNA durante a mitose (HE et al., 2014). Alguns estudos em humanos correlacionam a alta expressão de Ki-67 com menor tempo de sobrevida, enquanto outros não observam tal associação, ou relatam até mesmo uma relação inversa (HASSELBLOM et al., 2008; LI et al., 2012; HE et al., 2014).

Em cães com linfoma, estudo conduzido por Phillips et al. (2000), que avaliou índices de proliferação em 41 animais, concluiu que somente a análise de Ki-67 e do índice apoptótico foram preditores de duração do primeiro intervalo livre de recidiva, mas não de tempo de sobrevida global, sendo que quando o índice mitótico aumentava, o intervalo livre de recidiva e a sobrevida global tendiam a diminuir. Em uma análise multivariada, o índice mitótico foi preditor de intervalo livre de recidiva e de sobrevida global naqueles cães com linfoma de baixo grau. Já em um estudo que

em se avaliaram 30 felinos com linfoma nasal submetidos à radioterapia, Fu et al. (2016) puderam constatar que a alta expressão de ki-67 (>40%) e o elevado nível de apoptose (>0,9%) foram fortes preditores de resposta à radioterapia, uma vez que o tecido com alta taxa proliferativa tem maior radiosensibilidade e consequentemente, melhor resposta ao tratamento, do que aqueles que crescem lentamente.

Por sua vez, um estudo que avaliou fatores prognósticos em cadelas com neoplasia mamária constatou, por meio de análise multivariada, que a alta expressão de ki-67 (>40% de células marcadas) foi um fator prognóstico independente de menor tempo livre de doença e de sobrevida global (SANTOS et al., 2013).

Quanto à determinação do índice mitótico, é um meio rápido e prático de estimar a proporção de células proliferantes na fase de mitose (PHILLIPS et al., 2000). O índice mitótico é amplamente estudado na oncologia humana em diversos tipos neoplásicos como nos cânceres da região cervical, melanoma e linfomas, dentre outros, sendo que altas taxas de mitoses representam um fator preditivo para a recorrência local da neoplasia, o tempo de sobrevida do paciente e/ou a resposta ao tratamento (BRANDT et al., 1990; NAKANO; OKA, 1993; SUZUKI et al., 2009; LV et al., 2016).

No linfoma canino, alto índice mitótico (>21 por campo de 400X) associou-se à menor sobrevida dos animais tratados (VALLI et al., 2013). Em gatos com carcinoma epidermóide constatou-se significativa correlação positiva entre a expressão de Ki-67 e o índice mitótico, contudo não foi observada correlação com o tempo de sobrevida global destes animais, possivelmente devido ao pequeno número (n=22) de casos estudados (YOSHIKAWA et al., 2012).

Uma vez que a expressão de Ki-67 e a determinação do índice mitótico são amplamente usadas na rotina clínica como marcadores da evolução da atividade proliferativa tumoral e não havendo, até o momento, estudos em felinos com linfoma gastrointestinal e a sua relação com as formas linfocítica e linfoblástica, tampouco com o tipo celular T e B, foram objetivos deste estudo analisar a expressão desses marcadores em felinos com linfoma gastrointestinal e comparar a expressão de Ki-67 com o índice mitótico.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da referida Instituição. O projeto também recebeu a doação de material de uma clínica particular especializada no atendimento de felinos (Vetmasters – São Paulo / SP).

Foram estudadas as amostras provenientes de 47 animais da espécie felina com linfoma gastrointestinal, não havendo restrições sexuais, etárias ou raciais.

Os animais atendidos foram submetidos a exame clínico e material biológico foi colhido para as análises laboratoriais de rotina (hemograma, avaliação laboratorial de fígado e rins), incluindo os testes sorológicos para FIV/FelV, por meio do kit comercial ELISA (Snap® FIV / FeLV Combo Test IDEXX).

A confirmação do diagnóstico foi realizada por meio de exame histopatológico de material colhido por biópsia e o mesmo material foi utilizado para as análises imunoistoquímicas realizadas no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. Para tais análises, utilizaram-se os anticorpos monoclonal mouse anti-PAX5 (1:500; Clone 24; Invitrogen, Life Technologies, New York, USA) e policlonal rabbit anti-CD3 (1:2.000; DAKO; Carpinteria, CA, USA). Após os procedimentos de desparafinização e desmascaramento, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena e, então, incubou-se os anticorpos por 30 minutos a 37°C, seguido de *overnight*. Na sequência, utilizou-se anticorpo secundário combinado a polímero (SuperPicTure™ HRP Polymer Detection Kit; Invitrogen, Life Technologies, New York, USA), sendo feita a revelação através do uso de diaminobenzidina, seguido de coloração com hematoxilina, desidratação e montagem das lâminas. A análise foi realizada em microscópio óptico em aumento de 40 vezes. Foi utilizado linfonodo de um gato para o controle positivo e negativo das reações.

Para avaliação específica da imunoexpressão de Ki-67 foi utilizado o clone MIB-1 de anticorpo monoclonal de camundongo (figura 16 – A e B), na diluição 1:200 (DAKO, Carpinteria, CA, USA). O procedimento de imunoistoquímica foi o mesmo descrito anteriormente. A análise foi feita pela contagem de 1.000 linfócitos

infiltrados no microambiente tumoral, por meio de fotos das lâminas em aumento de 40 vezes e a expressão de células marcadas foi considerada como baixa (<20%), moderada (21 – 50%) ou alta (>51%), como descrito previamente por Sokolowska et al. (2012).

Figura 16 - Imunoexpressão de Ki-67 em linfonodo (A) e em vilosidade intestinal (B) de um gato-controle positivo na reação (aumentos de 20X e 40X, respectivamente) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

A determinação do índice mitótico foi feita pela avaliação de 10 campos do microambiente tumoral em aumento de 40 vezes e o índice foi considerado como discreto (0 a 2 mitoses por campo observado), moderado (3 a 5 mitoses por campo observado) ou alto (6 ou mais mitoses por campo observado).

Os animais do grupo estudado foram tratados com clorambucil e prednisolona associado ou não ao sulfato de vincristina ou à L-asparaginase e foram avaliados mensalmente, através de histórico clínico, exame físico, exames laboratoriais (hemograma, perfis renal e hepático) e ultrassonografia abdominal para determinar o estado de remissão da neoplasia (se completa, parcial ou ausência de resposta) durante os seis primeiros meses. Após esse período, o tempo de reavaliação aumentou para cada dois meses, sendo realizados os mesmos procedimentos.

Avaliação da resposta terapêutica (KISELOW et al., 2008; VAIL et al., 2009):

→ remissão completa: 100% de resolução dos sintomas clínicos por mais de 30 dias e normalização da avaliação dos intestinos e linfonodos mesentéricos pela ultrassonografia abdominal;

→ remissão parcial: melhora de mais de 50% dos sintomas clínicos e ultrassonográfica de intestinos e linfonodos mesentéricos por mais de 30 dias;

→ ausência de resposta: não melhora ou melhora de menos de 50% dos sintomas clínicos e não melhora ou progressão da doença avaliada por meio ultrassonográfico.

Para análise do tempo de sobrevivência dos gatos, considerou-se o período compreendido entre o momento do diagnóstico até o óbito do animal.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos e semi-contínuos das variáveis foram determinados como não paramétricos pelo teste K-S (Kolmogorov- Smirnov) e pelo teste de Chapiro-Wilks e por isso puderam ser representados por mediana e percentis 25 e 75 (dados não paramétricos).

Para os dados não-paramétricos na comparação entre dois grupos independentes foi utilizado o Teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni e, quando comparado três ou mais grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para avaliar se havia correlação entre as variáveis estudadas fez-se uso do teste de correlação não paramétrico de Spearman.

Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5%.

4.4 RESULTADOS

Dos 47 animais estudados, 61,7% eram machos (29/47), sendo 87,2% (41/47) felinos sem definição racial, com mediana de idade de 12 anos. No que diz respeito ao padrão de remissão da doença, 64% (30/47) dos animais apresentaram remissão completa, 26% (12/47) remissão parcial e 11% (5/47) ausência de resposta ao tratamento. A mediana de sobrevivência do grupo estudado foi de 24 meses.

Na análise histopatológica e imunofenotípica constatou-se linfoma linfocítico de células T como o mais prevalente, atingindo 85% dos casos (40/47); linfoma linfoblástico de células T em 4,3% dos casos (2/47) e linfoma linfoblástico de células B em 10,7% dos casos (5/47). Quanto à localização no trato digestório, o principal

local de acometimento foi o intestino delgado, em 85% (40/47) dos casos, seguido da junção íleo-ceco-cólica e cólon em 12,8% (6/47) e estômago em 2,2% (1/47). Quando consideraram-se somente os animais com linfoma de células T, a mediana de sobrevida do grupo foi de 24 meses, enquanto que para os felinos com linfoma de células B foi de 5 meses, contudo, não houve diferença na sobrevida quando compararam-se linfomas linfocítico e linfoblástico ($p=0,308$) e tampouco na comparação entre os de células T e B ($p=0,690$), provavelmente devido ao pequeno número de casos B ou linfoblásticos.

O mesmo material utilizado para o diagnóstico foi separado para as análises imunoistoquímicas realizadas no Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular (Lapmol) do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

No que diz respeito à imunoexpressão de Ki-67, 33 animais (70,2%) apresentaram baixa expressão (figura 17 – A e B), sendo que 97,2% (32/33) apresentavam o tipo linfocítico de células T e apenas um animal o tipo linfoblástico de células B. Dez animais (21,3%) apresentaram expressão moderada de Ki-67 (figura 18 - A), sendo que seis destes apresentaram linfoma linfocítico de células T, três linfoblástico de células B e um linfoblástico de células T. Apenas quatro animais (8,5%) mostraram alta expressão de Ki-67 (figura 18 – B) e destes, dois eram do tipo linfocítico de células T e dois linfoblásticos de células B.

Dos animais que apresentaram baixa expressão de Ki-67 ($<20\%$ Ki-67⁺), 80% eram do tipo linfocítico de células T, enquanto que 100% dos animais com linfoma linfoblástico de células B apresentaram imunoexpressão variando de moderada a alta (21 a 70% Ki-67⁺).

Figura 17 - Baixa expressão de Ki-67 no microambiente tumoral com infiltração linfocítica: 5% (A) e 19% (B) - São Paulo – 2016

A

B

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 18 - Moderada e alta expressão de Ki-67 no microambiente tumoral com infiltração linfocítica: 30% (A) e 68% (B) - São Paulo – 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise comparativa dos imunofenótipos pode-se constatar diferença significativa para a imunexpressão de Ki-67 ($p=0,001$) quando comparados os tipos celulares (B e T), com mediana de 47,2% e 8,5%, respectivamente, ou seja, houve maior expressão deste marcador naqueles pacientes com linfoma de células B se comparados aos de células T e o mesmo observou-se quando comparou-se o tipo histológico, linfoblástico e linfocítico, com mediana de 40,5% e 8,2%, respectivamente e $p=0,002$ (figura 19).

Figura 19 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação, dos felinos com linfoma gastrointestinal na comparação entre as formas linfoblástica e linfocítica ($p=0,002$) e entre os imunofenótipos B e T ($p=0,001$) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

No que tange às análises entre os padrões de remissão (completa, parcial ou ausência de resposta) não houve diferença significativa para Ki-67 seja considerando ausência de resposta *versus* remissão completa ($p=0,099$); remissão parcial *versus* completa ($p=0,559$) ou ausência de resposta *versus* remissão parcial ($p=0,206$). Contudo, vale salientar que a mediana do Ki-67 nos animais do grupo “ausência de resposta” foi de 30,6%, enquanto que os grupos “remissão parcial” e “remissão completa” apresentaram mediana de 8,6% e 8,4%, respectivamente.

Quanto ao índice mitótico, dois animais com linfoma linfoblástico de células B e um animal com linfoblástico de células T apresentaram alta taxa de figuras de mitose, enquanto que três animais apresentaram contagem moderada (dois eram linfoblástico de células B e um linfocítico de células T) e, na sua maioria, 41 animais (87,2%) apresentaram expressão discreta (dois linfoblásticos, sendo um de células B e o outro de células T, e 39 animais linfocíticos de células T).

Na análise de correlação entre as duas variáveis Ki-67 e índice mitótico foi constatada uma correlação positiva fraca ($r=0,291$ e $p=0,0472$).

4.5 DISCUSSÃO

Não foram encontrados estudos que avaliassem especificamente a expressão de Ki-67 e índice mitótico em felinos com linfoma gastrointestinal, bem como quanto à comparação entre os tipos histológicos e celulares e resposta terapêutica. O conhecimento de fatores prognósticos é de fundamental importância na escolha de protocolos terapêuticos, já que com base em uma avaliação prognóstica, a recomendação terapêutica permite tratamentos com a intensidade e a efetividade adequadas e até individualizadas para aquele paciente específico.

Ki-67 é uma proteína nuclear e marcador de proliferação celular frequentemente utilizado para estabelecer prognóstico em diversos tipos neoplásicos, incluindo carcinomas orais de células escamosas e mamários em gatos (YOSHIKAWA et al., 2012; SOARES et al., 2016), linfomas em humanos (LI et al., 2012; ZHOU et al., 2013; HE et al., 2014) e linfomas, cânceres perianais e mamários em cães (PHILLIPS et al., 2000; SANTOS et al., 2013; BRODZKI et al., 2012).

No presente estudo, os resultados em termos de sobrevida foram similares aos de Moore et al. (2012) e constatou-se expressão importante de Ki-67 naqueles pacientes com linfoma gastrointestinal de células B, com diferença significativa em relação aos de células T, além de baixa mediana de tempo de sobrevida dos pacientes com linfoma de células B (5 meses), significativamente menor do que os de células T (24 meses).

Tanto em humanos com linfoma (HE et al., 2014) quanto em cães e gatos com cânceres mamários (SANTOS et al., 2013; SOARES et al., 2016), a alta expressão de Ki-67 foi relacionada como fator prognóstico negativo, da mesma forma como observado neste estudo, no qual a alta expressão relacionou-se a menor resposta terapêutica (até ausência de resposta) e a curta sobrevida, entretanto, os mesmos achados não foram observados em outros estudos, como Hasselblom et al. (2008) que, estudando pessoas com linfoma linfoblástico difuso de células B, constataram que a baixa expressão de Ki-67 (<49%) foi correlacionada significativamente a menor tempo livre de progressão e de sobrevida global, independente dos fatores de riscos clínicos, sendo então a baixa expressão um importante fator prognóstico negativo, ou mesmo Jekerman et al. (2004) em um estudo também com linfomas B em que a expressão menor que 60% representou pior prognóstico em tempo livre de progressão e de sobrevida do que daqueles com Ki-67 entre 60 a 90%.

É possível que o resultado desses estudos com seres humanos associe-se ao fato de que os linfomas com baixa expressão seriam também menos sensíveis e responsivos à quimioterapia, o que difere dos achados dos gatos neste estudo já na comparação entre os tipos celulares, em que é sabido que o linfoma linfoblástico ou de células B tem pior prognóstico se comparado aos linfocíticos de células T (MOORE et al., 2012) e, mesmo sendo constatada maior taxa proliferativa, não há benefício na resposta terapêutica e, consequentemente, a sobrevida é mais curta. No caso do linfoma linfocítico de células T, mesmo com menor expressão de Ki-67, o sucesso terapêutico foi alcançado e a sobrevida foi maior em relação ao linfoblástico B.

Assim, é notável que o tipo celular é um fator determinante em termos prognósticos no linfoma gastrointestinal felino. Dois animais deste estudo que tiveram alta expressão de Ki-67 (aproximadamente 70%) e com índice mitótico baixo apresentaram tempo de sobrevida completamente diferentes, sendo um linfocítico

de células T (60 meses) e o outro linfoblástico de células B (< 1 mês). Em cães com linfoma multicêntrico, Kiupel et al. (1999) já descreviam que a imunofenotipagem era um importante marcador prognóstico para o tempo de sobrevida global, enquanto que o marcador Ki-67 foi menos útil em identificar diferenças prognósticas. Ainda assim, vale salientar que a baixa casuística dos linfomas linfoblásticos de células B (apenas 6 casos), dificultou uma avaliação mais acurada deste tipo celular.

Em estudos mais recentes, apesar de He et al. (2014) associarem a alta expressão de Ki-67 a menor tempo livre de doença e de sobrevida global em humanos com linfoma, na análise dos subgrupos não foi constatada diferença para linfoma de Hodgkin, enquanto que a alta expressão de Ki-67 foi altamente associada a um menor tempo de sobrevida global no linfoma de não Hodgkin e em seus vários subtipos, incluindo os tipos celulares T/NK, linfoblástico difuso de células B e das células do manto. Esses resultados mostram a controvérsia que existe na expressão de Ki-67 mesmo dentro de um mesmo tipo tumoral, como no caso do linfoma em humanos, sendo realmente necessários estudos nas diferentes espécies e dentro das espécies, estudos específicos para cada tipo e subtipo de neoplasia.

Quanto ao índice mitótico, alguns casos deste estudo mostraram, apesar da alta expressão de Ki-67, baixo índice mitótico, fato que pode ser atribuído provavelmente à diferença na capacidade de determinação da proliferação celular de cada método estudado, já que o índice mitótico avalia apenas células em fase M do ciclo celular, entretanto, observou-se que em 100% dos casos em que a expressão de Ki-67 foi baixa (<20%), esta foi acompanhada de baixo índice mitótico. Tal dado corrobora o descrito por Sokolowska et al. (2012) em 45 casos de cães com linfoma multicêntrico, no qual a baixa expressão de Ki-67 foi usualmente acompanhada por baixo índice mitótico, contudo, tais autores constataram importante correlação positiva entre a expressão de Ki-67 e o índice mitótico, sendo que esta correlação foi ainda mais expressiva nos linfomas de células T, enquanto neste estudo foi constatada somente uma correlação positiva fraca. Dessa forma, no que se aplica aos presentes resultados, a avaliação da imunoexpressão de Ki-67 mostrou-se superior em determinar a taxa proliferativa do linfoma gastrointestinal quando comparada ao índice mitótico, já que a correlação positiva entre tais marcadores foi fraca e o Ki-67 foi superior em determinar linfomas com alta taxa proliferativa.

No que tange ao grau histológico, Fournel-Fleury et al. (1997) demonstraram existir correlação entre a proporção de células marcadas por Ki-67 e a classificação histológica em baixo grau (<20% KI-67⁺) e alto grau (21 – 100% Ki-67⁺) em cães com linfoma e tal descrição aplica-se aos resultados deste estudo, ou seja, a alta expressão de Ki-67 foi relacionada ao linfoma de alto grau (linfoblástico) e a um menor tempo de sobrevida.

4.6 CONCLUSÃO

A expressão de Ki-67 foi uma metodologia superior para determinar o índice proliferativo se comparado ao índice mitótico, nos gatos com linfoma gastrointestinal. Maior expressão de Ki-67 foi observada naqueles animais acometidos pela forma linfoblástica ou de células B e relacionou-se a uma baixa resposta terapêutica e menor tempo de sobrevida.

REFERÊNCIAS

BRANDT, L.; JOHNSON, A.; OLSSON, H.; AKERMAN, M. Mitotic activity and survival in advanced non-Hodgkin lymphoma of unfavourable histology. **European Journal of Cancer**, v. 26, n. 3, p. 227-230, 1990.

BRODZKI, A.; LOPUSSZYNSKI, W.; BRODZKI, P.; TATARA, M. R. Diagnostic and prognostic value of cellular proliferation assessment with ki-67 protein in dogs suffering from benign and malignant perianal tumors. **Folia Biologica, (Krakow)**, v. 62, n. 3, p. 235-241, 2012. doi: 10.3409/fb62_3.235

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; CHABANNE, L. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression. Of the ki-67 antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 61–72, 1997.

FU, D.R.; KATO, D.; ENDO, Y.; KADOSAWA, T. Apoptosis and Ki-67 as predictive factors for response to radiation therapy in feline nasal lymphomas. **Journal of Veterinary Medicine and Sciences**, v. 78, n. 7, p. 1161–1166, 2016.

HASSELBLOM, S.; RIDELL, B.; SIGURDARDOTTIR, M.; HANSSON, U.; NILSSON-EHLE, H.; ANDERSSON, P. O. Low rather than high ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 49, n. 8, p. 1501–1509, 2008.

HAYES, A. Feline lymphoma – principles of diagnosis and management. **In practice**, v. 28, p. 516–524, 2006.

HE, X.; CHEN, Z.; FU, T.; JIN, X.; YU, T.; LIANG, Y.; ZHAO, X.; HUANG, L. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 14, p. 1-13, 2014.

JERKEMAN, M.; ANDERSON, H.; DICTOR, M.; KVALOY, S.; AKERMAN, M.; CAVALLIN-STAHN, E. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma – a Nordic Lymphoma Group Study. **Annals of Hematology**, v. 83, p. 414–419, 2004.

KISELOW, M. A.; RASSNICK, K. M.; MCDONOUGH, S. P. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995 – 2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 405–410, 2008.

KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 292–300, 1999.

LI, Z. M.; HUANG, J. J.; XIA, Y.; ZHU, Y. J.; ZHAO, W.; WEI, W. X.; JIANG, W. Q.; LIN, T. Y.; HUANG, H. Q.; GUAN, Z. Z. High ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. **European Journal of Haematology**, v. 88, p. 510-517, 2012.

LV, J.; DAI, B.; KONG, Y.; SHEN, X.; KONG, J. Acral melanoma in chinese: a clinicopathological and prognostic study of 142 cases. **Nature**, v. 6, p. 1–9, 2016.

MOORE, P. F.; RODRIGUES-BERTOS, A.; KASS, P. H. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype and molecular clonality. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 658-668, 2012.

NAKANO, T.; OKA, K. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population. **Cancer**, v. 72, n. 8, p. 2401-2408, 1993.

PHILLIPS, B. S.; KASS, P. H.; NAYDAN, D. K.; WINTHROP, M. N.; GRIFFEY, S. M.; MADEWELL, B. R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 12, p. 111-117, 2000.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIM, F. G.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2013.

SOARES, M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, S.; PELETEIRO, M.; CORREIA, J.; FERREIRA, F. Ki-67 as a prognostic factor in feline mammary carcinoma: what is the optimal cutoff value? **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 37-43, 2016. doi: 10.1177/0300985815588606.

SOKOLOWSKA, J.; MICUN, J.; MALICKA, E.; LECHOWSKI, R. Proliferation activity in canine lymphomas. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 4, p. 727–734, 2012.

SUZUKI, Y.; OKA, K.; OHNO, T.; KATO, S.; TSUJII, H.; NAKANO, T. Prognostic impact of mitotic index of proliferation cell populations in cervical cancer patients treated with carbon ion beam. **Cancer**, v. 115, p. 1875–1882, 2009.

VAIL, D. M.; MICHELS, G. M.; KHANNA, C.; SELTING, K. A.; LONDON, C. A. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) – a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus group. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 28–37, 2009.

VAIL, D. M. Feline Lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. p. 638-653, cap. 32.

VALLI, V. E.; KASS, P. H.; MYINT, M. S.; SCOTT, F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic index and treatment with survival. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 5, p. 738–748, 2013.

YOSHIKAWA, H.; EHRHART, E. J.; CHARLES, J. B.; THAMM, D. H.; LARUE, S. M. Immunohistochemical characterization of feline oral squamous cell carcinoma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 11, p. 1801-06, 2012.

ZHOU, Y.; ZHAO, Y.; BO, J.; MA, C.; SHI, Y. N. Expression and clinical significance of ki-67 in diffuse large B cell lymphoma. **Zhongguo Shi Yan**, v. 21, n. 5, p. 1162-1166, 2013.

CAPÍTULO 3

MARCADOR NUCLEAR DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS – FOXP3, EM FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL

5 MARCADOR NUCLEAR DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS - FOXP3, EM FELINOS COM LINFOMA GASTROINTESTINAL

RESUMO

FOXP3 é um fator de transcrição da família *forkhead*, implicado na regulação, ativação e diferenciação de células T regulatórias e pode estar envolvido na progressão e agressividade tumoral, sendo considerado o melhor marcador protéico de células T regulatórias. Já, o linfoma gastrointestinal é a principal neoplasia hematopoiética na espécie felina. O objetivo deste estudo foi investigar as células positivas para FOXP3 no linfoma gastrointestinal felino, por meio de imunistoquímica, e averiguar a relação deste marcador com a resposta terapêutica e o tempo de sobrevida global. O estudo foi realizado em 47 amostras de gatos com linfoma gastrointestinal utilizando os anticorpos CD3 e PAX5 para imunofenotipagem, e o clone 157B/F4 do anticorpo FOXP3. Para a análise, 1.000 linfócitos infiltrados no intestino foram avaliados no microambiente tumoral e considerou-se o resultado como positivo quando detectou-se ao menos 10% de células marcadas. Para análise estatística foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Dos 47 animais, verificou-se linfoma de células T em 89% dos casos e de células B em 11%. A mediana do tempo de sobrevida foi de 24 e 5 meses, respectivamente. Apenas três animais foram positivos para FOXP3 (dois de células T e um de células B). Um dos gatos com linfoma de células T mostrou expressão moderada de FOXP3 e teve sobrevida longa, entretanto, outros três animais com linfoma de células T e negativos para FOXP3 tiveram sobrevida semelhante. O gato com linfoma de células B teve expressão de 12,9% e sobrevida curta e, provavelmente, relacionou-se esta sobrevida ao tipo celular e não à expressão de FOXP3. Em conclusão, os dados sugerem que a expressão FOXP3 não esteve relacionada à sobrevida global e a resposta terapêutica em pacientes com linfoma gastrointestinal de células B e T.

ABSTRACT

FOXP3 is a forkhead family transcription factor implicated in the regulation, activation and differentiation of regulatory T cells and may be involved in tumor progression and aggressiveness, being considered the best protein marker of regulatory T cells. Gastrointestinal lymphoma is the main hematopoietic neoplasms in feline species. The aim of this study was to investigate the positive cells in FOXP3 feline gastrointestinal lymphoma by immunohistochemistry and to examine the association of this marker with therapeutic response and overall survival time. The study was performed on 47 samples of cats with gastrointestinal lymphoma using PAX5 and CD3 antibodies to immunophenotyping and clone 157B / F4 FOXP3 antibody. For the analysis, 1,000 infiltrating lymphocytes in tumor microenvironment were analyzed and the result was considered positive when found at least 10% of labeled cells. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test. Considering all animals, there was 89% T-cell lymphoma and 11% B cells. The median survival time was 24 and 5 months, respectively. Only three animals were positive for FOXP3 (two of T-cell and one of B-cell). One of the cats with T-cell lymphoma showed moderate expression of FOXP3 with a long survival time; however, three other animals with T-cell lymphoma and negative for FOXP3 had similar survival. The cat with B-cell lymphoma had 12.9% of labelled cells and shorter survival time and it was probably related to the cell-type and not with FOXP3 expression. In conclusion, the data suggest that FOXP3 expression was not related to overall survival and response to therapy in patients with B and T-cell gastrointestinal lymphoma.

5.1 INTRODUÇÃO

O desequilíbrio no sistema imune é uma das principais alterações que pode facilitar a ocorrência e a disseminação das neoplasias e, consequentemente, contribuir para o insucesso no tratamento quimioterápico, cabendo aos linfócitos a atividade de combater as células em transformação maligna (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Dentre os linfócitos, as células T com função regulatória (Treg) são componentes fundamentais de tolerância imunológica, sendo objeto de pesquisas

sobre sua função fisiológica e participação em diversas enfermidades, como doenças infecciosas, alérgicas, neoplásicas, autoimunes e no campo da imunologia dos transplantes (CRUVINEL et al., 2008).

O fator de transcrição nuclear FOXP3 é um membro da subfamília P das proteínas FOX, composto por três domínios (repressor, central e ligante de DNA ou *forkhead*), sendo no domínio *forkhead* identificadas a maioria das mutações que afetam o gene FOXP3 (SAKAGUCHI, 2005; CAMPBELL; ZIEGLER, 2007). O fator FOXP3 medeia o controle da produção de Tregs a partir de células T *naïve* e, a partir de sua ação, as células T adquirem características que as tornam anérgicas e supressoras, além de produzir citocinas ligadas a estas atividades (SAKAGUCHI, 2005).

As células Treg são representadas por linfócitos T CD4+CD25+, sendo que as células TCD4+ recém ativadas não regulatórias também expressam CD25, entretanto, a expressão do fator FOXP3 é uma característica das células T CD4+CD25+ regulatórias, embora nem todas as Treg o expressem. FOXP3 mostrou-se superior a GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor*) e CTLA (*cytotoxic-T lymphocyte antigen*) como marcador de Tregs e, dessa forma, passou a ser considerado o melhor marcador proteico para identificação dessas células (BANHAM et al., 2009).

Segundo Banham et al. (2009), FOXP3 apresenta homologia de mais de 90% em mamíferos e pode ser identificado em várias espécies a partir de um anticorpo anti-FOXP3 murino, sendo o clone 157B/F4 o de melhor resultado de expressão em várias espécies, incluindo os felinos. Na espécie felina, Lankford et al. (2009) detectaram um clone felino de FOXP3 por meio de RT-PCR e reação cruzada com dois anticorpos anti-FOXP3 humano e de rato, analisados por imunistoquímica de células HEK293 transfectadas com FOXP3, confirmando a localização nuclear desta proteína.

Em medicina humana, estudos sugerem que o aumento na atividade das Tregs associa-se a prejuízos na imunidade antitumoral, havendo co-estimulação deficiente das células T CD4+ sobre as células CD8+, bem como alteração na citotoxicidade mediada por células NK contra antígenos tumorais (TAAMS et al., 2006; MELO; CARVALHO, 2009). O aumento do número de células Tregs tem sido verificado em pacientes humanos com câncer de pulmão, pâncreas, mama, fígado e de pele, tanto no sangue periférico quanto no microambiente tumoral (TAAMS et al., 2006). Um

estudo em mulheres com carcinoma ovariano demonstrou que a elevada presença de Tregs representa um mecanismo pelo qual os tumores podem obter privilégio imunológico, estando inversamente relacionado com o tempo de sobrevida (CURIEL et al., 2004). Além disso, pessoas com mutações no gene FOXP3 podem desenvolver forte ativação do sistema imune levando a uma gama de lesões orgânicas autoimunes, doença intestinal inflamatória e alergias, por exemplo.

Em linfoma cutâneo linfoblástico de células B, Felcht et al. (2012) referiram que o elevado número de Tregs, representadas pela expressão de FOXP3 no microambiente tumoral, foi considerado como fator prognóstico positivo, enquanto que Alvaro et al. (2005) observaram que a baixa expressão de FOXP3 associado à alta expressão de linfócitos T citotóxicos influenciou negativamente o tempo de sobrevida livre de doença em pacientes humanos com linfoma de Hodgkin.

Em medicina veterinária, Biller et al. (2007) verificaram que o número de Tregs foi significativamente maior no sangue periférico de cães com neoplasia e a mesma pesquisadora em 2010 concluiu que cães com osteossarcoma e baixa proporção Treg/CD8 em sangue periférico apresentaram menor tempo de sobrevida quando comparados a animais com proporções mais elevadas (BILLER et al., 2010). Também em cães, com linfoma multicêntrico, Munhoz (2013), por meio de FOXP3, verificou aumento de Treg em sangue periférico, quando comparado a cães saudáveis.

O linfoma gastrointestinal felino representa a principal forma anatômica diagnosticada na espécie, em cerca de 50% dos casos (VAIL, 2013). O diagnóstico é estabelecido por biópsia intestinal, histopatológico e análise imunoistoquímica, sendo a forma celular linfocítica ou de pequenas células e de imunofenótipo T a mais frequente, afetando principalmente o intestino delgado (MOORE et al., 2012). O tratamento indicado é a quimioterapia antineoplásica, sendo necessário, em poucos casos, a remoção cirúrgica de massa intestinal, frequentemente associado à forma mais agressiva e menos frequente da doença, a linfoblástica de células B (LINGARD et al., 2009). O prognóstico é bastante variável, na dependência da forma e tipo celular envolvidos (MOORE et al., 2012).

Apesar de vários estudos sobre as Treg terem sido realizados, não existem estudos na espécie felina que avaliem a imunoexpressão de FOXP3 em linfoma gastrointestinal, assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a imunoexpressão de FOXP3 nesses linfomas e correlacioná-la com a resposta

terapêutica e sobrevida global, uma vez que a identificação da presença de células Treg nesses animais poderia auxiliar a melhor caracterização do comportamento biológico e evolução clínica da doença, além de sugerir fatores de risco que poderiam ser importantes na recomendação de protocolos terapêuticos para esses gatos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da referida Instituição. O projeto também recebeu doação de material de uma clínica particular especializada no atendimento de felinos (Vetmasters – São Paulo/SP).

Foram estudadas as amostras provenientes de 47 animais da espécie felina com linfoma gastrointestinal, não havendo restrições sexuais, etárias ou raciais.

Os 50 animais atendidos foram submetidos a exame físico e material biológico foi colhido para as análises laboratoriais de rotina (hemograma, avaliação laboratorial de fígado e rins), incluindo os testes sorológicos para FIV/FelV, por meio do kit comercial ELISA (Snap® FIV / FeLV Combo Test IDEXX). Três animais foram excluídos do estudo por terem vindo a óbito em consequência a complicações de infecção pelo FeLV.

A confirmação do diagnóstico de linfoma gastrointestinal foi realizada por meio de exame histopatológico de material colhido por biópsia e o mesmo material foi utilizado para as análises imunoistoquímicas realizadas no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da mesma FMVZ/USP. Para imunofenotipagem utilizaram-se os anticorpos monoclonal mouse anti-PAX5 (1:500; Clone 24; Invitrogen, Life Technologies, New York, USA) e policlonal rabbit anti-CD3 (1:2.000; DAKO; Carpinteria, CA, USA).

Na análise específica da imunoexpressão de FOXP3 foi utilizado o clone 157B/F4 produzido no Nuffield Division of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, United Kingdom. Após padronização, o anticorpo foi utilizado em diluição 1:2 (figura 20), em diluente de anticorpo - DAKO, Carpinteria, CA, USA. Após o procedimento de desparafinização e do desmascaramento, realizou-se o bloqueio da

peroxidase endógena e, então, incubou-se o anticorpo por 30 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, a detecção foi feita utilizando-se o sistema DAKO EnVision com horseradish peroxidase (HRP) e diaminobenzidina (DAB), como descrito pelo fabricante (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), seguido de coloração com hematoxilina, desidratação e montagem das lâminas. A análise foi feita pela contagem de 1.000 linfócitos infiltrados no microambiente tumoral (figura 21) por meio de fotos das lâminas em aumento de 40 vezes, e a expressão foi considerada como positivo quando encontradas, ao menos, 10% de células marcadas (BANHAM, 2015 - comunicação pessoal).

Figura 20 - Imunoexpressão de FOXP3 em linfonodo de gato como controle negativo (A) e positivo (B) da reação (aumentos de 40X) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V.M., 2016)

Figura 21 - Imunoexpressão de FOXP3 em tecido intestinal de felinos com linfoma gastrointestinal: negativo (A) e positivo (B) (aumentos de 40X) - São Paulo – 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Os animais do grupo estudado foram tratados com clorambucil e prednisolona associado ou não ao sulfato de vincristina ou à L-asparaginase e foram

avaliados mensalmente através de histórico clínico, exame físico, exames laboratoriais (hemograma, perfis renal e hepático) e ultrassonografia abdominal para determinar o estado de remissão da neoplasia (se completa, parcial ou ausência de resposta) durante os seis primeiros meses. Após esse período, o tempo de reavaliação aumentou para cada dois meses, sendo realizados os mesmos procedimentos.

Avaliação da resposta terapêutica (KISELOW et al., 2008; VAIL et al., 2009):

→ remissão completa: 100% de resolução dos sintomas por mais de 30 dias e normalização da avaliação dos intestinos e linfonodos mesentéricos pela ultrassonografia abdominal;

→ remissão parcial: melhora de mais de 50% dos sintomas e das alterações ultrassonográficas dos intestinos e linfonodos mesentéricos por mais de 30 dias;

→ ausência de resposta: ausência de melhora ou melhora de menos de 50% dos sintomas e não manutenção das alterações ou progressão da doença avaliada por ultrassonografia.

Para análise do tempo de sobrevida dos gatos, considerou-se o período compreendido entre o momento do diagnóstico até o óbito do animal.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos e semi-contínuos das variáveis foram determinados como não paramétricos pelo teste Kolmogorov- Smirnov e pelo teste de Shapiro-Wilks e por isso puderam ser representados por mediana e percentis 25 e 75.

Para comparação de dois grupos independentes foi utilizado o Teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni e, quando comparado três ou mais grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com a correção de Bonferroni.

Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5%.

5.4 RESULTADOS

Dos 47 animais estudados, 61,7% eram machos (29/47), sendo 87,2% (41/47) felinos sem raça definida (SRD), com mediana de idade de 12 anos. No que diz respeito ao padrão de remissão, 64% (30/47) dos animais apresentaram remissão completa da doença, 26% (12/47) remissão parcial e 11% (5/47) ausência de resposta ao tratamento. A mediana de sobrevida do grupo estudado foi de 24 meses.

Na análise histopatológica e imunofenotípica constatou-se linfoma linfocítico de células T como o mais prevalente em 85% dos casos (40/47), linfoma linfoblástico de células T em 4,3% dos casos (2/47), linfoma linfocítico de células B em 2,2% dos casos (1/47) e linfoma linfoblástico de células B em 8,5% dos casos (4/47). Quando consideraram-se somente os animais com linfoma de células T, a mediana de sobrevida do grupo foi de 24 meses, enquanto que para os felinos com linfoma de células B foi de 5 meses, contudo, não houve diferença na sobrevida quando compararam-se linfomas linfocítico e linfoblástico ($p=0,308$) e tampouco na comparação entre os de células T e B ($p=0,690$).

Na comparação entre os felinos com a forma linfoblástica em relação à linfocítica, não houve diferença significativa na imunoexpressão de FOXP3 ($p=0,315$), bem como na comparação entre os imunofenótipos B e T ($p=0,300$) (figura 22).

Figura 22 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação dos felinos com linfoma gastrointestinal na comparação entre as formas linfoblástica e linfocítica ($p=0,315$) e entre os imunofenótipos B e T ($p=0,300$) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

No que tange às análises entre os padrões de remissão (completa, parcial ou ausência de resposta), também não houve diferença significativa para FOXP3 (ausência de resposta *versus* remissão completa $p=0,741$; remissão parcial *versus* completa $p=0,337$; ausência de resposta *versus* remissão parcial $p=0,635$).

Considerando apenas os felinos com a forma linfocítica de células T, na análise de sobrevida (maior que 30 meses; $n=9$) *versus* óbito (até 30 meses; $n=31$), não houve diferença significativa de FOXP3 ($p=0,408$), bem como na análise do padrão de remissão parcial ($n=12$) *versus* completa ($n=27$) deste mesmo grupo ($p=0,102$).

Na análise individual dos animais constatou-se que apenas três animais foram positivos para FOXP3 (porcentagem de células marcadas superior a 10%) dos quais dois tinham linfoma linfocítico de célula T e um linfoblástico de células B. Um dos gatos com linfoma linfocítico de células T mostrou expressão moderada de FOXP3 (38,9%), remissão completa e sobrevida de 50 meses, enquanto que outros três animais com FOXP3 com baixíssima expressão, considerados negativos, tiveram sobrevida semelhante e remissão completa. O gato com linfoma linfoblástico de células B expressou 12,9% de células marcadas, remissão completa e sobrevida de 5 meses. Por fim, o outro gato com linfoma linfocítico de células T expressou FOXP3 em 10,7% das células, apresentou remissão completa e sobrevida de 28 meses.

5.5 DISCUSSÃO

Os casos de linfoma gastrointestinal na espécie felina são diagnosticados frequentemente na rotina clínica e, embora de modo geral tenham prognóstico favorável em relação ao tempo de sobrevida, não se tem informações sobre como a resposta imune pode interferir na resposta do animal ao tratamento e na evolução da doença.

Neste estudo observou-se marcação de FOXP3 em gatos com linfoma gastrointestinal variando de 0,5 a 38,9%, sendo essa marcação observada em linfócitos Tregs infiltrados no microambiente tumoral, como linfócitos reativos e sem marcação em células neoplásicas, o que concorda com resultados de pesquisas em

seres humanos com linfoma, nas quais se observa mais comumente a infiltração de células no microambiente (RONCADOR et al., 2005).

Felcht et al. (2012) referiram que o elevado número de Tregs no microambiente do linfoma representadas pela expressão de FOXP3 foi considerado como fator prognóstico positivo em pacientes com linfoma cutâneo linfoblástico de células B, enquanto que Alvaro et al. (2005) observaram que a baixa expressão de FOXP3 associado à alta expressão de linfócito T citotóxico representado pela TIA-1 (*antígeno intracelular de célula T*) esteve associado a um fator prognóstico independente, que influencia negativamente o tempo de sobrevida livre de doença em pacientes humanos com linfoma cutâneo de Hodgkin.

Rocandor et al. (2005) avaliaram, por imunistoquímica, a expressão de FOXP3 em 172 amostras de tonsila/linfonodo de pessoas com linfoma e leucemia de células T do adulto (ATL), em tecido parafinado e constataram somente marcação em células T reativas no microambiente tumoral, sendo que as células marcadas variaram desde praticamente ausentes no linfoma de Burkitt, a um infiltrado evidente no linfoma folicular, enquanto que na população neoplásica não houve marcação, e este achado concorda com o que foi observado nos felinos. Já na ATL a expressão em células tumorais foi evidenciada em 68% dos casos.

No que diz respeito à sobrevida, em um estudo com mulheres com carcinoma ovariano, a elevada presença de células T regulatórias no microambiente tumoral foi preditor de pior sobrevida (CURIEL et al., 2004), enquanto que, no linfoma de Hodgkin (ALVARO et al., 2005), assim como no linfoma folicular (CARRERAS et al., 2006), foi associada a um melhor prognóstico, oposto ao observado por Roncador et al. (2005) na ATL, em que os casos de alta expressão de FOXP3 tiveram pior prognóstico.

Em humanos, estudos (TAAMS et al., 2006; MELO; CARVALHO, 2009) sugerem que o aumento na atividade das Tregs associa-se a um prejuízo na resposta antitumoral, sendo este um mecanismo com o qual as neoplasias podem obter um privilégio imunológico, estando inversamente relacionado com o tempo de sobrevida. Do mesmo modo, em cadelas com neoplasias mamárias (KIM et al., 2012), a elevada expressão de FOXP3 esteve associada com grau histológico, invasão linfática e necrose, sugerindo que as células Tregs desempenham um papel crucial na progressão tumoral por meio da supressão do sistema imune e da atividade anti-tumoral, sendo considerado um fator prognóstico potencial nestes pacientes.

Esses resultados demonstram que existe variação na expressão de FOXP3 e na interpretação dessa expressão nas diversas neoplasias e que, muito provavelmente as análises devem ser feitas para cada tipo de neoplasia. No que tange aos resultados observados neste estudo, a positividade de FOXP3 no linfoma gastrointestinal foi baixa e não houve diferença estatística nas variáveis analisadas, portanto, a expressão não esteve associada a prejuízo na resposta terapêutica destes animais.

Mesmo o felino que expressou FOXP3 moderadamente (38,9% das células positivas) apresentou longo tempo de sobrevida (50 meses) e mesmo assim não se pode considerar este um fator prognóstico positivo, como descrito por Felcht et al. (2012) em humanos com linfoma cutâneo, já que outros três animais tiveram sobrevida superior a 48 meses e não expressaram FOXP3 pelos critérios estabelecidos. Nesse sentido, uma série maior de casos poderia permitir esclarecimentos sobre esse aspecto.

Dos seis gatos com linfoma linfoblástico apenas um expressou FOXP3 (12,9%) e teve sobrevida de 5 meses e, muito que provavelmente, o menor tempo de sobrevida esteve relacionado ao tipo celular do linfoma e não à expressão de FOXP3. Dos cinco pacientes com linfoma de células B todos foram considerados negativos.

De modo geral, a imunoexpressão de FOXP3 não esteve relacionada ao tempo de sobrevida e à resposta terapêutica naqueles pacientes com linfomas linfoblástico ou linfocítico, tampouco nos de células B e T. Em humanos com linfoma/leucemia de células T (KARUBE et al., 2004; KE et al., 2008), os autores observaram elevada expressão de FOXP3 naqueles pacientes em estado de imunossupressão, porém isso esteve associado a quadros de infecção severa e não à agressividade tumoral, uma vez que não houve diferença no estadiamento clínico e no tempo de sobrevida entre os FOXP3+ e FOXP3-.

De qualquer forma, é importante ressaltar que a baixa expressão de FOXP3 pode refletir realmente o que acontece no microambiente tumoral ou ainda, em se tratando de uma neoplasia linfoide, as próprias T regs poderiam sofrer transformação maligna que levariam a mudanças na expressão de FOXP3. No momento, é incerto se esse mecanismo existe ou não mas, considerando a importância dessas células, talvez fosse interessante utilizar outros marcadores em um perfil para avaliar as Tregs, para confirmar ou excluir como Tregs, as células FOXP3- .

5.6 CONCLUSÃO

Foi detectada a expressão de FOXP3 no microambiente tumoral em felinos com linfoma gastrointestinal de células T e B e essa expressão não teve relação com a resposta terapêutica e tempo de sobrevida global.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 576 p.

ALVARO, T.; LEJEUNE, M.; SALVADO, M. T.; BOSCH, R.; GARCIA, J. F.; JAEN, J.; BANHAM, A. H.; RONCADOR, G.; MONTALBAN, C.; PIRIS, M. A. Outcome in Hodgkin's Lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and Regulatory T cells. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 1467-1473, 2005.

BANHAM, A. H.; LYNE, L.; SCASE, T. J.; BLACKLAWS, B. A. Monoclonal antibodies raised to the human FOXP3 protein can be used effectively for detecting FoxP3 T Cell in other mammalian species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 376-381, 2009.

BILLER, B. J.; ELMSLIE, R. E.; BURNETT, R. C.; AVERY, A. C.; DOW, S. W. Use of Foxp3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 69-78, 2007.

BILLER, B. J.; GUTH, A.; BURTON, J. H. Decreased ratio of CD8/Tcelss to regulatory t cells associated to decreased survival in dogs with osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, p. 1118-1123, 2010.

CAMPBELL, D. J.; ZIEGLER, S. E. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nature reviews – Immunology**, v.7, p. 305–310, 2007.

CARRERAS, J.; GUILLERMO, A. L.; FOX, B. C.; COLOMO, L.; MARTINEZ, A.; RONCADOR, G.; MONTSERRAT, E.; CAMPO, E.; BANHAM, A. H. High number of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2957–2964, 2006.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D.; ARAUJO, J. A.; SALMAZI, K. C.; KALLAS, E. G.; ANDRADE, L. E. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 342-55, 2008.

CURIEL, T. J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature Medicine**, v. 10, n. 9, p. 942-949, 2004.

FELCHT, M.; HECK, M.; WEISS, C.; BECKER, J.C.; DIPPEL, E.; MULLER, C. S. L.; NASHAN, D. Expression of the T-cell regulatory marker FOXP3 in primary cutaneous large B-cell lymphoma tumour cells. **British Journal of Dermatology**, v. 167, p. 348-358, 2012.

KARUBE, K.; OHSHIMA, K.; TSUCHIYA, T.; YAMAGUCHI, T.; KAWANO, R.; SUZUMIYA, J.; UTSUNOMIYA, A.; HARADA, M.; KIKUCHI, M. Expression of Foxp3, a key molecule in CD4+CD25+ regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. **British Journal of Haematology**, v. 126, p. 81-84, 2004.

KE, X.; WANG, J.; LI, L.; CHEN, I. H.; WANG, H.; YANG, X. F. Roles of CD4+CD25^{high}FOXP3+ Tregs in lymphomas and tumors complex. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 3986-4001, 2008.

KIM, J. H.; HUR, J. H.; LEE, S. M.; IM, K. S.; KIM, N. H.; SUR, J. H. Correlation of FOXP3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 222-227, 2012.

KISELOW, M. A.; RASSNICK, K. M.; MCDONOUGH, S. P. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995 – 2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 405–410, 2008.

LANKFORD, S.; PETTY, C.; LAVOY, A.; RECKLING, S.; TOMPKINS, W.; DEAN, G.A. Cloning of feline FOXP3 and detection of expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, p. 159 – 166, 2009.

LINGARD, A. E.; BRISCOE, K.; BEATTY, J. A. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 692–700, 2009.

MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. **Revista brasileira de alergologia e imunopatologia**, v. 32, n. 5, p. 184–188, 2009.

MOORE, P. F.; RODRIGUES-BERTOS, A.; KASS, P. H. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype and molecular clonality. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 658-668, 2012.

MUNHOZ, T. D. **Células T reguladoras em cães com linfoma multicêntrico: quantificação, em sangue periférico, no momento do diagnóstico e após a etapa inicial do tratamento quimioterápico** 2013. 45 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

RONCADOR, G.; GARCIA, J. F.; MAESTRE, L.; LUCAS, E.; MENARGUEZ, J.; OHSHIMA, K.; NAKAMURA, S.; BANHAM, A. H.; PIRIS, M. A. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia / lymphoma. **Leukemia**, v. 19, p. 2247–2253, 2005.

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

TAAMS, L. S.; PALMER, D. B.; AKBAR, A. N.; BROWN, Z.; HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells in human diseases and their potential for therapeutic manipulation. **Immunology**, v. 118, p. 1–9, 2006.

VAIL, D. M.; MICHELS, G. M.; KHANNA, C.; SELTING, K. A.; LONDON, C. A. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) – a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus group. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 28–37, 2009.

VAIL, D. M. Feline Lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. cap. 32, p. 638-653.

CAPÍTULO 4

IMUNOEXPRESSÃO DE CD8, CD25 (IL-2R), IL-17A E FOXP3 EM FELINOS COM LINFOMA INTESTINAL LINFOCÍTICO DE CÉLULAS T

6 IMUNOEXPRESSÃO DE CD8, CD25 (IL-2R), IL-17A E FOXP3 EM FELINOS COM LINFOMA INTESTINAL LINFOCÍTICO DE CÉLULAS T

RESUMO

O linfoma intestinal linfocítico de células T representa a principal forma anatômica e celular de linfoma em gatos, sendo o prognóstico favorável quanto à resposta terapêutica para a maioria dos animais, contudo, sabe-se que, de modo geral, alterações na função do sistema imune podem levar à progressão e comprometimento da resposta à neoplasia. Para equilibrar a atividade do sistema imune, as células com função regulatória (Tregs), linfócitos T CD4⁺CD25⁺ que expressam FOXP3, são fundamentais e por isso, alvo de diversas pesquisas isoladamente ou associadas a outros marcadores, como a IL-17A e o CD8. A relação FOXP3/Th17 é importante uma vez que alterações nessa relação podem levar à supressão na produção de linfócitos T CD8. A IL-2 por sua vez, tem importante papel na regulação do sistema imune adaptativo e também no controle de sobrevivência e proliferação de Tregs. Com essas considerações, o objetivo deste estudo foi avaliar a imunoexpressão de CD8, IL-2R (CD25), IL-17A e FOXP3 em felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T e averiguar uma possível correlação entre a sobrevida global e a relação CD8/IL-17A e FOXP3/IL-17A. Foram realizadas análises imunoistoquímicas em 40 amostras de intestino de gatos com linfoma linfocítico utilizando os anticorpos anti CD3, PAX5, CD8, IL-2R, IL-17A e FOXP3. Para análise estatística foram utilizados os testes de Mann-Whitney, correlação de Spearman e a curva de Kaplan-Meyer. Dentre os animais que expressaram FOXP3, considerando como positivos aqueles animais com mais de 10% de células marcadas, apenas dois animais foram positivos (5%). Com relação à imunoexpressão da IL-17A, 25% dos animais apresentaram expressão moderada (grau 2) e 15% expressão elevada (grau 3). No que diz respeito ao marcador de CD8, 37,5% dos animais tiveram expressão maior que 51% de células marcadas. Por fim, a IL-2R não apresentou marcação no grupo estudado. Na análise de sobrevida (maior que 30 meses; n=9) *versus* óbito (até 30 meses; n=31) não houve diferença em relação a CD8 (p=0,357), IL-17A (p=0,475) e FOXP3 (p=0,428).

Considerando a análise de remissão como parcial (n=12) *versus* completa (n=27), constatou-se diferença significativa quanto à sobrevida ($p < 0,0001$) e CD8 ($p = 0,015$). Não houve diferença para IL-17A ($p = 0,138$) e FOXP3 ($p = 0,102$). No que tange a análise de correlação, não houve correlação entre a imunoexpressão de FOXP3/IL-17A ($p = 0,773$ e $r = -0,05$) e FOXP3/CD8 ($p = 0,172$ e $r = 0,27$). Em conclusão, felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T apresentaram baixa expressão de FOXP3 no microambiente tumoral, representando infiltração de pequena quantidade de Tregs, o que não impactou na resposta terapêutica e na sobrevida destes animais. Detectou-se também a expressão de IL-17A e CD8, contudo não houve correlação que pudesse indicar uma regulação inversa entre tais marcadores, seja entre FOXP3 e CD8 ou FOXP3 e IL-17A. A menor expressão de CD8 relacionou-se a remissão completa, bem como maior tempo de sobrevida.

ABSTRACT

Intestinal lymphocytic T-cell lymphoma is the principal anatomical form and cell-type in cats with lymphoma and usually has a good therapeutic response and prognosis for most animals. However, it is known that changes in the immune system function can lead to progression and compromise response to cancer. To balance the activity of immune system, cells with regulatory function (Tregs), T cells that expressed $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, are essential and therefore the target of various researches alone or in combination with other markers, such as IL-17A and CD8. The relation of FOXP3/Th17 is important since changes can lead to suppressed production of CD8+ T lymphocytes. The IL-2 plays an important role in the regulation of adaptive immune system and also to control proliferation and survival of Tregs cells. With these considerations, the aim of this study was to determine the expression of CD8, IL-2R (CD25), IL-17A and FOXP3 in cats with intestinal lymphocytic T-cell lymphoma and determine a possible correlation between overall survival and FOXP3/CD8 e FOXP3/IL-17A ratio. Immunohistochemical analyzes were performed on 40 samples of cats with intestinal lymphocytic T-cell lymphoma using antibodies to CD3, PAX5, CD8, IL-2R, IL-17A and FOXP3. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test, Spearman correlation and Kaplan-Meyer curve. Among the animals

that expressed FOXP3, considering positive those animals with more than 10% of labeled cells, only two animals were positive. In relation to immunoreactivity of IL-17A, 25% of the animals showed moderate expression (grade 2) and 15% high expression (grade 3). Regarding the CD8 marker, 37,5% of the animals had higher expression (>51% of labeled cells). Finally, IL-2R did not show labeling in the study group. In survival analysis (> 30 months; n=9) versus death (up to 30 months; n=31) there was no difference in relation to CD8 ($p=0.357$), IL-17A ($p=0.475$) and FOXP3 ($p=0.428$). There was a significant difference in survival time ($p < 0.0001$) and CD8 expression ($p=0.015$) considering partial ($n = 12$) versus complete remission ($n = 27$). No difference was observed for IL-17A ($p=0.138$) and FOXP3 ($p=0.102$). Regarding correlation analysis, there was no correlation between the immunoreactivity of FOXP3/IL-17A ($p = 0.773$ and $r = -0.05$) and FOXP3/CD8 ($p = 0.172$ and $r = 0.27$). In conclusion, cats with intestinal lymphocytic T-cell lymphoma showed low FOXP3 expression in the tumor microenvironment. IL17-A and CD8 expression were found, however no correlate was seen between FOXP3/CD8 and FOXP3/IL-17A. Regarding the remission, complete remission and longer survival time are related to animals with low CD8 expression.

6.1 INTRODUÇÃO

Na espécie felina, o linfoma intestinal linfocítico de células T representa a principal forma anatômica e celular da doença, responsável por mais de 80% dos casos de linfoma intestinal (RECHE et al., 2010; MOORE et al., 2011). O diagnóstico é feito com base nas análises histopatológica e imunofenotípica, sendo necessário, em alguns casos, a realização do teste de clonalidade para confirmação do diagnóstico (VAIL, 2013). A resposta terapêutica costuma ser satisfatória, com sobrevida mediana em torno de 24 meses, contudo, alguns casos podem evoluir desfavoravelmente, com insucesso ao tratamento, o que impacta diretamente no tempo de sobrevida destes pacientes (STEIN et al., 2010; MOORE et al., 2011).

Sabe-se que, de modo geral, alterações na atividade do sistema imune podem levar à progressão dos cânceres e ao desenvolvimento de metástases, e que as células T com função regulatória (Tregs) são fundamentais nesse processo, por

isso, essas células têm sido alvo de pesquisas relacionadas à sua função fisiológica e participação na evolução de diversas enfermidades (KE et al., 2008). As células Tregs são caracterizadas como CD4+CD25+FOXP3+ e representam aproximadamente 10% das CD4+ periféricas em indivíduos saudáveis (SAKAGUCHI, 2005), sendo sua principal função manter o balanço entre tolerância e imunidade e regular negativamente as respostas autoimune e antitumoral, garantindo a atuação dos mecanismos de supressão por meio da secreção de citocinas imunossupressoras, como a IL-10 (CRUVINEL et al., 2008; KE et al., 2014).

A mutação de FOXP3 (*Forkhead box P3*), membro da subfamília P dos fatores de transcrição FOX e que origina uma proteína envolvida na resposta do sistema imune, foi identificada como a anormalidade genética de base no fenótipo autoimune de doenças como aquelas ligadas ao cromossomo X e alérgicas e, subsequentemente, FOXP3 mostrou ter papel essencial no desenvolvimento das Tregs murinas (HORI et al., 2003), aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos (MELO; CARVALHO, 2009). Como as células T recém ativadas também podem expressar CD25, segundo Banham et al. (2009), o fator de transcrição nuclear FOXP3 passou a ser o melhor marcador para a identificação de Tregs.

De forma geral, o elevado número de células Tregs avaliadas por meio da imunoexpressão de FOXP3 em humanos com diferentes tipos de cânceres (gástrico, ovariano, mamário e melanoma) é geralmente associado com pior prognóstico, pela capacidade de inibir a imunidade antitumoral (LEFFERS et al., 2009; YUAN et al., 2010; MOUGIAKAKOS et al., 2010), exceto pelo câncer colo-retal, linfoma de células NK e linfoma linfoblástico difuso de células B, quando a alta infiltração de Tregs foi associada a melhor prognóstico (LEE et al., 2008; SALAMA et al., 2009; KIM et al., 2009).

Além da atuação das Tregs, os linfócitos Th17 representam um subtipo de linfócitos T produzidos pela ação das interleucinas 17 (IL-17) que são importantes na proteção contra infecções e completamente independente das linhagens Th1 e Th2 (AUJLA et al., 2007). A eles tem sido atribuído importante papel na patogênese de várias doenças inflamatórias, autoimunes e neoplásicas, incluindo o lúpus eritematoso sistêmico, a doença intestinal inflamatória e o linfoma em seres humanos (KITANI; XU, 2008; YANG et al., 2009). A interleucina-17A (IL-17A),

membro da família de IL-17 que é predominantemente produzida por linfócitos Th17 (T CD4+) (ZHENG et al., 2013) é responsável pela restauração da imunidade celular e controle da resposta autoimune, representando papel oposto ao das Tregs, sendo o melhor marcador indireto de células Th17 (YANG et al., 2009; WAITE; SKOKOS, 2012).

Os conhecimentos adquiridos nos últimos anos permitiram inferir que as Tregs e os linfócitos Th17 originam-se a partir de uma mesma progenitora T e sua diferenciação para um dos dois tipos é decorrente da presença de determinadas citocinas (BOUDREAUX et al., 2012). Assim, durante a inflamação, a produção de IL-2 dirige a proliferação de células T para Tregs, enquanto que a IL-6 promove a proliferação de linfócitos Th17 e inibe a produção de Tregs, havendo regulação inversa na produção dessas duas linhagens celulares, ou seja, correlação negativa entre FOXP3/IL-17A (YANG et al., 2009; BOUDREAUX et al., 2012).

No câncer, o impacto clínico das células Th17 não é totalmente definido. Yang et al. (2009) descreveram no linfoma não-Hodgkin de células B em seres humanos, que a baixa expressão de células Th17 esteve associada à elevada presença de células Tregs, confirmando uma regulação inversa recíproca no microambiente tumoral e esteve associada a melhor resposta imune e maior sobrevida. Punt et al. (2015), em uma revisão sistemática do papel da IL-17 no paciente com câncer, observaram que a IL-17 por si só esteve associada a pior prognóstico pela sua capacidade em induzir angiogênese e pelo maior recrutamento de neutrófilos. Desta forma, o entendimento do duplo papel dos linfócitos Th17 no microambiente tumoral e o processo que regula as atividades pró e antitumoral, poderia oferecer suporte para identificação de novos fatores prognósticos e o desenvolvimento de imunoterapias anti-tumorais mais eficientes (IIDA et al., 2011).

Quanto à IL-2 sabe-se que ela está implicada na diferenciação e homeostase dos subtipos de células T efectoras, incluindo Th1, Th2 e Th17, além das células de memória CD8 e das células Tregs (LETOURNEAU et al., 2009). O receptor de IL-2 (IL-2R) é composto de 3 subunidades distintas, sendo uma delas a CD25, que tem importância crucial na sinalização de IL-2 para produção de Tregs e na indução de suas características supressivas (KE et al., 2008). A IL-2 é uma citocina essencialmente produzida por células CD4+, apesar de já ter sido descrita a produção em pequenas quantidades por TCD8+ e natural killer (NK), exercendo a função de promover a proliferação e diferenciação de células CD4+ e CD8+, além de

mediar a sobrevivência de células Tregs, necessárias para manutenção da tolerância imune (LETOURNEAU et al., 2009). Estudos reportam que a alta expressão de IL-2R foi relacionada com pior prognóstico em diversos tipos de neoplasias em humanos, como dos pulmões, pele, próstata e leucemias (KUHN et al., 2003; KUHN et al., 2005; KASPRZAK et al., 2007), contudo, não existem estudos que avaliem o papel desta citocina no linfoma em felinos.

Por fim, as células T CD3+CD8+ são um subtipo de linfócitos T que expressam marcador de CD8 em sua superfície e produzem citocinas citotóxicas como a perforina e granzima B (MA; DONG, 2011), havendo evidências que indicam que desempenham papel importante na supressão do crescimento tumoral, ou seja, defeitos na função e/ou supressão destas células poderiam contribuir com o crescimento tumoral (RAMANATHAN et al., 2008). Pesquisas realizadas em pacientes humanos com câncer demonstraram associação entre o alto grau de infiltração de Tregs no microambiente tumoral e a supressão da resposta de células CD8+, podendo existir uma inter-relação negativa entre Tregs/CD8 (SATO et al., 2005; MA; DONG, 2011).

Devido a essa controvérsia com relação à expressão de Tregs entre diferentes neoplasias em seres humanos e pela ausência de estudos na espécie felina, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de CD8, IL-2R (CD25), IL-17A e FOXP3 em gatos com linfoma intestinal linfocítico de células T, analisando a resposta terapêutica e averiguando possível correlação entre a sobrevivência global e a relação FOXP3/IL-17A e FOXP3/CD8.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da referida Instituição. O projeto também recebeu a doação de material de uma clínica particular especializada no atendimento de felinos (Vetmasters – São Paulo / SP).

Desta forma, foram estudadas as amostras provenientes de 40 animais da espécie felina com linfoma intestinal linfocítico de células T, não havendo restrições sexuais, etárias ou raciais.

Os animais atendidos foram submetidos a exame físico e material biológico foi colhido para as análises laboratoriais de rotina (hemograma, avaliação laboratorial de fígado e rins), incluindo os testes sorológicos para FIV/FeLV, por meio do kit comercial ELISA (Snap® FIV / FeLV Combo Test IDEXX).

A confirmação do diagnóstico de linfoma intestinal linfocítico de células T foi realizada por meio de exame histopatológico de material colhido por biopsia e o mesmo material foi utilizado para as análises imunoistoquímicas realizadas no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. Para análise imunofenotípica, utilizaram-se anticorpos monoclonal mouse anti-PAX5 (1:500; Clone 24; Invitrogen, Life Technologies, New York, USA) e policlonal rabbit anti-CD3 (1:2.000; DAKO; Carpinteria, CA, USA).

A análise da imunoexpressão de CD8, IL-2R (CD25) e IL-17A foi realizada por meio do kit amplificador de sinal TSA (Tyramide Signal Amplification) pela técnica de imunofluorescência. Para tal, foi realizada a desparafinização, recuperação antigênica (desmascaramento), bloqueio da peroxidase endógena e de reações inespecíficas com TNB (Tris NaCl Blocking), seguido pela incubação dos anticorpos policlonais de cabra CD8-alpha felino (1:200; R&D Systems, Minneapolis, USA) e IL-2R felino (1:200; R&D Systems, Minneapolis, USA) e do anticorpo monoclonal de camundongo IL-17A humano (1:300; AbD Serotec, Raleigh, NC, USA) diluídos em TNB nos títulos adequados, por 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida e escura. Após *overnight*, procedeu-se com a incubação dos anticorpos secundários (biotinilado, seguido do complexo estreptavidina-peroxidase) por 30 minutos cada. Por fim, incubou-se a tiramida diluída (1:100), seguida do iodeto de propídeo (1:1.000) durante 10 minutos cada, sendo então as lâminas montadas com Vectashield, vedadas com esmalte, mantidas em geladeira protegidas da luz e, posteriormente, analisadas em microscópio de fluorescência. A determinação da marcação de CD8 (figura 23 - A) foi feita por porcentagem subjetiva de células marcadas na lâmina e indicado o grau em 0 (sem marcação), 1 (<10%), 2 (11-50%) e 3 (>51%), enquanto que a IL-17A (figura 23 - B) foi determinada por intensidade de marcação na lâmina em graus: 0 (sem marcação), 1 (leve), 2 (moderado) ou 3 (intenso). Apesar da técnica ter apresentado reação efetiva no

controle positivo para o anticorpo anti-IL-2R, não houve marcação no grupo experimental. Foram considerados como positivos para IL-17A, os graus 2 ou 3 de marcação e, para CD8, o grau 3 de marcação.

Figura 23 - Imunoexpressão de CD8 (A) e IL-17A (B) em tecido intestinal de felinos com linfoma linfocítico de células T (aumentos de 40X) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise específica da imunoexpressão de FOXP3 (figura 24 – A e B) foi utilizado o clone 157B/F4 produzido no Nuffield Division of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, United Kingdom. Após padronização do anticorpo estabeleceu-se a diluição de 1:2 (figuras 29 e 30), em diluente de anticorpo (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Após o procedimento de desparafinização e do desmascaramento, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena e, então, incubou-se o anticorpo por 30 minutos em temperatura ambiente. Após essa fase, a detecção foi feita utilizando-se o sistema DAKO EnVision com horseradish peroxidase (HRP) e diaminobenzidina (DAB), como descrito pela fabricante (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), seguido de coloração com hematoxilina, desidratação e montagem das lâminas. A análise foi feita pela contagem de 1.000 linfócitos infiltrados no microambiente tumoral, por meio de fotos das lâminas em aumento de 40 vezes, e considerado como positivo quando se identificou, ao menos, 10% de células marcadas.

Figura 24 - Imunoexpressão de FOXP3 em tecido intestinal de felinos com linfoma linfocítico de células T: negativo (esquerda) e positivo (direita) (aumentos de 40X) - São Paulo – 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Os animais do grupo estudado foram tratados com clorambucil e prednisolona associados ou não ao sulfato de vincristina ou à L-asparaginase, e foram avaliados mensalmente através de histórico clínico, exame físico, exames laboratoriais (hemograma, perfis renal e hepático) e ultrassonografia abdominal para determinar o estado de remissão da neoplasia (se completa, parcial ou ausência de resposta) durante os seis primeiros meses. Após esse período, o tempo de reavaliação aumentou para cada dois meses, sendo realizados os mesmos procedimentos.

Avaliação da resposta terapêutica (KISELOW et al., 2008; VAIL et al., 2009):

→ remissão completa: 100% de resolução dos sintomas por mais de 30 dias e normalização da avaliação dos intestinos e linfonodos mesentéricos pela ultrassonografia abdominal;

→ remissão parcial: melhora de mais de 50% dos sintomas e das alterações ultrassonográficas de intestinos e linfonodos mesentéricos por mais de 30 dias;

→ ausência de resposta: ausência de melhora ou melhora de menos de 50% dos sintomas e manutenção das alterações ou progressão da doença avaliada por meio ultrassonográfico.

Para análise do tempo de sobrevida dos gatos, considerou-se o período compreendido entre o momento do diagnóstico até o óbito do animal.

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos e semi-contínuos das variáveis foram determinados como não paramétricos pelo teste K-S (Kolmogorov- Smirnov) e pelo teste de Chapiro-Wilks e por isso puderam ser representados por mediana e percentis 25 e 75 (dados não paramétricos).

Os dados não-paramétricos na comparação de dois grupos independentes foi utilizado o Teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni. Já, na análise da sobrevivência destes pacientes utilizou-se do método de Kaplan-Meyer, enquanto que para avaliar se havia correlação entre as variáveis estudadas fez-se uso do teste de correlação não paramétrico de Spearman.

Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5%.

6.4 RESULTADOS

Dos 40 animais estudados (quadro 5), 62,5% eram machos (25/40), sendo 87,5% (35/40) felinos sem raça definida (SRD), com mediana de idade de 12 anos. No que diz respeito ao padrão de remissão, 67,5% (27/40) dos animais apresentaram remissão completa da doença, 30% (12/40) remissão parcial e 2,5% (1/40) ausência de resposta ao tratamento. A mediana de sobrevida do grupo estudado foi de 24 meses.

Nas análises histopatológica e imunofenotípica constatou-se linfoma linfocítico de células T para a totalidade do grupo estudado. Quanto à localização no trato digestório, o local principal de acometimento foi o intestino delgado em 85% (34/40), seguido da junção íleo-ceco-cólica e cólon em 15% (6/40).

Quadro 5 - Caracterização dos animais, sobrevida e imunoexpressão de CD8 (grau* e %), IL-17A (grau**) e FOXP3 (%) dos 40 animais do grupo experimental - São Paulo - 2016

<i>Animal</i>	<i>Definição o racial</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Sobrevida (meses)</i>	<i>Padrão de Remissão</i>	<i>CD8 (grau* e %)</i>	<i>IL-17A (grau**)</i>	<i>FOXP3 (%)</i>
1	SRD	Macho	8 anos	27	parcial	3=90%	0	7,2%
2	SRD	Macho	10 anos	24	completa	1=2%	1	4%
3	SRD	Macho	9 anos	27	completa	2=40%	0	1,5%
4	SRD	Fêmea	13 anos	37	completa	3=90%	3	1,3%
5	SRD	Macho	13 anos	27	completa	3=70%	2	5,9%
6	SRD	Fêmea	12 anos	10	parcial	3=90%	0	5,2%
7	SRD	Macho	15 anos	30	completa	3=90%	1	7,5%
8	SRD	Macho	12 anos	60	completa	1=10%	1	1,1%
9	SRD	Macho	13 anos	7	parcial	1=5%	2	1,2%
10	SRD	Macho	12 anos	50	completa	3=90%	2	38,9%
11	SRD	Macho	10 anos	20	parcial	3=70%	1	3,8%
12	SRD	Macho	13 anos	22	completa	1=2%	0	0,3%
13	SRD	Fêmea	11 anos	26	completa	2=50%	0	4,6%
14	Siamês	Macho	9 anos	23	completa	1=2%	0	3,6%
15	SRD	Macho	12 anos	29	completa	1=10%	2	3,2%
16	SRD	Macho	12 anos	2	parcial	3=90%	3	2,2%
17	SRD	Macho	10 anos	4	parcial	3=80%	3	3,4%
18	SRD	Fêmea	7 anos	60	completa	1=2%	2	1,4%
19	SRD	Fêmea	15 anos	7	parcial	3=60%	1	7,5%
20	SRD	Fêmea	10 anos	5	parcial	1=2%	3	4,7%
21	SRD	Macho	12 anos	15	completa	2=30%	1	1,7%
22	SRD	Macho	15 anos	19	completa	1=2%	1	2,3%
23	SRD	Fêmea	12 anos	25	completa	1=2%	2	1,6%
24	SRD	Macho	12 anos	22	parcial	3=90%	0	3,7%
25	SRD	Macho	10 anos	48	completa	3=80%	1	1,2%
26	SRD	Macho	11 anos	22	completa	3=80%	1	1%
27	SRD	Macho	10 anos	26	completa	1=10%	0	2,2%
28	SRD	Macho	10 anos	28	completa	3=90%	3	10,7%
29	Persa	Fêmea	15 anos	1	ausência	1=2%	1	0,9%
30	Siamês	Fêmea	14 anos	14	parcial	3=70%	2	7,5%
31	Siamês	Fêmea	13 anos	29	completa	1=2%	0	3%
32	SRD	Fêmea	8 anos	32	completa	1=2%	1	1,6%
33	SRD	Fêmea	13 anos	38	completa	1=2%	0	7,2%
34	SRD	Macho	14 anos	18	parcial	2=20%	2	0,5%
35	SRD	Fêmea	12 anos	40	completa	1=8%	0	2,8%
36	SRD	Macho	15 anos	29	completa	2=15%	1	3,6%
37	SRD	Macho	13 anos	24	parcial	1=8%	2	1,8%
38	SRD	Fêmea	12 anos	21	completa	1=2%	1	1,5%
39	SRD	Fêmea	14 anos	16	completa	1=2%	3	0,5%
40	Himalaio	Macho	10 anos	25	completa	2=15%	2	5,7%

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

* grau: 0 (sem marcação); 1 (<10%); 2 (11 – 50%); e 3 (>51%)

**grau: 0 (sem expressão); 1 (leve); 2 (moderado); e 3 (importante)

Dentre os animais que expressaram FOXP3, considerando como positivos aqueles animais com mais de 10% de células marcadas no microambiente tumoral, apenas dois animais foram positivos, ou seja, 5% do grupo estudado (2/40). Com

relação à imunoexpressão da IL-17A, 25% dos animais (10/40) apresentaram expressão moderada (grau 2) e 15% (6/40) expressão elevada (grau 3). No que diz respeito ao marcador de CD8, 37,5% dos animais (15/40) tiveram expressão importante (maior que 51%) de células marcadas.

Na análise de sobrevida (maior que 30 meses; n=9) *versus* óbito (até 30 meses; n=31), os marcadores não apresentaram diferença significativa: CD8 (p=0,357), IL-17A (p=0,475) e FOXP3 (p=0,428).

Considerando a análise de remissão como parcial (n=12) *versus* completa (n=27), constatou-se diferença significativa quanto à sobrevida (p<0,0001; figura 25) e para CD8 (p=0,015; figura 26), ou seja, a sobrevida foi maior naqueles pacientes em remissão completa e que apresentaram menor imunoexpressão de CD8. Não houve diferença para IL-17A (p=0,138) e FOXP3 (p=0,102).

Figura 25 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação dos felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T na comparação da sobrevida de acordo com a resposta terapêutica: remissão completa e parcial (p<0,0001) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Figura 26 - Representação gráfica dos valores mínimos, máximos, mediana, 25% e 75% de variação dos felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T na comparação entre a imunoe expressão de CD8 (em porcentagem) de acordo com a resposta terapêutica: remissão completa e parcial ($p=0,015$) - São Paulo - 2016

Fonte: (WINKEL, V. M., 2016)

Na análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas, não houve correlação entre a imunoe expressão de FOXP3 e IL-17A ($p=0,773$ e $r=-0,05$) e entre FOXP3 e CD8 ($p=0,172$ e $r=0,27$).

6.5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, pesquisas têm focado o papel dos linfócitos T e citocinas, como as interleucinas IL-2 e IL-17, no câncer. Os linfócitos Th17 e a IL-17 podem desempenhar duplo papel na inflamação e na autoimunidade (MAI et al. 2010; CANTINI et al., 2011) e foram reconhecidos como participantes em ambos os processos pró e antitumoral (LE GOUVELLO et al., 2008), tendo a capacidade de promover o desenvolvimento inicial das células cancerígenas (YANG et al., 2011), bem como de suprimir as células T CD8+ (MAC; DONG, 2011). No que tange à expressão de IL-17A neste estudo, não houve diferença significativa na análise de sobrevida e na análise do padrão de remissão, ou seja, a expressão de IL-17A não influenciou na resposta terapêutica e na sobrevida dos animais.

Segundo Yang et al. (2009) e Boudreaux et al. (2012), as células Tregs e os linfócitos Th17 originam-se a partir de uma mesma progenitora T e, na dependência da ação de determinadas citocinas, ocorre a regulação desta produção, sendo que a IL-2 dirige a produção para células Tregs, enquanto a IL-6 promove a proliferação de linfócitos Th17 e inibe a produção de células Tregs, havendo regulação inversa na produção destas duas linhagens celulares.

No linfoma não Hodgkin em humanos (YANG et al., 2009), foi observada regulação recíproca na expressão de FOXP3 e IL-17 nas células T intra-tumorais, por meio do uso de diferentes estímulos, como a IL-2 e TGF-beta, ou seja, o estímulo que resultou em aumento da expressão de FOXP3 levou à supressão da produção de IL-17 ou vice-versa, contudo, na metodologia utilizada neste estudo, não foi possível determinar qualquer inter-relação entre IL-17A e FOXP3, que representam os principais marcadores indiretos de células Th17 e Tregs, respectivamente (BANHAM et al., 2009; CANTINI et al., 2011). Uma possibilidade para esta diferença diz respeito ao método utilizado para este tipo de análise, já que Yang et al. (2009) fizeram a mensuração por meio de citometria de fluxo, método notadamente mais sensível na quantificação destes marcadores.

Da mesma forma, também não se constatou correlação inversa entre a expressão de FOXP3 e de CD8, como descrito anteriormente por Ma e Dong (2011), ou seja, quanto maior a expressão de FOXP3, menor seria a expressão de CD8+ devido ao efeito de supressão sobre estas células. Munhoz (2013), de forma similar a este estudo, também não constatou diferença significativa na relação Tregs/CD8 na análise quanto ao padrão de remissão em cães com linfoma multicêntrico, já que a maioria dos animais apresentaram resposta favorável ao tratamento, evidenciada pela remissão parcial ou completa, uma vez que quanto maior a relação Tregs/CD8, pior seria o prognóstico dos animais.

Pelos resultados deste estudo, as expressões de IL-17A e FOXP3, bem como a ausência de correlação FOXP3/CD8, não apresentaram impacto em termos de tempo de sobrevida e de resposta terapêutica nos felinos com linfoma intestinal.

Quando considerou-se a análise individual dos dois animais positivos para FOXP3 no estudo, observou-se expressão de moderada a elevada para IL-17A e alta expressão de CD8 em ambos os casos, ou seja, não foi possível constatar correlação negativa entre IL-17A e FOXP3, que poderia levar à produção de linfócito Th-17, e entre FOXP3 e CD8, já que a presença de Tregs pode levar à supressão de

células CD8+ (MA; DONG, 2011), não havendo impacto na resposta terapêutica, já que ambos os animais apresentaram remissão completa do linfoma, e tampouco na sobrevida, com tempo de sobrevida superior à mediana do grupo estudado.

Vasilescu et al. (2013) investigaram as expressões de FOXP3 e IL-17A nas células tumorais e nos linfócitos infiltrados na neoplasia em pessoas com adenocarcinomas pulmonares, bem como a possível correlação entre os dois marcadores, utilizando também a técnica de imunistoquímica em material parafinado e evidenciaram fraca correlação negativa entre FOXP3 e IL-17 A. Em um estudo de correlações, somente quando há uma correlação de moderada a forte é possível supor que haja uma regulação recíproca entre dois marcadores, ou seja, a correlação não se aplicou ao estudo de Vasilescu et al. (2013), assim como não se aplica a este.

Embora o sistema imune tenha a capacidade de reconhecer antígenos associados à neoplasia e direcionar uma resposta por meio de células T CD8+ citotóxicas, muitas vezes podem ocorrer falhas na sua efetividade, podendo levar à disseminação da neoplasia (SAKAGUCHI, 2005). O principal mecanismo imunológico que contribui para este tipo de resposta ocorre pelo reconhecimento de antígenos tumorais pelos linfócitos T CD8+ citotóxicos, capazes de induzir a morte da célula neoplásica, mas os linfócitos CD4+ também são importantes na imunidade antitumoral, atuando na liberação de citocinas, como a IL-2, para geração e ativação das células T CD8+ (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Neste estudo, a impossibilidade de determinar a marcação de linfócitos T CD4+ e estabelecer a relação CD4+/CD8+, não permitiu essa avaliação.

Na análise isolada da imunoexpressão de CD8, houve diferença significativa quanto ao padrão de remissão, sendo que a menor expressão de CD8 foi relacionada a melhor resposta terapêutica e maior tempo de sobrevida, porém, considerando os resultados de Ma e Dong (2011), seria esperado que a alta expressão de FOXP3 levasse à diminuição de CD8, como observado pelos referidos autores no câncer colorretal em humanos, contudo, apenas três dos animais estudados foram positivos para FOXP3 e, mesmo assim, tiveram alta expressão de CD8, já que, pela alta expressão eram animais com linfoma de células T CD3+CD8+. Nos demais animais avaliados, é possível que a menor expressão estivesse relacionada ao grupo de animais T CD3+CD8-, que apresentavam apenas

infiltração por linfócitos CD8 reativos no microambiente tumoral, não impactando em prejuízo da resposta imune antitumoral.

As células TCD8+ no intestino podem apresentar função imunomoduladora caracterizada pelo aumento da produção de citocinas e na proteção das camadas de células epiteliais (HAYDAY et al., 2001), contudo, vale salientar que a alta expressão de células T CD8+ no linfoma intestinal não necessariamente está relacionada a aumento do efeito antitumoral, já que pode tratar-se de infiltração por linfócitos neoplásicos, que podem ter sua função alterada. Em estudo conduzido por Roccabianca et al. (2006) em 21 felinos com linfoma intestinal linfoblástico granular houve um predomínio do imunofenótipo CD3+CD8+ e isto não foi associado a melhor prognóstico, já que o tempo de sobrevida não ultrapassou os 3 meses, ou seja, o predomínio de células T CD8+ que pressuporia maior atividade citotóxica não impactou em termos de sobrevida dos pacientes.

Como neste estudo avaliou-se uma neoplasia de linfócitos que, diferentemente de outras neoplasias como carcinomas, sarcomas e melanomas nas quais a infiltração de linfócitos CD8 está relacionada diretamente a uma resposta imune antitumoral, pode-se ter linfomas CD3+CD8+ (representando neste estudo por 37,5% dos casos) e estes linfócitos neoplásicos não apresentam a mesma função efetora, o que pode justificar a menor expressão ter se relacionado com uma maior sobrevida, podendo tratar-se apenas de infiltração por linfócitos CD8 reativos com sua função efetora preservada e que estariam em menor quantidade se comparado aos linfomas CD3+CD8+, além de não ter sido evidenciada relação inversa entre FOXP3 e CD8, que levaria à uma possível supressão de células CD8+ no microambiente tumoral.

No que tange à imunoexpressão do IL-2R, da mesma forma que Vasilescu et al. (2013) observaram em seres humanos, não foi possível quantificar CD25 uma vez que foi observada apenas a marcação em linfócitos isolados. O aumento da expressão de IL-2R tem sido demonstrado em diversas neoplasias em humanos, incluindo cânceres do pulmão, pele, próstata e leucemias (KUHN et al. 2003; KUHN et al. 2005; KASPRAZ et al., 2007), podendo estar associada a proliferação celular mais rápida e à instabilidade cromossomal, que pode promover aumento da agressividade neoplásica, resistência à múltiplas drogas e mau prognóstico, contudo, tal expressão não foi observada no grupo estudado, entretanto, não podemos afirmar categoricamente essa ausência de expressão, pois é possível que

a inexistência de um anticorpo felino específico para marcação de IL-2R por imunohistoquímica, em que foi necessário o uso de um kit amplificador de sinal para melhorar a marcação, possa ter influenciado o resultado final, já que, como as Tregs são um subtipo de linfócitos T CD4+ que expressam constitutivamente receptor da IL-2 (CD25) e o fator de transcrição nuclear FOXP3, era de se esperar ao menos a positividade de IL-2R naqueles três animais positivos para FOXP3.

6.6 CONCLUSÃO

Em conclusão, felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T apresentaram baixa expressão de FOXP3 no microambiente tumoral, representando infiltração de pequena quantidade de Tregs, o que não impactou na resposta terapêutica e na sobrevida destes animais. Detectou-se também a expressão de IL-17A e CD8, contudo não houve correlação que pudesse indicar uma regulação inversa entre tais marcadores, seja entre FOXP3 e CD8 ou FOXP3 e IL-17A. A menor expressão de CD8 relacionou-se a remissão completa, bem como maior tempo de sobrevida.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 576 p.

AUJLA, S.; DUBIN, P. J.; KOLLS, J. K. Th 17 cells and mucosal host defense. **Seminars in Immunology**, v.19, p. 377-382, 2007.

BANHAM, A. H.; LYNE, L.; SCASE, T. J.; BLACKLAWS, B. A. Monoclonal antibodies raised to the human FOXP3 protein can be used effectively for detecting FoxP3 T Cell in other mammalian species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 376-381, 2009.

BRODEAUX, C. E.; CHUMBLEY, L. B.; SCOTT, V. L.; WISE, D. A.; COATS, R. S. imbalance of placental regulatory T cell and Th17 cell population on dynamics in the FIV-infected pregnant cat. **Virology Journal**, v. 9, p. 88, 2012.

CANTINI, G.; PISATI, F.; MASTROPIETRO, A.; FRATTINI, V.; IWAKURA, Y.; FINOCCHIARO, G.; PELLEGATTA, S. Acritical role for regulatory T cells in driving cytokine profiles of Th17 cells and their modulation of glioma microenvironment. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 60, p. 1739–1750, 2011.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D.; ARAUJO, J. A.; SALMAZI, K. C.; KALLAS, E. G.; ANDRADE, L. E. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 342-55, 2008.

HAYDAY, A.; THEODORIDIS, E.; RAMSBURG, E.; SHIRES, J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. **Nature Immunology**, v. 2, p. 997–1003, 2001.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by transcription factor Foxp3. **Science**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

IIDA, T.; IWAHASHI, M.; KATSUDA, M.; ISHIDA, K.; NAKAMORI, M.; NAKAMURA, M.; NAKA, T. Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. **Oncology Reports**, v. 25, n. 5, p. 1271-1277, 2011.

KASPRAZK, A.; OLEJNICZAK, K.; PRZYBYSZEWSKA, W.; ZABEL, M. Cellular expression of interleukin 2 (IL-2) and its receptor (IL-2R, CD25) in lung tumors. **Folia Morphology**, v. 66, n. 3, p. 159–166, 2007.

KE, X.; WANG, J.; LI, L. L.; CHEN, I. H.; WANG, H.; YANG, X. F. Roles of CD4+CD25+FOXP3+ Tregs in lymphomas and tumors are complex. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 3986–4001, 2008.

KIM, W. Y.; JEON, Y. K.; KIM, T. M.; KIM, J. E.; KIM, Y. A.; LEE, S. H.; KIM, D. W.; HEO, D. S.; KIM, C. W. Increased quantity of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells is an independent predictor for improved clinical outcome in extra-nodal NK/T cell lymphoma. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 10, p. 1688-96, 2009.

KISELOW, M. A.; RASSNICK, K. M.; MCDONOUGH, S. P. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995 – 2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 405–410, 2008.

KITANI, A.; XU, L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. **Nature**, v. 1, p. S43-S46, 2008. Supplement 1.

KUHN, D. J.; DOU, Q. P. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. **Frontiers Bioscience**, v. 10, p. 1462–74, 2005.

KUHN, D. J.; SMITH, D. M.; PROSS, S.; WHITESIDE, T. L.; DOU, Q. P. Overexpression of interleukin -2 receptor in a human squamous cell line is associated with increased proliferation, drug resistance and transforming ability. **Journal Cell Biochemical**, v. 89, p. 824–36, 2003.

LE GOUVELLO, S.; BASTUJI-GARIN, S.; ALOULOU, N.; MANSOUR, H.; CHAUMETTE, M. T.; BERREHAR, F.; SEIKOUR, A.; CHARACHON, A.; KAROUI, M.; LEROY, K.; FARCET, J. P.; SOBHANI, I. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. **GUT**, v. 57, n. 6, p. 772–779, 2008.

LEE, N. R.; SONG, E. K.; JANG, K. Y.; CHOI, H. N.; MOON, W. S.; KWON, K.; LEE, J. H.; YIM, C. Y.; KWAK, J. Y. Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3 positive T regulatory cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. **Leukemia & Lymphoma**, v. 49, n. 2, p. 247–256, 2008.

LEEFERS, N.; GOODEN, M. J.; JONG, R. A.; HOOGEBOOM, B. N.; HOOR, K. A.; HOLLEMA, H. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary

and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 58, n. 3, p. 449–459, 2009.

LETOURNEAU, S.; KRIEG, C.; PANTALEIO, G.; BOYMAN, O. IL-2 and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 123, n. 4, p. 758–762, 2009.

MAI, J.; WANG, H.; YANG, X. F. Th 17 cells interplay with FOXP3+ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, p. 986–1006, 2010.

MA, C.; DONG, X. Colorectal cancer-derived Foxp3+ IL17+ T cells suppress tumour-specific CD8+ T cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 1, p. 47– 51, 2011.

MELO, K.M.; CARVALHO, B.T.C. T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 5, p. 184–188, 2009.

MOORE, P. F.; RODRIGUES-BERTOS, A.; KASS, P. H. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype and molecular clonality. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 658-668, 2011.

MOUGIAKAKOS, D.; JOHANSSON, C. C.; TROCME, E.; ALL-ERICSSON, C.; ECONOMOU, M. A.; LARSSON, O.; SEREGARD, S.; KIESSLING, R. Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. **Cancer**, v. 116, n. 9, p. 2224-2233, 2010.

MUNHOZ, T. D. **Células T reguladoras em cães com linfoma multicêntrico: quantificação, em sangue periférico, no momento do diagnóstico e após a etapa inicial do tratamento quimioterápico**. 2013. 45 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

PUNT, S.; VLIET, M.; SPAANS, V. M.; KROON, C. D.; FLEUREN, G. J.; GORTER, A.; JORDANOVA, E. S. FoxP3+ and IL-17+ cells are correlated with improved prognosis in cervical adenocarcinoma. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 64, p. 745-753, 2015.

RAMANATHAN, S.; GAGNON, J.; ILANGUMARAN, S. Antigen-nonspecific activation of cytokines: T lymphocytes by cytokines: relevance to immunity, autoimmunity, and cancer. **Archive of Immunology Therapy and Experimental**, v. 56, p. 311–323, 2008.

RECHE JR, A.; CHALITA, M. C. C.; GERALDO JR, C. A.; SANTOS, C. F.; FREITAS, M. F. Uso da L-Asparaginase (Elspar), prednisona (meticorten) e clorambucil (leukeran) no tratamento de gatos com linfoma alimentar: 32 casos (2004 – 2009). **A Hora Veterinária**, v. 29, n.173, p. 9 -16, 2010.

ROCCABIANCA, P.; VERNAU, W.; CANIATTI, M.; MOORE, P. F. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8-alfa phenotype. **Veterinary Pathology**, v. 43, p. 15–28, 2006.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory t cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.

SALAMA, P.; PHILIPS, M.; GRIEU, F.; MORRIS, M.; ZEPS, N.; JOSEPH, D.; PLATELL, C.; IACOPETTA, B. Tumor-infiltrating Foxp3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 2, p. 186-192, 2009.

SATO, E.; OLSON, S. H.; AHN, J.; BUNDY, B.; NISHIKAWA, H.; QIAN, F.; JUNGBLUTH, A. A. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 116, p. 69-78, 2007.

STEIN, T. J.; PELLIN, M.; STEINBERG, H.; CHUN, R. Treatment of feline gastrointestinal small-cell lymphoma with chlorambucil and glucocorticoids. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 6, p. 413–417, 2010.

VAIL, D. M.; MICHELS, G. M.; KHANNA, C.; SELTING, K. A.; LONDON, C. A. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) – a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus group. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 28–37, 2009.

VAIL, D. M. Feline Lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. cap. 31, p. 733-756.

VASILESCU, F.; ARSENE, D.; CIONICA, F.; COMANESCU, M.; ENACHE, V.; IOSIF, C.; ALEXANDRU, D. O.; GEORGESCU, D.; DOBREA, C.; BALAN, A.; ARDELEANU, C. Foxp3 and IL-17 expression in tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor cells – correlated or independent factors? **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 54, n. 1, p. 43-49, 2013.

WAITE, J. C.; SKOKOS, D. Th17 response and inflammatory autoimmune disease. **International Journal of Inflammation**, v. 2012, n. 8, p. 1-10, 2012.
Doi:10.1155/2012/819467.

YANG, Z. Z.; NOVAK, A. J.; ZIESMER, S. C.; WITZIG, T. E.; ANSELL, S. M. Malignant B cells skew the balance of Regulatory T cells and Th17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Research**, v. 69, n. 13, p. 5522-5530, 2009.

YANG, S.; WANG, B.; GUAN, C.; WU, B.; CAI, C.; WANG, M.; ZHANG, B.; LIU, T.; YANG, P. Foxp3+IL17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 1, p. 85-91, 2011.

YUAN, X. L.; CHEN, L.; MX, L.; DONG, P.; XUE, J.; WANG, J.; ZHANG, T. T.; WANG, X. A.; ZHANG, F. M.; GE, H. L.; SHEN, L. S.; XU, D. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg cells suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner. **Clinical Immunology**, v. 134, n. 3, p. 277–288, 2010.

ZHENG, S. G. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? **American Journal of Clinical Experimental and Immunology**, v. 2, n. 1, p. 94–106, 2013.

ANEXO A

→ TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADAS:

1- Tris/EDTA pH 9,0:

Diluir Tris ou Trizma 1,21g mais 0,37g de EDTA e 500 ul de Tween20 em 1 litro de água ultrapura Mili-Q. Após solução ser homogeneizada, regular o pH até atingir 9,0 por meio de solução de HCl 50%. Tal tampão foi utilizado para o desmascaramento dos anticorpos primários anti-CD3, PAX5, KI-67, CD8, IL-2R, IL-17A e FOXP3.

2- PBS:

Para o preparo do PBS sem tween a 10X era diluí-se 10,61 g de Na_2HPO_4 acrescidos de 2,2 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,2g e 8,5 g de NaCl em 1.000 mL de água destilada. A solução é então levada ao agitador e regulado o pH a 7,2. Para a sua utilização durante as provas imunoistoquímicas, este tampão era diluído com água destilada 1:10 (100mL da solução concentrada de PBS para 900mL de água destilada), regulado o pH novamente para 7,2 e acrescidos 500ul/litro de Tween20.

7 LIMITAÇÕES GERAIS

Não foi possível obter marcação para CD4 mesmo tendo sido testados diferentes anticorpos tanto para espécie felina quanto humana, por diferentes técnicas imunoistoquímicas.

8 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados analisados e na metodologia aplicada pode-se concluir que:

- o linfoma gastrointestinal mais prevalente em gatos foi o tipo linfocítico de células T, envolvendo principalmente o intestino delgado e com um tempo mediano de sobrevida de 24 meses;

- na análise da sobrevida, o tratamento A (no qual houve adição de L-asparaginase), níveis de albumina sérica iguais ou maiores que 2,5g/dL e manutenção ou ganho de peso em 30 dias com relação ao diagnóstico, foram preditores de maior tempo de sobrevida;

- a expressão de Ki-67 foi superior para determinar a proliferação celular quando comparada ao índice mitótico;

- Ki-67 foi mais expresso naqueles animais acometidos pela forma linfoblástica ou de células B e relacionou-se a menor tempo de sobrevida destes animais;

- a expressão de FOXP3 em gatos com linfoma gastrointestinal de células B e T foi baixa e não esteve relacionada à resposta terapêutica e ao tempo de sobrevida;

- não houve correlação entre FOXP3/IL-17 e FOXP3/CD8 nos felinos com linfoma intestinal linfocítico de células T;

- a baixa expressão de CD8 correlacionou-se a maior tempo de sobrevida naqueles pacientes em remissão completa do linfoma intestinal linfocítico de células T.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 576 p.

AUJLA, S.; DUBIN, P. J.; KOLLS, J. K. Th 17 cells and mucosal host defense. **Seminars in immunology**, v. 19, p. 377-382, 2007.

BANHAM, A. H.; LYNE, L.; SCASE, T. J.; BLACKLAWS, B. A. Monoclonal antibodies raised to the human FOXP3 protein can be used effectively for detecting FoxP3 T Cell in other mammalian species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 376-381, 2009.

BARRS, V.; BEATTY, J. Feline alimentary lymphoma: further diagnostics, therapy and prognosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, p. 191–201, 2012.

BARRS, M. C.; OLSEN, C. W.; SCOTT, F. W. Moléstias virais felinas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Editora Manole, 1995. v. 1, cap. 70, p. 589-631.

BERTONE, E. R.; SNYDER, I. A.; MOORE, A. S. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, p. 268–273, 2002.

BEYER, M.; SCHULTZE, J. L. Regulatory T cells in cancer. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 804–811, 2006.

BILLER, B. J.; ELMSLIE, R. E.; BURNETT, R. C.; AVERY, A. C.; DOW, S. W. Use of Foxp3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 69-78, 2007.

BOUDREAUX, C. E.; CHUMBLEY, L. B.; SCOTT, V. L.; WISE, D. A.; COATS, R. S. imbalance of placental regulatory T cell and Th17 cell population on dynamics in the FIV-infected pregnant cat. **Virology Journal**, v. 9, p. 88, 2012.

BRIDGEFORD, E. C.; MARINI, R. P.; PARRY, N. M.; RICKMAN, B.; FOX, J. Gastric Helicobacter species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 106-113, 2008.

BRISCOE, K. A.; KROCKENBERGER, M.; BEATTY, J. A.; CROWMEY, A.; DENNIS, M. M.; CANFIELD, P. J.; DHAND, N.; LINGARD, A. E.; BARRS, V. R.

Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, p. 187-198, 2011.

CAMPBELL, D. J.; ZIEGLER, S. E. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nature Reviews – Immunology**, v.7, p. 305–310, 2007.

CARRERAS, J. K.; GOLDSCHMIDT, M.; LAMB, M.; MCLEAR, R. C.; DROBATZ, K. J.; SORENMO, K. U. Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997 – 2000). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 326–331, 2003.

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

CURIEL, T. J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature Medicine**, v. 10, n. 9, p. 942-949, 2004.

DANIAUX, L. A.; LAURENSEN, M. P.; MARKS, S. L.; MOORE, P. F.; TAYLOR, S. L.; CHEN, R. X.; ZWINGENBERGER, A. L. Ultrasonographic thickening of the muscularis propria in feline small intestinal T-cell lymphoma and inflammatory bowel disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 2, p. 89 -98, 2014.

ETTINGER, S. N. Principles of treatment for feline lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 98-102, 2003.

FONDACARO, J. V.; RITCHER, K. P.; CARPENTER, J. L. Feline Gastrointestinal lymphoma: 67 cases. **European Journal of Comparative Gastroenterology**, v. 4, n. 2, p. 69–74, 1999.

GÁRATE, B. B.; AVILA, P. Q.; LUNA, D. M.; MONTENEGRO, E. C. Expresión de FOXP3 en linfomas de células T: estudio de 47 casos en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins - Peru. **Acta Medica Peruana**, v. 26, n. 2, p. 74-77, 2009.

GIEGER, T. Alimentary lymphoma in cats and dogs. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 41, p. 419–432, 2011.

HAYES, A. Feline lymphoma – principles of diagnosis and management. **In Practice**, v. 28, p. 516– 24, 2006.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by transcription factor Foxp3. **Science**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

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

KARUBE, K.; OHSHIMA, K.; TSUCHIYA, T.; YAMAGUCHI, T.; KAWANO, R.; SUZUMIYA, J.; UTSUNOMIYA, A.; HARADA, M.; KIKUCHI, M. Expression of Foxp3, a key molecule in CD4+CD25+ regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. **British Journal of Haematology**, v. 126, p. 81-84, 2004.

KASPRAZK, A.; OLEJNICZAK, K.; PRZYBYSZEWSKA, W.; ZABEL, M. Cellular expression of interleukin 2 (IL-2) and its receptor (IL-2R, CD25) in lung tumors. **Folia Morphology**, v. 66, n. 3, p. 159–166, 2007.

KE, X.; WANG, J.; LI, L.L.; CHEN, I. H.; WANG, H.; YANG, X. F. Roles of CD4+CD25+FOXP3+ Tregs in lymphomas and tumors are complex. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 3986–4001, 2008.

KISELOW, M. A.; RASSNICK, K. M.; MCDONOUGH, S. P. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 3, p. 405- 410, 2008.

KITANI, A.; XU, L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. **Nature**, v. 1, p. S43-S46, 2008. Supplement 1.

KUHN, D. J.; DOU, Q. P. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. **Frontiers Bioscience**, v. 10, p. 1462–1474, 2005.

LINGARD, A. E.; BRISCOE, K.; BEATTY, J. A. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 69 –700, 2009.

LOUWERENS, M.; LONDON, C. A.; PEDERSEN, N. C. Feline lymphoma in the post-feline leukemia era. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 329–335, 2005.

MA, C.; DONG, X. Colorectal cancer-derived Foxp3+ IL17+ T cells suppress tumour-specific CD8+ T cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 1, p. 47–51, 2011.

MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 5, p. 184–188, 2009.

MOORE, P. F.; WOO, J. C.; VERNAU, W.; KOSTEN, S.; GRAHAM, P. S. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, p. 167–178, 2005.

MOORE, P. F.; RODRIGUES-BERTOS, A.; KASS, P. H. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype and molecular clonality. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 658-668, 2012.

PINTO, C. F. **Avaliação do estado oxidante/antioxidante e defesa eritrocitária antioxidante em felinos com linfoma**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PUNT, S.; VLIET, M.; SPAANS, V. M.; KROON, C. D.; FLEUREN, G. J.; GORTER, A.; JORDANOVA, E. S. FoxP3+ and IL-17+ cells are correlated with improved prognosis in cervical adenocarcinoma. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 64, p. 745-753, 2015.

RAMANATHAN, S.; GAGNON, J.; ILANGUMARAN, S. Antigen-nonspecific activation of cytokines: T lymphocytes by cytokines: relevance to immunity, autoimmunity, and cancer. **Archive of Immunology Therapy and Experimental**, v. 56, p. 311–323, 2008.

RECHE JR, A.; CHALITA, M. C. C.; GERALDO JR, C. A.; SANTOS, C. F.; FREITAS, M. F. Uso da L-Asparaginase (Elspar), prednisona (meticorten) e clorambucil (leukeran) no tratamento de gatos com linfoma alimentar: 32 casos (2004 – 2009). **A Hora Veterinária**, v. 29, n. 173, p. 9-16, 2010.

RISSETTO, K.; VILLAMIL, J. A.; SELTING, K. A. Recent trends in feline intestinal neoplasia: an epidemiologic study of 1,129 cases in the veterinary medical database from 1964 to 2004. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 47, p. 28–36, 2011.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. 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. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 3808-3821, 2011.

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

SATO, E.; OLSON, S. H.; AHN, J.; BUNDY, B.; NISHIKAWA, H.; QIAN, F. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 116, p. 69-78, 2005.

SCHRECK, S.; FRIEBEL, D.; BUETTNER, M.; DISTEL, L.; GRABENBAUER, G.; YOUNG, L. S.; NIEDOBITEK, G. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. **Hematology Oncology**, v. 27, n. 1, p. 31–39, 2009.

STEIN, T. J.; PELLIN, M.; STEINBERG, H.; CHUN, R. Treatment of feline gastrointestinal small-cell lymphoma with chlorambucil and glucocorticoids. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 6, p. 413-417, 2010.

TAAMS, L. S.; PALMER, D. B.; AKBAR, A. N.; BROWN, Z.; HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells in human diseases and their potential for therapeutic manipulation. **Immunology**, v. 118, p. 1–9, 2006.

VAIL, D. M. Feline Lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. cap. 32, p. 638-653.

VAIL, D. M.; THAMM, D. H. Hematopoietic tumors. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. v. 1, cap. 181, p. 732-747.

VIGOUROUX, S.; YVON, E.; BIAGI, E.; BRENNER, M. K. Antigen-induced regulatory T cells. **Blood**, v. 104, p. 26–33, 2004.

WAITE, J. C.; SKOKOS, D. Th17 response and inflammatory autoimmune disease. **International Journal of Inflammation**. v. 2012, n. 8, p. 1-10, 2012.
Doi:10.1155/2012/819467.

WALY, N. E.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; STOKES, C. R.; DAY, M. J.
Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 253–260, 2005.

ZWINGENBERGER, A. L.; MARKS, S. L.; BAKER, T. W.; MOORE, P. F.
Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 289–292, 2010.