Ana Margarida Rogado do Vale Santos

Avaliação da Presença de Macrófagos Associados ao Tumor em 31 casos de Linfoma B Difuso de Células Grandes do cão

Orientador: Pedro Faísca, PhD, DEA, DVM

Co-orientador: Joaquim Henriques, DVM

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

Ana Margarida Rogado do Vale Santos

Avaliação da Presença de Macrófagos Associados ao Tumor em 31 casos de Linfoma B Difuso de Células Grandes do cão

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientador: Pedro Faísca, PhD, DEA, DVM
Co-orientador: Joaquim Henriques, DVM

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

Dedicatória

Ao meu pai, Dr. José Vale e aos meus avós António Rogado e Maria do Rosário Leão pelo exemplo que representam e pelo enorme contributo que tiveram na minha formação.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Pedro Faísca, pela importância determinante que desempenhou na minha formação desde o início do curso, pela compreensão e acompanhamento até ao fim do mesmo, pelas amostras gentilmente cedidas pela DNAtech, e pelo brilhantismo.
Agradeço ao Dr. Joaquim Henriques pelos preciosos ensinamentos na área da oncologia veterinária, pelas oportunidades, pelas gentilmente cedidas amostras e pelos valores morais.
Deixo um agradecimento muito especial a todos os Médicos e Técnicos do Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa, que, para além de possibilitarem a realização da parte pratica deste estudo nas suas instalações, me ofereceram uma quantidade enorme de conhecimento na área da Imunocitoquimica e do cancro. Agradeço em especial ao Dr. José Cabeçadas que, com o seu vasto conhecimento na área dos tumores hematopoiéticos, me auxiliou na interpretação de resultados do meu trabalho, à Prof.ª Doutora Paula Chaves pelo apoio, pela sensibilidade rara que lhe reconheço, pelo seu trabalho incansável.
Anoto o meu agradecimento a todos os técnicos do laboratório de Anatomia patológica do IPO, pela paciência, ajuda incansável no processamento das amostras e na elaboração dos diferentes protocolos de otimização. Não devo contudo deixar de sublinhar dois nomes: Teresa Pereira e João Matos, sem o vosso apoio, saber e simpatia dentro do laboratório nada disto teria sido possível. Agradeço aos meus amigos, Luís Costa e Mariana Turras por colmatarem as minhas falhas, pela ajuda decisiva, pelo apoio ilimitado. Agradeço aos restantes membros do nosso grupo: Ricardo Pais, João Almeida, Miguel Vicente, Rui Filipe Antunes e Sofia Cunha pela nossa amizade intemporal, pelo carinho e boa disposição. Por, em suma serem os melhores amigos que alguém pode ter, um muito obrigado.
Agradeço ao meu amigo Ricardo Felisberto, esse génio, pela ajuda imensa, pelo exemplo vivo que representa.
O último e sem dúvida mais importante Agradecimento aos meus familiares pela paciência inesgotável e pelo suporte incondicional. Devo destacar os meus avós por serem o exemplo diário de tantas virtudes que um dia ambiciono alcançar. A minha mãe e irmã pela força e salvaguarda. E o meu pai, meu exemplo, meu mestre pois foi a pessoa que me permitiu tudo isto sem me desejar nada mais que sucesso e serenidade, muito obrigado.
A todos vós só desejo poder ser um pouco do que já foram para mim.

Resumo

Linfoma é relatado como sendo o tumor hematopoiético mais comum em cães.

Os Macrófagos associados ao tumor (MAT) representam um dos componentes celulares mais abundantes no microambiente tumoral e principais contribuintes para a inflamação relacionada ao tumor. Os MAT reúnem uma série de funções (por exemplo, a promoção da proliferação de células tumorais e angiogénese, a remodelação da matriz extracelular, a inércia da imunidade adaptativa), que em última análise, têm um impacto importante na progressão da doença.

Neste estudo prospetivo, 31 amostras previamente diagnosticados e caracterizada como canino DLBCL foram coradas com MAC 387, a fim de avaliar infiltração TAM. Todas as amostras foram processadas de acordo com a técnica validada usada atualmente pelo Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa.

Os resultados não mostraram nenhuma correlação entre a expressão do MAC 387 e sobrevivência. Da mesma forma, não foi encontrada correlação entre altos valores de TAM e fatores intrínsecos da doença. Apesar disso, microambiente tumoral não deve ser descartada como alvo para novos estudos prospetivos. Este trabalho alerta para a falta de marcadores específicos da linhagem mielóide.

Palavras-chave: Linfoma não-Hodgkin do Cão; Macrófagos Associados ao Tumor; Imunohistoquímica; MAC.387; Sistema de classificação OMS.

Abstract

Lymphoma is reported to be the most common hematopoietic tumor in dogs. Tumor-associated macrophages (TAM) represent one of the most abundant cell components in the tumor environment and key contributors to cancer-related inflammation, summarize a number of functions (e.g., promotion of tumor cell proliferation and angiogenesis, matrix turnover, repression of adaptive immunity), which ultimately have an important impact on disease progression.

In this prospective study, 31 samples previously diagnosed and characterized as canine DLBCL were stained with MAC 387 in order to evaluate TAM infiltration. All the samples were processed according to the validated technique currently used by Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa.

The results showed no correlation between expression of MAC 387 and survival. In the same way no correlation was found between high TAM and intrinsic factors of the disease. In spite of this, tumoral microenvironment shouldn't be discarded as target for new prospective studies. This work warns to the lack of specific markers of myeloid line.

K**eywords:** Canine non-Hodgkin Lymphoma; Tumour Associated Macrophages; Immunohistochemistry; MAC.387; WHO classification system

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AgNOR - Região Organizadora Nucleolar Argirofílica

ANG - Angiopoietina

BCL-2 - Proteína anti-apoptótica "Linfoma de Células B 2"

CCL – do inglês *Chemokine (C-C motif) Ligand*

CD – do inglês *Cluster of Differentiation*

CD95L – ou FAS-Ligand, pertencente à família do Fator de Necrose Tumoral

CET – Células Estaminais Tumorais

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

c-Myc - Gene Mielocitomatose celular

COX - Cicloxigenase

CSF – Fator Estimulante de Colónia

CXCL – do inglês *Chemokine (C-X-C motif) Ligand*

CXCR – do inglês *Chemokine (C-X-C motif) Ligand Receptor*

DC-SIGN - do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

EBV – do inglês *Epstein-Barr Virus*

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

eNOS – Óxido Nítrico Endotelial

FAK – do inglês *Focal Adhesion Kinase* (Cinase de Adesão Focal)

FGF β – Fator de Crescimento de Fibroblastos β

HIF – Fator Indutor da Hipóxia

IGH – Gene das Cadeias Pesadas da Imunoglobulina

IL - Interleucina

ILK – do inglês *Integrin-Linked Kinase* (Cinase Ligada à Integrina)

GALT – do inglês *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

GEP – do inglês *Gene Expression Profile*

HAS-2 - Hialuronan Sintase-2

HSPG – Proteoglicano de Heparan Sulfato

Ki-67 - Proteína Codificada pelo gene MKI67

LnH – Linfoma não-Hodgkin

LYVE – do inglês *Extracellular Link Domain Containing*

MAC.387 – Anticorpo anti-Macrófagos clone 387

MALT – do inglês *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

MAT – Macrófago Associado ao Tumor

M-CSF – Fator Estimulante de Colónia Macrofágico (do inglês *Macrophage – Colony Stimulating Factor*)

MDSC – Células Supressoras Derivadas da linhagem Mielóide

MEC – Matriz Extracelular

MCH – Complexo Major de Histocompatibilidade

MCP – do inglês *Monocyte Chemotatic Protein*

MGF-E8 - do inglês *milk-fat globule epidermal growth factor VIII*

MMP – Metaloproteinase de Matriz

MT – Microambiente Tumoral

OMS – Organização Mundial de Saúde

PARR – do inglês *Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements*

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PCNA - Antigénio Nuclear de Proliferação Celular

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Prox – do inglês *Prospero Homeobox Protein*

PTHrP – Péptido relacionado à Paratormona

RANKL – do inglês *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*

RCT-β – Cadeias β do Recetor das Células T

Sema4D – Semaforina 4D

SNC – Sistema Nervoso Central

SPARC – Proteína Secretada Ácida Rica em Cisteína

SR-A – do inglês *Scavenger Receptor-A*

Src – Família de Tirosina Cinase Src

STAT 3 – do inglês Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TAM – do inglês *Tumour Associated Macrophage* (Macrófago Associado ao Tumor)

TEM – Monócitos que Expressam o Recetor da Angiopoietina

TGF – Fator de Crescimento Transformante (do inglês *Transforming Growth Factor*)

TIE – Recetor da Angiopoietina

Th – Linfócito T Auxiliar (do inglês *helper*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TP – Timidina Fosforilase

VEGF – do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Vascular Endotelial)

Wnt – Proteína codificada por genes da família WNT

Índice

1. Introdução 15
1.1 Linfoma no Cão 16
1.1.1. Definição 16
1.1.2. Epidemiologia: 16
1.1.3. Etiologia 16
1.1.3.1. Fatores Ambientais 17
1.1.3.2. Fatores Imunológicos 17
1.1.3.3. Agentes Infeciosos 17
1.1.3.4. Fatores Genéticos e Moleculares 18
1.1.4. Classificação 18
1.1.5. Comportamento Natural e Patologia 24
1.1.5.1. Linfoma com localização Multicêntrico 24
1.1.5.2. Linfoma com localização Alimentar 24
1.1.5.3. Linfoma de localização Mediastínica 25
1.1.5.4. Linfoma de localização Extranodal 26
1.1.5.5. Linfoma Cutâneo 26
1.1.5.6. Linfoma com localização no Sistema Nervoso Central 27
1.1.6. Síndromes Paraneoplásicos 28
1.1.7. Diagnóstico e Estadiamento 29
1.1.7.1. Exame físico 29
1.1.7.2. Análises Laboratoriais 30
1.1.7.3. Avaliação da medula óssea 30
1.1.7.4. Imagiologia 31
1.1.7.5. Avaliações Citológica e Histológica 32
1.1.7.6. Imunofenotipagem: 33
1.1.8. Tratamento 34
1.1.9. Prognóstico 36
1.2. Microambiente Tumoral 37
1.2.1. Definição 37
1.2.2. Matriz Extracelular (MEC) 38
1.3. Macrófagos Associados ao Tumor (MATs) 39
1.3.1. Definição 39
1.3.2. Nota Histórica 39

1.3.3. Heterogeneidade Macrofágica 39
1.3.4. Importância dos MAT no Desenvolvimento Tumoral 41
1.3.5. Promotores Neoplásicos 41
1.4. Biologia do Tumor 42
1.4.1. Desenvolvimento e Crescimento Tumoral 42
1.4.2. Envolvimento dos MAT no Desenvolvimento Tumoral 42
1.5. Metastização 43
1.5.1. Envolvimento dos MAT na Metastização 44
1.6. Fatores de Crescimento: 44
1.7. Angiogénese 44
1.7.1. Envolvimento dos MAT na Angiogénese 45
1.8. Envolvimento dos MAT na Linfagiogénese 46
1.9. Envolvimento dos MAT na Imunossupressão 47
1.10. Interações entre os MAT e as Células Estaminais Tumorais (CET) 48
2. MATERIAIS E MÉTODOS 50
2.1. Amostra: 50
2.2. População estudada e Análise histopatológica 50
2.2.1. Imunocitoquímica 51
2.2.2. Identificação MAT 51
2.3 Análise estatística 52
3.1. Caracterização da amostra estudada 52
3.2. Infiltração macrofágica 56
4. DISCUSSÃO 60
5. CONCLUSÃO 62
6. Bibliografia 63
I. Apêndice: Protocolos Imunohistoquímicos e Histoquímicos utilizados na optimização do anticorpo MAC387. i
Protocolo MAC387 i
Protocolo MAC387 – recuperação antigénica por acção enzimática: - Proteinase K //Pepsina ii
Protocolo MAC387 + Amplifier iii
Protocolo CD163 e CD68 –PGM1 v
Coloração Perls para detecção de ferro (Fe^{2+}) férrico e hemossiderina nos tecidos. vi
Coloração Hematoxilina e Eosina. vi
Protocolo CD45 e CD79α segundo Dr. Joaquim Henriques vii

II. Apêndice: Fotografias de Imunohistoquimica ix

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Representação do sistema de estadiamento clínico do linfoma das espécies domésticas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) 19

Tabela 2- Representação das modalidades terapêuticas descritas na abordagem ao Linfoma canino .. 36

Tabela 3 - Resumo da classificação do linfoma do cão resultante da Classificação de Revisão Europeia-Americana das Neoplasias Linfóides / Classificação da Organização Mundial de saúde das Neoplasias Linfóides. 49

Tabela 4- Representação dos dados estatísticos da amostra relativamente ao género. 53

Tabela 5- Representação dos dados estatísticos da amostra relativamente à raça..... 53

Tabela 6- Representação dos dados estatísticos da amostra relativamente ao pedigree 54

Tabela 7- Representação dos dados estatísticos da amostra relativos à Idade. 54

Tabela 8- Representação dos dados estatísticos da amostra relativos ao estadiamento clinico ao Diagnóstico 55

Tabela 9 - Representação dos resultados obtidos por imunocitoquímica..... 56

Índice de Figuras

Figura 1- Cadela, 9 anos, Sem Raça Definida, com linfoma multicêntrico. 18

Figura 2- Representação de Linfoma Multicêntrico, classificado de acordo com o esquema de classificação da OMS. 22

Figura 3- Representação de doente com Linfoma Nasal de imunofenótipo T 26

Figura 4- Representação de lesão cutânea solitária, ulcerada, eritematosa, pruriginosa, de doente com Linfoma T Periférico 27

Figura 5- Representação de esfregaço sanguíneo de cão com LBDCG, observam-se blastos em circulação o que evidencia o estadio Leucémico (TNM5) do doente. 31

Figura 6- Representação de punção de linfonodo poplíteo de cão com LBDCG 31

Figura 7- Representação de imagem obtida durante laparoscopia para obtenção de amostras de tecido hepático 32

Figura 8- Representação gráfica da sobrevivência da amostra através do método de Kaplan-meier 55

Figura 9 - Representação gráfica da infiltração macrofágica na sobrevivência da amostra através do método de Kaplan-meier 59

1. Introdução

As neoplasias hematopoiéticas são comummente diagnosticadas em animais de companhia. O linfoma representa o tumor hematopoiético mais frequente no cão e no gato. Sendo uma doença de incidência crescente em animais de companhia e em humanos, representa um desafio clínico na medida em que a sua evolução, resposta à terapêutica, e definição de prognóstico continuam a ser de difícil determinação, estando dependente de muitos fatores que possam contribuir para o seu desenvolvimento e adaptação ao organismo (Teske, 1994; V. E. Valli, 2011). Estudos recentes sugerem a importância do microambiente no estabelecimento e desenvolvimento das células neoplásicas (Albini & Sporn, 2007; Albonico *et al.*, 2013; Vail, 2012). Está também comprovada a ação essencial do microambiente tumoral em neoplasias linfóides (Coupland, 2011). Esta hipótese surgiu em parte a partir de perfis de expressão genética (do inglês *Gene Expression Profile- GEP*) efetuados em tumores.

O microambiente tumoral compreende células e elementos do estroma, bem como componentes celulares do sistema imunitário que estabelecem contacto direto com as células neoplásicas, propiciando condições favoráveis à sua sobrevivência através do fornecimento de nutrientes, neovascularização e imunorregulação local. É provável que o microambiente tumoral contribua para resistência à terapêutica e latência de células estaminais tumorais (CET) (Aldinucci, Gloghini, Pinto, De Filippi, & Carbone, 2010; Barar, 2012; Jinushi *et al.*, 2011).

O cão tem sido proposto como modelo comparativo para o estudo do linfoma no Homem, tendo como base os seguintes pressupostos: 1) as neoplasias são espontâneas e aparentemente não induzíveis; 2) os cães partilham mesmo ambiente que o Homem; 3) os cães domésticos apresentam uma proporção corporal e esperança média de vida que permitem a execução dos mesmos protocolos terapêuticos utilizados em medicina humana, porém com obtenção de resultados de forma mais célere; 4) os donos demonstram-se cooperantes com o tratamento e interessados em envolver os seus animais de estimação em terapias experimentais; 5) a maioria dos linfomas no cão responde favoravelmente ao tratamento; 6) as células neoplásicas seguem o mesmo padrão que as encontradas no Homem (Coyle & Steinberg, 2004; Dobson, J. M., 2013; Teske, 1994).

.

1.1 Linfoma no Cão

1.1.1. Definição

O linfoma é uma neoplasia com origem na proliferação clonal, autónoma e descontrolada de células linforeticulares. Os órgãos linfóides primários como timo, medula óssea e secundários, como as tonsilas e linfonodos são potenciais locais de oncogénese. Todavia devido à ampla difusão dos linfócitos pelo organismo, o linfoma pode manifestar-se em qualquer localização extranodal como pele, olho e sistema nervoso central (SNC) (Ito, Frantz, & Modiano, 2014).

1.1.2. Epidemiologia:

O linfoma é um dos tumores mais frequentes no cão, representando 5 a 7% de todas as neoplasias da espécie. A incidência anual do linfoma não-Hodgkin no cão estima 33 novos casos por 100 000 em risco. (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010; Vail, 2012).

Verifica-se o aumento da prevalência em algumas raças puras como: Airedale Terrier, Basset Hound, Cocker Spaniel, Golden Retriever, St. Bernard, Scottish Terrier, Rottweiler, Boxer, Bulldog e Bull Mastiff (Dobson, J. M., 2013). Estudos anteriores reportam que determinadas raças estão associadas à predisposição para o desenvolvimento de determinado fenótipo de linfoma, por exemplo o Boxer para o desenvolvimento de linfoma T (Lurie, Lucroy, Griffey, Simonson, & Madewell, 2004). Apesar de poder afetar cães de qualquer idade tem maior incidência entre os 6 e os 12 anos (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010).

1.1.3. Etiologia

A etiologia do linfoma é multifactorial e ainda amplamente desconhecida. Têm sido feitos estudos com o objetivo de correlacionar o desenvolvimento da doença com fatores como: I) a poluição ambiental por herbicidas, II) a exposição a campos magnéticos, III) anormalidades cromossómicas (Dobson, J. M., 2013; Teske, 1994), III) a imunossupressão e IV) infeção por retrovírus (Huang *et al.*, 2012; Marconato, Gelain, & Comazzi, 2013; Vail, 2012).

1.1.3.1.Fatores Ambientais

Foi reportado que a exposição a herbicidas compostos por ácido fenoxiacético está relacionada com a incidência de LnH no Homem. Foi sugerido que cães, cujos donos utilizassem como herbicida, produtos com o composto 2, 4-diclorofenoxiacetico, teriam maior probabilidade de desenvolver linfoma em comparação com animais não expostos. Contudo, este risco não foi corroborado em estudos subsequentes (Vail, 2012). Assume-se uma fraca associação entre o desenvolvimento de linfoma no cão e a exposição a fortes campos magnéticos. A poluição ambiental foi sugerida por dois estudos europeus como potencial fator de risco para o desenvolvimento de linfoma no cão (Marconato *et al.*, 2009; Turek, 2008; Vail, 2012).

1.1.3.2.Fatores Imunológicos

Disfunções do sistema imunitário também foram identificadas como potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de LnH no cão, como é exemplo a trombocitopenia imunomediada (Morris, 2001). Existe a suspeita que a doentes sob o efeito de fármacos imunossupressores como a ciclosporina, possa a debilidade do sistema imunitário ser fator predisponente para o desenvolvimento de tumores hematopoiéticos (Blackwood, German, Stell, & O'Neill, 2004).

1.1.3.3. Agentes Infeciosos

A hipótese do envolvimento de um retrovírus na patogénese do LnH no cão não foi ainda confirmada. Em humanos a deteção serológica de infeção por Vírus de Epstein-Barr (EBV) está relacionada com algumas entidades de linfoma (Chetaille *et al.*, 2009). A infeção por este gamaherpesvirus foi documentada em cães com linfoma e têm sido feitos estudos a fim de verificar a relação entre a infeção viral crónica e oncogénese (Cohen *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2012). Ainda não está totalmente comprovada a ação do *Helicobacter sp.* no desenvolvimento de linfoma gástrico no cão, tal como está comprovado no Homem e no gato (Bridgeford *et al.*, 2008). Contudo, demonstrou estar associado ao risco de linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT, do inglês *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) (Neiger & Simpson, 2000; Vail, 2012)

1.1.3.4.Fatores Genéticos e Moleculares

Avanços recentes na área da citogenética molecular, incluindo técnicas de microarranjos têm sido recentemente aplicados em estudos sobre aberrações cromossómicas em cães com linfoma. A publicação do genoma canino e a disponibilidade comercial de técnicas de microarranjos de genes levaram a uma melhor compreensão de eventos genéticos relacionados com o linfoma (Vail, 2012). Foram ainda documentadas mutações no gene p53, supressor tumoral, no LnH no cão. A depleção do cromossoma 11 ou deleção do gene p16 em linfócitos T no LnH no cão demonstrou estar associada à fosforilação da proteína do retinoblastoma e potencialmente envolvida na génese do linfoma. Os genes c-Myc, IGH, RCT-β e BCL-2 surgem na espécie canina com a mesma organização estrutural dos genes equivalentes do Homem. Em medicina humana a ativação dos genes c-Myc e BCL-2 por translocações cromossomais são um dos principais precursores no desenvolvimento do LnH (Shetty *et al.*, 1995; Teske, 1994). A trissomia do cromossoma 13 foi observada em cães com linfoma e está relacionada com o aumento da duração da primeira remissão e do tempo de sobrevivência (Devitt *et al.*, 2009; Vail, 2012).

1.1.4. Classificação

A classificação do linfoma no cão de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) compreende a localização anatómica, critério histológico e caracterização imunofenotípica da neoplasia. As localizações anatómicas mais comuns são: o linfoma multicêntrico (Figura 1), o gastrointestinal, o mediastínico e o extranodal (cutâneo) (Vail, 2012).



Figura 1- Cadela, 9 anos, Sem Raça Definida, com linfoma multicêntrico. A) Evidente linfadenomegália submandibular, retrofaríngea e pré-escapular. O Doente revelava, igualmente, linfadenomegália poplítea e inguinal. B) Pormenor da câmara anterior do globo ocular do mesmo doente da imagem A, com a presença de Hifema, consequente da uveíte secundária ao Linfoma. Fotografias gentilmente cedidas pelo Dr. Joaquim Henriques

A seguinte tabela representa o sistema utilizado para o estadiamento clínico do Linfoma para as espécies domésticas de acordo com a OMS.

Tabela 1 - Representação do sistema de estadiamento clínico do linfoma das espécies domésticas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Vail, 2012).

Sistema de Estadiamento do linfoma para as espécies domésticas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)	
Localização Anatómica	
A.	Multicentrico
B.	Gastrointestinal ou Alimentar
C.	Tímico
D.	Cutâneo
E.	Leucemia (verdadeira, seja envolvimento do sangue e medula apenas)
F.	Outros (incluindo renal solitário)
Estadio (incluindo localização anatómica)	
I.	Envolvimento de um único linfonodo ou tecido linfoide associado a um órgão (excluindo medula óssea)
II.	Envolvimento de múltiplos linfonodos de determinada região
III:	Envolvimento ganglionar generalizado
IV.	Estadio III e envolvimento hepático e/ou esplénico
V.	Estadio I a IV e manisfestação no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou sistema do organismo
Subclassificação do Estadio	
a.	Sem sinais sistémicos
b.	Com sinais sistémicos

Historicamente as neoplasias linfóides foram descritas de forma a diferenciar a doença em diferentes entidades com comportamentos biológicos e clínicos específicos. (Vezzali, Parodi, Marcato, & Bettini, 2010).

Os linfomas surgem da expansão clonal de células linfóides com características morfológicas e imunofenotípicas distintas. Muitos sistemas histológicos foram utilizados para classificar o linfoma no Homem e alguns destes foram aplicados ao linfoma no cão (Albonico *et al.*, 2013).Os principais sistemas de classificação utilizados no LnH no Homem e no cão são: de Rappaport, de Lukes-Collins, do Instituto Nacional do Cancro Formulação de Trabalho (do Inglês: "*National Cancer Institute Working Formulation"*) (NCI-WF), de Kiel - Lennert, da Revisão Europeia-Americana (do Inglês: "*Revised European American Lymphoma"*) (REAL) e mais recentemente da Organização Mundial de Saúde (OMS). (Dobson, J., 2004; Vail, 2012)

A classificação de Rappaport surge em 1966 como o primeiro sistema de Classificação a ser utilizado no linfoma do cão, compreende a identificação do padrão histológico de crescimento neoplásico (difuso ou nodular) e a diferenciação citológica do tumor considerando as categorias: bem diferenciado, pouco diferenciado ou histiocítico (Swerdlow, 2013)

Em 1974 o Sistema de Classificação de Karl Lennert surge em Kiel, Alemanha como a primeira classificação baseada em princípios imunológicos, esta classificação viria a ser revista em 1988 e 1992. A classificação de acordo com Kiel - Lennert foi amplamente utilizada na europa, baseia-se na composição celular da neoplasia (centroblástica, centrocítica, imunoblástica, linfoblástica, plasmocítica e linfocítica), no padrão histológico da lesão (folicular ou difuso) e no fenótipo das células (B ou T). De acordo com este esquema de classificação o linfoma pode ser dividido em dois grupos, os constituídos por células médias a grandes (blastos – 2,0 a 2,5 vezes o tamanho eritrocitário), linfomas de alto grau e os constituídos principalmente por células pequenas (citos – 1,0 a 1,5 vezes o tamanho eritrocitário), este esquema subdivide ainda o linfoma em duas subcategorias tendo por base a imunofenotipagem (B e T) (Teske, 1994).

A classificação de Lukes e Collins surge na mesma época, tendo sido amplamente utilizada na América do Norte. Este sistema associa as características morfológicas do linfoma com determinado fenótipo, contudo a sua aplicabilidade revela-se reduzida à espécie canina devido à heterogeneidade dos grupos citológicos em termos imunológicos. O sistema de classificação do "National Cancer Institute Working Formulation" (NCI-WF) constitui uma atualização do sistema Lukes and Collins, revelou aplicabilidade na categorização do LnH no cão. Este sistema categoriza a neoplasia exclusivamente através de critérios morfológicos e classifica-o quanto ao grau de malignidade em três graus (baixo, intermédio, alto), a malignidade relaciona-se com a biologia tumoral e a probabilidade de sobrevivência do doente. Este sistema foi amplamente utilizado na América do Norte e em outras partes do mundo, com

exceção da Europa onde se utilizava ainda o Esquema de Kiel.
A maioria dos estudos que recorreram a este sistema de classificação (NCI-WF) reporta dados consistentes entre si, referindo que os linfomas de intermédio a alto grau são os mais frequentes na espécie canina. Contudo, a forma imunoblástica é a mais frequentemente reportada nos Estados unidos, enquanto a variante folicular e de células grandes é mais frequentemente reportada na Europa. Os linfomas de baixo-grau são compostos por células pequenas com um baixo índice mitótico, tipicamente progridem lentamente e estão associados a longos tempos de sobrevivência mas são a nível absoluto incuráveis uma vez que respondem pouco favoravelmente à terapêutica. Os linfomas de alto-grau, com elevado índice mitótico, apresentam elevada taxa de progressão, mas são mais suscetíveis de apresentar uma resposta favorável inicial à quimioterapia e no Homem são potencialmente curáveis (Valli *et al.*, 2000; Vezzali *et al.*, 2010).

Em 1994 no contexto do "International Lymphoma study Group" surge um novo sistema de classificação: A revisão europeia-Americana (REAL, do ingles Revised European-American Lymphoma Classification) que incluía como critérios: morfologia celular, imunofenotipo, genótipo e apresentação clinica. Este sistema foi largamente utilizado e mais tarde, até ao sistema de classificação da OMS.

Atualmente, a classificação de acordo com o esquema da organização mundial de saúde (OMS) publicada em 2001, revista em 2008, compreende o melhor e mais completo esquema de classificação no Homem. Este sistema considera o conhecimento topográfico, morfologia celular, imunofenotipagem, caracterização genética e apresentação clínica da neoplasia. Este esquema de classificação foi validado com uma correspondência superior a 85% entre patologistas alcançando-se assim um verdadeiro consenso internacional relativamente à classificação das neoplasias linfóides do Homem (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010; Vail, 2012).

O esquema de classificação de acordo com a OMS foi adaptado para a Medicina Veterinária em 2002. Um projeto semelhante ao previamente levado a cabo em medicina humana validou a concordância entre as entidades neoplásicas do cão e o sistema de classificação implementado pela OMS. Este projeto científico foi aplicado ao linfoma no cão em 2011 com resultados semelhantes aos obtidos no Homem e com uma concordância de 83% entre patologistas. Este sistema de classificação identifica, várias entidades de linfoma e leucemia como doenças individuais, esta categorização compreende análise topográfica, citológica, imunofenotípica, citogenética e molecular da neoplasia e a entidade Linfoma B

Difuso de células grandes está reportada como a mais frequentemente diagnosticada na espécie canina (Figura 2)(Dobson, J., 2004; Vail, 2012; Vezzali *et al.*, 2010).

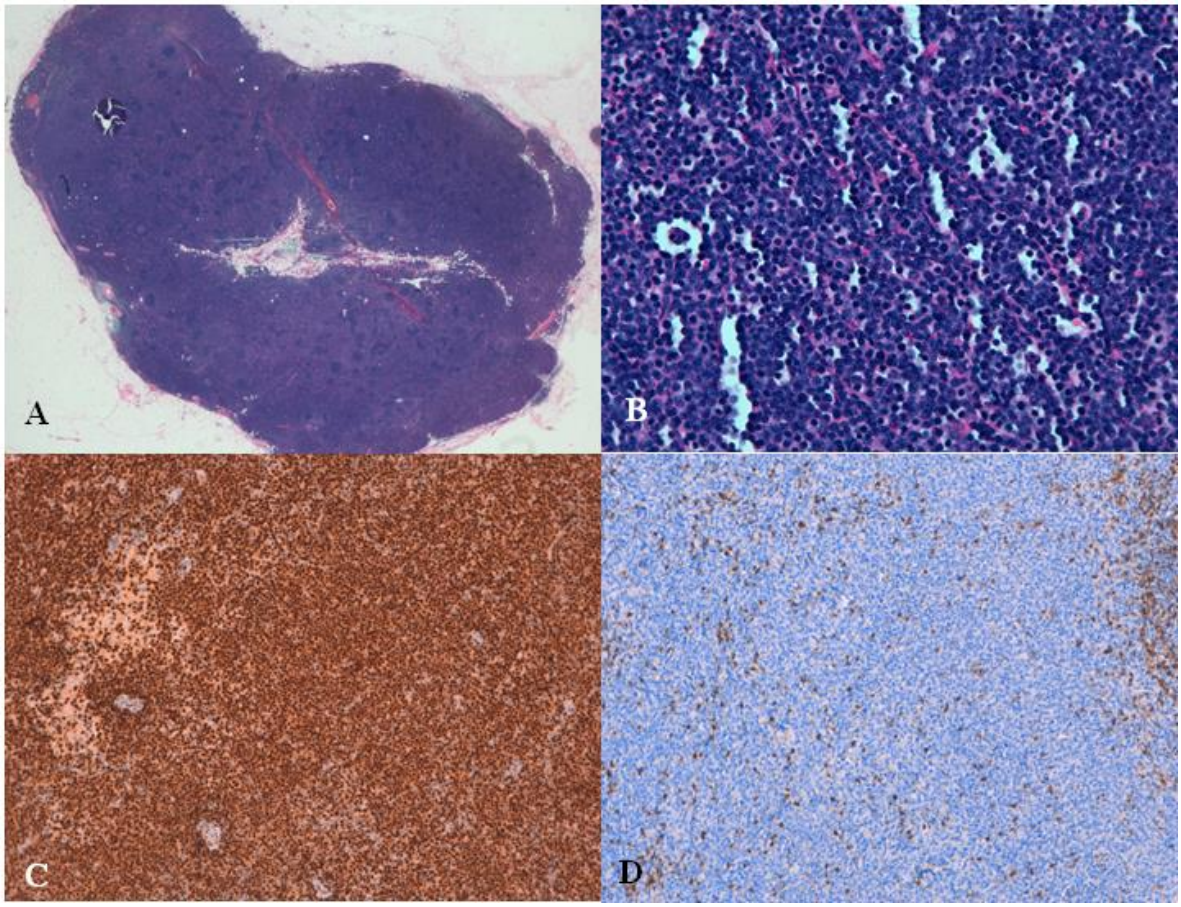


Figura 2- Representação de Linfoma Multicêntrico, classificado de acordo com o esquema de classificação da OMS como Linfoma B Difuso de Células Grandes, variante Imunoblástico. A) Imagem de biópsia de linfonodo poplíteo em ampliação de 20x (coloração Hematoxilina-Eosina– H&E), onde é observado o padrão de distribuição difuso dos linfócitos neoplásicos; B) Imagem histológica do mesmo linfonodo representado em A, em ampliação de 400x (coloração H&E); C) Imagem de Imunohistoquímica (IHQ) do mesmo linfonodo representado em A e B, em ampliação de 100x (anticorpo anti-Pax5 *(NCL-L-Pax5, Novocastra, UK, 1:40)*), revelando o padrão de distribuição de difuso das células B; D) Imagem de IHQ do mesmo linfonodo, em ampliação de 100x (anticorpo anti-CD3 *(A452; Dako, Glostrup, Denmark, 1:500)*), revelando a presença de apenas alguns linfócitos T entre os Linfócitos B neoplásicos. Fotografias gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Felisberto.

.

Entidade LBDCG:

Por definição a entidade de Linfoma B difuso de Células grandes compreende uma neoplasia constituída por células B cujo tamanho nuclear pode ser igual ou superior ao tamanho nuclear do macrófago; ou tamanho nuclear igual a duas vezes o tamanho do núcleo de um linfócito normal. São neoplasias com padrão de crescimento difuso. Nesta apresentação da doença os linfonodos apresentam uma proliferação difusa de células linfoides de grandes dimensões com perda do padrão e arquitectura normal do mesmo (Campo *et al.*, 2011).

Identificam-se dentro desta entidade variantes de acordo com o tipo celular predominante, monotonia celular e índice mitótico entre outros fatores, para medicina humana. Têm sido feitos estudos de modo a verificar a correlação entre estas variantes e os tipos de LBDCG identificados nas espécies domésticas no âmbito da medicina comparada (Ponce *et al.*, 2010).

Reconhecem-se para o homem, as seguintes variantes para linfoma B de alto grau:

1) centroblástico monomórfico: linfoma constituído por células de dimensão média a grande (2,0 a 2,5 vezes o tamanho eritrocitário) com núcleo redondo e cromatina fina, nucléolo pequeno e picnótico. Citoplasma vasto e basófilo. Padrão difuso. Índice mitótico elevado (Vardiman, 2008).

2) centroblástico polimórfico: linfoma constituído por mistura de células macronucleadas de tamanho médio e células blásticas pequenas, centroblastos e imunoblastos. Arquitectura difusa e índice mitótico muito elevado (Vardiman, 2008).

3) Imunoblástico: linfoma constituído por uma mistura de imunoblastos, células macronucleadas, centroblastos e células blasticas pequenas. Arquitectura difusa e índice mitótico elevado (Vardiman, 2008)

4) Anaplásico/mediastínico: linfoma constituído por células muito grandes, núcleo pleomorfico, células binucleadas e células com citoplasma muito vasto e intensamente basófilo. Índice mitótico muito elevado. Arquitectura difusa ou fibrosada (Vardiman, 2008).

5) Plasmocítico/plasmocitoide: linfoma constituído por células pequenas a médias com núcleo redondo e cromatina condensada. Núcleo excêntrico, citoplasma basófilo com uma área justanuclear hipocrómica. Arquitectura difusa e índice mitótico elevado (Vardiman, 2008).

6) Burkitt: Linfoma constituído por células de tamanho medio, núcleo redondo com cromatina muito granular, citoplasma escasso e profundamente basófilo. Arquitetura difusa, padrão de céu estrelado. Índice mitótico extremamente elevado (Vardiman, 2008).

1.1.5. Comportamento Natural e Patologia

1.1.5.1.Linfoma com localização Multicêntrico

A localização multicêntrica é a forma mais frequente no cão, representando cerca de 80% dos animais afetados, contudo apenas 20 a 40% destes doentes apresentam sintomatologia ao diagnóstico. A manifestação clínica mais frequente, nestes casos é a linfadenopatia indolor generalizada (Figura 1 A), hepatomegalia e/ou esplenomegalia e em casos mais avançados envolvimento da medula óssea também pode ocorrer. A maioria dos doentes com linfoma multicêntrico (em sub-estadio"*a"* de acordo com o esquema de estadiamento da OMS), não apresentam sinais de doença sistémica grave. Contudo, podem apresentar uma série de sintomas não específicos, (geralmente associados a um sub-estadio *"b"*do estadiamento da OMS) como: anorexia, perda de peso, vómito, diarreia, emaciação, ascite, dispneia, polidípsia, poliúria e febre (Ettinger, 2003; Marconato, 2011). A poliúria e polidípsia são particularmente evidentes em cães com hipercalcémia maligna (Bergman, 2012). Os doentes com linfoma multicêntrico podem ainda apresentar sinais clínicos relacionados com discrasias sanguíneas secundárias à infiltração da medula óssea pelo tumor, anemia paraneoplásica, trombocitopenia ou neutropenia. A infiltração pulmonar difusa é detetada em cerca de 34% dos cães com linfoma multicêntrico por radiografia torácica, porém é sugerido que este valor seria superior caso todos os doentes fossem submetidos a lavagem broncoalveolar (Burton, Garrett-Mayer, & Thamm, 2013; Ettinger, 2003).

1.1.5.2.Linfoma com localização Alimentar

O linfoma "alimentar" representa aproximadamente 5 a 7% de todos os linfomas. Afetando a espécie canina independentemente da idade, está descrita uma predisposição dos machos em relação às fêmeas. A forma alimentar, contrariamente à forma multicêntrica, geralmente não é caracterizada por envolvimento dos linfonodos superficiais e do baço. Podem constituir parte da síndrome do linfoma multicêntrico mas a maioria dos linfomas gastrointestinais são primários, afetando mais frequentemente o intestino mas também estômago e cólon. Estando frequentemente afetados múltiplos segmentos intestinais. A apresentação macroscópica do linfoma alimentar está associada ao espessamento da submucosa gastrointestinal com massas de textura variável e cor creme, estas lesões podem estender-se do lúmen à serosa (envolvimento transmural) (Coyle & Steinberg, 2004; Gieger, 2011).

As raças Boxer e Shar-Pei revelam maior tendência para o desenvolvimento desta localização anatómica de linfoma (Coyle & Steinberg, 2004).

A maioria dos cães afetados desenvolvem rapidamente sinais clínicos associados a patologia gastrointestinal, esta sintomatologia pode incluir, por ordem decrescente de frequência: vómito, diarreia, perda de peso, anorexia e letargia (Gieger, 2011).

Ao exame físico, sintomas compatíveis com esta condição poderão incluir, fraca condição corporal, massas palpáveis no abdómen, dor abdominal e ansas intestinais espessadas (Gieger, 2011).

Os testes para estadiamento são os mesmos utilizados para abordagem do linfoma (secção 1.1.6). De notar a importância da ultrassonografia abdominal para a identificação dos segmentos do trato gastrointestinal afetados ou alterações no parênquima hepático ou esplénico que lhe possam estar associadas, avaliação da motilidade gastrointestinal ou eventuais obstruções, deteção de organomegalias e avaliação dos linfonodos mesentéricos (Turek, 2008).

No cão a alteração bioquímica mais frequentemente associada ao linfoma alimentar é a hipoalbuminémia e o fenótipo mais frequentemente reportado é o de células T (Gieger, 2011).

1.1.5.3.Linfoma de localização Mediastínica

A localização mediastínica corresponde a cerca de 5% dos casos de LnH no cão. Carateriza-se por um aumento dos linfonodos mediastínicos craniais, timo ou ambos. A hipercalcémia é o sintoma mais frequente em doentes com linfoma sendo mais frequentemente reportado na localização mediastínica. Num estudo feito a animais com esta alteração bioquímica, verificou-se que 43% apresentavam a localização mediastínica. Esta entidade está geralmente associada ao fenótipo de células T (Vail, 2012).

Os sinais clínicos surgem associados à extensão da doença/lesão que origina dificuldade respiratória ou polidípsia e poliúria consequentes da hipercalcemia maligna. O compromisso respiratório surge por compressão das vias aéreas e pelo desenvolvimento de efusão pleural. A intolerância ao exercício e a regurgitação também podem ocorrer bem como síndrome pré-caval, caracterizado por edema da face, pescoço e membros anteriores consequente da compressão ou invasão tumoral da veia cava (North, 2009).

1.1.5.4. Linfoma de localização Extranodal

O linfoma extranodal compreende todas as formas de linfoma que se desenvolvem primariamente em tecidos ou órgãos não linfóides. Os sinais clínicos que acompanham a doença são geralmente inespecíficos ou seja, podem não estar diretamente relacionados com o órgão onde se desenvolve a neoplasia (Figura 3) (Vail & Young, 2007; (Ponce *et al.*, 2010).

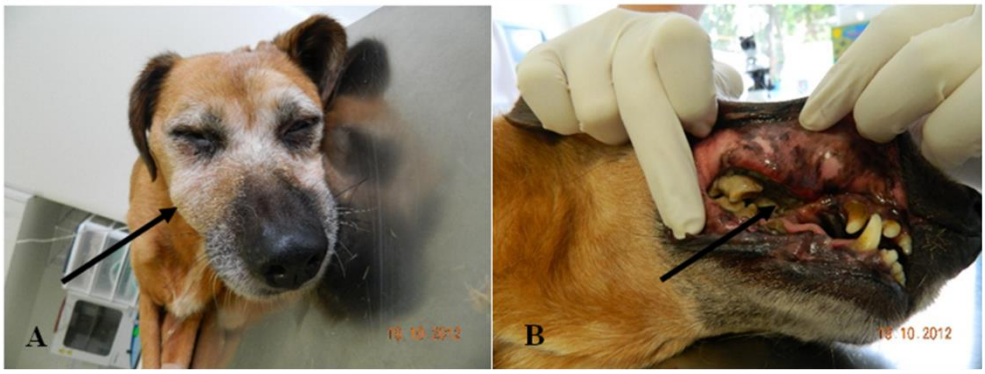


Figura 3- Representação de doente com Linfoma Nasal de imunofenótipo T. A) Imagem revela deformação facial (seta); B) Imagem intraoral da lesão revela presença de ulceração, infeção e fístula oro-nasal. O resultado da biópsia realizado revelou a presença de linfoma T epiteliotrópico. Fotografias gentilmente cedidas pelo Dr. Joaquim Henriques

1.1.5.5.Linfoma Cutâneo

O linfoma cutâneo pode ter uma apresentação solitária (Figura 4) ou generalizada, podendo ser subclassificado como epiteliotrópico (*mycosis fungoides*) ou não-epiteliotrópico (Moore, Affolter, Graham, & Hirt, 2009).

O linfoma cutâneo epiteliotrópico no cão, à semelhança do que acontece no ser humano, tem origem nas células T. Em cães estas células expressam frequentemente CD8+ marcador para células T citotóxicas, enquanto o linfoma cutâneo do ser humano predominam células T *helper*, CD4+ (Moore *et al.*, 2009).

Existe uma forma rara de linfoma cutâneo caracterizado pelo envolvimento da pele e sangue periférico com células T malignas de grandes dimensões (15 a 20 μm de diâmetro ou 2,5 vezes o tamanho eritrocitário), em medicina humana esta entidade é referida como síndrome de Sézary e foi já reportada em cães e gatos (Foster, Evans, Kerlin, & Vail, 1997).

O linfoma cutâneo não-epiteliotrópico pode surgir como uma ou múltiplas lesões, em forma de placa ou nodulares, dérmicas ou subcutâneas. Histologicamente verifica-se

frequentemente infiltração de epiderme e da camada papilar da derme podendo afetar as camadas mais profundas da derme e tecido subcutâneo (Vail, 2012).

Na espécie canina o linfoma cutâneo epiteliotrópico é geralmente de baixo grau (Fontaine, Bovens, Bettenay, & Mueller, 2009). Afetando predominantemente cães entre os 9 e 12 anos de idade. A apresentação clínica começa por eritema evoluindo para a formação de típica de placas e subsequentemente de formações neoplásicas. Numa etapa final da doença pode haver disseminação com envolvimento nodal e células de Sézary em circulação o que evidencia estadio leucémico (Fontaine *et al.*, 2009; Suarez *et al.*, 2013)**.**

Apesar de a pele ser a localização primária mais frequente para o linfoma cutâneo epiteliotrópico, também podem ser encontradas lesões na cavidade oral e junções mucocutâneas (de Lorimier, 2006).



Figura 4- Representação de lesão cutânea solitária, ulcerada, eritematosa, pruriginosa, de doente com Linfoma T Periférico Não Especificado com apresentação multicêntrica e com progressão cutânea epiteliotrópica. Fotografia gentilmente cedidas pelo Dr. Joaquim Henriques

1.1.5.6.Linfoma com localização no Sistema Nervoso Central

O linfoma primário do Sistema Nervoso central pode ocorrer com uma apresentação solitária ou multifocal (Vail, 2012). Representa uma das neoplasias centrais com pior prognóstico, uma vez que é caracterizado frequentemente por comportamento agressivo com tendência a infiltrar para as leptomeninges (North, 2009). O linfoma central em pequenos animais expressa positivamente o marcador antigénico CD3, específico para o fenótipo T em cerca de 90% dos casos. No entanto, foram descritos linfomas B Centrais em cães e gatos, com base na sua expressão uniforme da cadeia leve da imunoglobulina (Ig) de subclasse IgG (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010).

1.1.6. Síndromes Paraneoplásicos

Os síndromes paraneoplásicos compreendem alterações metabólicas, endócrinas e hematológicas, ou seja todas as alterações latentes das constantes fisiológicas de um animal, associadas ou provocadas pelo desenvolvimento neoplásico. Podem surgir como um dos primeiros sinais de malignidade e daí a sua pertinência (North, 2009). Estes conjuntos de sinais clínicos podem ser consequência da produção de substâncias biologicamente ativas tanto na forma de hormonas como seus percursores tais como: fatores de crescimento, citoquinas ou interleucinas. Pode verificar-se envolvimento do sistema imunitário originando-se: formação de imunocomplexos, auto-imunidade e imunossupressão (North, 2009). A avaliação clínica do doente deve ter em consideração a existência de síndromes paraneoplásicos para o correto planeamento da terapia (North, 2009; Turek, 2008).

A caquexia associada ou não a anorexia representa uma das alterações sistémicas mais frequentemente associadas ao desenvolvimento tumoral (Higginbotham, 2010). Outra manifestação sistémica comum em cães com linfoma é a anemia. A fisiopatologia que leva ao aparecimento de anemia, pode ser por mecanismo "de doença crónica" (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010) ou anemia hemolítica imunomediada, sendo que a primeira, ocorre pela coexistência de inflamação crónica associada ao tumor, a uma diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, a uma alteração do metabolismo do ferro ou a uma alteração da resposta por parte da medula óssea à eritropoietina endógena; e é mais comum em doentes com doença disseminada ou metastizada (Higginbotham, 2010). É possível o desenvolvimento de anemia hemolítica imunomediada adquirida, associada ou não a trombocitopenia, quando o organismo reconhece os eritrócitos como um componente estranho (do inglês *non-self*), estas células são revestidas com auto-anticorpos e destruídas prematuramente, estes anticorpos são produzidos concomitantemente ao desenvolvimento de doenças linfoproliferativas. As células envolvidas por auto-anticorpos são posteriormente eliminadas por macrófagos (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010; Turek, 2008).

A anemia pode estar associada a outra alteração sistémica comum em cerca de 50% dos cães com linfoma, a trombocitopénia. Os mecanismos que levam a esta alteração incluem a diminuição da produção de plaquetas, secundária ao envolvimento da medula óssea pelo tumor, a formação de imuno-complexos e anticorpos contra as plaquetas do hospedeiro ou por reatividade cruzada entre antigénios plaquetários e antigénios tumorais no caso específico do linfoma. Por outro lado a microangiopatia pode causar fragmentação plaquetária e coagulação

intravascular disseminada (CID), os quais irão reduzir o número de plaquetas em associação ao aumento do seu consumo ou sequestro. A febre pode surgir frequentemente como síndrome paraneoplásico causada pela produção de citoquinas que estimulam a produção de prostaglandinas promotoras envolvidas no desenvolvimento de pirexia. Reconhecem-se como pirogenos endógenos a interleucina-1 (IL-1) e os fatores de necrose tumoral α e β (TNF-α/β) (Bergman, 2003; North, 2009).

A hipercalcémia é frequente em animais com linfoma, o mecanismo está associado à produção secundária e ectópica de um péptido relacionado com a hormona da paratiroide (PTHrP), o qual estimula a actividade osteoclástica de reabsorção óssea, promovendo o aumento dos níveis séricos de cálcio (Bergman, 2003).

1.1.7. Diagnóstico e Estadiamento

A confirmação diagnostica em animais suspeitos deve incluir: o exame físico, obtenção de amostras para estudo citológico e histológico da lesão (ou linfadenopatia), hemograma completo, perfil bioquímico, urianálise e preferencialmente deverá ser medido o cálcio ionizado, além disso é essencial recorrer a técnicas imagiológicas para definição do estadiamento clínico (Simon T. Kudnig, 2012; Vail, 2012).

1.1.7.1.Exame físico

Na observação do paciente deverão ser examinados todos os linfonodos palpáveis incluindo o toque rectal de modo a verificar se existem pólipos compatíveis com neoformações. Deverão observar-se minuciosamente as mucosas com especial atenção a palidez, icterícia, presença de petéquias ou úlceras; estes sinais poderão ser indicadores de anemia paraneoplásica ou secundária a infiltração neoplásica da medula óssea, falência orgânica, doença imunomediada ou uremia respetivamente. Será espectável identificar á palpação abdominal: organomegalia, espessamento intestinal, linfadenopatia mesentérica ou massa linfática solitária. A auscultação cuidadosa pode sugerir comprometimento respiratório secundário a massa mediastínica ou efusão pleural. O exame oftalmológico deve ser regular nestes doentes uma vez que está descrito que aproximadamente um terço a metade dos cães com linfoma revela alterações oculares (Simon T. Kudnig, 2012; Vail, 2012).

1.1.7.2.Análises Laboratoriais

A alteração hematológica mais frequentemente relacionada com o linfoma é anemia, geralmente caracterizando-se por ser normocrómica e normocítica compatível com anemia associada a doença crónica, não regenerativa. Todavia, anemias hemolíticas e por hemorragia também podem ocorrer (Higginbotham, 2010). A identificação do tipo de anemia através da contagem diferencial de plaquetas e reticulócitos pode ser útil, no caso de ser regenerativa, poderá refletir a perda de sangue ou hemólise. Se houver invasão medular uma baixa contagem de eritrócitos poderá ser acompanhada de trombocitopenia e leucopenia. Está descrita neutrofilía em 20 a 40% dos doentes e linfocitose em cerca de 20%. A observação do esfregaço sanguíneo pode ser útil na identificação de células atípicas em circulação, situação compatível com envolvimento medular e consequente fase leucémica. Outras alterações, podem ser identificadas como hipoalbuminémia em cães com linfoma alimentar. Gamapatias monoclonais foram descritas em cerca de 6% dos cães com linfoma (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010).

Alterações bioquímicas do soro podem refletir zonas anatómicas afetadas pelo tumor ou síndromes paraneoplásicos como a hipercalcemia. Para além da hipercalcemia de origem desconhecida ser sugestiva de neoplasia linfóide a sua associação com a doença pode servir como biomarcador ajudando o clínico a ter uma melhor perceção da resposta do doente á terapêutica ou relapso através dos seus níveis séricos de cálcio. Um aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina podem significar infiltração renal do tumor, nefrose secundária à hipercalcemia ou azotemia pré-renal por desidratação. Da mesma forma um aumento da concentração das enzimas hepáticas ou bilirrubina podem ser secundárias a infiltração tumoral do parênquima hepático (Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X., 2010; North, 2009; Vail, 2012).

1.1.7.3.Avaliação da medula óssea

A avaliação do envolvimento medular através de punção aspirativa com agulha fina ou biopsia é recomendada para um completo estadiamento da doença e elaboração prognóstico e é indicada em cães que apresentem anemia, linfocitose, linfócitos atípicos no sangue periférico ou outras citopenias periféricas (Carter, Kruth, Valli, & Dube, 1990; Marconato, Martini, *et al.*, 2013).

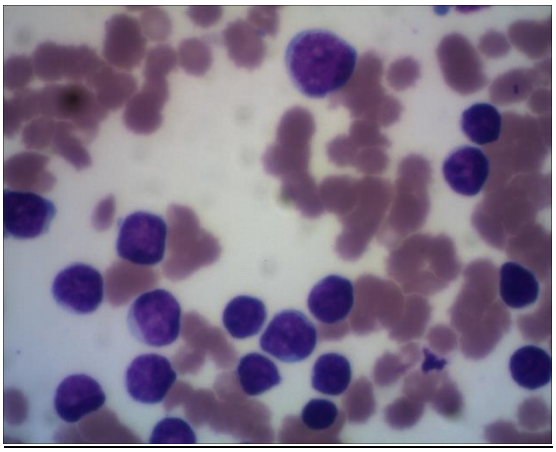


Figura 5- Representação de esfregaço sanguíneo de cão com LBDCG, observam-se blastos em circulação o que evidencia o estadio Leucémico (TMN5) do doente. Fotografia original da autora

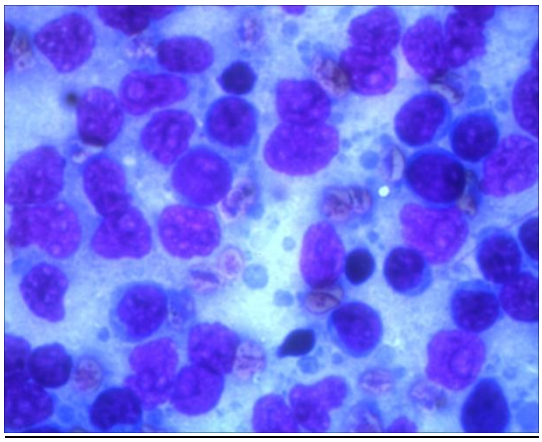


Figura 6- Representação de punção de linfonodo poplíteo de cão com LBDCG, observam-se células blásticas com vários nucléolos compatíveis com centroblastos, corpos linfoglandulares entre as células, achados sugestivos de doença linfoproliferativa. Fotografia original da autora

1.1.7.4.Imagiologia

As provas imagiológicas são importantes para a localização anatómica do tumor numa abordagem inicial mas também são testes na avaliação de extensão da lesão aquando do seu estadiamento (Blackwood, Sullivan, & Lawson, 1997; Vail, 2012).

Cerca de 60 a 75% dos cães com linfoma multicêntrico apresentam alterações radiográficas mediastínicas, pulmonares e/ou pleurais (Higginbotham, 2010; Marconato, 2011).

Relativamente à radiografia abdominal apenas em cerca de 50% dos cães com linfoma multicêntrico se pode evidenciar envolvimento dos linfonodos mesentéricos, baço ou fígado (Higginbotham, 2010).

A ultrassonografia abdominal é importante no diagnóstico de formas de linfoma com origem em regiões do organismo não exploráveis ao exame físico, como o linfoma

gastrointestinal, linfoma hepato-esplénico, linfoma abdominal nodal. A obtenção de amostras destas lesões através de punção aspirativa com agulha fina ou biopsia com trocarter, bem como é importante para a avaliação da resposta à terapia.

As modalidades imagiológicas mais avançadas como endoscopia (obtenção de amostras) (Figura 7), tomografia computorizada e ressonância magnética têm-se tornado de utilização mais frequente em medicina veterinária contribuindo para uma melhor avaliação da extensão da doença (Blackwood *et al.*, 1997; North, 2009).

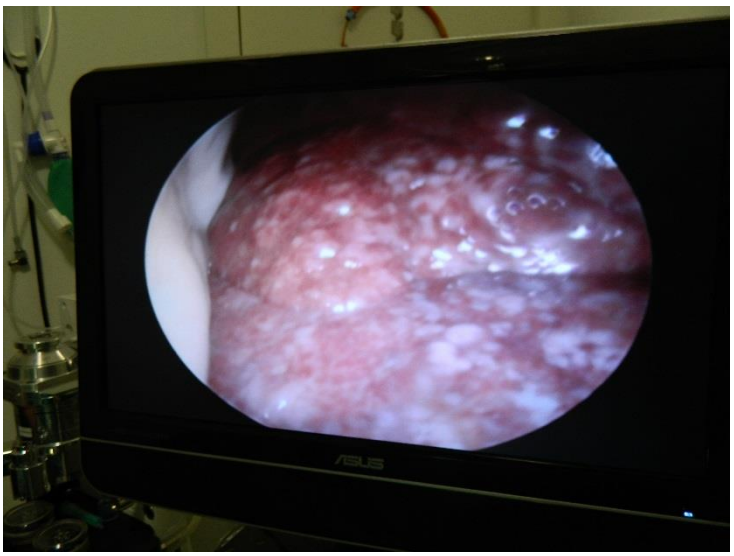


Figura 7- Representação de imagem obtida durante laparoscopia para obtenção de amostras de tecido hepático. São evidentes múltiplos focos de coloração branca por todo o parênquima hepático associado a hepatomegália generalizada. O resultado da biópsia revelou Li Linfoma Primário do Fígado de imunofenótipo T. Fotografia gentilmente cedida por Dr. Rui Bio.

1.1.7.5.Avaliações Citológica e Histológica

O estudo do tecido e das células que constituem o tumor é essencial para o diagnóstico definitivo de linfoma (Meda *et al.*, 2000; Simon T. Kudnig, 2012)

Na avaliação dos linfonodos devem evitar-se os que estão associados a áreas normalmente reativas, como o linfonodo submandibular, exceto se estes forem os únicos aumentados (Simon T. Kudnig, 2012).

Na maioria dos casos o diagnóstico de linfoma pode ser feito através do estudo citológico dos tecidos afetados. Este estudo baseia-se na morfologia das células neoplásicas, nas suas características de malignidade, tais como tamanho do núcleo e sua proporção com tamanho do citoplasma, forma do núcleo, padrão e distribuição da cromatina, número e tamanho dos nucléolos, heterogeneidade ou monotonia celular e ainda a presença de figuras de mitose

atípicas. A classificação citológica pode permitir a identificação dos tipos celulares mais frequentemente associados ao linfoma mas não permite uma perceção da arquitetura dos tecidos ou quantificação do índice mitótico da neoplasia como na análise histopatológica (Galindo *et al.*, 2000; Simon T. Kudnig, 2012). Habitualmente são observadas em predominância blastos com dimensão média a grande (2,0 vezes o tamanho eritrocitário), estas células podem apresentar nucléolo visível e citoplasma intensamente basófilo ou cromatina finamente dispersa sem nucléolo identificável. Na avaliação inicial do tecido linfóide suspeito, os achados citológicos como monotonia celular com predomínio de células imaturas podem ser suspeitos de linfoma. O estudo histopatológico é essencial para o diagnóstico absoluto e correta classificação de acordo com o esquema da OMS uma vez que permite avaliar o padrão da lesão (difuso ou nodular) e a arquitetura dos tecidos envolventes. A identificação da linhagem celular B ou T é determinada com recurso à técnica de imunohistoquímica (Figura 2 C e D) ou imunocitoquímica a partir de amostras de análise histopatológica (Figura 2 A e B) ou citológica, respetivamente. Histologicamente, os linfomas com origem em células B apresentam geralmente intensa basofilia citoplasmática, maior número de núcleos em posição excêntrica, podendo apresentar uma diferenciação plasmocitóide respetiva e excluindo as formas linfoblásticas que se apresentam menos pleomórficas que os linfomas com origem nas células T. São ainda reconhecidas a neoangiogénese e a marcada inflamação relacionada aos linfomas de fenótipo T.(Caniatti, Roccabianca, Scanziani, Paltrinieri, & Moore, 1996; Gibson *et al.*, 2004).

1.1.7.6. Imunofenotipagem:

A imunofenotipagem é utilizada para determinar o fenótipo das células que constituem o tumor, permitindo a correta classificação de acordo com o esquema de classificação da OMS. Dado que no tecido linfoide é expectável a identificação de uma população celular heterogénea (de fenótipo B e T) a identificação do mesmo imunofenótipo na vasta maioria das células é sugestivo de processo neoplásico. O imunofenótipo é determinado pela expressão de moléculas específicas de células B, como CD79a, CD20, PAX5 (Figura 2 C) e células T, como CD3 (Figura 2 D)(Jubala *et al.*, 2005; Valli, Kass, San Myint, & Scott, 2013; Willmann *et al.*, 2009).

Atualmente é possível reconhecer o fenótipo de uma amostra por métodos imunocitoquímicos, com recurso a técnicas como a citometria de fluxo. Esta técnica permite identificar o fenótipo da amostra através da identificação dos antigénios expressos na superfície das células neoplásicas com recurso a anticorpos marcados com fluorocromos que são

reconhecidos a determinado comprimento de onda pelo citómetro, promovendo a formação de "nuvens" indicadoras de população celular com a expressão do mesmo antigénio.

A citometria de fluxo permite ainda a distinção entre neoplasia de origem linfóide e histiocítica com envolvimento do tecido linfóide (Comazzi & Gelain, 2011).

O imunofenótipo também pode ser determinado através de imunohistoquímica. Esta técnica pode ser realizada em peças embebidas em parafina ou por congelação. Esta técnica consiste na marcação das preparações com diferentes painéis de anticorpos monoclonais com especificidade para antigénios de membrana, citoplasmáticos ou nucleares expressos unicamente pelas células B e T. O padrão de expressão das preparações e a sua interpretação permitem a classificação imunofenotípica. Além disso é possível determinar o fenótipo do linfoma através da técnica de PCR para a deteção dos rearranjos do recetor de cadeias de imunoglobulina (PARR), a qual consiste na identificação de picos mono- ou oligoclonais indicadores da expressão do recetor das células T (RCT) ou recetor das células B (RCB)(Lana, Jackson, Burnett, Morley, & Avery, 2006).

1.1.8. Tratamento

O linfoma é a neoplasia canina mais frequentemente tratada com quimioterapia (Valli *et al.*, 2013).

A abordagem terapêutica do doente com linfoma deve considerar o estadio e subestadio da doença, coexistência de síndromes paraneoplásicos, o estado fisiológico do animal e relação entre a probabilidade de sucesso da terapêutica e efeitos secundários que esta possa ter na qualidade de vida do doente (tabela 2)(Morris, 2001).

O tempo de sobrevivência estimado para cães com linfoma que não recebam qualquer tratamento é de 4 a 6 semanas após diagnóstico apesar de existirem variações neste intervalo de tempo. Na grande maioria dos casos, o linfoma é considerado uma doença sistémica ou neoplasia difusa requerendo terapia sistémica de modo a atingir remissão ou cura (Morris, 2001). Sabe-se que numa fase inicial do tratamento as células tumorais são mais sensíveis aos fármacos citotóxicos, esta sensibilidade pode diminuir com a progressão do tempo e as células malignas que se mantêm revelam-se mais resistentes à quimioterapia. Estudos prévios suportam a ideia de que esta resistência se deve à expressão do gene que codifica a glicoproteína-P, responsável pelo transporte transmembranar do fármaco para fora da célula (Lee, Hughes, Fine, & Page, 1996). Apesar disto, quando tratados, a maioria dos animais responde ao tratamento

conseguindo manter uma boa qualidade de vida, apresentando regressão dos sinais clínicos e alterações relacionadas com a doença, revelando-se gratificante para o clínico e para o proprietário(Ettinger, 2003).

O CHOP, cujas letras representam respetivamente: Ciclofosfamida (C), Doxorubicina (H, hidroxidaunorubicina), Vincristina (O, Oncovin), e Prednisolona (P) a uma combinação de substâncias farmacológicas que o constitui é o protocolo terapêutico mais amplamente utilizado no tratamento no LnH no cão (Burton *et al.*, 2013). Estão reportadas estimativas de resposta completa de cerca 80-90% ao tratamento e de tempo médio de sobrevivência de 12 meses aproximadamente para o protocolo CHOP (Lori, Stein, & Thamm, 2010). Este protocolo mais complexo, que incorpora doxorrubicina associada a outros fármacos citotóxicos é o que oferece maior tempo de remissão. A teoria subjacente é a de que estes fármacos, usados em simultâneo no mesmo plano terapêutico, tenham diferentes mecanismos de ação e atuem em diferentes fases do ciclo celular aumentando a taxa de resposta terapêutica. Existem também protocolos menos complicados como os protocolos de agente único, mas que proporcionam taxas de remissão inferiores (Burton *et al.*, 2013).

Tabela 2- Representação das modalidades terapêuticas descritas na abordagem ao Linfoma canino

Tipo de cancro	Modalidades terapêuticas descritas
Linfoma	Vários protocolos de quimioterapia
	Imunoterapia – âmbito investigacional
	Radioterapia de corpo todo
	Transplante medular, radioterapia a metade da área corporal apos atingida remissão com quimioterapia – âmbito investigacional
	Cirurgia para linfoma solitário (estadio I), linfoma extranodal solitário; Esplenectomia para esplenomegalia grave associada a linfoma; Cirurgia indicada ainda nos casos de linfoma gastrointestinal obstrutivo

1.1.9. Prognóstico

Os dois fatores de prognóstico, mais consistentemente identificados para o LnH no cão relacionam-se com a entidade definida pelo esquema de classificação da OMS, o imunofenótipo do linfoma e a taxa de resposta inicial à quimioterapia (Keller, MacEwen, Rosenthal, Helfand, & Fox, 1993). Existem evidências de que tumores imunoreactivos a CD3 apresentam períodos de remissão e sobrevivência mais curtos. De acordo com o esquema de classificação da OMS doentes que apresentem o subestadio *b*, ou seja, que apresentem sinais clínicos aquando do diagnóstico da doença, apresentam pior prognóstico que o subestadio *a*. Os estadios precoces da doença (I e II) estão associados a melhor prognóstico que estadios mais avançados (Teske, 1994). Relativamente à classificação Histológica (subtipo) é descrito que linfomas de médio a elevado grau, como a maioria dos linfomas B difusos de células grandes (LBDCG), centroblásticos ou imunoblásticos, podem apresentar boas taxas de resposta ao tratamento mas tendem a ter relapsos precoces. Contrariamente, cães com linfomas de baixo grau, de células pequenas linfocíticos ou centrocíticos, geralmente apresentam parcas taxas de resposta à terapia inicial, porém apresentam períodos de remissão e sobrevivência superiores aos doentes com linfomas classificados com elevado ou médio grau. A localização anatómica da doença também pode ser considerado potencial fator de prognóstico, neoplasias primárias cutâneas localizadas tendem a ter melhor prognóstico que as difusas, por exemplo. O linfoma alimentar difuso, o linfoma T hepatoesplénico com sobre-expressão do RCT γ/δ e os linfomas primários do sistema nervoso central tendem a estar associados a pior prognóstico que os linfomas cutâneos indolentes caracterizados por uma população de células T linfocíticas (Salles *et al.*, 2011).

Admite-se, também a influência negativa de sintomas sistémicos associados ao tumor como a hipercalcemia e anemia, envolvimento dos linfonodos mediastínicos, sistema nervoso central, olho ou medula óssea (Bergman, 2012).

Estão sugeridos diversos biomarcadores, possíveis indicadores de prognóstico para o linfoma do cão, a sobre-expressão destas proteínas podem ser compatíveis com prognóstico desfavorável (Aresu *et al.*, 2014; Carioto, Kruth, Betts, & King, 2001; Dhaliwal, Kitchell, Ehrhart, Valli, & Dervisis, 2013; Elliott, Cripps, & Blackwood, 2013; Kiupel, Bostock, & Bergmann, 1998; Kiupel, Teske, & Bostock, 1999; Mealey, Northrup, & Bentjen, 2003; Phillips *et al.*, 2000).

Estão descritos como potenciais indicadores de prognóstico a sobre-expressão de determinados marcadores de proliferação. Uma das características típicas do desenvolvimento neoplásico é o seu crescimento incontrolável. No acompanhamento clínico de um doente oncológico é importante quantificar a proliferação celular, de modo a avaliar o desenvolvimento neoplásico. Existem marcadores histoquímicos como a Região Organizadora Nucleolar Argirofílica (AgNOR) e imunohistoquímicos como o Antigénio Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e Ki-67 que permitem quantificar a proliferação celular neoplásica(Kiupel *et al.*, 1998).

A sobre-expressão de AgNORs indica elevada necessidade de biogénese ribossomal e consequentemente atividade metabólica mais elevada. Estando por isso associados a ciclos celulares mais curtos e a taxa elevada de proliferação celular. Em animais de companhia com linfoma a quantificação de AgNOR representa uma ferramenta importante na estimativa do tempo médio de sobrevivência (North, 2009; Waters, 2002).

O Ki-67 é uma proteína nuclear de elevado peso molecular, é expressa exclusivamente pelas células durante o ciclo celular, deste modo a sua expressão de permite quantificar o crescimento de uma população celular (Phillips *et al.*, 2000; Sokolowska, Micun, Malicka, & Lechowski, 2012).

1.2.Microambiente TumoralDefinição

O microambiente tumoral é constituído por células, pelos elementos da matriz extracelular e por fatores solúveis e mecânicos que promovem a oncogénese, favorecem o crescimento tumoral e a invasão dos tecidos através do suporte e proteção do tumor da resposta imunitária do hospedeiro, favorecendo resistência às terapêuticas e propiciando condições de progressão de metástases (Ding, Zou, & Wei, 2012; Steidl, 2011).

Tem sido sugerido que a infiltração tumoral por parte de células do sistema imunitário adaptativo está associada a melhor prognóstico uma vez que representará uma resposta anti-tumoral por parte do organismo. Contrariamente, a presença de células do sistema imunitário

inato, especialmente macrófagos, constitui um fator favorável à progressão neoplásica (Cacciatore *et al.*, 2012; Sanchez-Espiridion *et al.*, 2012).

São os processos dinâmicos e bidirecionais que se estabelecem entre as células tumorais e um conjunto de células reativas do seu microambiente que têm importância fulcral nas várias fases de desenvolvimento do tumor bem como na sua progressão (Fessler, Dijkgraaf, De Sousa, & Medema, 2013).

Este microambiente celular compreende um grupo heterogéneo de células que pode incluir macrófagos, células dendríticas foliculares, células reticulares foliculares, fibroblastos e células endoteliais envolvidas por uma complexidade de elementos constituintes da matriz extracelular (Yang & Ansell, 2012).

Outro aspeto importante do microambiente tumoral é a constituição e organização da matriz extracelular, cujas propriedades afetam a diferenciação das células neoplásicas e capacidade de invasão (Cacciatore *et al.*, 2012).

1.2.2. Matriz Extracelular (MEC)

A matriz extracelular é constituída por macromoléculas proteicas que permitem o suporte estrutural das células nela presente. A MEC é constituída pela 1) membrana basal, camada de moléculas com 50 nanómetros de espessura sobre a qual se encontram as células endoteliais ou epiteliais e 2) pela matriz intersticial, constituída por moléculas da MEC (entre as quais se destacam: as lamininas, proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs), fibronectinas, tenascinas, entactinas, trombospondinas e proteína secretada ácida rica em cisteína (SPARC) no seio das quais se podem encontrar elementos celulares. Apesar do colagénio tipo IV ser o componente predominante das membranas basais, o colagénio fibrilhar como os colagénios tipo I, II e III, surge com maior frequência nas matrizes intersticiais (Ahmed, Riley, Rice, & Quinn, 2005).

Durante o desenvolvimento tumoral e angiogénese, a MEC representa muito mais de que suporte estrutural ao tumor, proporcionando o contexto necessário para a diferenciação das células endoteliais através da sinalização integrina-dependente. No seu conjunto as integrinas reconhecem e interagem com várias moléculas constituintes da MEC e do citoplasma, incluindo: colagénio, lamininas, fibronectinas, trombospondinas e tenascinas (Alphonso & Alahari, 2009; Liu *et al.*, 2012).

A ativação das integrinas revela ser um sensor dinâmico e contínuo de remodelação do microambiente dada a importante função da Cinase de Adesão Focal (FAK), da família de cinases Src e da Cinase Ligada à Integrina (ILK)(Ahmed *et al.*, 2005).

1.3.Macrófagos Associados ao Tumor (MATs)

1.3.1. Definição

Os macrófagos com polarização tipo 2, associados ao tumor são constituintes frequentes do microambiente de muitos tumores sólidos, apresentando propriedades proangiogénicas e proinvasivas mas também de supressão dos linfócitos T CD8+, protegendo as células neoplásicas da imunidade anti-tumoral do organismo. (Allavena & Mantovani, 2012)

1.3.2. Nota Histórica

Os macrófagos foram descritos pela primeira vez pelo vencedor do prémio nobel em 1905, Elie Metchnikoff, pela sua teoria da fagocitose que incluiu a identificação destes fagócitos (Hao *et al.*, 2012).

Em 1970 foi descoberto que os macrófagos associados ao tumor constituíam o leucócito predominante, com papel determinante para o desenvolvimento tumoral (Hao *et al.*, 2012).

Os macrófagos, inicialmente identificados como fagócitos de grandes dimensões, desempenham a importante função do sistema inato e adaptativo de fagocitose de bactérias e outros microrganismos e pela secreção de moléculas inflamatórias. Assumia-se que os macrófagos possuíam funções deletérias e inflamatórias, porém estudos recentes revelam que estas células estão envolvidas em numerosas funções, tais como: a) capacidade de remodelação ou reparação de tecidos, b) neovascularização, c) aterosclerose e d) desenvolvimento tumoral. Os efeitos benéficos dos macrófagos devem-se aos fatores tróficos que estes libertam, em particular os que afetam as células do parênquima, promovendo o desenvolvimento tecidular, a sua reparação e hemóstase (Heusinkveld & van der Burg, 2011).

1.3.3. Heterogeneidade Macrofágica

A heterogeneidade macrofágica pode ser simplificada no conceito de polarização que compreende dois fenótipos distintos, macrófagos M1 e M2. (Allavena & Mantovani, 2012) Os macrófagos M1 são ativados de forma clássica através de produtos bacterianos ou de citoquinas produzidas por linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1). Promovem a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro através da produção de citoquinas pro-inflamatórias como o TNF-α, a Interleucina 6 (IL-6) e a IL-12, e ainda radicais livres e compostos

nitrogenados que têm uma função citotóxica sobre as células em transformação neoplásica. Contrariamente, os macrófagos M2, polarizados por via alternativa quando se encontram num microambiente rico em citoquinas específicas de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2). Estes macrófagos apresentam capacidade de remodelação tecidular, produzem fatores de crescimento que propiciam a reparação dos tecidos e suprimem a resposta imunitária adaptativa dos Th1 através da produção de fatores anti-inflamatórios como a IL-10, o Fator de Crescimento Transformante-β (TGF-β) e o antagonista do recetor da IL-1 (Allavena & Mantovani, 2012; Jaguin, Houlbert, Fardel, & Lecureur, 2013).

Esta plasticidade identificada nos macrófagos em resposta aos diferentes estímulos do microambiente onde se encontram, constitui uma importante ferramenta de resposta específica por parte destas células. Assim, numa infeção bacteriana local, por exemplo, os macrófagos ativados M1 serão os responsáveis pela resposta inflamatória aguda inicial com o objetivo de eliminar o agente agressor. Numa fase posterior, os macrófagos M2 terão a capacidade de remodelação dos tecidos lesados e de promover a proliferação e cicatrização destes tecidos através da libertação de citoquinas e fatores de crescimento que levam ao tropismo de fibroblastos e angiogénese. (Allavena & Mantovani, 2012)

Os macrófagos expressam ainda recetores como: Recetor *Scavenger* A (SR-A), Receptor da Manose (CD206), Recetor *Scavenger* da Hemoglobina (CD163), Dectina-1 e a molécula com a designação em inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN ou CD 209), envolvidos na extração de detritos celulares, fagocitose e apresentação de antigénios. (Allavena & Mantovani, 2012)

Os macrófagos são células com plasticidade que lhes permite alternar do estado ativado M1 para M2 e vice-versa dependendo dos sinais específicos de indução (Barros, Hauck, Dreyer, Kempkes, & Niedobitek, 2013).

1.3.4. Importância dos MAT no Desenvolvimento Tumoral

Os MAT são recrutados numa fase precoce para o local do tumor onde frequentemente desempenham funções que propiciam o seu desenvolvimento, através da ativação de fatores neoangiogénicos, secreção de fatores solúveis que dão suporte às células tumorais contra o estímulo apoptótico e estímulo de proliferação e invasão de células malignas. Os MAT têm sido associados à supressão do sistema imunitário adaptativo, podendo, através da supressão da sua atividade anti-tumoral, contribuir ativamente para o desenvolvimento das células malignas (Biswas, Allavena, & Mantovani, 2013; Raposo, T. P. *et al.*, 2013). Os monócitos circulantes são recrutados pelas células tumorais e do estroma através da produção de quimiotáticos. Uma vez em contacto com o tumor os monócitos sofrem diferenciação para macrófagos principalmente devido à presença do Fator Estimulante de Colónica Macrofágico *(*M-CSF) produzido pelas células neoplásicas. De acordo com microambiente tumoral os monócitos sofrem diferenciação para macrófagos associados ao tumor e adquirem capacidades imunossupressoras e pro-neoplásicas(Jaguin *et al.*, 2013) .

1.3.5. Promotores Neoplásicos

Os MAT produzem vários fatores tróficos e de ativação, tais como: Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Transformante-β (TGF-β). Estes fatores de crescimento promovem diretamente a proliferação das células tumorais e aumentam a resistência ao estímulo apoptótico. Os MAT são também uma das maiores fontes de enzimas proteolíticas que degradam a MEC, favorecendo a libertação de fatores de crescimento desta. A IL-6 libertada pelos MAT desempenha uma importante função na sobrevivência, suporte e proliferação das células neoplásicas em tumores de origem epitelial e hematopoiética (Taskinen M, 2011).

Recrutamento de Monócitos

Os monócitos sofrem diferenciação para MATs por ação de várias moléculas quimiotáticas produzidas pelas células tumorais e do estroma. A molécula CCL2 também conhecida como Proteína Quimiotática dos Monócitos (MCP) desempenha um papel fundamental no recrutamento de macrófagos tecidulares. Esta molécula é produzida por células neoplásicas, fibroblastos e pelos próprios macrófagos. Outras moléculas que promovem o recrutamento de monócitos e outras células mielóides são: CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CXCL12,

VEGF, PDGF, IL-10 e um grupo de proteínas libertadas pelas células tumorais em apoptose, as Alarminas (Hao *et al.*, 2012; Richards, Hettinger, & Feuerer, 2013).

1.4.Biologia do Tumor

1.4.1. Desenvolvimento e Crescimento Tumoral

As neoplasias são doenças com componente genética que compreendem alterações a nível genético do ADN, reconhecem-se diversos fatores capazes de provocar estas alterações, denominam-se fatores carcinogénicos que por sua vez levam a alterações na expressão de genes reguladores originando o crescimento indiscriminado da célula e consequente oncogénese (Waters, 2002).

As células tumorais replicam-se independentemente de estímulo mitótico externo ou sinais inibidores de crescimento, devido à ativação dos oncogenes celulares. Contudo, para o tumor se estabelecer e desenvolver em determinado tecido necessita de fonte de suprimento sanguíneo (angiogénese). A capacidade angiogénica do tumor é fundamental para o seu estabelecimento, desenvolvimento e subsistência. A angiogénese é mantida através da comunicação bidirecional (positiva e negativa) entre mediadores solúveis e os seus recetores (integrinas), locais de adesão que são responsáveis pelas interações entre as células e a matriz extracelular. São exemplos de fatores angiogénicos os seguintes: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fribroblastos-β (FGF-β) (Cacciatore *et al.*, 2012; Fidler, 2001; Waters, 2002).

1.4.2. Envolvimento dos MAT no Desenvolvimento Tumoral

Para além de promoverem a angiogénese e linfagiogénese os MAT desempenham um papel importante no crescimento do tumor primário. Estudos recentes correlacionaram a proliferação de células neoplásicas com a infiltração macrofágica. É reconhecido que os macrófagos que infiltram massas de células neoplásicas podem libertar várias substâncias que facilitam a proliferação tumoral. Por outro lado, estudos reportam que a depleção macrofágica prejudica o desenvolvimento neoplásico. A MMP-9 produzida pelos macrófagos, além do fator angiogénico, desempenha, também, um papel importante para o crescimento do tumor. A IL-23 está relacionada com a incidência tumoral e promotora do seu crescimento através da regulação positiva da produção de MMP-9 e estímulo da resposta inflamatória. (Aresu *et al.*, 2014; Raposo, T., Gregorio, Pires, Prada, & Queiroga, 2014)

Os MAT limitam a citotoxicidade do microambiente favorecendo, deste modo, o desenvolvimento tumoral. Esta afirmação é corroborada pelo fato de que a maioria da

população macrofágica que constitui o microambiente tumoral é do fenótipo M2 e que estas células conseguem produzir grandes quantidades de IL-10, molécula supressora da ação das células Th1 e simultaneamente das células NK, contribuindo para a supressão da ação anti-tumoral do doente (Baay, Brouwer, Pauwels, Peeters, & Lardon, 2011). Estudos recentes reportam ainda que a molécula adrenomedulina produzida pelos MAT está relacionada com angiogénese e crescimento celular através da interação com recetores específicos das células endoteliais de modo a promover o seu crescimento via parácrina (Chen, P. *et al.*, 2011) .Outro mecanismo é por ativação do Óxido Nítrico Endotelial (eNOS) nos próprios macrófagos promovendo o seu estímulo de forma autócrina (Decker *et al.*, 2008). Outros estudos demonstram que a inibição dos recetores de adrenomedulina nos MAT prejudica a angiogénese e o crescimento tumoral (Chen, P. *et al.*, 2011; Riabov *et al.*, 2014).

1.5.Metastização

Para uma célula tumoral metastizar num tecido que não o que lhe deu origem, ela tem de ter a capacidade de se mobilizar, vencer as barreiras tecidulares e entrar na corrente sanguínea, este processo requer a produção de enzimas proteolíticas, fatores de crescimento e citoquinas, entre outros. As células neoplásicas podem produzir alguns destes mediadores de invasão, enquanto outros são produzidos pelo tecido não tumoral que envolve as células neoplásicas (Bodenstine & Welch, 2008).

Estudos demonstram que a maioria das células neoplásicas que chegam à corrente sanguínea morre (entre 90 a 99%) por consequência tanto de fatores físicos (fluxo turbulento) como celulares e imunes do hospedeiro. Este fato sustenta a hipótese de que as células neoplásicas cultivam um microambiente favorável ao seu estabelecimento e crescimento e que, entre outras funções, as protege da imunidade do hospedeiro.

Finalmente, para se estabelecerem como novos tumores em tecidos ou órgãos distantes do tumor primário, as células neoplásicas precisam de neovascularização que lhes confira sustentabilidade, para isso produzem fatores angiogénicos e induzem a sua produção pelas células vizinhas normais. (Atherton *et al.*, 2013; Waters, 2002).

Esta última etapa da progressão tumoral sustenta a ideia de que as células tumorais estabelecem sempre relações diretas e fundamentais ao seu desenvolvimento com as células do seu meio envolvente.

1.5.1. Envolvimento dos MAT na Metastização

A metastização é um marcador importante para determinar a gravidade da doença constituindo um fator de prognóstico (Richards *et al.*, 2013) .

As células tumorais metastizam através de vasos sanguíneos ou linfáticos o que origina a formação de tumores ectópicos. Estudos reportaram que não apenas as células neoplásicas mas também os MAT migram com frequência. Sabe-se também que o fator de crescimento epidérmico (EGF) libertado pelos macrófagos interage com o fator CSF-1 produzido pelas células neoplásicas com o objetivo de promover a migração neoplásica. Vários estudos sugerem que as células tumorais movem-se sempre próximas de MAT os quais parecem auxiliar as células malignas na sua progressão (Allavena & Mantovani, 2012; Richards *et al.*, 2013; Taskinen M, 2011).

Por outro lado, nos locais onde o tumor ectópico se desenvolverá os macrófagos irão influenciar o microambiente promovendo a fase de invasão. Através da expressão de MMPs, nomeadamente a MMP-2 e MMP-9 por estímulo de TNF-α. Estas MMP degradam as proteínas constituintes da MEC de modo a promover a metastização. (Chinni *et al.*, 2006; Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010; Riabov *et al.*, 2014)

1.6.Fatores de Crescimento:

Os fatores de crescimento são péptidos de baixo peso molecular que funcionam não apenas como promotores da proliferação celular mas também como reguladores do desenvolvimento e diferenciação celular embriológico e durante a vida do organismo. Contrariamente às hormonas, as quais são libertadas por órgãos endócrinos e dirigidas a recetores celulares ou nucleares específicos; os fatores de crescimento podem ser produzidos por todas as células e são dirigidos a recetores específicos em diferentes tipos de células. A elevada afinidade dos fatores de crescimento, para os recetores membranares e nucleares, permite a transcrição genética e consequente modulação da função celular. Estas vias de transdução, desempenham um importante papel como promotores do crescimento tumoral (Waters, 2002; Zhang, Nie, & Chakrabarty, 2010).

1.7.Angiogénese

O processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da vascularização já existente é uma etapa essencial para o desenvolvimento tumoral, a progressão e crescimento da neoplasia

dependem desta neovascularização para o fornecimento de oxigénio e nutrientes às células tumorais. Sem suporte sanguíneo a neoplasia incipiente não poderá progredir por mais de 2 mm (Vong & Kalluri, 2011). É proposto, que um balanço positivo de fatores pro-angiogénicos sobre os anti-angiogénicos no microambiente tumoral provoque a alteração angiogénica determinante para o crescimento de vasos do tumor. A angiogénese é também fulcral no desenvolvimento da doença metastática (Taskinen M, 2011; Vong & Kalluri, 2011).

Existem diversos elementos celulares e não-celulares no microambiente envolvente das células neoplásicas que promovem o seu crescimento. As células não-neoplásicas presentes na matriz extracelular (MEC), tais como; miofibroblastos, células perivasculares e inflamatórias, participam em todo o processo de crescimento e progressão tumoral (Barar, 2012).

A angiogénese tumoral é também regulada pela arquitetura da MEC, a densidade e o seu padrão de organização está implicada na modulação, sobrevivência e migração das células endoteliais. Apesar das propriedades baseadas na emissão de sinais por parte das integrinas às células endoteliais, é sugerida também a contribuição da reorganização da estrutura fibrilhar do colagénio na estimulação direcional da migração celular (Richards *et al.*, 2013).

1.7.1. Envolvimento dos MAT na Angiogénese

Estudos recentes reportam que a presença de MATs no interior de tumores sólidos representa um fator iniciador da angiogénese. Na ausência destes macrófagos, as células neoplásicas produzem o estímulo necessário para a angiogénese tumoral, contudo verifica-se um atraso na sua iniciação (Guihard *et al.*, 2012).

Os MAT libertam diversas substâncias com função pro-angiogénica, tais como: fatores de crescimento (VEGF, PDGF), fatores transformantes, citoquinas, quimoquinas e proteases. Estudos em medicina humana fundamentaram que a expressão de CSF-1 estabelece relação positiva proporcionalmente à infiltração macrofágica do tumor e à densidade vascular do mesmo. Em adição, as Metaloproteinases de Matriz (MMP) derivadas dos MAT, tais como: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 desempenham um papel benéfico para a angiogénese. A MMP-9 constitui uma das proteases mais importantes na degradação da MEC com consequente libertação de fatores de crescimento que estimulam, por si, a formação de novos vasos sanguíneos. A sobre-expressão desta metaloproteinase também pode estar relacionada com o estadio tumoral (Aresu *et al.*, 2014; Arico *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2012).

Têm sido encontradas aglomerados de MAT em regiões hipóxicas do tumor. Como células adaptadas a este microambiente, os MAT podem expressar mais genes pro-angiogénicos, tais

como VEGF, FGF-β, CXCL8 e enzimas glicolíticas cuja transcrição é controlada pelos seguintes fatores de transcrição: Fator Indutor da Hipóxia-1 (HIF-1) e HIF-2. Foi ainda reportado que a molécula CXCL-12, dependente do fator HIF-1, atua como potente quimiotático e promove a infiltração tumoral por células endoteliais quando combinada com o seu recetor específico CXCR4 (Dehne & Brune, 2009; Raposo, T. P. *et al.*, 2013).

Estudos recentes evidenciam que uma subpopulação específica de monócitos pode também estar envolvida na estimulação angiogénica do tumor. Os monócitos que expressam o Recetor da Angiopoietina-2 (TIE-2) ou Monócitos que Expressam o Recetor da Angiopoietina-2 (TEMs) são atraídos para as imediações do tumor por uma citoquina derivada das células endoteliais, a angiopoietina-2 (ANG-2), a qual interage com o recetor TIE2 destes fagócitos. Os TEM expressam o recetor para a molécula CXCR4 podendo ser atraídos pela ação da CXCL12. Esta subpopulação de macrófagos está associada a uma ação altamente angiogénica, atuando de forma parácrina. Os monócitos TIE2 circulantes já apresentam naturalmente atividade pro-angiogénica, uma vez que expressam elevados níveis de MMP-9, VGEF-A e COX-2. (Riabov *et al.*, 2014)

1.8.Envolvimento dos MAT na Linfagiogénese

A linfagiogénese é um passo inicial para a difusão generalizada do tumor que consequentemente está associada a pior prognóstico.

Os MAT, promovem a linfangiogénse através da libertação dos fatores VEGF-C e VEGF-D. Sabe-se que estas moléculas são produzidas pelas células neoplásicas e pelos macrófagos, o fator VEGF-C está associado também a angiogénese enquanto o fator VEGF-D relaciona-se apenas com a produção de vasos linfáticos.

Estudos recentes demonstram ainda que os MAT podem expressar recetores de fatores de crescimento endotelial linfático, o que por si, pode contribuir para a linfagiogénese(Riabov *et al.*, 2014).

Atualmente é reconhecido que os macrófagos CD11b+ contribuem para a linfagiogénese sobre condições patológicas e que estes fagócitos com origem na medula óssea expressam positivamente marcadores associados ao endotélio linfático, tais como: LYVE-1 (do inglês *Extracellular Link Domain Containing*) e Prox-1 (do inglês *Prospero Homeobox Protein*).Estes estudos suportam a hipótese de que os macrófagos induzem a linfagiogénese através de dois mecanismos: 1) por transdiferenciação, incorporando diretamente a camada endotelial linfática

ou 2) através da libertação de fatores que estimulam as células endoteliais linfáticas já existentes. (Hao *et al.*, 2012; Riabov *et al.*, 2014)

1.9.Envolvimento dos MAT na Imunossupressão

A imunossupressão é um mecanismo estabelecido para a regulação do crescimento tumoral. Estudos demonstram que citoquinas e proteases libertadas pelos MAT, tais como: TGF-β, IL-10 e arginase 1 contribuem de forma significativa para a imunossupressão associada ao tumor (al-Sarireh & Eremin, 2000; Hao *et al.*, 2012).
Relativamente ao TGF-β, este desempenha um papel crucial na imunomodulação do sistema inato e adaptativo uma vez que promove a polarização dos macrófagos em M2. Este tipo de macrófagos irá produzir TGF-β, que levará a uma supressão da resposta imunitária, uma vez que esta molécula também inibe a atividade citolítica das células NK e compromete a migração das células dendríticas (DC) aumentando o seu estímulo apoptótico o que leva a uma consequente redução da apresentação antigénica diminuindo a resposta imunitária adaptativa. Por outro lado o TGF-β promove a diferenciação dos linfócitos T CD4+ em Th2 em vez de Th1, inibe atividade ati-tumoral das células T CD8+ por supressão de vários genes citolíticos (Granzima A, Granzima B, Interferão-gamma, CD95L). Em adição esta molécula (TGF-β) promove a manutenção e a diferenciação de células T reguladoras que contribuem para a inibição da resposta anti-tumoral (Hao *et al.*, 2012; Krneta, Gillgrass, & Ashkar, 2013).
A arginase 1, constitui um marcador molecular de macrófagos M2 com muita expressividade em diversos tipos de neoplasias. Esta enzima decompõe a L-arginina em Poliamina e Prolina e provoca a desregulação dos recetores das células T (TCR) de modo a que sinais subsequentes obtenham anergia por parte das células T CD8+. A arginase 1 foi associada à produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) por parte das Células Supressoras Derivadas da linhagem Mielóide (MDSCs), estas células ao apresentarem epitopos classe I (restritos) às células T CD8+ inibem a produção por parte das últimas de Interferão-gamma através do contacto dependente da produção de H_2O_2 mas este mecanismo ainda não se encontra totalmente clarificado (Allavena & Mantovani, 2012; Bianchi, Borgonovo, Pistoia, & Raffaghello, 2011; Hao *et al.*, 2012) .
Finalmente estudos indicam que moléculas quimiotáticas produzidas pelos MAT também desempenham um importante papel na imunossupressão. As CCL17 e CCL22 previnem a infiltração por células T citotóxicas, promovendo a progressão das células T reguladoras e das células Th2. A CCL18 também derivada dos macrófagos apresenta capacidade de recrutamento

de células T *naïve* as quais induzem a anergia das restantes células T nas imediações do tumor. A CCL-2 e CCL-5 como potentes moléculas quimiotáticas de monócitos para o tumor induzem também supressão da resposta das células T (Allavena & Mantovani, 2012; Hao *et al.*, 2012). Em adição a ANG-2 produzida pelas células endoteliais induz a expressão de IL-10 e CCL-17 pelos TEMs, estes fatores suprimem a proliferação de células T e promovem a expansão das células T reguladoras promovendo, deste modo, a inibição da resposta anti-tumoral (Garcia *et al.*, 2014; Ghotra, Puigvert, & Danen, 2009; Riabov *et al.*, 2014).

1.10. Interações entre os MAT e as Células Estaminais Tumorais (CET)

Na última década foi identificada uma população celular tumoral específica, definida como iniciadora do cancro, constituída pelas células estaminais tumorais (CET). Estas células têm a capacidade de iniciar a oncogénese submetendo-se a autorrenovação e diferenciação. Está descrito que os MAT estão sempre distribuídos em volta das CETs e que o número de MAT está positivamente correlacionado com o grau histológico de malignidade e o número de CET identificadas. Estudos sugerem que quimocinas produzidas pelas CET, tais como: CCL2, CCL5, VEGF-A apresentam atividade quimiotática promovendo a infiltração macrofágica. (Jinushi *et al.*, 2011)Reportaram que as CET podem promover a expressão de MFG-E8 (do inglês *milk-fat globule epidermal growth factor VIII*) nos MAT. Este fator apresenta importantes funções na fagocitose, angiogénese e na tolerância imunitária. Esta molécula induz as CET a desenvolverem resistência à terapêutica citotóxica através do fator de transcrição STAT3 (do inglês Signal Transducer and Activator of Transcription 3)(Bournazou & Bromberg, 2013; Chen, G. *et al.*, 2013; Groner, Lucks, & Borghouts, 2008).

Estudos reportaram que as CET altamente metastáticas apresentam também uma elevada expressão de Hialuronan Sintase-2 (HAS-2), a qual está relacionada com o comportamento agressivo e progressivo de muitos tipos de tumores. A produção desta molécula pelas CET, interage com os MAT originando a libertação de PDGF-BB que por sua vez estimula as células do estroma para a libertação de FGF-7 e FGF-9 que constituem potentes promotores das CET contribuindo assim para a sua auto-renovação e metastização (Hao *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Resumo da classificação do linfoma do cão resultante da Classificação de Revisão Europeia-Americana das Neoplasias Linfóides / Classificação da Organização Mundial de saúde das Neoplasias Linfóides. Adaptado de Valli *et al.*, (2011).

Neoplasias de Células B
Neoplasias de Células B Percussoras
Linfoma / Leucemia Linfoblástica de Células B Percussoras
Neoplasias de Células B Maturas (Periféricas)
Leucemia Linfocítica / Prolinfocítica Crónica de Células B
Linfoma / Leucemia Linfocítico(a) de Células Pequenas
Leucemia de Células B Prolinfocítica
Linfoma Linfoplasmocítico
Linfoma Esplénico de Células B da Zona Marginal
Plasmocitoma / Mieloma
Linfoma B Extranodal da Zona Marginal Associado ao Tecido Linfóide das Mucosas
Linfoma Nodal da Zona Marginal
Linfoma Folicular
Linfoma de Células do Manto
Linfoma B Difuso de Células Grandes
Linfoma B Mediastínico de Células Grandes
Linfoma de Burkitt / Leucemia de Células de Burkitt
Entidade Temporária: Linfoma de Células B de Alto-Grau
Tipo Burkitt
Linfoma de Efusão Primária
Neoplasias de Células T e *Natural Killer* (NK)
Neoplasias de Células T Percussoras
Linfoma / Leucemia Linfoblástico(a) de Células T Percussoras
Neoplasias de Células T e NK Maturas (Periféricas)
Leucemia Prolinfocítica de Células T
Leucemia de Linfócitos Grandes e Granulares (LLGG)
Leucemia Agressiva de Células NK
Linfoma T Periférico Não Especificado
Leucemia / Linfoma de Células T do Adulto
Linfoma T Intestinal com ou sem Enteropatia Associada
Linfoma Hépato-esplénico de Células T γδ
Linfoma T tipo-Paniculite Subcutânea
(Continuação)
Mycosis fungoides / Síndrome de Sézary
Linfoma Anaplásico de Células Grandes, do tipo Cutâneo Primário T e NK

Linfoma T Periférico Não Especificado
Linfoma de Células T Angioimunoblástico
Linfoma de Células T Angiocêntrico

1.11. Objetivos:

O presente trabalho teve por objetivo principal a avaliação do valor prognóstico da infiltração de macrófagos associados ao tumor em 31 casos de Linfoma B Difuso de Células Grandes no cão tratados com um protocolo CHOP durante 19 semanas. Para tal, e como objectivos específicos, foi avaliada a presença de infiltrado macrofágico nos linfonodos desta população e comparada com a infiltração macrofágica de linfonodos livres de tumor. Foi avaliada a relação entre a presença de infiltrado macrofágico e fatores intrínsecos desta população e ainda verificada a relação entre a presença de infiltrado macrofágico e prognóstico da doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostra:

Este trabalho foi realizado com recurso a 58 amostras previamente diagnosticadas como Linfoma B Difuso de células grandes no cão, de acordo com o esquema de classificação OMS, fixadas em formol e incluídas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina (H&E). Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Anatomia Patológica VetPat. O tecido das referidas amostras foi colhido com recurso a cirurgia ou biopsia do animal no Oncovet, Lisboa para diagnóstico. Toda a atividade laboratorial decorreu nas instalações do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil (IPO), Lisboa. Foram excluídas 27 amostras uma vez que a diminuta quantidade de tecido processado poderia inviabilizar a análise pretendida para estes casos. Foi utilizado como tecido controlo linfonodo livre de tumor de cão e tonsila humana para otimização dos marcadores, estes controlos foram gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Pedro Faísca, Dr. Joaquim Henriques e Serviço de Anatomia Patologia do Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil (IPO), Lisboa.

2.2. População estudada e Análise histopatológica

Para a população estudada foram registadas as seguintes características: género, idade, raça, diagnóstico histopatológico de LnH de acordo com a OMS e o seu estadiamento. As amostras

dos linfomas foram todas fixadas durante pelo menos 24 horas em formol 10% tamponado seguindo o processamento de rotina para inclusão em blocos de parafina. A classificação histopatológica foi realizada pela patologista Professora Doutora Maria Conceição Peleteiro (VetPat).

2.2.1. Imunocitoquímica

O fenótipo das 52 amostras tinha sido previamente determinado com recurso à imunocitoquímica, nomeadamente através da utilização do anticorpo anti-CD3 (clone A0452; Dako) na identificação de células T e utilização de anticorpo anti-CD79alfacy (M7051, clone HM57; Dako) para caracterização de células B com recurso ao protocolo imunocitoquimico referido nos apêndices I e II. A classificação das secções foi feita independentemente com recurso a microscopia ótica por um médico veterinário oncologista, Dr. Joaquim Henriques e dois Patologista Dr. José Cabeçadas e Dr. Fernando Constantino-Casas de acordo com o esquema da OMS.

2.2.2. Identificação MAT

Para a identificação de MAT foi optimizado o marcador MAC387 (clone M0747, Dako), CD68 (clone PGM1, Dako M0876) e CD163 (clone 10D6, Novocastra refª NCL-CD163) contudo apenas o primeiro clone apresentou reatividade para a espécie em estudo. Para otimização do marcador MAC387 foram executados diversos protocolos (referidos no apêndice I) em tecidos controlo: 5 linfonodos de cão sem alterações e tecido de lesões granulomatosas ricas em macrófagos. Foram realizados cortes de 2 micra de espessura dos blocos de parafina correspondentes aos 31 casos de LBDCG previamente classificados, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, lavadas em álcool 100º, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (com uma solução de bloqueio extemporânea feita manualmente com metanol e peróxido de hidrogénio) durante 10 minutos. Para recuperação antigénica foi utilizado o módulo PTLink® (Dako) com solução de recuperação de pH alto Envision®FlexTM a 94ºC a 20 minutos, após arrefecimento à temperatura ambiente e etapas de lavagem com TBS (solução salina tamponada com tris) as lâminas foram incubadas com o imunosoro do anticorpo MAC387, previamente preparado na diluição 1:200 em diluente Genova, durante 30 minutos, após etapas de lavagem as lâminas foram incubadas com HRQ LinkerEnvisionVentana durante 10 minutos, seguido do polímero Multimer HRQ Envision Ventana durante 10 minutos, após lavagem com TBS foi aplicado o cromogéneo DAB em incubação durante 8 minutos, as lâminas foram lavadas em

água corrente, colocadas em hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, lavadas com água quente (azular), deixadas na estufa a 43ºC para secagem e montadas com recurso a TissueTek®.

Foi feita uma quantificação qualitativa pela autora com auxílio dos patologistas referidos acima. E quantitativo utilizando o método descrito por (Hussein, Al-Assiri, & Musalam, 2009) consistindo na selecção de 3 "hotspots" áreas selecionadas a 10x como correspondendo a áreas de maior e mais homogénea densidade de macrófagos marcados. As células marcadas positivamente foram depois contabilizadas manualmente a 400x sendo obtido um valor médio do número de macrófagos por HPF (HighPower Field).

2.3 Análise estatística

Foi realizada analise estatística descritiva da amostra de 31 casos de LBDCG canino. Foram analisados aspetos epidemiológicos e laboratoriais com recurso ao programa estatístico IBM SPSS Statistics 20.

Foi feita a análise estatística dos dados dos doentes com objetivo de avaliar a sua dispersão e relevância a nível epidemiológico. Deste modo foi avaliada a dispersão de vários fatores inerentes á amostra como o género, a raça, o estadiamento clinico ao diagnóstico, a idade em anos dos animais e a frequência média de tempo de sobrevivência dos pacientes. Relativamente ao *pedigree* pretendia-se não apenas verificar a raça com maior expressão mas também verificar se existia alguma diferença relativamente à sobrevivência de animais com *pedigree* comparativamente aos sem raça definida, deste modo foram agrupados os doentes descriminando a raça e categoricamente (*pedigree*/ sem raça definida). A análise de sobrevivência perante os vários fatores foi feita com recurso ao método de Kaplan-Meier, o significado absoluto dos resultados desta análise foram aferidos através dos testes Log rank, Breslow e Tarone-Ware.

3.1.Caracterização da amostra estudada

A caracterização estatística da amostra encontra-se sumarizada nas tabelas abaixo. De um modo geral verifica-se, em relação ao género, as fêmeas representam 51,6% (16/31) do total da amostra, (representando os machos 48,4%) verifica-se uma predominância de machos inteiros (12/31 – 38,7%) e de fêmeas castradas (11/31 – 35,5%) (tabela 4).

Tabela 4- Representação dos dados estatísticos da amostra relativamente ao género.

Amostra	Machos 15/31 = 48,4%	Machos inteiros 12/31= 38,7 % Machos castrados 3/31= 9,7%
	Fêmeas 16/31= 51,6 %	Femeas inteiras 5/31= 16,1% Femeas castradas 11/31= 35,5%

Nesta amostragem, a raça mais representada, para alem dos animais sem raça definida que representam 28,1% (9/31) da amostra, é o *Rottweiller* (12,5% 4/31).(tabela 5)

Tabela 5- Representação dos dados estatísticos da amostra relativamente à raça.

Raças	**Representatividade**
Bulldog Francês	1/31 = 3,2%
Beagle	1/31 = 3,2%
Basset Hound	1/31 = 3,2%
Cocker Spaniel	1/31 = 3,2%
Doberman	1/31 = 3,2%
Grand Dane	1/31 = 3,2%
Golden Retriever	1/31 = 3,2%
Retriever Labrador	2/31 = 6,5%
Podengo	1/31 = 3,2%
Pitbull	2/31 = 6,5%
Rottweiler	4/31 = 12,9%
Serra da Estrela	1/31 = 3,2%
Shar pei	1/31 = 3,2%
Sem raça definida	9/31 = 29,0%
West Highland White Terrier	2/31 = 6,5%
Yorkshire Terrier	2/31 = 6,5%

Numa classificação categórica assumindo animais com *pedigree* e animais sem raça definida como únicas categorias verificou-se uma predominância dos indivíduos com raça pura, representando estes 71% (22/31) da amostra (tabela 6).

Tabela 6- Representação dos dados estatísticos da amostra relativamente ao pedigree

Amostra	**Representatividade**
Animais com *pedigree*	22/31= 71%
Animais sem raça definida	9/31= 29%

A idade média dos doentes corresponde a 9 anos (22,6% - 7/31), analisando a distribuição das idades dos doentes verifica-se que a valor médio é 9,39, localizando a maioria dos cães afetados com linfoma desta amostra numa faixa etária correspondente ao estado adulto ou sénior (tabela 7).

Tabela 7- Representação dos dados estatísticos da amostra relativos à Idade.

Idade	**Máxima**	**Mínima**	**Mediana**	**Media**	**DP**
(anos)	17	4	9,0	9,4	3,1

Observou-se que 81,3% dos doentes (26/31) apresentava estadio IV ao diagnóstico sendo que os restantes 15,6% (5/31) apresentaram estadio III e apenas 3,1% (1/31) apresentaram estadio II (tabela 8).

Tabela 8- Representação dos dados estatísticos da amostra relativos ao Estadiamento clínico ao Diagnóstico

Estadiamento ao diagnóstico	Representatividade na amostra
II b	1/31 = 3,2%
III a	2/31 = 6,5%
III b	3/32= 9,7%
IV a	11/32= 35,5%
IV b	14/32 =45,2%

O tempo médio de sobrevivência estimado para os doentes da amostra foi de 318 dias através do método de kaplan-meier (figura 8).

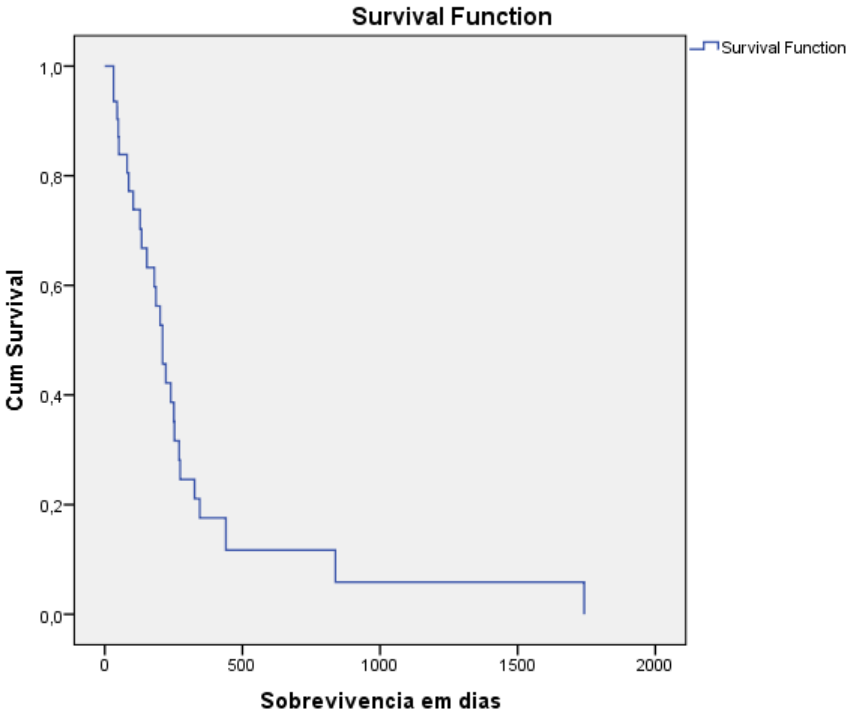


Figura 8- Representação gráfica da sobrevivência da amostra através do método de Kaplan-meier

Assumindo o estadio clínico do doente como fator determinante de sobrevivência, verificou-se que não existir significância de acordo com nenhum dos testes Log rank, Breslow e Tarone-Ware, a nível de sobrevivência entre o estadio III e IV. O mesmo método foi ainda aplicado visando distinguir cães de raça pura e cães sem raça definida, contudo nenhum dos testes usados apresentou resultados que distinguissem as duas categorias a nível de

sobrevivência. Resultados semelhantes foram obtidos quando aplicado o método para as categorias “macho inteiro” e “fêmea castrada”.

3.2.Infiltração macrofágica

A análise do infiltrado macrofagico associado a cada amostra (relativa aos animais e aos tecidos controlo) incluiu a contagem de células marcadas positivamente com MAC 387 cuja morfologia corresponde-se à do macrófago. Foi feita uma análise qualitativa de cada caso de modo a incluir os diferentes padrões de dispersão dos macrófagos. (tabela 9)

Tabela 9 - Representação dos resultados obtidos por imunocitoquímica

Animais da amostra	**Contagem de MAT por HPF**	**Avaliação qualitativa**
Nº1 – Alex	8	Identificação de MAT associados a tecido conjuntivo e vasculatura
Nº2 – Nico Pitta	14	Identificação de MAT associados a áreas de necrose
Nº3 – Bull	8	Poucas células marcadas positivamente, localizadas junto a vasos sanguíneos
Nº4 – Brownie	24	Identificação de Macrófagos associados a áreas de necrose na região central do tumor
Nº5 – Aramis	14	Identificação de Macrófagos em pequenos aglomerados nos CG e periferia dos CG
Nº6 – Olivia	11	Identificação de células marcadas positivamente dispersas pelo linfonodo
Nº7 – Boris	11	Identificação de MAT dispersos pela massa tumoral
Nº8 – Nico Sampaio	3	Identificação de escassos MAT dispersos pelo tumor

Animais da amostra	**Contagem de MAT por HPF**	**Avaliação qualitativa** (continuação)
Nº9 – sushi	11	Identificação de macrófagos em aglomerados envolvidos nos CG, associados a zonas de necrose e tecido conjuntivo perivascular
Nº10 – Spock	4	Identificação de escassos MAT dispersos pelo tumor
Nº11 – Pitucha	25	Identificação de MAT em aglomerados de densidade variável associados a tecido conjuntivo
Nº12 – Gaffe	22	Identificação de MAT dispersos pela massa tumoral e em formações de maior densidade junto a vasculatura
Nº13 – Chantell	6	Marcação difusa, identificação de células macrofágicas positivas dispersas por todo o linfonodo e em pequenos aglomerados associados a tecido conjuntivo peri-CG
Nº14 – Nicky	43	Identificação de muitas células marcadas: MAT dispersos e em aglomerados associados a zonas periféricas
Nº15 – Dixie	3	Identificação de escassos MAT dispersos pelo tumor
Nº16 – King	13	Identificação de macrófagos positivos associados a zonas de necrose
Nº17 – Nala	44	Identificam-se células macrofágicas positivas associadas a vasta área necrótica no centro do linfonodo
Nº18 – Simba	22	As células macrofágicas identificadas encontram-se dispersas pela massa tumoral
Nº19 – Phoebe	39	Identificadas células marcadas positivamente na periferia da amostra associadas a tecido conjuntivo e adiposo
Nº20 – Cookie	16	Macrófagos identificados dispersos e em pequenos aglomerados associados a vasculatura
Nº21 – Black	60	Aglomerações densas de macrófagos associados a tecido conjuntivo periférico e vasos
Nº22 – Nina Saial	27	Identificação de células macrofágica positivas associadas a tecido conjuntivo e vasos
Nº23 – Lucky	4	Identificação de escassos macrófagos dispersos pelo linfonodo

Animais da amostra	Contagem de MAT por HPF	Avaliação qualitativa (continuação)
Nº24 – Bocas	10	Identificação de células macrofágicas positivas dispersas e em aglomerados associados a tecido conjuntivo
Nº25 – Afonso	26	Identificação de MAT dispersos pela massa tumoral e em pequenos aglomerados associados a vasculatura
Nº26 – Zeus	36	Identificação de MAT em aglomerados associados a áreas de necrose
Nº27- Nina Santos	37	Identificação de MAT infiltrados pela passa tumoral (não se distinguem CG). Verifica-se formação de pequenos agregados associados a tecido conjuntivo e vasculatura
Nº28 – Bubas	28	Identificação de muitas células marcadas: MAT dispersos pela massa tumoral e em aglomerados associados a tecido conjuntivo
Nº29 – Camila	57	Identificação de MAT associados a tecido necrótico
Nº30 – Blue	2	Observam-se células macrofágicas positivas com infiltração dispersa pela massa tumoral
Nº31 – Iela	9	Identificação de pequenas aglomerações de MAT associados a vasos
Controlos	Contagem de MAT por HPF	Avaliação qualitativa
Linfonodo 1	25	Macrófagos associados a tecido conjuntivo nas zonas peri-CG
Linfonodo 2	17	Identificação de células macrofágicas positivas associadas a tecido conjuntivo e vasculatura
Linfonodo 3	19	Identificação de macrófagos em aglomerados na periférica dos CG
Linfonodo 4	26	Macrófagos associados a tecido conjuntivo e vasculatura nas zonas peri-CG
Linfonodo 5	25	Identificação de macrófagos em aglomerados na periférica dos CG

Para a correlação entre a presença de infiltrado macrofágico e fatores intrínsecos à amostra como: tempo de sobrevivência, estadio ao diagnóstico, idade e sexo foi utilizado o método de Kaplan-Meier. Verificou-se uma média de 22 macrófagos positivos por HPF em linfonodo, tecido controlo. Na amostra de LBDCG foram contabilizados valores discrepantes (superiores e inferiores) considerando o controlo. O valor de infiltrado macrofágico não revelou ser fator determinante para a sobrevivência dos pacientes (figura 2). De facto, valores de MAT superiores corresponderam neste estudo a maiores períodos de sobrevivência comparativamente aos pacientes com baixos valores de MAT. Estes resultados não são conclusivos uma vez que nenhum dos testes LogRank, Breslow e Tarone-Ware apresentaram um valor de p inferior a 0,05. Deste modo não foi possível correlacionar, nesta amostra a presença de MAT com valor prognóstico.

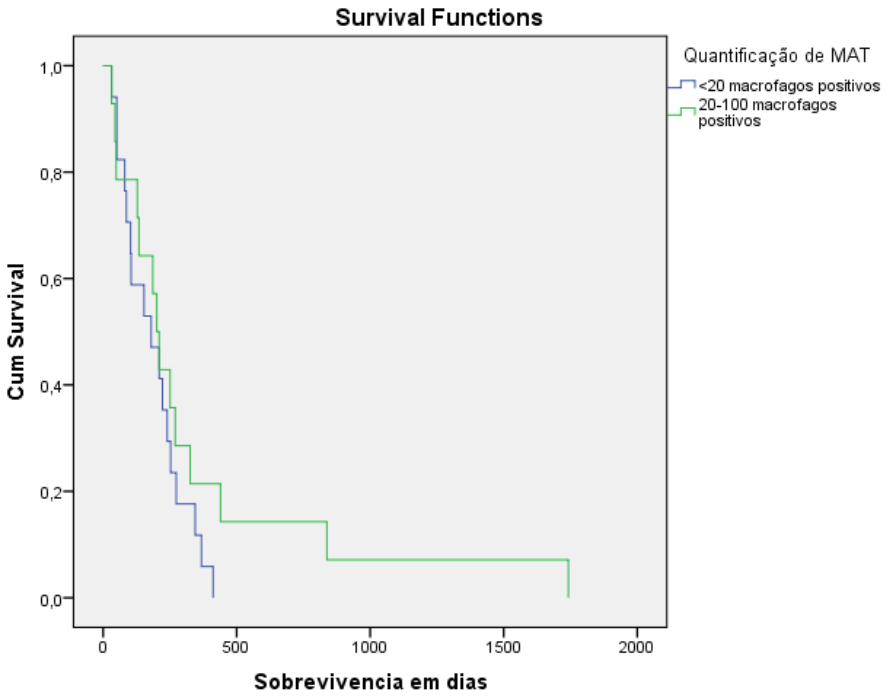


Figura 9 - Representação gráfica da infiltração macrofágica na sobrevivência da amostra através do método de Kaplan-meier

Relativamente à distribuição das idades de acordo com a presença de MAT, não se verificou disparidade nesta distribuição entre valores superiores de MAT (20-100 macrófagos positivos) e valores inferiores de MAT (<20 macrófagos positivos). Os mesmos resultados foram obtidos relativamente à distribuição de MAT de acordo com o sexo dos animais e estadio

clinico ao diagnóstico, não sendo deste modo possível correlacionar os valores de MAT obtidos com nenhum fator intrínsecos da amostra.

4. DISCUSSÃO

O linfoma é uma neoplasia hematopoiética de incidência crescente no cão e no Homem (Maurizio Martelli, 2013; Salles *et al.*, 2011). A entidade LBDCG é reconhecida como uma das mais frequentes em Medicina Humana (30 a 40%) e no cão (40 a 70%) (Valli *et al.*, 2013; Vezzali *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com a literatura segundo a qual não há predisposição associada ao sexo para o desenvolvimento de LnHc (Maurizio Martelli, 2013). Dentro da proporção semelhante de machos (N=15/48,4%) e fêmeas (16/51,6%) foi destacável uma sobreexpressão de fêmeas castradas (11/35,5%) e machos inteiros (12/38,7%) relativamente às categorias "fêmea inteira" e "macho castrado". Esta situação pode estar relacionada com o efeito protetor das hormonas sexuais femininas anteriormente descrito por (Villamil *et al.*, 2009) e/ou com um preconceito por parte dos proprietários relativamente à castração do macho perante as vantagens que a intervenção possibilita relativamente à esperança média de vida (Promislow, 2013).

Relativamente à raça, verificou-se que a maioria dos indivíduos da amostra eram de raça pura (22/71%), esta situação pode estar correlacionada com a disponibilidade dos proprietários destes pacientes e com a sua capacidade de promover uma terapêutica adequada ao seu animal. Poder-se-ia especular que a incidência verificada numa amostra maioritariamente constituída por indivíduos de raça pura estivesse relacionada com a predisposição de determinadas raças para o desenvolvimento de linfoma. De fato, a raça mais representada é o rottweiler que como citado anteriormente é uma das raças predispostas ao desenvolvimento de linfoma bem como outras neoplasias (Dobson, J. M., 2013) contudo não constam da amostra outras raças predispostas como: boxer, bullmastif ou bulldog. Relativamente ao boxer, esta pouca representatividade pode estar relacionada com a entidade da amostra (LBDCG) uma vez que esta descrita uma susceptibilidade desta raça para o desenvolvimento de linfoma de fenótipo T. (Dobson, J. M., 2013; Fan, 2003).

A maioria dos indivíduos da amostra (25/80,7%) apresentava estadio IV ou estadio III (5/16,2%) ao diagnóstico. Estes resultados estão de acordo com a concepção de que o linfoma é uma doença de abordagem diagnóstica e tratamento tardios em medicina veterinária (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014; Rowell, McCarthy, & Alvarez, 2011). Esta situação pode

ser um fator determinante para a efetividade do tratamento e sobrevivência dos doentes. Relativamente à idade, a maioria dos doentes apresentava idade entre os 8 e os 10 anos de idade (16/51,7%) estando de acordo com a literatura que refere ser esta a idade de maior incidência da doença (Rowell *et al.*, 2011).

O estudo do microambiente tumoral tem sido proposto no âmbito do tratamento e prognóstico de linfoma em Medicina e Medicina Veterinária.(Barros, Hassan, & Niedobitek, 2012; Tan *et al.*, 2012)

As características epidemiológicas analisadas neste trabalho estão de acordo com estudos anteriores segundo os quais: não se verifica predisposição associada ao sexo para desenvolvimento de linfoma, podendo verificar-se um efeito protector das hormonas sexuais femininas (Villamil *et al.*, 2009). Verificou-se uma maior prevalênciada doença em animais tendencialmente séniores o que também corresponde ao descrito (Fan, 2003; Valli *et al.*, 2013). A raça mais representada, rottweiler é uma das raças associadas a risco moderado para o desenvolvimento de linfoma de acordo com (Dobson, J. M., 2013).
Os MAT são um elemento importante do microambiente tumoral, deste modo procurou-se estudar este constituinte através da utilização do marcador imunohistoquímico MAC 387. A afinidade do marcador disponível para identificação de macrófagos na espécie canina (MAC387) não apresenta afinidade excelente para este tipo celular, durante este estudo foram identificadas células de morfologia correspondente à do macrófago que não marcaram. Os diversos marcadores atualmente disponíveis para o Homem para a marcação desta linhagem celular (CD68, CD163) não apresentam afinidade para o cão. Não sendo assim possível a distinção entre subpopulações de macrófagos ou a marcação específica de células monocitóides percursoras (Chilosi *et al.*, 1990; Zaki *et al.*, 2011). Foram contabilizados valores heterogéneos de MAT entre os indivíduos da amostra e identificados diferentes padrões de dispersão destas células (Anexo II: Imagem 1 a 4) quando comparados com tecido controlo. De notar a presença de células de morfologia macrofágica sem aparente afinidade para o marcador utilizado (MAC 387), esta situação pode sugerir a presença de subpopulações específicas de macrófagos associados ao tumor. Contudo uma vez que nenhum dos marcadores desta linhagem celular (CD68 e CD163) apresentou reatividade para a espécie canina não foi possível aferir mais neste âmbito. Não se verificou correlação entre a taxa de infiltração MAT e o tempo de sobrevivência. Estes resultados podem dever-se ao reduzido número de casos da amostra (31 casos) ou à eutanásia dos cães perante um quadro clinico grave, o que contribuiria para valores de sobrevivência mais curtos. Todavia não se verificou relação entre a presença de MAT e o

estadiamento (OMS) dos doentes ao diagnóstico. Do mesmo modo não foi obtida correlação entre a taxa de infiltração macrofágica e a idade e o sexo dos doentes.

Foram observados valores de MAT diferentes entre os indivíduos com LBDCG. Foram observados padrões de infiltração macrofágica associada a áreas de necrose e na periferia dos CG como descrito (Zaki *et al.*, 2011). Todavia, não foi possível estabelecer correlação entre a taxa de MAT e dados intrínsecos da população (idade, sexo, estadio OMS), do mesmo modo a presença de MAT não se revelou fator determinante na sobrevivência dos indivíduos da população estudada.

5. CONCLUSÃO

Em suma, o presente trabalho procurou o estudo do microambiente tumoral em LBDCG no cão, através da análise da presença de MAT com recurso a imunocitoquímica. Verificou-se: a) numa amostra de LBDCG (epidemiologicamente correspondente ao descrito na literatura) a presença de MAT é variável de cão para cão, b) o padrão de dispersão dos MAT difere do padrão uniforme observado nos controlos, c) não foi possível correlacionar estas variáveis com a sobrevivência dos animais, não contribuindo este estudo para unificar a crença de que estas células contribuam fundamentalmente para a progressão da doença.

Futuramente, propõem-se estudos prospetivos do microambiente tumoral em linfoma nas espécies domésticas, com uma amostragem mais representativa, com recurso a mais marcadores para melhor caracterização e estudo do microambiente. Sendo o linfoma uma doença difusa e com íntima relação com as células do sistema imunitário beneficiaria com este estudo, na sua compreensão clinica e patológica.

6. Bibliografia

Ahmed, N., Riley, C., Rice, G., & Quinn, M. (2005). Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin Exp Metastasis, 22*(5), 391-402. doi: 10.1007/s10585-005-1262-y

al-Sarireh, B., & Eremin, O. (2000). Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth. *J R Coll Surg Edinb, 45*(1), 1-16.

Albini, A., & Sporn, M. B. (2007). The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer, 7*(2), 139-147. doi: 10.1038/nrc2067

Albonico, F., Mortarino, M., Avallone, G., Gioia, G., Comazzi, S., & Roccabianca, P. (2013). The expression ratio of miR-17-5p and miR-155 correlates with grading in canine splenic lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol, 155*(1-2), 117-123. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.06.018

Aldinucci, D., Gloghini, A., Pinto, A., De Filippi, R., & Carbone, A. (2010). The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol, 221*(3), 248-263. doi: 10.1002/path.2711

Allavena, P., & Mantovani, A. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol, 167*(2), 195-205. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04515.x

Alphonso, A., & Alahari, S. K. (2009). Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment. *Neoplasia, 11*(12), 1264-1271.

Aresu, L., Arico, A., Comazzi, S., Gelain, M. E., Riondato, F., Mortarino, M., . . . Castagnaro, M. (2014). VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma. *Vet Comp Oncol, 12*(1), 29-36. doi: 10.1111/j.1476-5829.2012.00328.x

Arico, A., Giantin, M., Gelain, M. E., Riondato, F., Comazzi, S., Rutgen, B. C., . . . Aresu, L. (2013). The role of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and in vitro study. *BMC Vet Res, 9*, 94. doi: 10.1186/1746-6148-9-94

Atherton, M. J., Braceland, M., Fontaine, S., Waterston, M. M., Burchmore, R. J., Eadie, S., . . . Morris, J. S. (2013). Changes in the serum proteome of canine lymphoma identified by electrophoresis and mass spectrometry. *Vet J, 196*(3), 320-324. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.12.010

Baay, M., Brouwer, A., Pauwels, P., Peeters, M., & Lardon, F. (2011). Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin Dev Immunol, 2011*, 565187. doi: 10.1155/2011/565187

Barar, J. (2012). Targeting tumor microenvironment: the key role of immune system. *Bioimpacts, 2*(1), 1-3. doi: 10.5681/bi.2012.001

Barros, M. H., Hassan, R., & Niedobitek, G. (2012). Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. *Clin Cancer Res, 18*(14), 3762-3771. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0129

Barros, M. H., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B., & Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One, 8*(11), e80908. doi: 10.1371/journal.pone.0080908

Bergman, P. J. (2003). Clinical techniques in small animal molecular oncology. *Clin Tech Small Anim Pract, 18*(2), 88-91. doi: 10.1053/svms.2003.36621

Bergman, P. J. (2012). Paraneoplastic hypercalcemia. *Top Companion Anim Med, 27*(4), 156-158. doi: 10.1053/j.tcam.2012.09.003

Bianchi, G., Borgonovo, G., Pistoia, V., & Raffaghello, L. (2011). Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histol Histopathol, 26*(7), 941-951.

Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol, 35*(5), 585-600. doi: 10.1007/s00281-013-0367-7

Blackwood, L., German, A. J., Stell, A. J., & O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *J Small Anim Pract, 45*(5), 259-262.

Blackwood, L., Sullivan, M., & Lawson, H. (1997). Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases. *J Small Anim Pract, 38*(2), 62-69.

Bodenstine, T. M., & Welch, D. R. (2008). Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron, 1*(1), 1-11. doi: 10.1007/s12307-008-0001-8

Bournazou, E., & Bromberg, J. (2013). Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. *JAKSTAT, 2*(2), e23828. doi: 10.4161/jkst.23828

Bridgeford, E. C., Marini, R. P., Feng, Y., Parry, N. M., Rickman, B., & Fox, J. G. (2008). Gastric Helicobacter species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol, 123*(1-2), 106-113. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.01.016

Burton, J. H., Garrett-Mayer, E., & Thamm, D. H. (2013). Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol, 11*(4), 306-315. doi: 10.1111/j.1476-5829.2012.00324.x

Cacciatore, M., Guarnotta, C., Calvaruso, M., Sangaletti, S., Florena, A. M., Franco, V., . . . Tripodo, C. (2012). Microenvironment-centred dynamics in aggressive B-cell lymphomas. *Adv Hematol, 2012*, 138079. doi: 10.1155/2012/138079

Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood, 117*(19), 5019-5032. doi: 10.1182/blood-2011-01-293050

Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S., & Moore, P. F. (1996). Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol, 33*(2), 204-212.

Carioto, L. M., Kruth, S. A., Betts, D. H., & King, W. A. (2001). Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma. *Am J Vet Res, 62*(9), 1442-1446.

Carter, R. F., Kruth, S. A., Valli, V. E., & Dube, I. D. (1990). Long-term culture of canine marrow: cytogenetic evaluation of purging of lymphoma and leukemia. *Exp Hematol, 18*(9), 995-1001.

Chen, G., Lv, Y., Guo, P., Lin, C., Zhang, X., Yang, L., & Xu, Z. (2013). Matrix mechanics and fluid shear stress control stem cells fate in three dimensional microenvironment. *Curr Stem Cell Res Ther, 8*(4), 313-323.

Chen, P., Huang, Y., Bong, R., Ding, Y., Song, N., Wang, X., . . . Luo, Y. (2011). Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin Cancer Res, 17*(23), 7230-7239. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1354

Chetaille, B., Bertucci, F., Finetti, P., Esterni, B., Stamatoullas, A., Picquenot, J. M., . . . Xerri, L. (2009). Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood, 113*(12), 2765-3775. doi: 10.1182/blood-2008-07-168096

Chilosi, M., Mombello, A., Montagna, L., Benedetti, A., Lestani, M., Semenzato, G., & Menestrina, F. (1990). Multimarker immunohistochemical staining of calgranulins, chloroacetate esterase, and S100 for simultaneous demonstration of inflammatory cells on paraffin sections. *J Histochem Cytochem, 38*(11), 1669-1675.

Chinni, S. R., Sivalogan, S., Dong, Z., Filho, J. C., Deng, X., Bonfil, R. D., & Cher, M. L. (2006). CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate, 66*(1), 32-48. doi: 10.1002/pros.20318

Cohen, M., De Matteo, E., Narbaitz, M., Carreno, F. A., Preciado, M. V., & Chabay, P. A. (2013). Epstein-Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particular

association and latency patterns: analysis of viral role in tumor microenvironment. *Int J Cancer, 132*(7), 1572-1580. doi: 10.1002/ijc.27845
Comazzi, S., & Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J, 188*(2), 149-155. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.03.011
Coupland, S. E. (2011). The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Histopathology, 58*(1), 69-80. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03706.x
Coyle, K. A., & Steinberg, H. (2004). Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol, 41*(2), 141-146. doi: 10.1354/vp.41-2-141
de Lorimier, L. P. (2006). Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract, 36*(1), 213-228, viii-ix. doi: 10.1016/j.cvsm.2005.09.013
Dehne, N., & Brune, B. (2009). HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res, 315*(11), 1791-1797. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.03.019
Devitt, J. J., Maranon, D. G., Ehrhart, E. J., Bachand, A. M., Lana, S. E., & LaRue, S. M. (2009). Correlations between numerical chromosomal aberrations in the tumor and peripheral blood in canine lymphoma. *Cytogenet Genome Res, 124*(1), 12-18. doi: 10.1159/000200083
Dhaliwal, R. S., Kitchell, B. E., Ehrhart, E., Valli, V. E., & Dervisis, N. G. (2013). Clinicopathologic significance of histologic grade, pgp, and p53 expression in canine lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc, 49*(3), 175-184. doi: 10.5326/JAAHA-MS-5843
Ding, Z. Y., Zou, X. L., & Wei, Y. Q. (2012). Cancer microenvironment and cancer vaccine. *Cancer Microenviron, 5*(3), 333-344. doi: 10.1007/s12307-012-0107-x
Dobson, J. (2004). Classification of canine lymphoma: a step forward. *Vet J, 167*(2), 125-126. doi: 10.1016/j.tvjl.2003.09.017
Dobson, J., Duncan, B., Lascelles, X. (2010). *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3rd ed. Vol. 1): BSAVA.
Dobson, J. M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci, 2013*, 941275. doi: 10.1155/2013/941275
Elliott, J. W., Cripps, P., & Blackwood, L. (2013). Thymidine kinase assay in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol, 11*(1), 1-13. doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00296.x
Ettinger, S. N. (2003). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract, 18*(2), 92-97. doi: 10.1053/svms.2003.36622
Fan, T. M. (2003). Lymphoma updates.
Fessler, E., Dijkgraaf, F. E., De Sousa, E. M. F., & Medema, J. P. (2013). Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis: is the microenvironment to blame? *Cancer Lett, 341*(1), 97-104. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.015
Fidler, I. J. (2001). Angiogenic heterogeneity: regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J Natl Cancer Inst, 93*(14), 1040-1041.
Fontaine, J., Bovens, C., Bettenay, S., & Mueller, R. S. (2009). Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Vet Comp Oncol, 7*(1), 1-14. doi: 10.1111/j.1476-5829.2008.00176.x
Foster, A. P., Evans, E., Kerlin, R. L., & Vail, D. M. (1997). Cutaneous T-cell lymphoma with Sezary syndrome in a dog. *Vet Clin Pathol, 26*(4), 188-192.
Galindo, L. M., Garcia, F. U., Hanau, C. A., Lessin, S. R., Jhala, N., Bigler, R. D., & Vonderheid, E. C. (2000). Fine-needle aspiration biopsy in the evaluation of lymphadenopathy associated with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sezary syndrome). *Am J Clin Pathol, 113*(6), 865-871. doi: 10.1309/TJGE-FJG6-VQYV-WFX8
Garcia, S., Krausz, S., Ambarus, C. A., Fernandez, B. M., Hartkamp, L. M., van Es, I. E., . . . Reedquist, K. A. (2014). Tie2 signaling cooperates with TNF to promote the pro-inflammatory activation of human macrophages independently of macrophage functional phenotype. *PLoS One, 9*(1), e82088. doi: 10.1371/journal.pone.0082088

Ghotra, V. P., Puigvert, J. C., & Danen, E. H. (2009). The cancer stem cell microenvironment and anti-cancer therapy. *Int J Radiat Biol, 85*(11), 955-962. doi: 10.3109/09553000903242164

Gibson, D., Aubert, I., Woods, J. P., Abrams-Ogg, A., Kruth, S., Wood, R. D., & Bienzle, D. (2004). Flow cytometric immunophenotype of canine lymph node aspirates. *J Vet Intern Med, 18*(5), 710-717.

Gieger, T. (2011). Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract, 41*(2), 419-432. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.02.001

Groner, B., Lucks, P., & Borghouts, C. (2008). The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment. *Semin Cell Dev Biol, 19*(4), 341-350. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.06.005

Guihard, P., Danger, Y., Brounais, B., David, E., Brion, R., Delecrin, J., . . . Blanchard, F. (2012). Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells, 30*(4), 762-772. doi: 10.1002/stem.1040

Hao, N. B., Lu, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R., & Yang, S. M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol, 2012*, 948098. doi: 10.1155/2012/948098

Heusinkveld, M., & van der Burg, S. H. (2011). Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med, 9*, 216. doi: 10.1186/1479-5876-9-216

Higginbotham, C. J. H. M. L. (2010). *Cancer Management in Small Animal Practice* (1st ed.). 3251 Riverport Lane

Maryland Heights, Missouri 63043: Saunders Elsevier.

Huang, S. H., Kozak, P. J., Kim, J., Habineza-Ndikuyeze, G., Meade, C., Gaurnier-Hausser, A., . . . Mason, N. J. (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology, 427*(2), 107-117. doi: 10.1016/j.virol.2012.02.013

Hussein, M. R., Al-Assiri, M., & Musalam, A. O. (2009). Phenotypic characterization of the infiltrating immune cells in normal prostate, benign nodular prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol, 86*(2), 108-113. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.11.010

Ito, D., Frantz, A. M., & Modiano, J. F. (2014). Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol*. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.02.016

Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., & Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol, 281*(1), 51-61. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.010

Jinushi, M., Chiba, S., Yoshiyama, H., Masutomi, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., . . . Tahara, H. (2011). Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(30), 12425-12430. doi: 10.1073/pnas.1106645108

Johnston, S. A., Thamm, D. H., & Legutki, J. B. (2014). The immunosignature of canine lymphoma: characterization and diagnostic application. *BMC Cancer, 14*, 657. doi: 10.1186/1471-2407-14-657

Jubala, C. M., Wojcieszyn, J. W., Valli, V. E., Getzy, D. M., Fosmire, S. P., Coffey, D., . . . Modiano, J. F. (2005). CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet Pathol, 42*(4), 468-476. doi: 10.1354/vp.42-4-468

Keller, E. T., MacEwen, E. G., Rosenthal, R. C., Helfand, S. C., & Fox, L. E. (1993). Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med, 7*(5), 289-295.

Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell, 141*(1), 52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015

Kiupel, M., Bostock, D., & Bergmann, V. (1998). The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas. *J Comp Pathol, 119*(4), 407-418.

Kiupel, M., Teske, E., & Bostock, D. (1999). Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol, 36*(4), 292-300.

Krneta, T., Gillgrass, A., & Ashkar, A. A. (2013). The influence of macrophages and the tumor microenvironment on natural killer cells. *Curr Mol Med, 13*(1), 68-79.

Lana, S. E., Jackson, T. L., Burnett, R. C., Morley, P. S., & Avery, A. C. (2006). Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med, 20*(2), 329-334.

Lee, J. J., Hughes, C. S., Fine, R. L., & Page, R. L. (1996). P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer, 77*(9), 1892-1898. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960501)77:9<1892::AID-CNCR20>3.0.CO;2-U

Liu, R., He, Y., Li, B., Liu, J., Ren, Y., Han, W., . . . Zhang, L. (2012). Tenascin-C produced by oxidized LDL-stimulated macrophages increases foam cell formation through Toll-like receptor-4. *Mol Cells, 34*(1), 35-41. doi: 10.1007/s10059-012-0054-x

Lori, J. C., Stein, T. J., & Thamm, D. H. (2010). Doxorubicin and cyclophosphamide for the treatment of canine lymphoma: a randomized, placebo-controlled study. *Vet Comp Oncol, 8*(3), 188-195. doi: 10.1111/j.1476-5829.2010.00215.x

Lurie, D. M., Lucroy, M. D., Griffey, S. M., Simonson, E., & Madewell, B. R. (2004). T-cell-derived malignant lymphoma in the boxer breed. *Vet Comp Oncol, 2*(3), 171-175. doi: 10.1111/j.1476-5810.2004.00047.x

Marconato, L. (2011). The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. *Vet J, 188*(1), 34-38. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.027

Marconato, L., Gelain, M. E., & Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol, 31*(1), 1-9. doi: 10.1002/hon.2017

Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., . . . Zini, E. (2009). Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med, 23*(3), 564-569. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0278.x

Marconato, L., Martini, V., Aresu, L., Sampaolo, M., Valentini, F., Rinaldi, V., & Comazzi, S. (2013). Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: prognostic significance and proposal of a cut-off value. *Vet J, 197*(3), 776-781. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.05.003

Maurizio Martelli, A. J. M. F., Claudio Agostinelli, Alice Di Rocco, Michael Pfreundschuh, Stefano A. Pileri. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology Hematology*.

Mealey, K. L., Northrup, N. C., & Bentjen, S. A. (2003). Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *J Am Vet Med Assoc, 223*(10), 1453-1455, 1434.

Meda, B. A., Buss, D. H., Woodruff, R. D., Cappellari, J. O., Rainer, R. O., Powell, B. L., & Geisinger, K. R. (2000). Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytomorphology and flow cytometry. *Am J Clin Pathol, 113*(5), 688-699. doi: 10.1309/0Q7F-QTGM-6DPD-TLGY

Moore, P. F., Affolter, V. K., Graham, P. S., & Hirt, B. (2009). Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: an investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. *Vet Dermatol, 20*(5-6), 569-576. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00814.x

Morris, J., Dobson, J. (2001). Haematopoietic System *Small Animal Oncology* (1st Edition ed., pp. 228-239): Blackwell Science.

Neiger, R., & Simpson, K. W. (2000). Helicobacter infection in dogs and cats: facts and fiction. *J Vet Intern Med, 14*(2), 125-133.

North, S., Banks, T. (2009). Tumours of the haemolymphatic system *Introduction to Small Animal Oncology* (pp. 217-230): Saunders Elsevier.

Phillips, B. S., Kass, P. H., Naydan, D. K., Winthrop, M. D., Griffey, S. M., & Madewell, B. R. (2000). Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest, 12*(2), 111-117.

Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., . . . Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol, 47*(3), 414-433. doi: 10.1177/0300985810363902

Promislow, J. M. H. K. E. C. D. E. L. (2013). Reproductive Capability Is Associated with Lifespan and Cause of Death in Companion Dogs

PLoS One, 7.

Raposo, T., Gregorio, H., Pires, I., Prada, J., & Queiroga, F. L. (2014). Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol, 12*(1), 10-19. doi: 10.1111/j.1476-5829.2012.00326.x

Raposo, T. P., Pires, I., Carvalho, M. I., Prada, J., Argyle, D. J., & Queiroga, F. L. (2013). Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. doi: 10.1111/vco.12067

Riabov, V., Gudima, A., Wang, N., Mickley, A., Orekhov, A., & Kzhyshkowska, J. (2014). Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol, 5*, 75. doi: 10.3389/fphys.2014.00075

Richards, D. M., Hettinger, J., & Feuerer, M. (2013). Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron, 6*(2), 179-191. doi: 10.1007/s12307-012-0123-x

Rowell, J. L., McCarthy, D. O., & Alvarez, C. E. (2011). Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med, 17*(7), 380-388. doi: 10.1016/j.molmed.2011.02.004

Salles, G., de Jong, D., Xie, W., Rosenwald, A., Chhanabhai, M., Gaulard, P., . . . Weller, E. (2011). Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood, 117*(26), 7070-7078. doi: 10.1182/blood-2011-04-345256

Sanchez-Espiridion, B., Martin-Moreno, A. M., Montalban, C., Medeiros, L. J., Vega, F., Younes, A., . . . Garcia, J. F. (2012). Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica, 97*(7), 1080-1084. doi: 10.3324/haematol.2011.055459

Shetty, V., Mundle, S., Sanoy, A., Sanghvi, R., Loew, J., Marcus, B., . . . Raza, A. (1995). A multivariate study of non Hodgkin's lymphoma involving proliferation, apoptosis, bcl-2 and the microenvironment. *Leuk Lymphoma, 18*(3-4), 273-279. doi: 10.3109/10428199509059618

Simon T. Kudnig, B. S. (2012). *Veterinary Surgical*

Oncology (L. John Wiley & Sons Ed.): Blackwell Publishing.

Sokolowska, J., Micun, J., Malicka, E., & Lechowski, R. (2012). Proliferation activity in canine lymphomas. *Pol J Vet Sci, 15*(4), 727-734.

Steidl, C., Gascoyne, R, D. (2011). The role of the microenvironment in lymphoid cancers. *Annals of Oncology, 22*, iv47-iv50. doi: 10.1093/annonc/mdr173

Suarez, A. L., Pulitzer, M., Horwitz, S., Moskowitz, A., Querfeld, C., & Myskowski, P. L. (2013). Primary cutaneous B-cell lymphomas: part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *J Am Acad Dermatol, 69*(3), 329 e321-313; quiz 341-322. doi: 10.1016/j.jaad.2013.06.012

Swerdlow, S. H. (2013). Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. *Mod Pathol, 26 Suppl 1*, S1-S14. doi: 10.1038/modpathol.2012.177

Tan, K. L., Scott, D. W., Hong, F., Kahl, B. S., Fisher, R. I., Bartlett, N. L., . . . Gascoyne, R. D. (2012). Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood, 120*(16), 3280-3287. doi: 10.1182/blood-2012-04-421057

Taskinen M. (2011). *Prognostic Importance of the tumour microenvironment in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy.* (PhD), University of Helsinki, Helsinki.

Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q, 16*(4), 209-219. doi: 10.1080/01652176.1994.9694451

Turek, M., Saba, C., Paoloni, M., Argyle, D. . (2008). CANINE LYMPHOMA AND LEUKEMIA *Decision Making in Small Animal Oncology* (pp. 171-196): Wiley-Blackwell.

V. E. Valli, M. S. M., A. Barthel, D. Bienzle, J. Caswell, F. Colbatzky, A. Durham, E. J. Ehrhart, Y. Johnson, C. Jones, M. Kiupel, P. Labelle, S. Lester, M. Miller, P. Moore, S. Moroff, P. Roccabianca, J. Ramos-Vara, A. Ross, T. Scase, H. Tvedten, and W. Vernau. (2011). Classification of Canine Lymphoma according to the World Health Organization Criteria.

Vail, D., Pinkerton, M., Young, K. (2012). Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemia *Small Animal Clinical Oncology* (pp. 608-638): Elsevier.

Valli, V. E., Jacobs, R. M., Norris, A., Couto, C. G., Morrison, W. B., McCaw, D., . . . Moore, A. (2000). The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest, 12*(4), 295-306.

Valli, V. E., Kass, P. H., San Myint, M., & Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol, 50*(5), 738-748. doi: 10.1177/0300985813478210

Vardiman, S. H. S. E. C. N. L. H. E. S. J. S. A. P. H. S. J. T. J. (2008). *WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4th ed.): IARC Press.

Vezzali, E., Parodi, A. L., Marcato, P. S., & Bettini, G. (2010). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol, 8*(1), 38-49. doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00201.x

Villamil, J. A., Henry, C. J., Hahn, A. W., Bryan, J. N., Tyler, J. W., & Caldwell, C. W. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol, 2009*, 591753. doi: 10.1155/2009/591753

Vong, S., & Kalluri, R. (2011). The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer, 2*(12), 1139-1145. doi: 10.1177/1947601911423940

Waters, D. (2002). Host: Tumor Cell interaction as a Determinant of Tumor Cell Behavior *Cancer in Dogs & Cats: Medical & Surgical Management* (2nd ed., pp. 39-49): Teton NewMedia.

Willmann, M., Mullauer, L., Guija de Arespacochaga, A., Reifinger, M., Mosberger, I., & Thalhammer, J. G. (2009). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: a novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Vet Immunol Immunopathol, 128*(4), 359-365. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.11.019

Yang, Z. Z., & Ansell, S. M. (2012). The tumor microenvironment in follicular lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol, 10*(12), 810-818.

Zaki, M. A., Wada, N., Ikeda, J., Shibayama, H., Hashimoto, K., Yamagami, T., . . . Aozasa, K. (2011). Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch, 459*(4), 361-366. doi: 10.1007/s00428-011-1140-8

Zhang, X., Nie, D., & Chakrabarty, S. (2010). Growth factors in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed), 15*, 151-165.

I. Apêndice: Protocolos Imunohistoquímicos e Histoquímicos utilizados na optimização do anticorpo MAC387.

Protocolo MAC387

- Desparafinar em xilol – 15 minutos
- Duas lavagens em Álcool 100º
- Bloqueio da Peroxidase endógena com solução extemporânea de bloqueio → solução = 100 ml metanol + 2 ml H_2O_2
- Lavagem em água corrente
- Recuperação antigénica com PT High – modulo PT link (Dako) em solução de pH alto (High) – 20 minutos a 94ºC
- Arrefecimento em solução de arrefecimento pós-recuperação antigénica (Dako)
- Lavagem em água corrente
- Aplicação de caneta hidrofóbica
- Duas lavagens com solução salina (TBS) de 5 min cada – 2x TBS -5 minutos
- Incubação com imunosoro do anticorpo MAC387 (clone M0747, Dako) diluído 1:200 – 30 minutos
- Lavagem com TBS
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com Optiview HQ Universal Linker® (Ventana) – 10 minutos
- Escorrer
- Incubação com Optiview HRP multimer® (Ventana) – 10 minutos
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com o cromogéneo 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto –DAB + H_2O_2 (em partes iguais) (Ventana) – 8 minutos

- Lavagem em água corrente
- Hematoxilina de Mayer – 2 minutos
- Lavagem em água quente para azular
- Secagem na estufa a 43ºC
- Montagem com recurso a TissueTek®

Protocolo MAC387 – recuperação antigénica por acção enzimática: - Proteinase K //Pepsina

- Desparafinar em xilol – 15 minutos
- Duas lavagens em Alcool 100º
- Bloqueio da Peroxidase endógena com solução extemporânea de bloqueio → solução = 100 ml metanol + 2 ml H_2O_2
- Lavagem em água corrente
- Incubação com Proteinase K (S3020 Dako) – 6 minutos á temperatura ambiente
  OU
- Incubação com solução de pepsina – 20 minutos a 37ºC → solução = 0,8gr pepsina + 2 ml ácido clorídrico + 200ml água destilada
- Lavagem em água corrente
- Aplicação de caneta hidrofóbica
- Duas lavagens com solução salina (TBS) de 5 min cada – 2x TBS -5 minutos
- Incubação com imunosoro do anticorpo MAC387 (clone M0747, Dako) diluído 1:200 – 30 minutos
- Lavagem com TBS

- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com Optiview HQ Universal Linker® (Ventana) – 10 minutos
- Escorrer
- Incubação com Optiview HRP multimer® (Ventana) – 10 minutos
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com o cromogéneo 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto –DAB + H_2O_2 (em partes iguais) (Ventana) – 8 minutos
- Lavagem em água corrente
- Hematoxilina de Mayer – 2 minutos
- Lavagem em água quente para azular
- Secagem na estufa a 43ºC
- Montagem com recurso a TissueTek®

Protocolo MAC387 + Amplifier

- Desparafinar em xilol – 15 minutos
- Duas lavagens em Alcool 100º
- Bloqueio da Peroxidase endógena com solução extemporânea de bloqueio → solução = 100 ml metanol + 2 ml H_2O_2
- Lavagem em água corrente
- Recuperação antigénica com PT High – modulo PT link (Dako) em solução de pH alto (High) – 20 minutos a 94ºC
- Arrefecimento em solução de arrefecimento pós-recuperação antigénica (Dako)
- Lavagem em água corrente

- Aplicação de caneta hidrofóbica
- Duas lavagens com solução salina (TBS) de 5 min cada – 2x TBS -5 minutos
- Incubação com imunosoro do anticorpo MAC387 (clone M0747, Dako) diluído 1:200 – 30 minutos
- Lavagem com TBS
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com Optiview HQ Universal Linker® (Ventana) – 10 minutos
- Escorrer
- Incubação com Optiview HRP multimer® (Ventana) – 10 minutos
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com o cromogéneo 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto –DAB + H_2O_2 (em partes iguais) (Ventana) – 8 minutos
- Lavagem com TBS
- Optiview Amplifier + Optiview Amplification H_2O_2® (em partes iguais) (Ventana) – 4 minutos
- Optiview Amplification Multimer – 4 minutos
- Lavagem com TBS
- DAB + H_2O_2 (em partes iguais) (Ventana) – 8 minutos
- Lavagem em água corrente
- Hematoxilina de Mayer – 2 minutos
- Lavagem em água quente para azular
- Secagem na estufa a 43ºC
- Montagem com recurso a TissueTek®

Protocolo CD163 e CD68 –PGM1

- Desparafinar em xilol – 15 minutos
- Duas lavagens em Alcool 100º
- Bloqueio da Peroxidase endógena com solução extemporânea de bloqueio → solução = 100 ml metanol + 2 ml H_2O_2
- Lavagem em água corrente
- Recuperação antigénica com PT High – modulo PT link (Dako) em solução de pH alto (High) – 20 minutos a 94ºC
- Arrefecimento em solução de arrefecimento pós-recuperação antigénica (Dako)
- Lavagem em água corrente
- Aplicação de caneta hidrofóbica
- Duas lavagens com solução salina (TBS) de 5 min cada – 2x TBS -5 minutos
- Incubação com imunosoros dos anticorpos CD163 (clone 10D6, Novocastra refª NCL-CD163) e CD68 (clone PGM1, Dako M0876) ambos diluídos na concentração 1:300 – 30 minutos
- Lavagem com TBS
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com Optiview HQ Universal Linker® (Ventana) – 10 minutos
- Escorrer
- Incubação com Optiview HRP multimer® (Ventana) – 10 minutos
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com o cromogéneo 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto –DAB + H_2O_2 (em partes iguais) (Ventana) – 8 minutos
- Lavagem em água corrente

- Hematoxilina de Mayer – 2 minutos
- Lavagem em água quente para azular
- Secagem na estufa a 43ºC
- Montagem com recurso a TissueTek®

Coloração Perls para detecção de ferro (Fe^{2+}) férrico e hemossiderina nos tecidos.

- Desparafinar em xilol durante 10 minutos e rehidratadar na bateria de álcoois 100º, 90º, 70º e água destilada
- Aplicar ferrocianeto de potássio 2% - 5 minutos
- Aplicar solução extemporânea de Ferrocianeto de potássio 2% + Acido clorídrico em partes iguais – 30 minutos
- Lavagem em água corrente
- Lavagem em água destilada
- Aplicar Kernechtnot (nuclear Fast red) – 3 minutos
- Desidratar, clarificar e montar

Coloração Hematoxilina e Eosina.

- Desparafinar em xilol -10 minutos
- Rehidratar em bacteria de álcoois: álcool 100º – 3 minutos, álcool 96º – 3 minutos, álcool 70º – 1 minuto e água destilada – 2 minutos.
- Hematoxilina - 7 minutos
- Lavagem com água corrente – 5 minutos
- Álcool clorídrico - 30 segundos
- Lavagem com água corrente – 5 minutos

- Álcool 70º – 1 minuto
- Eosina – 1 minuto e 30 segundos
- Álcool 96º – 3 minutos
- Álcool 100º – 3 minutos
- Xilol – 2 minutos
- Montagem manual com Entelan®

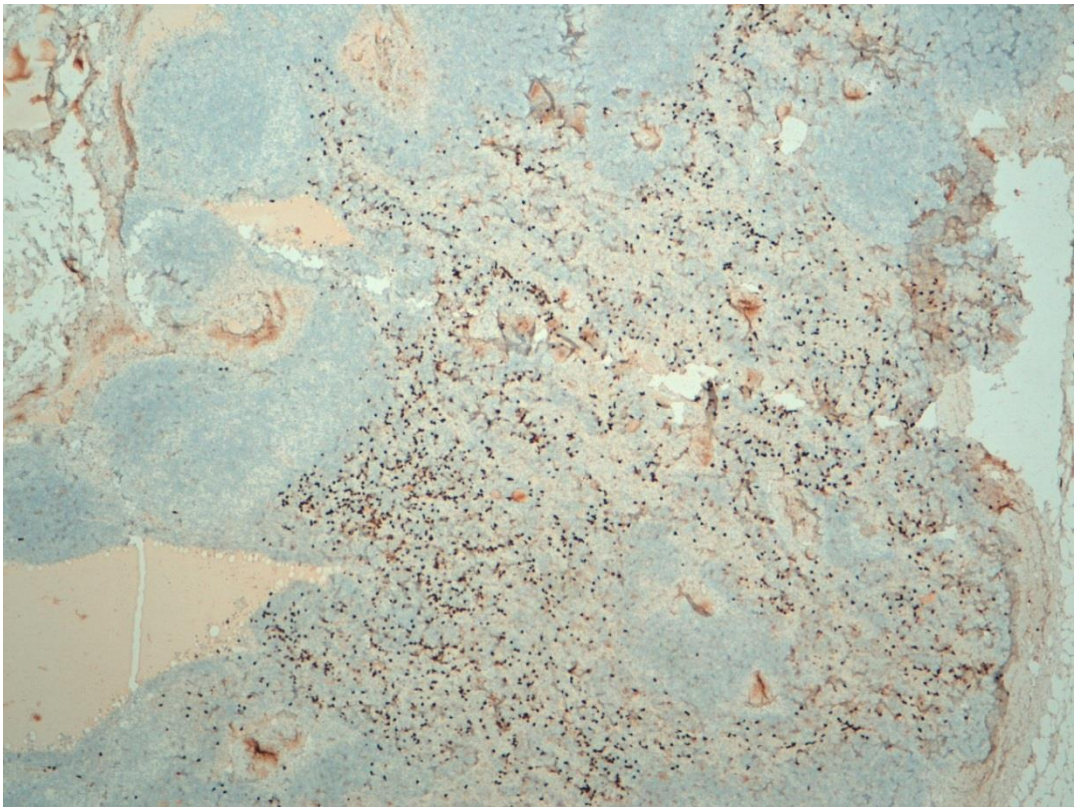
Protocolo CD45 e CD79α segundo Dr. Joaquim Henriques

- Desparafinar em xilol durante 15 minutos e rehidratadar na bateria de álcoois 100º, 90º, 70º e água destilada
- Lavagem com TBS
- Recuperação antigénica com PT High – modulo PTlink (Dako) em solução de pH alto (High) – 20 minutos a 94ºC
- Arrefecimento em solução de arrefecimento pós-recuperação antigénica (Dako)
- Bloqueio da Peroxidase endógena com solução específica Dako Real TM Peroxidase Blocking Solution® – 30 minutos
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com os imunosoros dos anticorpos CD3 (clone A0452; Dako) e CD79α (M7051, clone HM57; Dako) nas diluições 1:500 e 1:200 respectivamente no diluente primário (Leica, Bond) – 30 minutos
- 2x TBS -5 minutos
- Incubação com Dako Real TM Envision® HRP Rabbit/Mouse – 30 minutos
- Lavagem 2x TBS -5 minutos

- Incubação com conjugado de peroxidase ABC complex Vectastain® Elite kit Standard Vector Laboratories – 30 minutos
- Incubação com o cromogéneo 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto –DAB
- Lavagem em água corrente
- Hematoxilina de Mayer – 2 minutos
- Lavagem em água quente para azular
- Secagem na estufa a 43ºC
- Montagem com recurso a Eukitt®

II. Apêndice: Fotografias de Imunohistoquimica

Imagem 1: tecido controlo (linfonodo canino normal) 1643-14F 4x



Ampliação do mesmo tecido 20x

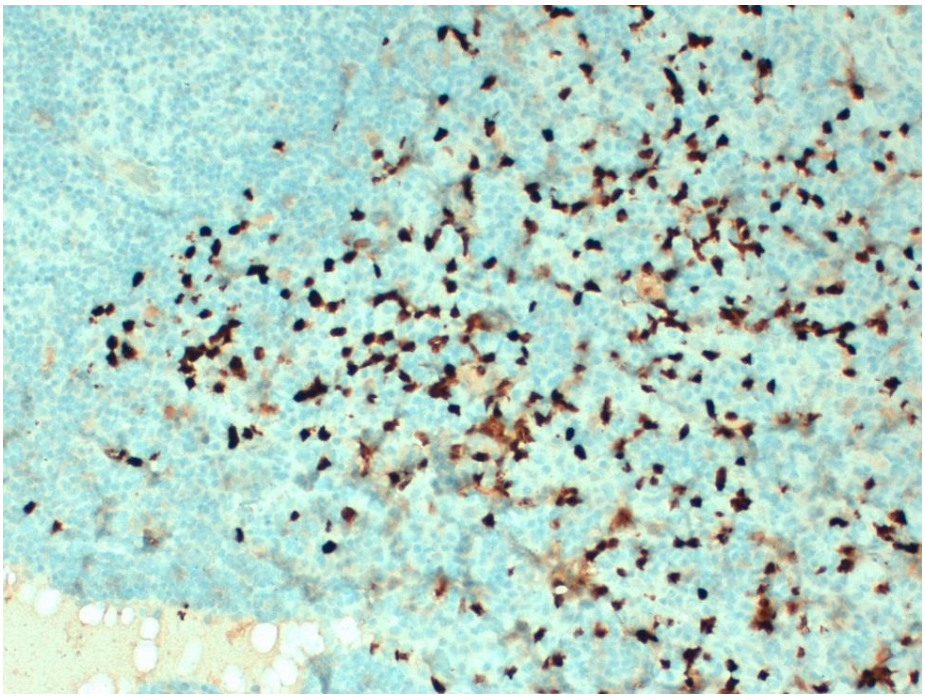
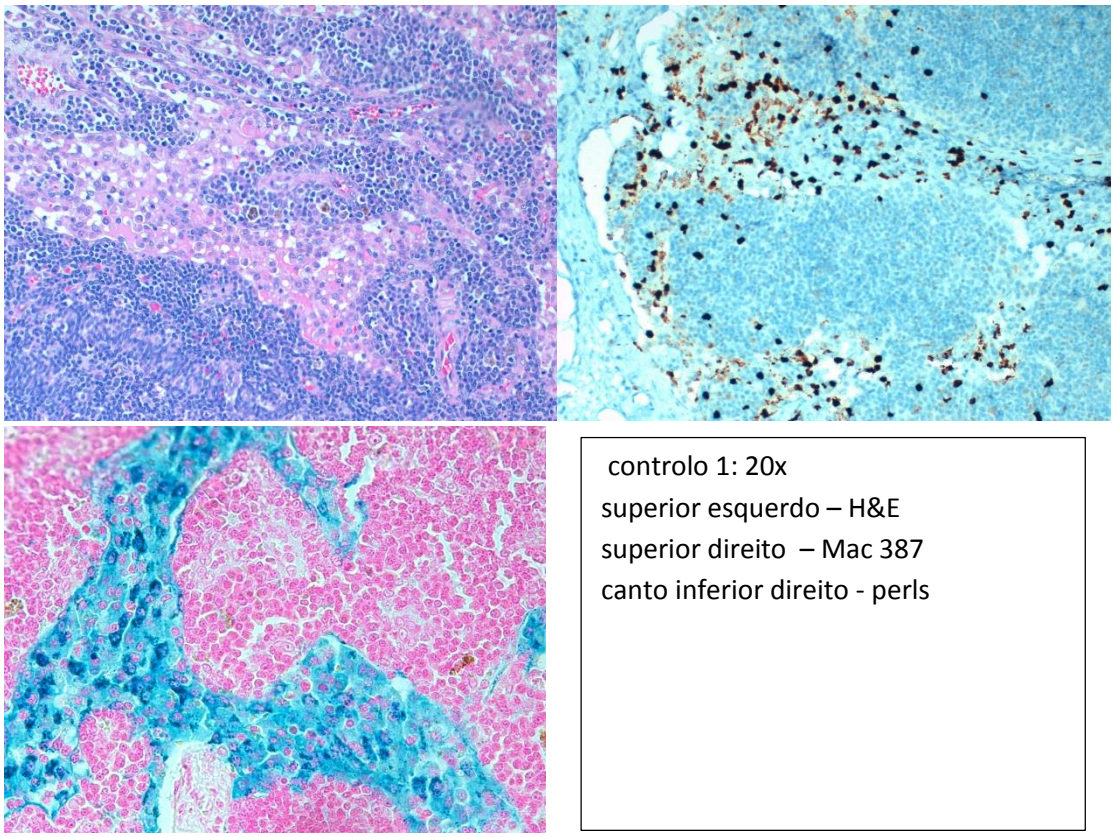
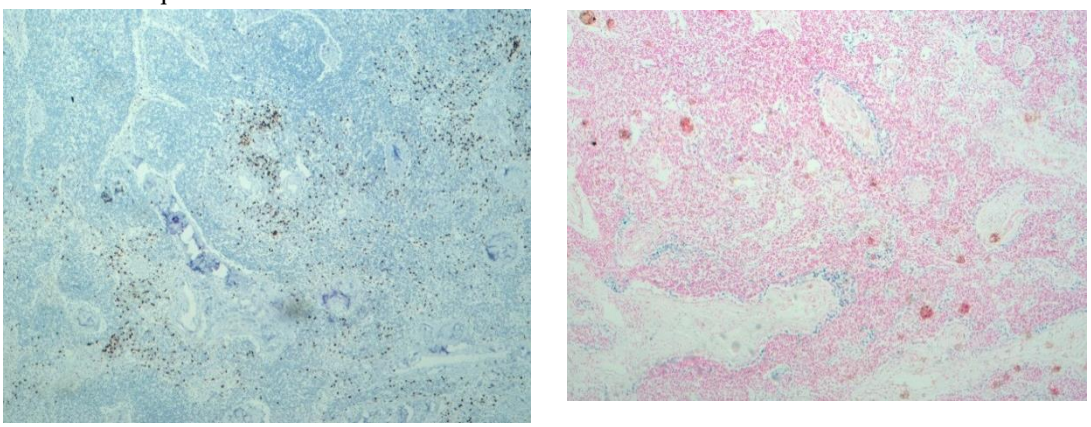


Imagem 2: tecido controlo (linfonodo canino normal) cortes sequenciados para coloração diferencial e imunohistoquimica.



controlo 1: 20x
superior esquerdo – H&E
superior direito – Mac 387
canto inferior direito - perls

Imagem 3: tecido controlo2 (linfonodo canino normal) cortes sequenciados para coloração diferencial e imunohistoquimica.



Linfonodo controlo2:

- superior esquerdo: Mac 387
- superior direito – Perls
- Inferior – H&E

x

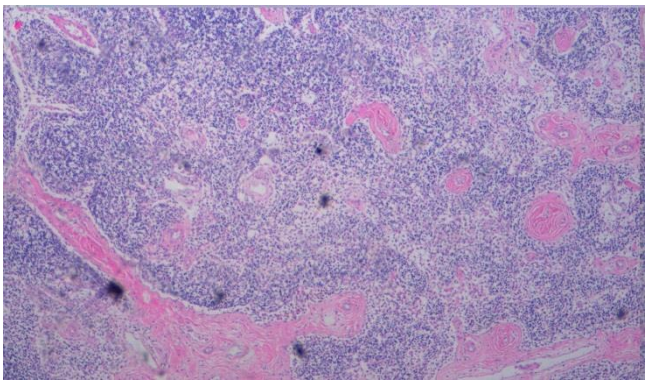
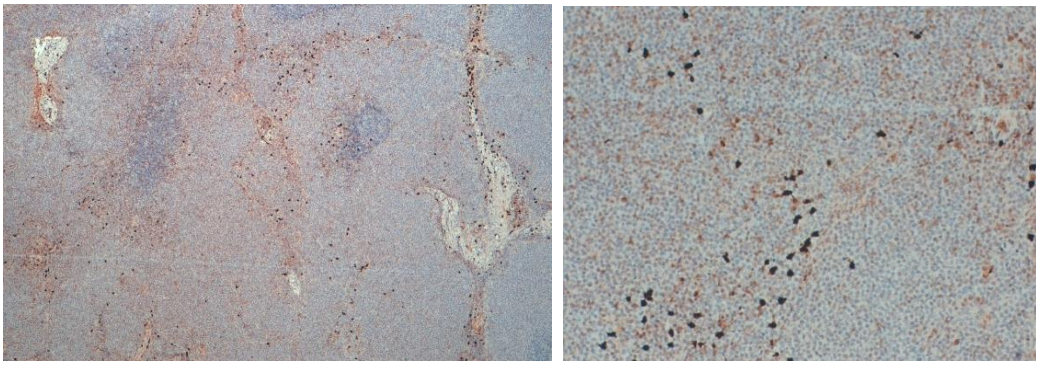
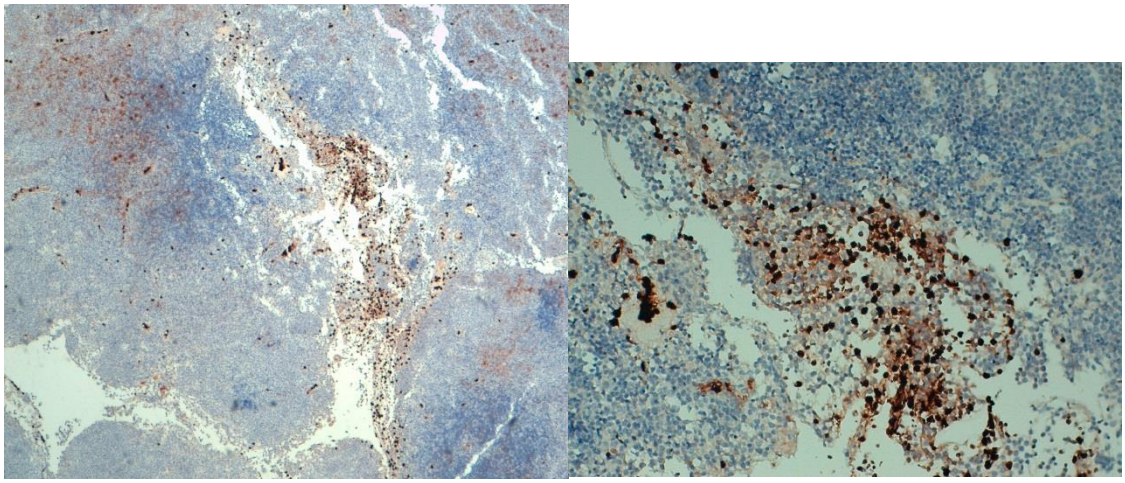


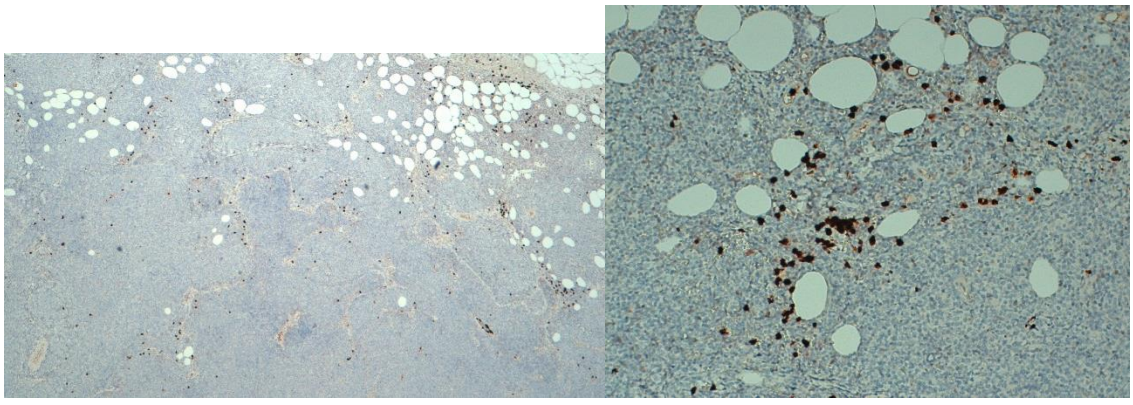
Imagem 4: Casos



Caso x (Aramis): infiltração macrofágica discreta associada a vasculatura e tecido conjuntivo

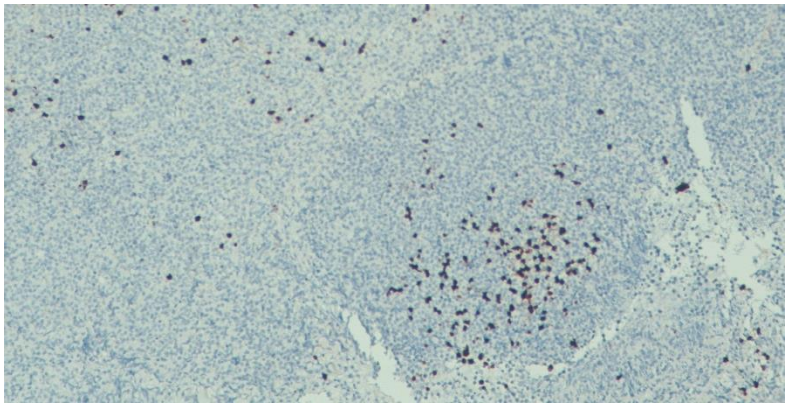


Caso x2 (Nala) – Infiltração macrofágica associada a área de necrose central do tumor. Tecido conjuntivo

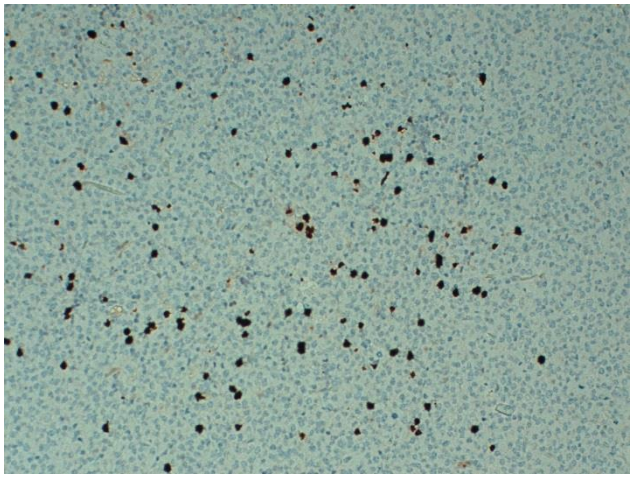


Caso x3 (Phoebe) – infiltração de pequenos aglomerados de macrófagos junto a tecido conjuntivo e adiposo.

Outro tipo de padrões infiltrativos:



Caso x4 (sushi): aglomerados mais densos de macrófagos associados ao centro germinativo



Caso x5 (Nina): Infiltração de macrófagos dispersos pela massa tumoral