



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA NO LINFOMA CANINO: AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO DE IL-17

MARIANA GUEDES LOPES

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutora Maria da Conceição da Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Solange Judite Roque

Coelho Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque

Coelho Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Dr. Joaquim José Garcia

Pereira Henriques

2017

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA NO LINFOMA CANINO: AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO DE IL-17

MARIANA GUEDES LOPES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutora Maria da Conceição da Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Solange Judite Roque

Coelho Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque

Coelho Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Dr. Joaquim José Garcia

Pereira Henriques

2017

LISBOA

Agradecimentos:

- À minha família, e em especial aos meus pais, por me terem proporcionado a oportunidade de estudar e seguir o curso dos meus sonhos, por sempre me terem inculcido valores que foram essenciais durante todo o meu percurso, e por todo o apoio demonstrado ao longo destes anos. Ao meu irmão, que no meio das minhas horas de estudo, sempre me sabia fazer rir nos momentos de maior cansaço.
- Às entidades financiadoras do presente projeto, nomeadamente o CIISA, através do Projeto CIISA 15 da Professora Solange Gil: “Clinical and immunological characterization of naturally occurring canine lymphoma” e a Fundação para a Ciência e Tecnologia através do Projeto do Doutor Frederico Aires da Silva, IF/01010/201.
- À minha orientadora, a Professora Solange Gil, por ser a melhor orientadora que podia ter pedido, pelo apoio, simpatia e disponibilidade demonstradas ao longo da elaboração desta dissertação, que tornou todo este processo mais fácil, e por todos os conhecimentos transmitidos, que serão certamente uma mais valia no meu futuro.
- Ao meu co-orientador, o Dr. Joaquim Henriques, que me deu a oportunidade de estagiar no Hospital Veterinário Berna, pelos conhecimentos transmitidos, pelas oportunidades que me foram dadas durante a minha passagem pelo hospital, e pela confiança depositada em mim.
- À Dra. Joana Dias, pois sem ela nada disto teria sido possível! Por ser um grande exemplo de trabalho e dedicação, por todo o tempo e conselhos que despendeu comigo, e pela ajuda infinita durante os meus meses de estágio e durante a elaboração desta dissertação de mestrado, um grande obrigada!
- À equipa do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UL e ao grupo do Doutor Frederico Aires da Silva, com quem tive o prazer de trabalhar, que aumentou em muito as minhas expectativas sobre futuras equipas de trabalho, agradeço toda a ajuda e simpatia com que me receberam, sem dúvida que a vossa dedicação e todo o trabalho notável que desenvolvem todos os dias criou o “bichinho” da investigação em mim.
- Ao Professor Luís Tavares, por ter disponibilizado os meios para a realização do Projeto Linfoma, no qual o trabalho que consta na presente dissertação de mestrado esteve incluído.
- À equipa do Hospital Veterinário Berna, pela paciência e pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade e bom ambiente que fizeram com que as horas de trabalho passassem a correr.

- Aos meus grandes amigos e companheiros de curso, Ana Rodrigues, Carlota Gil, Sara Coelho, João Figueiredo, Tiago Trovão e João Poças, vocês são os maiores tesouros que levo destes seis anos nesta faculdade. Não sei que estrelinhas estavam alinhadas no momento em que nos juntámos mas não consigo imaginar melhor experiência de faculdade do que a que passei convosco. E tenho pena de quem se tente meter no vosso caminho, vocês são todos enormes!

- Por fim, e porque nem toda a gente tem a sorte de ter um melhor amigo como namorado, queria agradecer novamente ao João Figueiredo. Para esta tese em específico, por toda a ajuda na análise estatística que teria demorado eternidades sem ti, e na vida em geral, por seres o meu maior apoio nos momentos de fraqueza e de cansaço e a minha melhor companhia nos momentos de alegria e celebração. Tudo valeu a pena só por te ter conhecido. Mais aventuras nos aguardam.

Resumo

CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA NO LINFOMA CANINO: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-17

O linfoma canino é a neoplasia hematopoiética mais frequente no cão. Pode ter variadas apresentações, sendo a apresentação multicêntrica a mais comum, que se caracteriza por uma linfadenomegália generalizada, muito semelhante ao Linfoma Não-Hodgkin dos humanos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da IL-17 no linfoma canino e contribuir para a caracterização imunológica desta doença. Foram utilizados um grupo de animais diagnosticados com linfoma (n=22) no Hospital Escolar da FMV, e dois grupos controle, dos quais foram colhidas amostras de linfonodo e células mononucleares do sangue periférico, que foram posteriormente submetidas a quantificação, por qRT-PCR, dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-17.

Observou-se que a IL-17 estava significativamente diminuída nas células mononucleares do sangue periférico dos animais com linfoma, e que existe uma correlação significativa positiva entre os níveis de IL-17 no linfonodo de animais com linfoma B e a sua sobrevida.

O papel da IL-17 no linfoma canino, paralelamente ao que acontece com as outras neoplasias, ainda não está bem definido. Deste modo, os resultados obtidos permitiram a caracterização do estadiu imunológico dos animais com linfoma canino abrindo assim portas para novos estudos que contribuam para a compreensão do papel da IL-17 nesta neoplasia.

Palavras-chave: linfoma canino, interleucina 17, caracterização imunológica

Abstract

IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION IN CANINE LYMPHOMA: EVALUATION OF THE EXPRESSION OF IL-17

Canine lymphoma is the most common hematopoietic neoplasia in dogs. It can have multiple presentations, and the multicentric presentation is the most common, which is characterized by generalized lymphadenomegaly, and is very similar to Non-Hodgkin's Lymphoma that occurs in humans.

This study aimed to evaluate the expression of IL-17 in canine lymphoma and contribute to its immunological characterization. One group of animals diagnosed with lymphoma (n=22) and two controls groups were enrolled, and samples of lymph node and peripheral blood mononuclear cells were collected, that were subjected to quantification, by qRT-PCR, of the mRNA expression levels of IL-17 gene.

Our results showed that the levels of IL-17 were significantly lower in the peripheral blood mononuclear cells of animals with lymphoma when compared with controls, and that there was a significant positive correlation between the survival of animals with B-cell lymphoma and the levels of IL-17 in the lymph node.

The role of IL-17 in canine lymphoma, like in other neoplasias, is not well defined. These results help characterize the immunological stage of animals with canine lymphoma and open doors to new studies that lead to the comprehension of the role of IL-17 in this disease.

Key-words: canine lymphoma, interleukin 17, immunological characterization

Índice

Capítulo I - Relatório de estágio.....	1
Capítulo II – Revisão bibliográfica.....	3
1. Linfoma canino.....	3
1.1. Epidemiologia.....	3
1.2. Etiologia.....	3
1.2.1. Fatores ambientais.....	3
1.2.2. Fatores genéticos.....	4
1.2.3. Fatores imunitários.....	4
1.3. Classificação.....	4
1.3.1. Classificação histológica.....	5
1.3.2. Classificação imunofenotípica.....	5
1.3.3. Classificação anatómica.....	7
1.4. Síndromes paraneoplásicas.....	10
1.5. Diagnóstico e Estadiamento.....	10
1.5.1. Exame físico.....	10
1.5.2. Análises hematológicas e bioquímicas.....	11
1.5.3. PAAF e biópsia.....	11
1.5.4. Imunohistoquímica, citometria de fluxo e PCR para rearranjos do recetor de antigénios (PRRA).....	11
1.5.5. Colheita de medula óssea.....	12
1.5.6. Radiografia.....	12
1.6. Tratamento.....	12
1.6.1. Terminologia.....	12
1.6.2. Quimioterapia.....	13
1.6.3. Imunoterapia.....	19
1.7. Prognóstico.....	20
1.7.1. Fatores epidemiológicos.....	20
1.7.2. Fatores clínicos.....	21
1.7.3. Fatores relacionados com a classificação.....	21
2. O sistema imunitário.....	22
2.1. O sistema imunitário inato.....	22
2.2. O sistema imunitário adquirido.....	23

2.3.	As citocinas	24
2.3.1.	As interleucinas	26
2.4.	Células Th1, Th2 e Treg	26
3.	O desenvolvimento de neoplasias	27
3.1.	A imunidade tumoral	28
3.2.	O papel das citocinas nas neoplasias	29
3.3.	A imunidade e o linfoma canino.....	30
3.4.	Interleucina 17.....	31
3.4.1.	Resposta Th17	31
3.4.2.	Ações fisiológicas e patológicas da IL-17.....	31
3.4.3.	A interleucina 17 e as neoplasias	33
Capítulo III – Materiais e Métodos: Expressão do gene da IL-17 no linfoma canino		35
1.	Objetivo:.....	35
2.	Amostra em estudo.....	35
2.1.	Critérios de inclusão.....	35
2.2.	Critérios de exclusão.....	36
3.	Colheita das amostras:	36
4.	Processamento de amostras.....	36
4.1.	Armazenamento das amostras.....	36
4.2.	Extração de RNA e síntese de DNA complementar.....	36
4.3.	Seleção dos <i>primers</i>	37
4.4.	qRT-PCR.....	38
4.5.	Análise estatística	40
Capítulo IV – Resultados: Expressão do gene da IL-17 no linfoma canino.....		41
1.	Caracterização da amostra.....	41
2.	Diagnóstico oncológico.....	41
3.	Níveis de expressão de mRNA do gene da IL-17.....	42
3.1.	Linfonodo.....	42
3.2.	Células mononucleares do sangue periférico	43
4.	Correlação entre a expressão da IL-17 e a sobrevida dos animais	45
5.	Correlação entre a expressão de IL-17 e a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos	47
Capítulo V – Discussão: Expressão do gene da IL-17 no linfoma canino		49
1.	Perspetivas futuras	53
Conclusão.....		55
Bibliografia:.....		56

Anexo I – Abstract da comunicação oral “Clinical and immunological characterization of naturally occurring canine lymphoma”	69
Anexo II: Resumo do poster “Avaliação da sobrevivência associada a um protocolo de 12 semanas de Vinblastina + Prednisolona em comparação com o protocolo convencional de 8 semanas no tratamento de cães com mastocitoma de alto grau”	71
Anexo III – Dados dos animais diagnosticados com linfoma canino pertencentes ao grupo em estudo.....	73
Anexo IV – Animais incluídos na análise da correlação entre a sobrevivência dos animais com linfoma e as quantificações de IL-17 no linfonodo e no sangue e respectiva sobrevivência.....	74
Anexo V – Gráficos relativos às correlações entre a sobrevivência dos animais com linfoma B e linfoma T e as quantificações de IL-17 no linfonodo e no sangue.....	75
Anexo VI - Gráficos relativos às correlações entre os valores de hemograma dos animais com linfoma e as quantificações de IL-17 no linfonodo e no sangue.....	78

Lista de figuras:

Figura 1: A ação dos sistemas imunitários inato e adquirido ao longo do tempo.....	24
Figura 2: As células T conseguem regular diversos elementos do sistema imunitário através da produção de citocinas.	25
Figura 3: Ações da IL-17 após a diferenciação das células Th17.	32
Figura 4: Gel de agarose a 3%: Produtos do qRT-PCR da expressão de mRNA de várias interleucinas.....	39

Lista de gráficos:

Gráfico 1: Distribuição dos Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo no grupo controlo (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).....	42
Gráfico 2: Distribuição dos Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico no grupo controlo (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).	44
Gráfico 3: Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo dos animais com linfoma e a sua sobrevida.	45
Gráfico 4: Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico dos animais com linfoma e a sua sobrevida ...	46

Lista de tabelas:

Tabela 1: <i>National Cancer Institute Working Formulation</i> para linfoma.....	6
Tabela 2: Classificação de Kiel de linfoma	6
Tabela 3: Classificação da <i>World Health Organization</i> para as neoplasias linfóides. Adaptado de Valli <i>et al</i> , 2011.....	7
Tabela 4: Sistema de estadiamento clínico para linfoma nos animais domésticos da <i>World Health Organization</i>	8
Tabela 5: Protocolo quimioterápico combinado curto da Universidade de Wisconsin-Madison para o tratamento de linfoma canino.	15
Tabela 6: Protocolo COP para tratamento de linfoma canino.....	16
Tabela 7- Sequências nucleotídicas dos primers utilizados na quantificação, por qRT-PCR, dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico.....	38
Tabela 8: Interleucinas estudadas no âmbito do Projeto Linfoma Canino e respetivos tamanhos.	39
Tabela 9: Distribuição dos Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo no grupo controlo (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).....	43
Tabela 10: Distribuição dos Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares no grupo controlo (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).	44
Tabela 11: Valores de p e Rho obtidos através de testes de Spearman para avaliar a correlação entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo ou nas células mononucleares.....	47
Tabela 12: Valores de p e Rho obtidos através de testes de Spearman para avaliar a correlação entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo em linfomas B e T.....	48
Tabela 13: Valores de p e Rho obtidos através de testes de Spearman para avaliar a correlação entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares em linfomas B e T.	48

Lista de abreviaturas:

‰: por cento

µl: microlitro

ALT: Alanino-transferase

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina (H – hidroxidaunarubicina), vincristina (O – Oncovin) e Prednisolona

CIISA – Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal

COP: Ciclofosfamida, vincristina (O – Oncovin) e Prednisolona

cTERT: Transcriptase Reversa da Telomerase canina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FBS: soro fetal bovino

Fc: fragmento cristalizável

FMV-UL: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

G-CSF: Fator Estimulador das Colónias de Granulócitos

GM-CSF: Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos e Macrófagos

HVB: Hospital Veterinário Berna

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

INF: Interferão

IV: intra venoso

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

MOPP: Mecloretamina, vincristina (O – Oncovin), Procarbazina e Prednisolona

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

NK: *Natural Killer*

nM: nanomole

°C: graus centígrados

PAAF: Punção aspirativa por agulha fina

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PO: *per os*

PRRA: PCR para rearranjos do recetor de antigénios

PTHrP: Proteína relacionada com a Hormona da Paratiróide

qRT-PCR: Reacção de Polimerase em Cadeia quantitativa em Tempo Real

rIL-2r: recetor solúvel da Interlecina 2

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

TGF: Fator de Crescimento Tumoral

Th: T *helper*

TNF: Fator de Necrose Tumoral

Treg: T reguladora

VCOG: Veterinary Cooperative Oncology Group

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

WHO: *World Health Organization*

Δ CT: *delta cycle threshold*

Capítulo I - Relatório de estágio

O estágio curricular para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária foi dividido em duas componentes distintas. A primeira parte decorreu no Laboratório de Imunologia e Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV – UL), no período de 12 de Setembro de 2016 a 4 de novembro de 2016, com uma carga horária total de 280 horas, na área de investigação, em colaboração com o doutoramento da Dra. Joana Dias (FMV-UL), no âmbito do Projeto Linfoma Canino. A segunda parte decorreu no Hospital Veterinário Berna (HVB), em Lisboa, no período de 7 de novembro de 2016 a 10 de março de 2017, com uma carga horária total de cerca de 620 horas, na área de clínica de animais de companhia, com ênfase em oncologia veterinária. A segunda parte do estágio foi interrompida durante o período de 16 de janeiro a 17 de fevereiro pois a autora passou as referidas cinco semanas num estágio no Serviço de Oncologia no Small Animal Hospital da Universidade de Glasgow.

Durante a primeira parte do estágio, no Laboratório de Imunologia e Virologia da FMV-UL, a autora avaliou os perfis de expressão de diversas citocinas em amostras de linfonodo e de células mononucleares do sangue periférico de cães saudáveis e com linfoma, e teve a oportunidade de aprender e executar diversas técnicas laboratoriais no processo, tais como a extração, purificação e quantificação de ácidos nucleicos a partir de várias amostras, eletroforese em gel de agarose, transcrição de ácidos nucleicos, reação de polimerização em cadeia em tempo real (RT-PCR), entre outras. Os resultados obtidos a partir do trabalho desenvolvido durante este estágio contribuíram para uma comunicação oral apresentada no XIII Congresso do Hospital Veterinário do Montenegro – Patologias Cardio-Respiratórias sem segredos, intitulada de “*Clinical and immunological characterization of naturally occurring canine lymphoma*” apresentada pela Dra. Joana Dias (Anexo I).

Durante a segunda parte do estágio, no HVB, a autora frequentou os diversos serviços do hospital, entre eles, oncologia, medicina interna, cardiologia, imagiologia, anestesia, cirurgia, dermatologia, oftalmologia, ortopedia e internamento, sendo que houve uma maior incidência nas consultas de oncologia, uma vez que o HVB é um hospital de referência nessa área. A autora assistiu e participou em diversas consultas de primeira e segunda opinião, tendo a possibilidade de executar ou auxiliar na execução de vários procedimentos tais como: colheita de sangue, realização de análises clínicas e interpretação das mesmas (hemograma completo, bioquímicas e ionograma), utilização do refratómetro para determinação de densidade urinária e proteínas totais séricas, realização de exames completos de urina, venopunção para colocação de catéter, medição da glicémia, drenagem de líquido de derrames cavitários, algaliação, realização de enemas, realização de punções

aspirativas por agulha fina, limpeza de feridas, administração de medicamentos (via oral, endovenosa, intramuscular e subcutânea), vacinação, medição da pressão arterial, teste de fluoresceína, teste de Schirmer, preparação e administração de quimioterápicos, observação ao microscópio ótico de lâminas de citologia e de esfregaços sanguíneos, remoção de pontos simples, realização de pensos simples e pensos gordos, realização de electrocardiograma, entre outros. A autora teve a oportunidade de participar no diagnóstico imagiológico dos animais doentes, recorrendo a ecografia abdominal, ecocardiografia, raio-X e tomografia computadorizada, ajudando no posicionamento e contenção dos animais e na realização e na interpretação dos exames. No bloco cirúrgico, a autora acompanhou os doentes antes, durante e após as cirurgias, realizando a avaliação pré-cirúrgica, preparando o doente (colocação de catéter, entubação endotraqueal, tricotomia, desinfecção e limpeza da zona sujeita à incisão), administrando a pré-medicação e a indução anestésica, preparando o material cirúrgico e os aparelhos de monitorização anestésica, monitorizando a anestesia, auxiliando durante a cirurgia e, no recobro desta, efetuando as avaliações e os cuidados pós-cirúrgicos. Durante as cirurgias, a autora teve a oportunidade de desempenhar as funções de anestesista, ajudante de cirurgião e circulante, consoante a requisição do cirurgião responsável. Foram ainda visualizadas algumas cirurgias por mínima invasão como endoscopias, broncoscopias, toracoscopias, rinoscopias, laparoscopias e ovariectomias eletivas. No internamento, a autora prestou cuidados de higiene e alimentou os doentes internados, administrou medicações consoante as suas necessidades individuais e atendendo à sua evolução clínica, e monitorizou os seus sinais vitais. Por fim, durante este estágio, a autora teve a oportunidade de elaborar um poster em conjunto com outros elementos da equipa do HBV que foi apresentado no XIII Congresso do Hospital Veterinário do Montenegro – Patologias Cardio-Respiratórias sem segredos, intitulado “Avaliação da sobrevivência associada a um protocolo de 12 semanas de Vinblastina + Prednisolona em comparação com o protocolo convencional de 8 semanas no tratamento de cães com mastocitoma de alto grau” (Anexo II).

Capítulo II – Revisão bibliográfica

1. Linfoma canino

O linfoma canino é um conjunto de neoplasias das células linforreticulares frequentemente diagnosticada na prática clínica. Tem origem principalmente nos tecidos linfóides, como os linfonodos, o baço ou a medula óssea, mas pode aparecer em quase qualquer localização (Vail & Young, 2007).

1.1. Epidemiologia

O linfoma é a neoplasia hematopoiética com maior incidência no cão, representando cerca de 80% a 90% deste tipo de neoplasias (Morris & Dobson, 2001; Dobson, Samuel, Milstein, Rogers & Wood, 2002) e 7% a 24% de todas as neoplasias caninas (Vail & Young, 2007). Indivíduos de meia-idade (entre 6 e 9 anos) são os mais afetados, mas a doença pode ocorrer em animais de qualquer idade (Turek, Saba, Paoloni & Argyle, 2008). Não parece haver uma predisposição de género óbvia, mas certas raças como Scottish terrier, Boxer, Basset hound, Bulldogs, Labrador retriever, Airdale terrier e São Bernardo parecem ter um risco acrescido (Morris & Dobson, 2001) apesar de qualquer raça poder desenvolver a doença.

1.2. Etiologia

A etiologia desta doença não está bem estabelecida e várias hipóteses já foram propostas.

1.2.1. Fatores ambientais

Estima-se que a prevalência do linfoma canino tenha vindo a aumentar, paralelamente ao que se observa no Linfoma Não-Hodgkin dos humanos (Cartwright *et al*, 1999; Howlader *et al*, 2012; Zandvliet, 2016), tendo sido por isso sugerido que fatores ambientais possam influenciar ambas as espécies no desenvolvimento da doença, devido à grande proximidade entre o ser humano e os seus animais de estimação. Alguns dos fatores ambientais que podem estar relacionados com o desenvolvimento do linfoma são a proximidade de áreas industriais ou incineradoras de lixo urbano, exposição a produtos químicos como tintas e solventes, locais radioativos ou poluídos ou a campos magnéticos, quer pela sua ação carcinogénica ou pela sua ação imunossupressora (Teske, 1994; Reif, Lower & Ogilvie, 1995; Gavazza *et al*, 2001; Pastor *et al*, 2009). No entanto, uma relação causa-efeito ainda não foi provada.

Por estas e outras razões, que se prendem com o facto de ser uma doença que ocorre espontaneamente numa espécie sem grande consanguinidade no todo da sua população como é o cão, com apresentações clínicas e resposta ao tratamento semelhantes às que se observam no Homem, e sendo que os proprietários costumam ser complacentes com o

tratamento desta doença nos seus animais, o linfoma canino é considerado um excelente modelo animal para o estudo do Linfoma Não-Hodgkin das pessoas (Teske, 1994; Zandvliet, 2016).

1.2.2. Fatores genéticos

Foi também sugerido que possa existir alguma predisposição genética na gênese do linfoma. A limitada variabilidade genética dentro de cada raça individual, combinado com o elevado número de descendentes, comparativamente com a espécie humana, oferece uma oportunidade para a identificação de possíveis fatores de risco genéticos. O facto de haver raças mais predispostas para o desenvolvimento da doença, como já foi previamente referido, parece suportar esta teoria (Teske, 1994). Num estudo em que estavam incluídas 87 raças de cães, 15 mostraram diferenças significativas na prevalência de um tipo específico de linfoma comparativamente à população geral (Modiano *et al*, 2005), o que leva a crer que existe alguma característica transmitida à descendência possa ser um fator de risco na ocorrência do linfoma canino.

1.2.3. Fatores imunitários

Outra hipótese que foi sugerida foi a de que uma disfunção do sistema imunitário pudesse estar na gênese do desenvolvimento destas neoplasias. Já foi identificada uma função imunitária humoral e celular diminuída em cães com linfoma relativamente a cães com outros tumores não-hematológicos (Weiden *et al*, 1974), e foi verificado que cães com trombocitopénia imunomediada tinham mais probabilidade de desenvolver linfoma do que cães sem a doença (Keller, 1992), embora ainda esteja por perceber se a disfunção imunitária é causada pelo linfoma ou se precede o mesmo. Em humanos esta associação já foi feita, e existe um risco aumentado de desenvolver uma neoplasia do sistema linforreticular após uma supressão espontânea ou iatrogénica do sistema imunitário (Penn & Starzl, 1973; Filopovich, Heinitz, Robison, & Frizzera 1987), para além de também ter sido verificado uma associação positiva entre doenças auto-imunes e uma incidência aumentada de linfoma (Symmons, 1985; Teske, 1994). No entanto, uma disfunção imune secundária também foi identificada, havendo uma depleção de células B e T em pacientes com linfoma, independentemente de o paciente ter sido recentemente diagnosticado, estar em remissão ou a ser tratado, e do grau de malignidade da neoplasia (Janowska-Wieczorek, Andrews, Khaliq & Pilarski, 1987).

1.3. Classificação

O linfoma canino pode ser classificado de acordo com a localização anatómica, critérios histológicos ou caracterização imunofenotípica.

1.3.1. Classificação histológica

Os linfomas originam-se de uma variedade de células linfóides com características morfológicas e imunofenotípicas diferentes. Numa tentativa de ligar o tipo de células que deu origem ao linfoma com o prognóstico do mesmo, vários sistemas de classificação histológica para o linfoma canino foram sugeridos, muitos deles adaptados dos sistemas de classificação já utilizados para o Linfoma Não-Hodgkin. Os esquemas da *National Cancer Institute Working Formulation* e de Kiel modificado foram adaptados para as neoplasias caninas com algum sucesso e são os que aparentam ter o maior valor de prognóstico (Tabela 1 e Tabela 2) (Morris & Dobson, 2001; Vail & Young, 2007).

A *Work Formulation* classifica os linfomas de acordo com o padrão celular (difuso ou folicular) assim como com o tipo celular (células grandes, células pequenas clivadas, imunoblástico), sem ter no entanto informação acerca do fenótipo imunológico do tumor. A classificação de Kiel modificada inclui o padrão arquitetural celular, a morfologia (centroblástico, centrocítico, imunoblástico) e o fenótipo imunológico (células B ou T) das células tumorais. Em ambos os sistemas, os tumores são classificados em baixo grau, grau intermédio ou alto grau de malignidade. Tanto no sistema da *Work Formulation* como no sistema modificado de Kiel, apenas uma minoria dos linfomas é considerado de baixo grau (16,4% e 12%, respetivamente), e linfomas de células grandes ou centroblásticos são os mais frequentes, respetivamente (Teske, Wisman, Moore & van Heerde, 1994b).

Mais recentemente, foi proposto um sistema de classificação pela *World Health Organization* (Harris *et al*, 1999). Este sistema foi criado no intuito de identificar os diferentes tipos de linfoma como diferentes doenças, e não apenas como diferentes tipos celulares. Esta classificação inclui a linhagem e morfologia celular, a topografia e biologia geral que defina um certo tipo de linfoma como uma doença específica (Tabela 3). A validade deste sistema foi comprovada no linfoma e leucemia humana pelo grande consenso verificado entre patologistas, e foi adaptado para o linfoma canino. Segundo esta classificação, a maioria dos linfomas no cão ocorre na forma de linfoma difuso de grandes células B (54%) (Valli *et al*, 2011).

1.3.2. Classificação imunofenotípica

Quanto ao fenótipo imunológico, os linfomas podem ser originários de células B ou células T, sendo que este último tipo representa apenas 10% a 38% das ocorrências de linfoma. Podem também haver linfomas considerados mistos, em que estão presentes as duas populações de células, o que acontece em cerca de 22% dos casos, ou nulos, em que as células do linfoma não são reativas para os marcadores de células B nem de células T, uma ocorrência rara, que representa menos de 5% dos casos de linfoma (Vail & Young, 2007). Não há diferenças significativas de idade ou sexo entre os linfomas de células B e células T (Ponce *et al*, 2010) mas parece haver alguma predisposição rácica para os diferentes

fenótipos imunológicos de linfoma, sendo o Cocker spaniel e o Doberman pinscher mais predispostos a desenvolver linfomas de células B e o Boxer mais predisposto a desenvolver linfomas de células T (Modiano *et al*, 2005).

Tabela 1: *National Cancer Institute Working Formulation* para linfoma. Adaptado de Vail & Young (2007).

Grau	Categoria
Baixo	Linfocítico de células pequenas Folicular de células pequenas clivadas Folicular misto de células clivadas pequenas e grandes
Intermédio	Folicular de células grandes Difuso de células pequenas clivadas Difuso misto de células clivadas pequenas e grandes Difuso de células grandes
Alto	Difuso imunoblástico Difuso linfoblástico Difuso de células pequenas não clivadas

Tabela 2: Classificação de Kiel de linfoma. Adaptado de Vail & Young (2007).

Grau	Categoria
Baixo	Linfocítico Linfoplasmocítico Centroclítico Centroblástico-centroclítico
Alto	Centroblástico Linfoblástico de células T Linfoblástico de células B Imunoblástico

Tabela 3: Classificação da *World Health Organization* para as neoplasias linfóides. Adaptado de Valli *et al*, 2011.

<p>Neoplasias das células B</p> <ul style="list-style-type: none">❖ Neoplasias das células B precursoras<ul style="list-style-type: none">▪ Linfoma/leucemia linfoblástica de células B precursoras❖ Neoplasias das células B maduras<ul style="list-style-type: none">▪ Leucemia linfocítica crónica de células B/Leucemia prolinfocítica de células B/Linfoma linfocítico de células pequenas▪ Linfoma linfoplasmocítico▪ Linfoma de células B da zona marginal esplénica▪ Plasmocitoma▪ Linfoma da zona marginal extralinfonodal do tecido linfóide associado à mucosa▪ Linfoma da zona marginal nodal▪ Linfoma folicular▪ Linfoma de células do manto▪ Linfoma difuso de grandes células B▪ Linfoma de grandes células B mediastínico▪ Linfoma/leucemia de Burkitt▪ Entidade provisória: Linfoma de células B de alto grau tipo Burkitt▪ Linfoma de efusão primária
<p>Neoplasias de células T e de células <i>Natural Killer</i></p> <ul style="list-style-type: none">❖ Neoplasias de células T precursoras<ul style="list-style-type: none">▪ Leucemia/linfoma linfoblástica de células T precursoras❖ Neoplasias de células T e NK maduras<ul style="list-style-type: none">▪ Leucemia prolinfocítica de células T▪ Leucemia de grandes células granulares▪ Leucemia agressiva de células NK▪ Linfomas periféricos de células T▪ Leucemia/linfoma de células T adulto▪ Linfoma de células T intestinal▪ Linfoma de células T hepatoesplênico▪ Linfoma de células T tipo paniculite subcutânea▪ Micose fungóide/ Síndrome de Sézary▪ Linfoma de grandes células anaplásicas tipo cutâneo primário de células T ou nulas▪ Linfoma de células T periférico não-especificado▪ Linfoma de células T angioimunoblástico▪ Linfoma de células T angiocêntrico

1.3.3. Classificação anatómica

O linfoma canino caracteriza-se por uma diversidade de apresentações clínicas, com tratamentos e prognósticos diferentes. Anatomicamente, os linfomas podem ser agrupados segundo a classificação da *World Health Organization* (WHO) (Owen, 1980), sendo que cada grupo tem uma apresentação clínica característica (Tabela 4).

1.3.3.1. Apresentação multicêntrica ou generalizada

A apresentação multicêntrica representa cerca de 75% a 80% das ocorrências de linfoma canino e caracteriza-se por uma linfadenomegália generalizada e não dolorosa, com início nos linfonodos submandibulares ou pré-escapulares (Vail & Young, 2007; Zandvliet, 2016). A maioria dos animais é assintomático à apresentação, mas cerca de 20% a 40% dos quadros podem ser complicados com sinais inespecíficos como depressão, emaciação, anorexia e febre (Vail & Young, 2007). Pode haver linfadenopatia mediastínica, traqueobrônquica e mesentérica evidente à imagiologia. Hepatoesplenomegália e envolvimento medular também podem estar presentes (Teske, 1994). Está classificada em cinco estadios pela *World Health Organization* (Owen, 1980), que são evidenciados na Tabela 4.

Tabela 4: Sistema de estadiamento clínico para linfoma nos animais domésticos da *World Health Organization*.

Localização Anatômica	
A	Generalizado
B	Alimentar
C	Tímico
D	Cutâneo
E	Leucemia (verdadeira: apenas o sangue ou a medula óssea estão envolvidos)
F	Outros
Estadio	
I	Apenas um linfonodo/órgão está afetado (excluindo a medula óssea)
II	Envolvimento regional de mais do que um linfonodo
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos
IV	Estadio I-III acompanhado de envolvimento do fígado e/ou baço
V	Estadio I-IV acompanhado de manifestações no sangue ou envolvimento da medula óssea e/ou outros órgãos
Sub-estadio	
A	Ausência de sinais clínicos sistêmicos
B	Presença de sinais clínicos sistêmicos

1.3.3.2. Apresentação gastrointestinal ou alimentar

A apresentação gastrointestinal é a mais frequente no gato mas representa apenas 5% a 7% dos linfomas no cão. Pode ocorrer na forma de uma única lesão isolada, mas mais frequentemente apresenta-se numa forma multifocal ou difusa, com perda de diferenciação das camadas da parede do intestino, infiltração da submucosa e lâmina própria, ulceração da mucosa e ocasionalmente infiltração transmural da serosa. Linfadenopatia mesentérica está presente com frequência. Os sinais clínicos mais comuns incluem perda de peso, anorexia, vômitos, diarreias que podem ou não ser hemorrágicas, e sinais de má-absorção como hipoproteinemia. Pode ser facilmente confundida com enterite linfoplasmocítica ao diagnóstico histopatológico, e já foi proposto que esta enterite seja uma alteração gastrointestinal que precede o linfoma (Teske, 1994; Vail & Young, 2007; Zandvliet, 2016).

1.3.3.3. Apresentação mediastínica ou tímica

A apresentação mediastínica representa cerca de 5% dos linfomas canino e é geralmente um linfoma de células T, caracterizado por um aumento dos linfonodos craniomediastínicos, do timo ou de ambos, e os sinais clínicos podem incluir tosse, dispneia, intolerância ao exercício, síndrome da veia cava e regurgitação, para além de poliúria e polidipsia causada pela hipercalcemia, um síndrome paraneoplásico frequente neste tipo de linfoma que ocorre entre 10% e 40% dos casos (Teske, 1994; Vail & Young, 2007; Zandvliet, 2016).

1.3.3.4. Apresentação cutânea

A apresentação cutânea é geralmente difusa ou multifocal e pode ser sub-classificada em epiteliotrófica ou não-epiteliotrófica, sendo a primeira mais comum e origina-se mais frequentemente dos linfócitos T. Os tumores podem ocorrer na forma de placas, nódulos, úlceras, eritroderma ou dermatite exfoliativa, e prurido pode estar presente. Pode haver envolvimento da mucosa oral e envolvimento extra-cutâneo de linfonodos, fígado, baço ou medula óssea. Parece haver um risco acrescido de animais diagnosticados com dermatite atópica virem a desenvolver um tipo de linfoma cutâneo epiteliotrófico, *mycosis fungoides* (Santoro, Marsella & Hernandez, 2007).

1.3.3.5. Outros

No caso de linfomas em órgãos específicos, os sinais clínicos variam com a sua localização. Nos linfomas primários do sistema nervoso central os sintomas podem incluir convulsões, paralisia ou parésia. No caso de linfoma ocular, há infiltração e espessamento da íris, uveíte, hipópion, hifema, sinequias posteriores e glaucoma. No linfoma hepatosplénico primário os sinais podem ser inespecíficos, como letargia e inapetência (Vail & Young, 2007).

1.4. Síndromes paraneoplásicas

O linfoma canino pode ser acompanhado por síndromes paraneoplásicas, tais como a hipercalcemia, que já foi referida anteriormente. Clinicamente, a hipercalcemia é caracterizada por anorexia, perda de peso, fraqueza muscular, poliúria, polidipsia e, raramente, depressão do sistema nervoso central e coma (Vail & Young, 2007) e parece estar associada com linfomas de células T (Rosenberg, Matus & Patnaik, 1991). Pensa-se que este síndrome seja originado por uma hormona produzida pelas células tumorais, semelhante à hormona da paratiróide, a PTHrP (*parathyroid hormone-related protein*) e que também ocorre noutros tipos de cancro, como o adenocarcinoma dos sacos anais, adenomas da paratiróide e alguns tipos de carcinoma (Rosol *et al*, 1992). Geralmente, o tratamento do tumor primário leva a um retorno dos níveis de cálcio à normalidade, enfatizando a relação da hipercalcemia com a neoplasia (Meuten, Cooper, Capen, Chew & Kociba, 1981). A anemia também acompanha os linfomas com frequência, e gamopatias monoclonais, neuropatias e caquexia também podem estar presentes (Vail & Young, 2007).

1.5. Diagnóstico e Estadiamento

Para todos os animais com suspeita de linfoma, independentemente da apresentação do mesmo, o diagnóstico deve ser estabelecido com base num exame físico completo, análises sanguíneas e bioquímicas e urianálise. O diagnóstico definitivo é estabelecido com base numa análise citológica ou histopatológica de um órgão afetado, e por isso uma amostra de células desse tecido deve ser colhida obrigatoriamente. Para além disso, a extensão da doença tem de ser determinada, para que possa ser corretamente tratada, sendo que a maioria dos animais apresentam-se em estadios avançados (III-V). Para isso, uma colheita de medula óssea e realização de exames de imagiologia devem ser realizados (Vail & Young, 2007; Vail, 2011).

1.5.1. Exame físico

O exame físico de um animal com suspeita de linfoma deve incluir a palpação de todos os linfonodos acessíveis. Este passo é fundamental, uma vez que muitos animais se apresentam com linfadenomegália como único sinal clínico. As mucosas devem ser inspecionadas em busca de palidez, icterícia, petéquias ou ulceração, pois estes sinais podem ser indicativos de anemia, trombocitopenia, falência orgânica ou urémia. A palpação abdominal também é um passo importante, pois pode ser identificado algum grau de espessamento do intestino, organomegália ou linfadenomegália mesentérica. À auscultação torácica pode ser identificável efusão pleural ou uma massa mediastínica. No exame ocular, incluindo um exame do fundo do olho, pode ser visível uveíte, hemorragia na retina, ou infiltração ocular, que pode estar presente em cerca de um terço a metade dos animais com linfoma (Vail & Young, 2007).

1.5.2. Análises hematológicas e bioquímicas

Todos os casos suspeitos de linfoma requerem análises hematológicas, com o objetivo de estadiar a doença, assim como de estabelecer parâmetros base com os quais comparar futuras análises e determinar o nível de imunossupressão induzido pelo tratamento. As análises iniciais podem estar dentro do intervalo fisiológico, ou, se já houver envolvimento da medula óssea, pode estar presente algum grau de anemia, trombocitopênia, neutropênia, linfocitose e precursores linfóides imaturos. A avaliação bioquímica deve incluir ALT e fosfatase alcalina, assim como ureia e creatinina, para avaliar a presença ou não de disfunção hepática e renal, respectivamente, um painel de eletrólitos para detectar hipercalcemia, e eletroforese de proteínas séricas para detectar gamopatia monoclonal caso as proteínas séricas estejam elevadas (Morris & Dobson, 2001).

1.5.3. PAAF e biópsia

Uma amostra colhida por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) analisada por um patologista experiente pode muitas vezes ser suficiente para sugerir um diagnóstico de linfoma. Um esfregaço de boa qualidade vai conter uma grande quantidade de células intactas e bem espalhadas, tornando possível avaliar claramente a morfologia individual das células. O diagnóstico de linfoma é feito pela observação de uma população uniforme de grandes células linfóides neoplásicas, com o diâmetro aproximado de um neutrófilo maduro. Se, no entanto, a colheita de células não tiver sido bem feita, poderá não haver células suficientes para fazer o diagnóstico, uma vez que grandes células linfóides estão presentes em outras situações clínicas, mas em menor proporção. Uma biópsia de linfonodo irá trazer resultados mais fidedignos, é mais adequada para classificação histológica e imunofenotipagem e permite avaliar a arquitetura do tecido afetado. A biópsia deve tentar evitar linfonodos de áreas muito reativas, como os linfonodos submandibulares, que podem dificultar o diagnóstico. Se possível, o diagnóstico deve ser feito a partir de uma biópsia de um linfonodo periférico, no entanto se nenhum desses linfonodos estiver envolvido, podem ser recolhidas amostras de órgãos abdominais afetados (Dicknson, 2008; Vail, 2011).

1.5.4. Imunohistoquímica, citometria de fluxo e PCR para rearranjos do recetor de antigénios (PRRA)

Análises citológicas e histopatológicas podem ser complementadas com imunohistoquímica, citometria de fluxo e PRRA. Estas técnicas podem ser utilizadas para determinar o fenótipo imunológico do linfoma, que representa um fator a ter em conta na escolha do tratamento, assim como um indicador de prognóstico. Para além da informação imunofenotípica, graças à disponibilidade crescente de anticorpos contra os antigénios hematológicos no cão, a citometria de fluxo permite saber a linhagem celular que deu origem ao linfoma (Comazzi & Gelain). O PRRA permite determinar a clonalidade de uma população de células linfóides

através da amplificação do DNA codificante das regiões variáveis dos recetores de células B ou T (Thalheim, Williams, Borst, Fogle & Suter, 2013).

1.5.5. Colheita de medula óssea

Como parte do estadiamento do linfoma, um aspirado ou uma biópsia de medula óssea deve ser analisado, especialmente se houver alterações nas análises hematológicas. Idealmente, isto deve ser feito em todos os casos, uma vez que é possível haver envolvimento da medula óssea que não é refletido nas análises sanguíneas (Morris & Dobson, 2001).

1.5.6. Radiografia

Radiografias podem ser necessárias para ajudar no diagnóstico de certas formas anatómicas da doença, como no linfoma mediastínico, renal, da medula espinal ou gastrointestinal, assim como para determinar o envolvimento de linfonodos ou outros órgãos para estadiar o linfoma multicêntrico. A utilização de contraste pode ser útil em radiografias baritadas seriadas, urografias intravenosas ou mielografias (Morris & Dobson, 2001).

1.5.7. Ecografia

Apesar de as radiografias serem capazes de mostrar alterações evidentes na forma ou tamanho dos órgãos, a ecografia é mais adequada para identificar infiltração do parênquima ou mudança na arquitetura do órgão, o que pode ser útil no estadiamento da doença. Aspições e biópsias ecoguiadas também são úteis para confirmar o diagnóstico (Morris & Dobson, 2001).

1.6. Tratamento

Uma vez alcançado o diagnóstico, os cães sem tratamento geralmente vivem apenas quatro a seis semanas, excetuando casos específicos, como os animais com tumores de baixo grau (Vail, 2011). A abordagem terapêutica ao doente com linfoma depende do estadio e subestadio da doença, da presença ou não de síndromes paraneoplásicas, do estado fisiológico geral do animal, das condições financeiras do tutor, da sua disponibilidade para o tempo requerido para os tratamentos, e do seu nível de conforto relativamente à ocorrência de possíveis efeitos secundários (Vail & Young, 2007). O nosso foco será o tratamento dos linfomas multicêntricos de alto e médio grau, sendo que representam uma significativa maioria da população de linfomas.

1.6.1. Terminologia

No decorrer do tratamento do linfoma, várias respostas possíveis podem ser esperadas. Podemos atingir uma situação em que o linfoma entra em remissão completa, em que há

uma redução de 100% da doença mensurável, remissão parcial, em que há uma redução superior a 50% da doença mensurável, pode atingir um estado de doença estável, em que há uma redução menor que 50% da doença mensurável ou nenhum aparecimento de novas lesões, e, por fim, pode haver doença progressiva, em que há um aumento superior a 25% da doença mensurável ou há o aparecimento de novas lesões (Ettinger, 2005).

Os principais objetivos do tratamento do linfoma são induzir uma primeira remissão completa e duradoura superior a seis meses (indução), reinduzir uma nova remissão após a recidiva quando a primeira remissão foi atingida (reindução), e por fim, quando o tumor deixa de responder aos protocolos de indução e reindução, utilizar fármacos diferentes dos fármacos utilizados nos primeiros protocolos para atingir uma nova remissão (resgate) (Vail & Young, 2007).

1.6.2. Quimioterapia

A quimioterapia é o tratamento de eleição para o linfoma canino, devido à sua natureza maioritariamente sistêmica. Exceções incluem linfomas restringidos a um só linfonodo ou casos extra-nodais em órgãos específicos, em que a terapia local, como cirurgia ou radioterapia podem estar indicadas como primeira abordagem, podendo ser necessária, no entanto, terapia sistêmica em estadios mais avançados, devido à possibilidade de propagação da doença (Vail & Young, 2007).

1.6.2.1. Agentes quimioterápicos

Os agentes mais eficazes contra o linfoma canino são a doxorubicina (Hahn *et al*, 1992), L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida, e prednisolona (Garrett, Thamm, Chun, Dudley & Vail, 2002; Chun, Garrett & Vail, 2000). Outras drogas com alguma atividade e que podem ser utilizadas como terapêuticas de segunda linha são a lomustina (Sauerbrey *et al*, 2007), vinblastina (Lenz, Robot & Stein, 2016), actinomicina-D (Bannink, Sauerbrey, Mullins, Hauptman & Obradovich 2008), mitoxantrona (Lucroy, Phillips, Kraegel, Simonson & Madewell, 1998), clorambucil, metotrexato e dacarbazina (Vail & Young, 2007; Griessmayr, Payne, Winter, Barber & Shofer; 2009).

1.6.2.2. Protocolos de tratamento

Uma variedade de protocolos quimioterápicos está descrita para o tratamento do linfoma canino multicêntrico. Geralmente, protocolos baseados numa combinação de fármacos resultam em tempos de remissão e sobrevividas mais longas. Têm, contudo, a desvantagem de serem mais dispendiosos, requerem visitas mais frequentes ao veterinário e têm maior probabilidade de causarem algum nível de toxicidade do que protocolos com apenas um fármaco. Inicialmente, a resposta ao tratamento é muito boa na grande maioria dos casos, com cerca de 90% dos animais a atingirem remissão total ou parcial com um protocolo com

vários agentes quimioterápicos. (Vail, 2011). Os animais que atingem a remissão geralmente estão livres de sinais clínicos e mantêm uma boa qualidade de vida e apenas uma pequena percentagem exibe efeitos secundários significativos (Vail & Young, 2007). No entanto, quase todos os animais eventualmente sucumbe devido a recidivas resistentes ao tratamento (Vail, 2011).

1.6.2.2.1. Protocolo CHOP

Praticamente todos os protocolos quimioterápicos combinados para o tratamento de primeira linha do linfoma canino são versões modificadas do protocolo CHOP (Tabela 5), baseado num protocolo semelhante inicialmente desenhado para o tratamento do linfoma humano. Este protocolo é constituído por uma combinação de ciclofosfamida (C), doxorrubicina (H – hidroxidaunarubicina), vincristina (O – Oncovin) e prednisolona (P). Um estudo recente, com o objetivo de testar a ação de vários quimioterápicos sobre linhas celulares de linfoma e leucemia, demonstrou que a doxorrubicina e a vincristina demonstravam a maior ação sobre a viabilidade das células e a ciclofosfamida induzia o maior nível de apoptose (Pawlak, Rapak, Zbyryt & Obmińska-Mrukowicz, 2014). As taxas de respostas com o protocolo CHOP e seus derivados rondam os 80% a 90% com remissões medianas e sobrevidas medianas de 8 e 12 meses, respetivamente. Aproximadamente, 25% dos animais tratados sobrevivem dois anos ou mais após o início da terapia (Vail, 2011).

Os protocolos iniciais eram constituídos por duas fases, uma fase de indução inicial mais intensa com o objetivo de atingir a remissão completa, e uma fase de manutenção durante a restante vida do animal, com o objetivo de manter a remissão inicialmente atingida (Vail, 2011; Zandvliet, 2016). Estudos mais recentes demonstraram que a fase de manutenção não trazia nenhuns benefícios, para além de que diminuía a probabilidade do animal atingir uma segunda remissão após a recidiva (Garrett *et al*, 2002; Lautscham, Kessler, Ernst, Willimzig & Neiger, 2017) e como tal a duração do tratamento foi diminuída. Apesar de um protocolo de seis meses, como o protocolo modificado da Universidade de Wisconsin-Madison de 25 semanas (Garrett *et al*, 2002), estar indicado e ser amplamente utilizado, protocolos mais curtos, de 12 semanas (Simon *et al*, 2006) e de 15 semanas (Burton, Garrett-Mayer & Thamm, 2013), já mostraram alguma eficácia.

Tabela 5: Protocolo quimioterápico combinado curto da Universidade de Wisconsin-Madison para o tratamento de linfoma canino. A furosemida pode ser administrada em conjunto com a ciclofosfamida para diminuir a incidência de cistite hemorrágica estéril. Se o animal estiver em remissão completa na semana 9, o tratamento é retomado na semana 11. Se o animal estiver em remissão completa na semana 19, o tratamento é descontinuado e o animal é reavaliado mensalmente. Um hemograma deve ser feito antes de cada tratamento. Se a contagem de neutrófilos estiver abaixo de 1500 células/ μ l, o tratamento deve ser adiado 5 a 7 dias e o hemograma deve ser repetido. O tratamento será então administrado se a contagem de neutrófilos estiver acima de 1500 células/ μ l. Adaptado de Vail, 2011.

Semana de tratamento	Fármaco, dose, via
1	Vincristina: 0,5 – 0,7 mg/m ² IV Prednisolona: 2 mg/kg PO
2	Ciclofosfamida: 250 mg/m ² IV Prednisolona: 1,5 mg/kg PO Furosemida: 1mg/kg IV
3	Vincristina: 0,5 – 0,7 mg/m ² IV Prednisolona: 1 mg/kg
4	Doxorrubicina: 30 mg/m ² IV Prednisolona: 0,5 mg/kg
5	-
6	Vincristina: 0,5 -0,7 mg/m ² IV
7	Ciclofosfamida: 250 mg/m ² IV Furosemida: 1 mg/kg IV
8	Vincristina: 0,5 -0,7 mg/m ² IV
9	Doxorrubicina: 30 mg/m ² IV
10	-
11	Vincristina: 0,5 -0,7 mg/m ² IV
12	Ciclofosfamida: 250 mg/m ² IV Furosemida: 1 mg/kg IV
13	Vincristina: 0,5 -0,7 mg/m ² IV
14	Doxorrubicina: 30 mg/m ² IV
15	-
16	Vincristina: 0,5 -0,7 mg/m ² IV
17	Ciclofosfamida: 250 mg/m ² IV Furosemida: 1 mg/kg IV
18	Vincristina: 0,5 -0,7 mg/m ² IV
19	Doxorrubicina: 30 mg/m ² IV

Por vezes, por razões que se prendem com limitações financeiras ou de tempo por parte dos tutores dos animais, ou simplesmente por estes declinarem abordagens mais agressivas, terapias alternativas têm de ser instituídas.

1.6.2.2.2. Protocolo COP

O protocolo COP é constituído por uma combinação de ciclofosfamida (C), vincristina (O – Oncovin) e prednisolona (P). É um protocolo bem tolerado e relativamente barato, com a desvantagem de se tratar de um tratamento prolongado no tempo. Pode ser implementado na versão de dose alta ou na versão de dose baixa. Apresenta taxas de remissão de cerca de 70% com uma sobrevida mediana de pode variar entre 4 a 7 meses (Hahn *et al*, 1992; Turek *et al*, 2008) (Tabela 6).

Tabela 6: Protocolo COP para tratamento de linfoma canino. Para o protocolo de alta dose, deve ser feito um hemograma prévio a cada tratamento com ciclofosfamida. Se a contagem de neutrófilos estiver abaixo de 1500 células/ μ l, o tratamento deve ser adiado 5 a 7 dias e repetida a análise. O tratamento deve ser administrado se os neutrófilos estiverem acima de $1,5 \times 10^9/l$. Para o protocolo de baixa dose contínuo, um hemograma deve ser feito a cada 2 a 4 semanas, dependendo das contagens de neutrófilos. Adaptado de Vail, 2011.

Protocolo	Frequência de administração
COP de alta dose	
Ciclofosfamida (250-300 mg/m ² IV ou PO)	Administrar uma vez a cada 3 semanas durante 1 ano. Se ao fim de 1 ano, o animal estiver em remissão completa, diminuir a frequência para uma vez a cada 4 semanas durante mais seis meses. Descontinuar se o animal estiver em remissão completa ao ano e meio.
Vincristina (0,75 mg/m ² IV)	Administrar uma vez por semana quatro vezes, seguida de uma vez a cada 3 semanas, no mesmo dia da ciclofosfamida. Se o animal estiver em remissão completa ao fim de 1 ano, diminuir a frequência para uma vez a cada 4 semanas durante mais seis meses. Descontinuar se o animal estiver em remissão completa ao ano e meio.
Prednisolona (1 mg/kg PO)	Administrar diariamente durante 22 dias, e depois em dias alternados. Descontinuar gradualmente ao longo de três semanas se o animal estiver em remissão completa ao ano e meio.
COP de baixa dose	
Ciclofosfamida (50 mg/m ² PO)	Administrar a cada 48 horas ou nos primeiros 4 dias de cada semana.

Vincristina (0,5 mg/m ² IV)	Administrar a cada sete dias.
Prednisolona	Administrar 40 mg/m ² oralmente a cada 24 horas durante sete dias, seguida de 20 mg/m ² oralmente a cada 48 horas
Manutenção	Após oito semanas de indução, continuar com o protocolo COP em semanas alternadas durante 4 meses, seguida de uma semana em cada três durante seis meses, seguida de uma semana em cada quatro durante um ano.

1.6.2.2.3. Doxorubicina como agente único

A doxorubicina, um antibiótico da família das antraciclinas, é uma opção eficaz como agente único, sendo administrada de três em três semanas num total de cinco administrações (Vail, 2011). A duração de remissão mediana ronda os sete meses e a sobrevida mediana os nove meses (Chun, 2009). Existem inclusivamente estudos que não identificaram diferenças na duração de remissão e sobrevida medianas entre um tratamento com doxorubicina como agente único e um tratamento com um protocolo de fármacos combinados que incluía a doxorubicina, sendo que, no entanto, não podem ser ignoradas as vantagens de múltiplos mecanismos de ataque celular e menor desenvolvimento de resistência tumoral associados aos protocolos com vários fármacos (Simon *et al*, 2008; Chun, 2009). Apesar dos benefícios deste agente ultrapassarem as desvantagens, a doxorubicina causa severos danos teciduais se ocorrer extravasão no local da administração (Langer, Sehested & Jensen, 2000) para além de que pode induzir mielossupressão, gastroenterite e insuficiência cardíaca congestiva, arritmias e alterações não-específicas ao eletrocardiograma (Mauldin *et al*, 1992; Wang, Lee & Liau, 2016). Por estas razões, deve ser dada especial atenção à dose cumulativa deste fármaco, quer na sua utilização como agente único, quer em protocolos combinados.

1.6.2.2.4. Lomustina

Quando os tutores declinam terapias endovenosas, ou os animais não têm o temperamento adequado para as mesmas, medicações orais como a lomustina podem ser uma opção. Trata-se de um potente agente alquilante que pode causar neutropénia e trombocitopénia severa, para além de falência hepática potencialmente irreversível. Como as taxas de resposta e sobrevidas medianas são menores às dos restantes protocolos disponíveis e já descritos, este é um agente que deve ser reservado para tratamentos de segunda linha para linfomas refractários, onde apresenta melhores resultados do que utilizado como primeira opção (Moore *et al*, 1999; Kristal *et al*, 2004; Sauerbrey *et al*, 2007; Vail, 2011). No entanto nestas condições, é uma boa opção, sendo que com administrações em intervalos de três semanas, num total de cinco administrações, atinge-se uma taxa de resposta de cerca de

80%, com 50% dos animais a atingir a remissão completa, sendo que a duração da mesma pode durar entre um mês e meio e três meses. A combinação com L-asparaginase nas primeiras duas administrações ou prednisolona não parece melhorar os resultados mas pode ser uma opção (Saba, Thamm & Vail, 2007; Vail, 2011).

1.6.2.2.5. Prednisolona

A prednisolona como agente único também pode ser instituída como terapêutica para o linfoma canino quando a quimioterapia convencional não está disponível, não pode ser instituída ou os tutores dos animais recusam a sua utilização. A sua ação prende-se com a indução da apoptose dos linfócitos e dos linfoblastos (Smith & Cidlowski, 2010). Este tratamento leva a uma remissão de curta duração de cerca de um ou dois meses, sendo por isso considerado um tratamento paliativo. A utilização de prednisolona prévia a outros tratamentos quimioterápicos pode levar o tumor a tornar-se resistente, levando a períodos de remissão e sobrevividas mais curtas (Price, Page, Fischer, Levine & Gerig, 1991; Marconato *et al*, 2011), devendo por isso ser reservado para casos em que estes não vão ser instituídos no futuro (Vail, 2011; Zandvliet, 2016).

1.6.2.2.6. Protocolos de resgate

Quando, após o tratamento com os protocolos de primeira linha, existe uma recidiva, é necessário recorrer a protocolos de resgate. A escolha do protocolo de resgate mais adequado depende de vários fatores, nomeadamente do estado fisiológico do animal, da altura em que se deu a recidiva, dos fármacos que foram previamente utilizados e da própria experiência do veterinário responsável. Se a recidiva se deu um mês ou mais após a conclusão do tratamento com o primeiro protocolo, este pode voltar a ser instituído, com o objetivo de fazer uma reindução da remissão, e a probabilidade de sucesso é alta (80-90%), sendo que esta segunda remissão dura tipicamente metade da primeira (Vail, 2011). Se a recidiva se deu, no entanto, durante o tratamento com o protocolo de primeira linha, deve ser instituído um protocolo de resgate que deve ser constituído por fármacos diferentes do primeiro, uma vez que se torna bastante provável que as células tumorais sejam inerentemente resistentes ao mesmo ou se tratem de novos clones que desenvolveram resistência após o tratamento (Zandvliet, 2016). Alguns dos fármacos utilizados em protocolos de resgate já foram referidos anteriormente, como a lomustina e a L-asparaginase em combinação, ou mesmo a doxorrubicina, se não tiver feito parte do protocolo de primeira-linha, dacarbazina, mitoxantrona ou actinomicina D, como agentes únicos ou em combinação, ou o protocolo combinado de mecloretamina, vincristina, procarbazina e prednisolona (MOPP). As taxas de resposta destes protocolos variam entre 40% e 50%, com respostas pouco duradouras, que rondam os 45 a 75 dias (Vail & Young, 2007; Vail, 2011).

1.6.2.3. Efeitos secundários

Tipicamente, os protocolos quimioterápicos desenhados para pacientes veterinários têm uma incidência menor que 5% de efeitos secundários severos ou que ponham em risco a vida do animal, e estes disfrutam de uma boa qualidade de vida durante o tratamento (Chun, Garrett & Vail, 2007). No entanto, esta classe de fármacos possui dos índices terapêuticos mais baixos de qualquer classe de fármacos, o que implica que, por vezes, para se atingir concentrações terapêuticas, células saudáveis acabem por ser afetadas, levando a efeitos indesejáveis (MacDonald, 2009). O Veterinary Cooperative Oncology Group elaborou um documento com o objetivo de classificar os efeitos adversos em diferentes graus, para que possa ser feita uma correta avaliação dos mesmos (VCOG, 2011). Este registo é importante para que se saiba como cada animal reage ao tratamento, para ajustar as doses ao longo do protocolo caso seja necessário e evitar efeitos secundários mais severos que possam vir a ocorrer. Uma redução da dose do fármaco, geralmente de 20%, deve ser praticada caso ocorram efeitos secundários gastrointestinais ou neutropénias graves. No entanto, um controlo sintomático dos efeitos secundários, com antidiarreicos, antieméticos, ou outros, deve ser instituído em primeiro lugar. A dose correta é muito importante para a eficácia do tratamento e, assim sendo, só se deve proceder a uma diminuição da dose se o controlo medicamentoso dos efeitos secundários não for suficiente para manter a qualidade de vida e o estado hígido do animal. Análises de controlo hematológico, bioquímico ou urianálises devem ser feitas antes dos tratamentos sempre que necessário, sendo que cada fármaco tem uma toxicidade específica que deve ser avaliada, e os testes adequados devem ser realizados para que o tratamento possa ser administrado em segurança (Chun *et al*, 2007).

1.6.3. Imunoterapia

Apesar do tratamento quimioterápico para o linfoma canino produzir bons resultados com taxas elevadas de remissão, a recidiva derivada a uma população de células cancerígenas resistentes acaba por ser inevitável na maioria dos casos. Para além disto, devido à sua natureza inespecífica, acaba por afetar células saudáveis, com efeitos secundários tóxicos, e por estas razões, surgiu a necessidade de terapias com um alvo mais específico. As imunoterapias podem ser do tipo ativo ou passivo, na medida em que estimulam ou complementam a resposta no sistema imunitário (Brody, Kohrt, Marabelle & Levy, 2011). No entanto, apesar de a imunoterapia já ter um papel relevante no tratamento do Linfoma Não-Hodgkin dos humanos, ainda tem eficácia limitada contra o linfoma canino. O anticorpo monoclonal quimérico Rituximab (IDEC-C2B8; IDEC Pharmaceuticals Corp, San Diego, CA), é uma imunoglobulina G humana com regiões variáveis de rato, é uma forma de imunoterapia passiva, que aumentou significativamente o período de remissão e a sobrevivência de pacientes com Linfoma Não-Hodgkin, com toxicidade reduzida (McLaughlin *et al*, 1998; Maloney, 1999; Waldmann, 2003). Este anticorpo tem como alvo o recetor de superfície

CD20, que está presente em mais de 90% dos linfomas de células B, assim como em células B normais, desde o estadio pré-célula B até ao estadio de célula B ativada (McLaughlin *et al*, 1998). Devido às diversas semelhanças entre o linfoma canino e o Linfoma Não-Hodgkin, foi sugerido que o cão também expressasse o recetor CD20 nas suas células B, o que se verificou, tendo o CD20 canino demonstrado uma homologia de 73% com o CD20 humano na sua sequência de aminoácidos (Julaba *et al*, 2005; Kano *et al*, 2005). No entanto, o Rituximab não se mostrou eficaz no tratamento do linfoma canino, não havendo ligação entre o anticorpo e o recetor CD20 canino (Impellizeri, Howell, McKeever & Crow, 2006). Também vacinas, imunoterapias ativas, foram desenvolvidas para o tratamento do linfoma canino. A administração intralinfática de células tumorais autólogas mortas em conjunto com quimioterapia foi testada, com resultados pouco consistentes (Jeglum *et al*, 1986; Jeglum, Young, Barnsley & Whereat, 1988; Jeglum, Winters & Young, 1989). Uma vacina contra a transcriptase reversa da telomerase canina (cTERT) induziu uma resposta imune em cães com linfoma multicêntrico (Peruzzi *et al*, 2010), e em combinação com quimioterapia (protocolo COP) deu origem a uma resposta imune duradoura e a um aumento na sobrevida sem efeitos adversos (Gavazza *et al*, 2013).

Recentemente, uma vacina autóloga com proteínas de choque térmico purificadas de biópsias de linfonodos afetados começou a ser utilizada, e apresenta uma forte imunogenicidade. Estas proteínas combinam-se com péptidos imunogénicos específicos tumorais, expondo o hospedeiro a uma grande quantidade de antigénios associados ao tumor, que induzem uma forte imunização. Cada animal tem uma vacina própria e individual, produzida a partir do seu próprio tumor. O protocolo consiste em quatro administrações durante quatro semanas seguidas de quatro administrações mensalmente, em combinação com quimioterapia. Estudos preliminares mostram que esta vacina prolonga a sobrevida e o período sem doença dos animais, com toxicidade reduzida (Marconato *et al*, 2015).

1.7. Prognóstico

O comportamento do linfoma canino, caso não seja tratado, é agressivo e os animais vivem apenas algumas semanas (Vail, 2011). Por essa razão, vários fatores de prognóstico têm sido estudados e alguns identificados como indicadores da resposta ao tratamento e da sobrevida dos animais com linfoma.

1.7.1. Fatores epidemiológicos

Não parece haver qualquer relação entre a idade ou peso do animal e a resposta ao tratamento ou o tempo de sobrevida (Greenlee *et al*, 1990; Hahn, Richardson, Hahn & Chrisman, 1994; Teske, 1994; Jagielski, Lechowski, Hoffmann-Jagielska & Winiarczyk, 2002), se bem que um estudo reporta que pesos superiores a 18 quilogramas estão associados a pior prognóstico (Garrett *et al*, 2002). No entanto, existem posições

contraditórias no que toca ao papel do género. Alguns estudos reportam que fêmeas esterilizadas têm melhor prognóstico (Keller, MacEwen, Rosenthal, Helfland & Fox, 1993) e que machos inteiros têm pior prognóstico (Page *et al*, 1992) mas outros não demonstraram diferenças significativas (Hahn *et al*, 1992; MacEwen, Rosenthal, Fox, Loar & Kurzman, 1992; Kiupel, Teske & Bostock, 1999). Foi sugerido que houvesse uma modulação do crescimento ou diferenciação dos linfócitos pelas hormonas sexuais, o que podia justificar a diferença verificada em alguns estudos, no entanto recetores para estrogénio ou progesterona não foram identificados no tecido linfóide saudável nem em tecido tumoral de cães com linfoma (Teske, Besselink, Blankenstein, Rutteman & Misdorp, 1987; Vicini, Oglivie, Katzenellenbogen & Carlson, 1991).

1.7.2. Fatores clínicos

O tratamento prévio com glucocorticóides parece diminuir a resposta à quimioterapia, estando assim associado a piores prognósticos (Price *et al*, 1991; Marconato *et al*, 2011). A falta de resposta inicial à terapia, que se reflete na falta de uma remissão total durante o tratamento, ou uma recidiva após a remissão, estão negativamente relacionados com o resultado do tratamento (Rosenberg *et al*, 1991; Jagielski *et al*, 2002; Zandvliet, 2016). Pensa-se que estas situações estejam relacionadas com resistência do tumor aos fármacos, como já foi anteriormente referido. Diminuição das doses dos fármacos, intervalos prolongados entre sessões de quimioterapia ou descontinuação do tratamento estão relacionados com diminuição da eficácia do tratamento e por isso com pior prognóstico (Gramer, Kessler & Geyer, 2015).

Também a presença de hipercalcémia parece estar associada com pior prognóstico (Keller *et al*, 1993; Valerius, Oglivie, Mallinckrodt & Getzy, 1997; Vail & Young, 2007; Marconato *et al*, 2011). No entanto, outros estudos não reportaram qualquer associação entre os níveis de cálcio e a resposta à terapêutica e a sobrevida (Weller, Theilen & Madewell, 1982; Teske, 1994). Esta discordância pode dever-se ao facto de a hipercalcémia estar associada ao fenótipo imunológico T e poder causar disfunção renal, que por sua vez são indicadores de mau prognóstico (Rosenberg *et al*, 1991; Sakals, Peta, Fernandez & Allen, 2006), sendo por isso difícil isolar a hipercalcémia como factor de prognóstico e prever a sua importância (Vail & Young, 2007).

1.7.3. Fatores relacionados com a classificação

Dois dos fatores que mais consistentemente mostram ter valor prognóstico para animais com linfoma são o fenótipo imunológico e o subestadio da *World Health Organization* (Vail e Young, 2007). O fenótipo imunológico T está associado a sobrevidas mais curtas (Greenlee *et al*, 1990; Kiupel *et al*, 1999; Dobson *et al*, 2001) e a menores taxas de resposta ao tratamento (Teske *et al*, 1994a; Starrak, Berry, Page, Johnson & Thrall, 1997; Beaver,

Strottnner & Klein, 2010). O subestadio b da *World Health Organization*, ou seja, presença de sintomas sistêmicos, também está associado a piores prognósticos (Valerius *et al*, 1997; Garrett *et al*, 2002), tendo estes animais sobrevidas menores e piores respostas ao tratamento (Greenlee *et al*, 1990; Keller *et al*, 1993; Jagielski *et al*, 2002). Também o estadio, em menor grau que o fenótipo imunológico e o subestadio, tem valor de prognóstico, tendo os estadios mais avançados respostas piores ao tratamento (Jagielski *et al*, 2002). Apesar de estudos mais antigos apresentarem resultados contraditórios, também foram identificadas diferenças nos prognósticos dos subtipos histológicos de linfoma (Ponce *et al*, 2010). Linfomas de baixo grau constituídos por células pequenas, com um baixo índice mitótico, não respondem ao tratamento mas têm uma progressão lenta e estão associados com uma longa sobrevida, uma vez que o curso da doença é indolente. Linfomas de alto grau com um índice mitótico elevado têm uma progressão rápida mas têm uma boa resposta à quimioterapia e podem por vezes ser curados em humanos, no entanto podem recidivar mais cedo e por isso estão associados a sobrevidas mais curtas (Vail & Young, 2007).

2. O sistema imunitário

Ao longo dos tempos, os animais desenvolveram inúmeras estratégias para se defenderem das infeções. Estes mecanismos podem ser constituídos por proteínas isoladas de ação independente até células altamente específicas que atacam outras células danificadas. Durante o processo de evolução, estes mecanismos individuais coalesceram em sistemas de defesa mais complexos a que hoje chamamos sistema imunitário (Janeway & Medzhitov, 2002). O sistema imunitário inclui tecidos, células e moléculas que trabalham em conjunto com o objetivo de criar uma resposta efetiva contra uma determinada ameaça ao indivíduo, assegurando não só a sua sobrevivência imediata, mas também tornando o indivíduo mais competente para lidar com exposições posteriores a essa ameaça particular (Callahan & Yates, 2014).

O sistema imunitário está dividido em dois subsistemas funcionais, o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adquirido (Bottazzi, Doni, Garlanda & Mantovani, 2010).

2.1. O sistema imunitário inato

O sistema imunitário inato medeia respostas rápidas e precoces às ameaças, através de mecanismos moleculares e celulares que eliminam uma grande variedade de agentes patogénicos. Este sistema de defesa assenta no facto destes agentes serem quimicamente diferentes dos restantes componentes do organismo, e essa diferença ser reconhecida pelo sistema imunitário (Janeway & Medzhitov, 2002). Outro aspeto chave do sistema imunitário inato é a capacidade de focar os mecanismos de defesa inata no local de invasão microbiana, num processo denominado inflamação. Durante a inflamação, danos nos tecidos provocados pelos agentes patogénicos resultam num aumento do fluxo sanguíneo

local e concentração de células com a capacidade de destruir os agentes invasores e impedir a sua propagação para áreas não infetadas do organismo, como os neutrófilos e os macrófagos (Medzhitov, 2008). Para além disso, a presença dos agentes patogénicos despoleta a libertação de enzimas que levam à destruição microbiana. Este sistema de enzimas é denominado sistema de complemento (Ricklin & Lambris, 2007). Algumas das células envolvidas no processo de inflamação têm também a capacidade de reparar os tecidos envolvidos após a destruição dos agentes invasores. O sistema imunitário inato não tem qualquer tipo de memória e a intensidade da sua resposta mantém-se inalterada independentemente de quantas vezes o organismo foi exposto ao mesmo agente. No entanto, tem a vantagem de ser um sistema sempre pronto a responder face ao encontro com um agente patogénico (Tizard, 2004; Callahan & Yates, 2014).

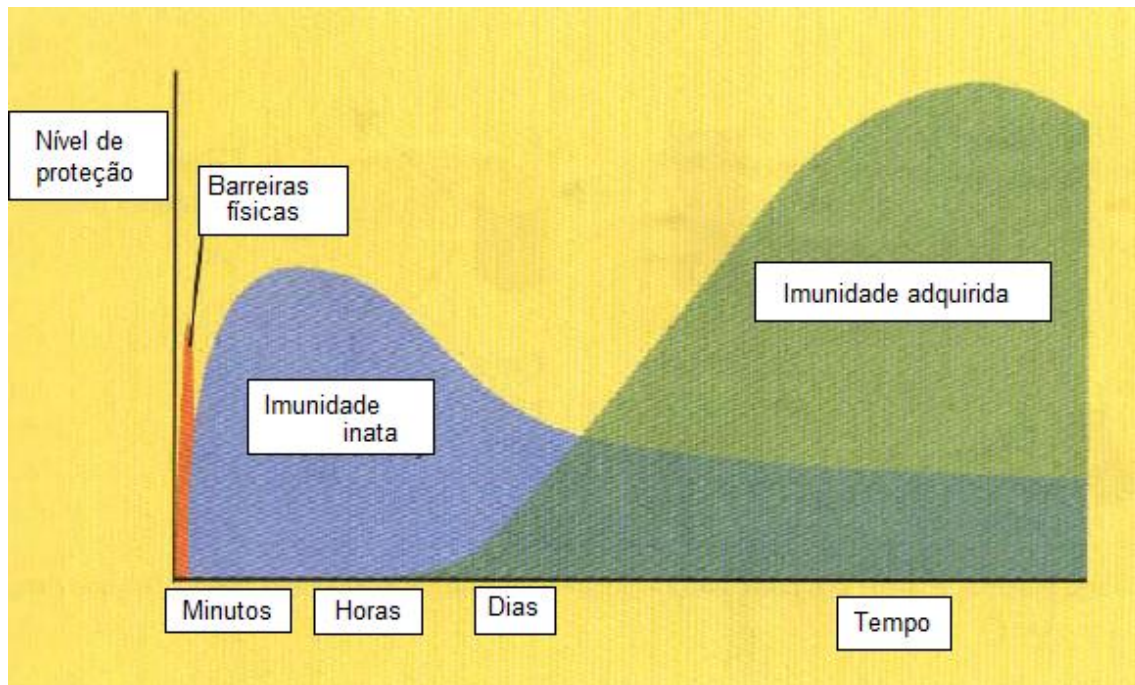
2.2. O sistema imunitário adquirido

O sistema imunitário adquirido é responsável por uma resposta retardada mas específica aos agentes infecciosos. Este sistema certifica-se que, de cada vez que o organismo faz face a um agente invasor, a sua resposta é mais eficaz, através da produção de anticorpos, respostas de células T e imunidade de memória (Schenten & Medzhitov, 2011). Este sistema é extremamente complexo e sofisticado, e por isso demora vários dias até se tornar ativo, no entanto após a resposta estar montada é extremamente eficaz. Assim, após o desenvolvimento de uma resposta adquirida contra um agente patogénico, as hipóteses de uma invasão bem sucedida são quase nulas (Callahan & Yates, 2014). O sistema imunitário adquirido pode ser dividido em dois ramos diferentes, consoante o tipo de resposta que é montada. A primeira, denominada resposta imunitária humoral, é direcionada a microorganismos exógenos ou extracelulares, como por exemplo bactérias, fungos, alguns protozoários e helmintes, e produz anticorpos para destruir estes invasores. A segunda, denominada resposta imunitária celular, é direcionada a organismos que vivem ou são originários do interior da célula, como vírus, bactérias e protozoários intracelulares, e mesmo células anormais, que são destruídas por células especializadas. Esta resposta denomina-se resposta imunitária mediada por células (Tizard, 2004).

Uma das principais diferenças entre estes dois subsistemas é o tipo de recetores que utilizam para reconhecer a presença de agressores. Enquanto que o sistema imunitário inato utiliza recetores pré-existentes que reconhecem moléculas ou padrões moleculares que estão presentes numa grande quantidade de agentes patogénicos, o sistema imunitário adquirido consegue gerar grandes quantidades de recetores estruturalmente únicos (Janeway & Medzhitov, 2002). Estes dois subsistemas trabalham de forma recíproca e sobreposta, sendo que sem uma resposta inata funcional não é possível criar uma resposta adquirida efetiva, e sem uma resposta adquirida funcional os mecanismos inatos não são suficientes para uma grande parte das agressões. O sistema imunitário inato mantém o nível

de agentes patogénicos estável até que a resposta adquirida seja montada e a infecção seja debelada (Figura 1) (Tizard, 2004; Callahan & Yates, 2014).

Figura 1: A ação dos sistemas imunitários inato e adquirido ao longo do tempo. As barreiras físicas providenciam protecção imediata. Os mecanismos inatos montam uma resposta rápida que mantém o nível de infecção estável até que uma resposta adquirida eficaz se possa desenvolver. Adaptado de Tizard (2004).



2.3. As citocinas

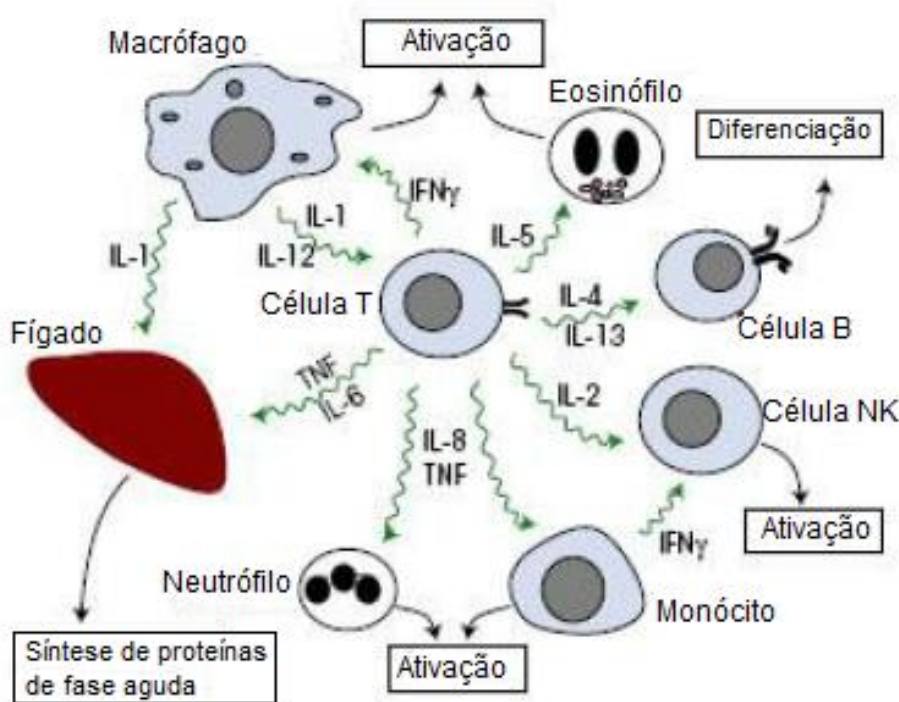
São necessárias biliões de células do sistema imunitário para produzir respostas de defesa eficazes. A coordenação de uma quantidade tão acentuada de agentes requer um sistema de comunicação sofisticado que envolve contacto directo entre células e o envolvimento de várias citocinas (Callahan & Yates, 2014).

As citocinas são moléculas proteicas mensageiras extracelulares produzidas pelas células envolvidas na inflamação, imunidade, divisão e diferenciação celular, fibrose, entre outros processos, e algumas delas também funcionam como moléculas de superfície sinalizadoras (Burger & Dayer, 2002). A produção de citocinas caracteriza-se por não ser constante no tempo, mas em resposta a estímulos. Tipicamente um ciclo de produção pode durar entre algumas horas e alguns dias num estado normal, mas se o estímulo for persistente, como por exemplo numa situação de doença, a produção de citocinas pode ser prolongada (Feldmann, Brennan, & Maini, 1996). Outra característica das citocinas é a sua potência, ou seja, o facto de serem biologicamente ativas em concentrações muito baixas, geralmente entre 10^{-10} e 10^{-13} mol/L. Esta potência está relacionada com a sua alta afinidade com os

recetores e também com o facto de a sinalização não necessitar de uma alta ocupação dos recetores, sendo que 10% de ocupação é suficiente (Oppenheim & Feldmann, 2000).

Praticamente todas as células podem produzir citoquinas, uma vez expostas a diversos estímulos. As citoquinas produzidas dependem do estímulo, da sua natureza, duração e intensidade, e também da presença de outros fatores, como outras citoquinas, hormonas, interação entre células, entre outros (Oppenheim & Feldmann, 2000). Cada célula tem a sua própria panóplia de citoquinas que pode produzir, sendo que alguns tipos de células, como os macrófagos, células T e mastócitos podem produzir um espectro amplo de citoquinas (Day & Schultz, 2014a). As citoquinas são, assim, elementos chave de comunicação entre as células do sistema imunitário, como as células apresentadoras de antígenos, linfócitos B e T e células *Natural Killer* (células NK), mas também entre estas células e outras células do organismo (Callahan & Yates, 2014). Algumas das citoquinas produzidas pelos linfócitos T e as suas funções estão ilustradas na Figura 2.

Figura 2: As células T conseguem regular diversos elementos do sistema imunitário através da produção de citoquinas. Aqui estão representadas algumas das interações que as células T ativadas podem ter com outros elementos do sistema imunitário, sendo importante notar que nem todas as células T podem produzir todas as citoquinas aqui indicadas, mas sim grupos específicos de células T produzem grupos específicos de citoquinas. Adaptado de Delves, Martin, Burton & Roitt, 2011a.



Enquanto que algumas citoquinas são produzidas e rapidamente libertadas, em algumas situações elas podem ser armazenadas temporariamente na célula. Tal como as hormonas, as citoquinas podem atuar na própria célula que as produziu (estimulação autócrina), em

células do ambiente circundante (estimulação parácrina), ou, através da via sanguínea, em células distantes (estimulação endócrina) (Zhang & An, 2007). As citocinas podem também ser categorizadas segundo a sua função, origem e estrutura, sendo que algumas delas são denominadas de interleucinas (Callahan & Yates, 2014).

2.3.1. As interleucinas

As interleucinas são um grupo diverso de citocinas que regulam as relações entre linfócitos e outros leucócitos. Linfócitos T ativados secretam a maioria das interleucinas, mas outros leucócitos, como os macrófagos e as células dendríticas, também produzem interleucinas para comunicarem com outras células (Callahan & Yates, 2014). As interleucinas são numeradas sequencialmente pela ordem da sua descoberta, e sua definição é muito ampla, sendo proteínas com características muito heterogêneas, com pouco em comum excepto o nome (Tizard, 2004).

2.4. Células Th1, Th2 e Treg

As células T CD4⁺, um subtipo de células T com funções chave na resposta imunitária, diferenciam-se em várias linhagens de células T *helper*, que por sua vez são reguladores essenciais da resposta imunitária e de doenças inflamatórias (Muraille & Leo, 1998). Esta diferenciação está dependente de células apresentadoras de antigénios, que através de sinalização específica, levam à formação de um dos vários subtipos de células T *helper* efetoras, das quais as células Th1 e Th2 são as principais, com funções distintas e secreção de citocinas especializadas e que caracterizam a sua resposta (Del Prete, 1998). Ambos os subtipos de células induzem a proliferação de células T CD8⁺ citotóxicas, que são importantes agentes de defesa do organismo. Esta diferenciação das células T CD4⁺ também pode dar origem a células T reguladoras (Treg), que por sua vez têm funções opostas às das células T *helper*, regulando e diminuindo a intensidade da resposta imunitária (Park *et al*, 2005; Bailey *et al*, 2014).

As células da resposta Th1 produzem interferão, interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), entre outras, e medeiam a imunidade celular (Romagnani, 2000). Participam nas respostas inflamatórias e na produção de alguns tipos de anticorpos, sendo que a maioria das células características desta resposta desenvolvem-se após infeções por bactérias intracelulares e vírus (Del Prete, 1998). Estas células ativadas produzem várias citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez desencadeiam uma variedade de respostas protetoras, especialmente respostas efetoras inatas, estimulando em conjunto a ativação de macrófagos, a proliferação e diferenciação dos linfócitos B, acelerando a proliferação dos linfócitos T, e aumentando a inflamação (Callahan, 2014a).

As células da resposta Th2 produzem interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 13 (IL-13) e interleucina 25 (IL-25) e medeiam a resposta imunitária humoral. São responsáveis pela ativação, divisão e diferenciação dos linfócitos B e pela produção e respostas dos anticorpos, incluindo imunoglobulinas G (IgG) e imunoglobulinas E (IgE) (Romagnani, 2000). Ativam também os eosinófilos e os mastócitos, assim como um tipo específico de macrófagos importante na resposta imune aos parasitas e na reparação dos tecidos (Callahan, 2014a).

3. O desenvolvimento de neoplasias

A transformação neoplásica e o desenvolvimento de uma neoplasia clínica são eventos genéticos que envolvem oncogenes e genes supressores tumorais que regulam o ciclo celular e a apoptose (Morris & Chan, 2015). Genes equivalentes aos oncogenes também existem em células saudáveis. As células saudáveis têm proto-oncogenes, que não são mais do que percursores dos oncogenes. São genes que regulam a divisão celular, produzindo fatores de crescimento celular, recetores para os fatores de crescimento, proteínas mensageiras, entre outros (Delves, Martin, Burton & Roitt, 2011b). Uma vez passando por um processo de oncogénese, dão origem a oncogenes, que conferem as características de malignidade típicas das células cancerígenas, uma vez que sofrem mutações que levam à alteração da sequência de aminoácidos e das funções das proteínas que derivam dos mesmos. O mesmo se passa com os genes supressores tumorais nas células tumorais, que em situações normais regulam a morte celular e a correção de erros no DNA. Quando sofrem a ação de mutações cancerígenas, perdem a sua função normal, pelas alterações da sequência de aminoácidos das suas proteínas características e perda de função das mesmas (Callahan, 2014b).

O processo de transformação neoplásica pode também levar à mutação dos genes que codificam os antigénios reconhecidos como próprios, de maneira a que as sequências de aminoácidos destes antigénios se alteram de maneira suficiente a serem reconhecidos como estranhos. Outras células tumorais podem simplesmente expressar antigénios normais mas em quantidades excessivas, e outras podem começar a expressar antigénios típicos de um tipo celular diferente do seu, reativando genes que eram previamente não codificantes (Callahan, 2014b). É importante frisar que o desenvolvimento de um tumor quase nunca ocorre a partir de uma mutação isolada, uma vez que são muitos os mecanismos de reparo ou de indução da morte celular que previnem a transformação maligna da célula, sendo necessários uma série de eventos e mutações sequenciais para que uma célula completamente saudável e funcional se transforme numa célula maligna (Delves *et al*, 2011b).

3.1. A imunidade tumoral

O sistema imunitário representa também um papel importante no desenvolvimento de tumores. A resposta imune a um tumor tem geralmente três etapas. A primeira é a eliminação, em que o sistema imunitário reconhece as células cancerígenas como anormais e é capaz de destruí-las. A segunda etapa é o equilíbrio, em que células cancerígenas resistentes aos ataques do sistema imunitário começam a aparecer, mas o sistema imunitário continua a eliminar as células susceptíveis, podendo esta fase chegar a durar vários anos. A última fase é a evasão, em que as células cancerígenas desenvolvem métodos para escapar ao reconhecimento e eliminação pelo sistema imunitário (Vinay *et al*, 2015). Estes métodos podem incluir perda ou diminuição da expressão dos antigénios tumorais, produção de citocinas inibitórias, ou apresentação de antigénios tumorais às células T sem sinais estimulatórios, levando a uma anergia das células T e tolerância ao tumor (Oleinika, Nibbs, Graham & Fraser, 2013) Pensa-se que o próprio tumor altere o sistema imunitário, recrutando macrófagos e outras células da resposta imune inata e “reeducando-as” para que contribuam para o crescimento e sobrevivência do tumor (Callahan, 2014b; Day & Schultz, 2014b).

No entanto, apesar de, em teoria, as células cancerígenas, como células anormais que são, desencadearem uma resposta imune, esta resposta nunca é tão robusta e eficaz como a resposta que é desencadeada por agentes patogénicos, como bactérias e vírus. Isto deve-se a vários fatores, como a falta de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que os microorganismos têm e se ligam a recetores nos macrófagos, células dendríticas e outras células do sistema imunitário, e que são importantes agentes da ativação da resposta imunitária (Belardelli & Ferrantini, 2002). Por isso, mesmo que os antigénios tumorais sejam reconhecidos como estranhos, isso pode não ser suficiente para desencadear uma forte resposta imune, e gera-se um ambiente tolerogénico em torno do tumor, que pode ser passivo pela falta de PAMPs, ou induzido por substâncias produzidas pelo próprio tumor, como a interleucina-10 (IL-10), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou fator de crescimento tumoral β (TGF- β) (Oleinika *et al*, 2013). Por outro lado, a falta de PAMP's leva à falta de co-estimulação do sistema imunitário, uma vez que uma resposta imune adquirida raramente penetra nos tecidos, local onde os tumores se desenvolvem, a não ser que seja estimulada por uma resposta inata, o que geralmente só acontece na presença dos PAMPs (Delves *et al*, 2011b).

Assim, a verdadeira importância do papel do sistema imunitário na defesa do organismo contra os tumores está longe de estar bem definida, e há várias posições contraditórias. Quando o transplante de órgãos se tornou um procedimento corrente devido ao desenvolvimento de potentes fármacos imunossupressores, chegou-se à conclusão que pacientes que estavam a ser medicados com estes fármacos durante longos períodos de tempo, tinham uma maior probabilidade de vir a desenvolver determinadas neoplasias no

futuro em relação a indivíduos não imunodeprimidos (Burra & Rodriguez-Castro, 2015). Chegaram-se a conclusões semelhantes relativamente a indivíduos imunodeficientes, que tinham maior probabilidade de desenvolver certos tumores malignos em relação a indivíduos imunocompetentes (Robbins *et al*, 2015). Pensa-se que a incidência relativa mais elevada de tumores nas populações idosas esteja relacionada com uma deterioração nas funções imunitárias, principalmente nas reações citotóxicas e mediadas por células, que estão na base de uma resposta anticancerígena eficaz (Day & Schultz, 2014b). Foi por isso sugerido que o sistema imunitário estava responsável pela prevenção do cancro, de onde emergiu a teoria da vigilância imunitária. Esta teoria baseava-se na crença de que o organismo está constantemente a produzir células neoplásicas que, num indivíduo saudável, são rapidamente reconhecidas e destruídas pelo sistema imunitário, sugerindo que um cancro seria originário de células tumorais que conseguiram escapar de alguma forma ao reconhecimento pelas células T (Tizard, 2013).

No entanto, apesar de não ter sido abandonada, a teoria da vigilância imunitária foi modificada (Schreiber & Podack, 2009). Verificou-se que muitos dos tumores mais frequentes nos humanos, como o do pulmão ou da mama, não eram mais frequentes em indivíduos imunodeprimidos, e, em experiências com ratinhos, foi demonstrado que indivíduos com depleção de células T não tinham uma maior probabilidade de desenvolver tumores espontâneos nem tumores induzidos por químicos. Percebeu-se então que apenas um conjunto restrito de neoplasias era mais frequente em indivíduos imunodeficientes, como por exemplo as que são causadas por vírus, como o sarcoma de Kaposi (Tizard, 2013).

3.2. O papel das citocinas nas neoplasias

Uma vez que as citocinas estão envolvidas em praticamente todos os processos biológicos, como o crescimento e diferenciação celular, inflamação, imunidade, reparação e fibrose, devem estar envolvidas numa grande variedade de processos patológicos, senão em todos. O seu papel, no entanto, pode ser bastante diverso, sendo que estas podem ser patológicas, protectoras, ou ter uma presença neutra, e por isso determinar o seu papel no desenvolvimento de uma doença não é tão simples como seria desejável. A identificação de quantidades elevadas de uma citocina no soro ou no local onde a doença ocorre é apenas o primeiro passo na determinação do seu papel no desenvolvimento da doença, e não significa por si só que esta tenha relevância patológica (Feldmann & Brennan, 2000).

As citocinas podem ser produzidas quer pelas células neoplásicas, quer pelo microambiente tumoral, incluindo linfócitos reativos, células dendríticas e macrófagos, e por esta razão a avaliação do perfil de citocinas circulante pode refletir a atividade tumoral e a resposta imunitária do hospedeiro (Kimby, 2015). Algumas citocinas já se revelaram bons biomarcadores para prognóstico e resposta à terapêutica. Em humanos, a interleucina 6 (IL-6) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são bons indicadores independentes

de resposta à terapêutica e sobrevida em pacientes com Linfoma Não-Hodgkin, e podem ser utilizados para identificar precocemente pacientes com menor probabilidade de responder à terapia convencional com o protocolo CHOP e que por isso podem ser candidatos a novas opções de tratamento (Niitsu *et al*, 2002; Pedersen, Klausen, Davidsen & Johnsen, 2005). Por outro lado, foi também demonstrado que a quantidade de recetor solúvel da interleucina 2 (sIL-2r) e de interleucina 6 (IL-6) no soro relacionam-se com a resposta total ao tratamento, tempo de vida sem doença e sobrevida no geral (Fabre-Guillevin *et al*, 2006). Também níveis elevados de interleucina 8 (IL-8) e níveis diminuídos de interleucina 10 (IL-10) e interleucina 16 (IL-16) no soro medidos antes do início do tratamento foram associados a uma resposta completa ao tratamento (Passam *et al*, 2008; Wang, Zhao, Gu, Liu & Bikmituofu, 2011).

Abordagens relativas ao papel das citocinas como tratamento de certos tumores já foram feitas no passado, não tanto no bloqueio, mas na administração das mesmas, com sucesso limitado. A administração de interferão, por exemplo, só é eficaz contra certos tumores específicos. Assim, cerca de 70% a 90% dos pacientes com leucemia de “hairy cell” tratadas com interferão- α (IFN- α) apresentam remissão total ou parcial (Quesada, Reuben, Manning, Hersh & Gutterman, 1984). As propriedades antitumorais do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são sinérgicas com as do interferão (Kost, Mutch & Herzog, 1999). Por outro lado, a administração de IL-2 a pacientes com melanoma e cancro das células renais induziu remissão total ou parcial em apenas 15% a 20% dos casos (Dutcher, 2002). No entanto, estas terapias revelaram-se pouco promissoras devido aos seus elevados efeitos tóxicos, quer do TNF- α , quer da IL-2, sendo que a aplicação local desta última revelou ter os resultados mais interessantes. Doses relativamente baixas de IL-2 recombinante injetadas localmente em papilomas ou carcinomas da vulva em vacas induziram remissão em 83% dos animais tratados (Hill *et al*, 1994). Algumas remissões totais foram observadas. A terapia com IL-2 induziu remissão total em 63% das vacas tratadas para carcinoma das células escamosas ocular (Tizard, 2013).

3.3. A imunidade e o linfoma canino

Como foi anteriormente referido, já foi identificada um função imunitária humoral e celular deficiente em cães com linfoma comparativamente a cães com outras neoplasias (Weiden *et al*. 1974), assim como uma associação entre o linfoma canino e certas doenças auto-imunes (Keller, 1992). O papel do sistema imunitário na patogénese do linfoma canino e a sua interação com o microambiente circundante ainda não foram esclarecidos. Em humanos, foi identificada uma relação entre a estimulação crónica do sistema imunitário e o desenvolvimento de linfoma, assim como uma desregulação da produção de citocinas (Vendrame & Martínez, 2011).

3.4. Interleucina 17

A interleucina 17 foi descrita inicialmente em 1993 por Rouvier *et al*, tendo então a designação de CTLA8, sendo mais tarde renomeada por sugestão de Yao *et al* em 1995. Representa uma família de citocinas que partilha homologia na sequência de aminoácidos, com resíduos de cisteína conservados fundamentais para a sua estrutura tridimensional. Esta família inclui IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Teve como primeira origem conhecida nos linfócitos T de memória CD4⁺ ativados no sangue periférico (Yao *et al*, 1995; Fossiez *et al*, 1996). Mais tarde também os linfócitos T de memória CD8⁺ ativados foram identificados como fonte de IL-17 (Shin, Benbernou, Esnault & Guenounou, 1999). Em 2005, foi sugerido que as células T CD4⁺ que produziam IL-17 eram ativadas pelo mecanismo Th17, distinto dos já conhecidos Th1 e Th2 (Harrington *et al*, 2005).

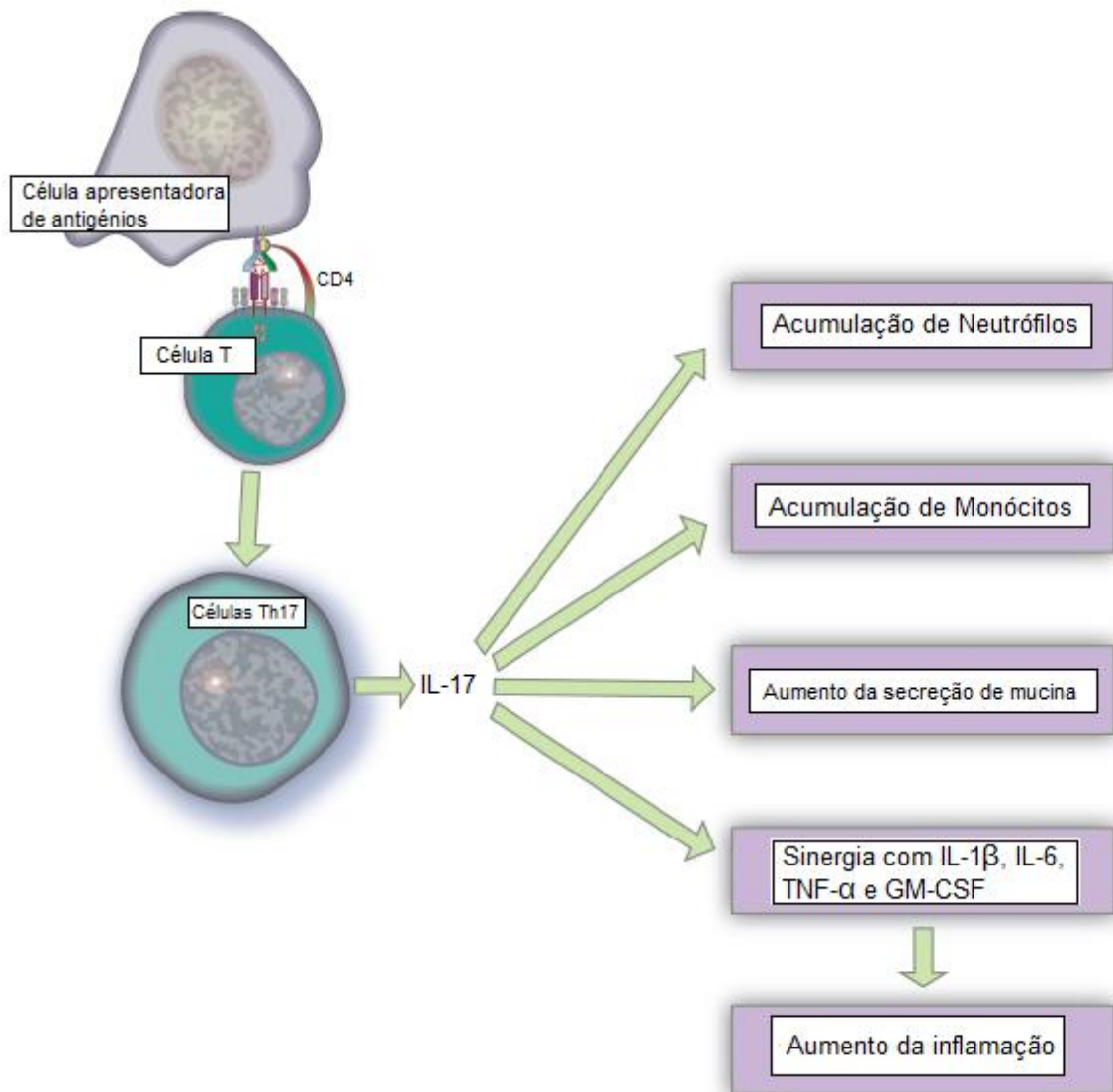
3.4.1. Resposta Th17

O desenvolvimento de células Th17 a partir dos seus precursores é ainda pouco claro e várias teorias têm sido propostas. Em ratinhos, as células T CD4⁺ *naive* são ativadas na presença de TGF- β e IL-6, iniciando a sua diferenciação em Th17, que é posteriormente desenvolvida pelas IL-21 e IL-23, cuja ação é estimulada pela IL-6 (McGeachy & Cua, 2008). Esta diferenciação é fortemente inibida pela ação do interferão e da IL-4, e por outro lado uma resposta Th17 madura é resistente à supressão pelas citocinas produzidas pelas respostas Th1 e Th2 (Harrington *et al*, 2005).

3.4.2. Ações fisiológicas e patológicas da IL-17

As células Th17 produzem várias citocinas, incluindo a IL-17, que é uma citocina pró-inflamatória, com várias funções em eventos relacionados com a inflamação, que estão resumidos na Figura 3 (Callahan, 2014a). A IL-17 geralmente não se encontra nos fluidos biológicos em condições normais, e a sua função fisiológica ainda está por determinar, apesar de resultados *in vivo* e *in vitro* mostrarem que a IL-17 pode ter um papel central em várias doenças inflamatórias que envolvem células T CD4⁺ ativadas (Lebecque, Fossiez & Bates, 2000).

Figura 3: Ações da IL-17 após a diferenciação das células Th17. Nas respostas imunes contra bactérias, fungos e parasitas, a IL-17 atrai neutrófilos e macrófagos para os locais da inflamação. Uma vez nestes locais, esta citocina estimula a produção de mucina e interage com outras interleucinas pró-inflamatórias para aumentar e manter o estadio inflamatório. Adaptado de Callahan, 2014a.



Para além das suas ações pró-inflamatórias, a IL-17 também tem atividade hematopoiética, através da estimulação de células do estroma, induzindo por elas a produção de outras citocinas e fatores de crescimento (Lebecque *et al*, 2000). Testes *in vivo* mostraram que a instilação intratraqueal de IL-17 humana em ratos aumenta os níveis de proteína inflamatória de macrófagos 2 no líquido recolhido por lavagem broncoalveolar, que recruta seletivamente neutrófilos para as vias aéreas. Este recrutamento de neutrófilos é inibido quer pelo anticorpo anti IL-17 humano quer pelo anticorpo anti proteína inflamatória de macrófagos 2 de rato (Laan *et al*, 1999).

O efeito marcado mas indireto da IL-17 na produção de neutrófilos humanos *in vitro*, quer seja pela indução de fator estimulador das colónias de granulócitos (G-CSF) ou pela

produção de IL-6 (Fossiez *et al*, 1996), levou a testes acerca do seu papel na neutrofilia aguda. Assim, injectou-se IL-17 recombinante numa estirpe de ratinhos e verificou-se que havia um pequeno aumento na contagem total de glóbulos brancos e um aumento significativo só dos neutrófilos, que se tornava progressivamente maior com injeções diárias, com os níveis a manterem-se elevados durante sete dias, mesmo após a cessação das injeções. Esta neutrofilia parece ser causada pela desmarginalização dos neutrófilos uma vez que não se observou nenhuma mobilização dos precursores mielóides da medula óssea durante este tratamento, indicando nenhuma ou insuficiente indução de G-CSF *in vivo* (Lebecque *et al*, 2000).

A IL-17 foi detetada em biópsias de rim de pacientes transplantados que desenvolveram rejeição do órgão, produzida por linfócitos infiltrativos, enquanto que se mostrou que biópsias prévias ao transplante e em rins normais esta interleucina estava ausente (Van Kooten *et al*, 1998), sendo inclusivamente sugerido esta fosse utilizada como marcador precoce de rejeição de rim, pois os resultados mostravam-se sensíveis e específicos (Strehlau *et al*, 1997). Foi também demonstrado que a interferência com a sua atuação através da administração da região do fragmento cristalizável (Fc) de um anticorpo anti IL-17 em pacientes que receberam transplantes cardíacos não compatíveis com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) prolongava significativamente a sobrevida destes pacientes (Antonysamy *et al*, 1999), o que em conjunto com as restantes evidências, indica que a IL-17 pode ter um papel importante na regulação das respostas inflamatórias locais na rejeição de transplantes (Lebecque *et al*, 2000).

3.4.3. A interleucina 17 e as neoplasias

As células Th17 revelaram-se agentes importantes na auto-imunidade e na defesa contra agentes infecciosos. Estudos consequentes revelaram que a IL-17 era um alvo válido nas terapias contra certas doenças inflamatórias crónicas. Assim sendo, e uma vez que a inflamação se relaciona tão intimamente com o desenvolvimento de tumores, começou a estudar-se o papel destas células e da IL-17 no desenvolvimento e progressão tumorais (Fabre *et al*, 2016). Variados estudos já foram feitos acerca do seu papel na patogénese de neoplasias, com resultados contraditórios (Kolls & Lindén, 2004).

Linhas celulares de cancro cervical humano transfetadas com DNA complementar de IL-17A demonstraram que a sobreexpressão de IL-17A aumenta o recrutamento de macrófagos e a expressão de IL-6 em ratinhos, associadas com um aumento do tamanho dos tumores em relação com os controlos (Tartour *et al*, 1999). Da mesma forma, linhas de células de fibrossarcoma de murganho transfetadas com DNA complementar de IL-17A mostram um aumento da angiogénese e da formação tumoral em testes *in vivo* em ratinhos (Numasaki *et al*, 2003). Interessantemente, a atividade angiogénica influenciada por células T CD4⁺ foi significativamente suprimida por anticorpos monoclonais neutralizantes contra a IL17.

Por outro lado, contagens elevadas de células Th17, produtoras de IL-17, em carcinomas ováricos, parecem estar um prognóstico clínico mais favorável, assim como têm valores mais elevados em doentes com neoplasias menos avançadas (Fialová *et al*, 2013; Munn, 2009).

Nenhum consenso foi atingido, uma vez que parece que a sua função pode ser benéfica ou deletéria, dependendo do tumor, das intervenções terapêuticas a que o paciente foi sujeito, da fonte produtora de IL-17, entre outros fatores que não foram ainda identificados (Bailey *et al*, 2014).

Capítulo III – Materiais e Métodos: Expressão do gene da IL-17 no linfoma canino

1. Objetivo:

O objetivo do presente estudo foi quantificar a expressão da IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico de animais com linfoma canino, contribuindo assim para a caracterização da resposta imunitária desta doença. Ao mesmo tempo, procurou perceber-se se havia relação entre os valores da sobrevida dos animais em estudo com os valores da expressão da IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico, e por fim, avaliar a relação entre os valores da expressão de IL-17 e a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos.

2. Amostra em estudo

Para a realização do presente estudo, fizeram parte da amostra 22 cães com linfoma diagnosticados e acompanhados no Hospital Escolar da FMV-ULisboa. Foram também utilizados dois grupos controlo constituídos por animais saudáveis. De um destes grupos, constituído por 8 cães de um biotério de experimentação animal, foram recolhidas amostras de linfonodo, e de outro, constituído por 9 animais dadores, foram recolhidas amostras de sangue.

2.1. Critérios de inclusão

Os animais dos grupos controlo não tinham historial de doença oncológica ou outra doença conhecida e não tinham recebido nenhum tipo de medicação nas seis semanas anteriores à colheita das amostras. Foram realizadas análises hematológicas e bioquímicas que comprovavam que os animais não apresentavam nenhuma alteração no seu estado hígido, e foram realizadas análises por imunofluorescência indireta para deteção de anticorpo de *Babesia*, *Ehrlichia* e *Leishmania*, que se revelaram todas negativas. Os animais foram também testados para *Rickettsia*, e sendo que todos os animais se revelaram positivos, o que é um achado extremamente comum na prática clínica, aceitaram-se estes resultados e os animais foram incluídos no grupo controlo.

Os animais doentes pertencentes ao grupo em estudo tinham sido diagnosticados com linfoma pela primeira vez no momento da realização do presente estudo. Foram também sujeitos a análises de controlo para os mesmos hemoparasitas que os grupos controlo, que se apresentaram negativas, exceto as análises para *Rickettsia*, que foram aceites pelas razões acima evidenciadas.

2.2. Critérios de exclusão

Animais com outras doenças conhecidas, como outras neoplasias, hemoparasitoses, entre outras, foram excluídos deste estudo, e animais que tivessem sido sujeitos a tratamentos quimioterápicos ou anti-inflamatórios para tratamento do linfoma ou de outra doença nas quatro semanas anteriores ao momento do diagnóstico foram igualmente excluídos.

3. Colheita das amostras:

Foram utilizadas, para a realização do presente estudo, 22 amostras de linfonodo colhidas por biópsia excisional e 22 amostras de sangue dos 22 cães com linfoma recolhidas no Hospital Escolar da FMV, que pertencem ao biobanco do Projeto Linfoma Canino. Estas amostras foram colhidas antes dos animais serem sujeitos a qualquer tratamento. Foram também colhidas 8 amostras de linfonodo durante a necrópsia dos animais do grupo controlo e 9 amostras de sangue dos cães saudáveis pertencentes ao grupo controlo.

4. Processamento de amostras

4.1. Armazenamento das amostras

Cada amostra de linfonodo foi cortada em várias pequenas porções que foram armazenadas em *RNA lather* a -80°C . As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas através do método de gradiente por *Ficoll* (Biocoll Separating Solution, BioChrom®). A viabilidade celular foi avaliada com azul de tripano e alíquotas com 5×10^6 células suspendidas em soro fetal bovino (FBS) (Gibco) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) foram armazenadas em azoto líquido.

4.2. Extração de RNA e síntese de DNA complementar

O restante processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Imunologia e Virologia da FMV-ULisboa. O ácido ribonucleico (RNA) total dos linfonodos e das células mononucleares foi extraído com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen GmbH; Hilden, Alemanha). Para extrair o RNA total dos linfonodos, foi cortada de forma asséptica uma porção de linfonodo com uma massa de 20-30 mg, à qual se juntou um volume de 600 μL de *Buffer RLT Plus* (Qiagen). A destruição e homogeneização do tecido foram realizadas no aparelho *TissueLyser II* (Qiagen). O lisado foi posteriormente centrifugado a velocidade máxima durante 3 minutos, sendo que o sobrenadante foi posteriormente retirado e o precipitado descartado. O restante protocolo decorreu de acordo com as instruções do fabricante. Por sua vez, para a extração de RNA total das células mononucleares, estas foram lavadas e descongeladas com o tampão PBS e posteriormente centrifugadas a 400xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 350 μL de *Buffer RLT Plus* (Qiagen). O restante protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante.

Seguiu-se a digestão do ácido desoxirribonucleico (DNA) genómico, utilizando para isso o *RNase-free DNase Set* (Promega; Wood Hollow road, Madison, E.U.A.). A concentração e pureza do RNA obtido para cada amostra foi determinada por espectrofotometria através do aparelho *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific; Wilmington, E.U.A.) a um comprimento de onda de 260 nm e 280 nm.

De seguida, procedeu-se à síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) através do *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Alemanha): após a adição de 1 µL de *Oligo (dT)₁₈ primer* ancorado (50 µM; Roche), foram reversamente transcritas entre 250 e 1000 ng de RNA total, dependendo da concentração de cada amostra determinada por espectrofotometria, diluídas numa quantidade de água esterilizada que perfizesse um volume total de 13 µL por amostra. Estas misturas foram aquecidas a 65°C durante 10 minutos e imediatamente arrefecidas a 4°C. Subsequentemente introduziu-se em cada um dos microtubos os seguintes reagentes e respetivas doses, pela ordem com que são mencionados: 4 µL de *5x Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer* (Roche), 2 µL de *Deoxynucleotide Mix* (10 mM; Roche), 0,5 µL de *Protector RNase Inhibitor* (40 U µL⁻¹; Roche) e 0,5 µL de *Transcriptor Reverse Transcriptase* (20 U µL⁻¹; Roche). As misturas assim formadas perfaziam 20 µL de volume total por amostra e foram inicialmente aquecidas a 50°C durante 30 minutos, seguidas de 5 minutos a 85°C, sendo por fim arrefecidas a 4°C.

A integridade do cDNA resultante foi avaliada através da realização de eletroforese em gel de agarose a 1%, com tampão Tris acetato contendo ácido etilenodiamino tetraacético, em que se utilizou o brometo de etídio como corante.

Todas as amostras de cDNA foram conservadas a -20°C até serem amplificadas por reacção de polimerização em cadeia quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

4.3. Seleção dos *primers*

O gene constitutivo escolhido foi o gene do *RLP27*. Para além deste gene, foi também considerado como potencial gene constitutivo o gene da beta-actina. A validade de um gene constitutivo jaz na falta de variabilidade que apresenta entre diferentes amostras, pois quanto maior esta variabilidade, maior o erro associado à calibração que é feita no gene alvo (Huggett, Dheda, Bustin & Zumla, 2005). Por análise através de qRT-PCR, o gene da beta-actina demonstrou resultados menos consistentes do que os do gene do *RLP27*, que por isso foi o gene constitutivo escolhido. Os *primers* do gene do *RLP27* foram gentilmente cedido pela Professora Luísa Mateus, e os *primers* do gene da IL-17 foi obtido do fabricante comercial Frilabo a partir de referências anteriores (Salavati, 2012).

Tabela 7- Sequências nucleotídicas dos primers utilizados na quantificação, por qRT-PCR, dos níveis de expressão de mRNA do gene da IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico.

Gene	Sequência (5' → 3')
IL-17	Direto- CACTCCTTCCGGCTAGAGAA
	Reverso- CACATGGCGAACAATAGGG
RLP27	Direto- TCGTCAACAAGGATGTCTTCAGAG
	Reverso- TCTTGCCAGTCTTGTACCTCTCCT

4.4. qRT-PCR

Para fins de concretização do qRT-PCR realizado no âmbito da quantificação dos níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) da IL-17, recorreu-se ao equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) e a placas de 96 poços para PCR quantitativo (BIOplastics, Landgraaf, Holanda). Cada reação de polimerização foi realizada em poços duplicados, com um volume final de 20 μ L em cada poço, contendo 4 μ L de água esterilizada, 10 μ L de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 2 μ L de *primer* direto (100 nM) e 2 μ L de *primer* reverso (100 nM), ambos diluídos a uma concentração de 1 nM, e 2 μ L de cDNA. O esquema de amplificação consistiu numa fase inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificação (15 segundos a 95°C e hibridação aos 60°C durante 1 minuto).

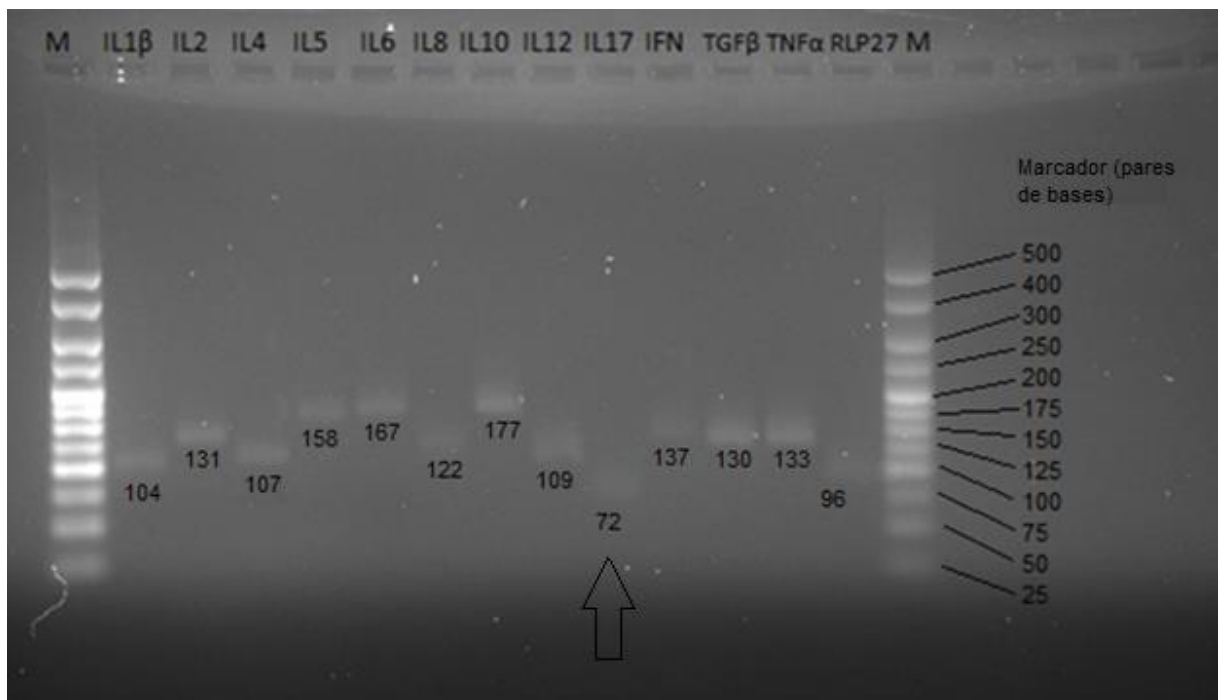
A especificidade da amplificação foi assegurada através da análise das curvas de dissociação, confirmando a amplificação de um produto único, e por eletroforese do produto do qRT-PCR em gel de agarose a 3% com brometo de etídio como corante, para confirmação do peso molecular dos produtos (Figura 4 e Tabela 8).

Para cálculos relativos à quantificação do mRNA, os valores utilizados correspondiam ao Δ CT, ou seja, a diferença entre a amplificação do mRNA do gene da IL-17 de cada amostra individual com a amplificação do mRNA do gene constitutivo dessa mesma amostra, neste caso o gene do *RLP27*. Isto significa que quanto maior o valor do Δ CT, mais tardia a amplificação do mRNA, ou seja, menor a quantidade do mesmo presente na amostra.

Os resultados obtidos relativamente à quantificação do mRNA foram analisados com base no método $2^{-\Delta\Delta C}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Este é um método de quantificação relativo que se baseia na comparação da expressão do mRNA de amostras alvo, no nosso caso dos animais com linfoma, com uma amostra calibradora, no nosso caso dos animais dos grupos controlo. A expressão do mRNA em cada amostra individual é representada pelo o Δ CT, ou seja, a diferença entre amplificação do gene da IL-17 com a amplificação do gene constitutivo, neste caso o gene do *RLP27*. Quanto maior o valor do Δ CT, mais tardia a amplificação do mRNA ou seja, menor a quantidade de IL-17 na amostra.

O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utiliza a fórmula $N\text{-fold} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Assim, para cada gene em estudo, no nosso caso a IL-17, o ΔC_t de cada animal doente é comparado com a média do ΔC_t das amostras calibradoras, ou seja, dos animais dos grupos controle. Esta diferença é expressa em $N\text{-fold}$, ou seja, a título de exemplo, uma variação de 2 *fold* significa que os animais doentes transcrevem um determinado gene duas vezes mais do que os animais saudáveis e uma variação de 0,2 *fold* significa que os animais doentes têm apenas 20% da transcrição dos animais saudáveis.

Figura 4: Gel de agarose a 3%: Produtos do qRT-PCR da expressão de mRNA de várias interleucinas.



Este projeto de mestrado decorreu em conjunto com o Projeto Linfoma Canino, e por isso outras interleucinas foram analisadas em simultâneo. Destaque para a IL-17, a interleucina estudada neste estudo. O marcador utilizado foi o *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific).

Tabela 8: Interleucinas estudadas no âmbito do Projeto Linfoma Canino e respetivos tamanhos.

Citoquina	IL-1β	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-17	IFN	TGFβ	TNFα
Pares de bases	104	131	107	158	167	122	177	109	72	137	130	133

4.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados recolhidos foi efetuada através da utilização do programa Rcommander versão 3.4.0 (2017). Analisou-se a distribuição das variáveis em estudo com o teste de Shapiro-Wilk, sendo que os valores da expressão da IL-17 no linfonodo tinham uma distribuição normal e os valores da expressão da IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico não tinham uma distribuição normal. Assim sendo, no primeiro caso, uma vez que se tratavam de valores quantitativos e pertencentes a grupos independentes, utilizou-se o teste paramétrico *Two Sample t-test*. No segundo caso, sendo que também se tratavam de valores quantitativos e pertencentes a grupos independentes, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon. Em ambas as situações, avaliou-se a expressão da IL-17 no grupo dos animais doentes e no grupo dos animais saudáveis.

A associação entre os níveis de expressão da IL-17 e os valores da sobrevida foi avaliada através de testes de correlação de Spearman, tendo-se procedido da mesma forma relativamente ao valor dos neutrófilos. O intervalo de confiança foi sempre de 95%, pelo que apenas valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Capítulo IV – Resultados: Expressão do gene da IL-17 no linfoma canino

1. Caracterização da amostra

A amostra em estudo foi constituída por 22 animais, sendo que 59% (13/22) eram machos e 41% (9/22) eram fêmeas. Os animais tinham idades compreendidas entre 3 e 17 anos de idade, com uma média de $9,1 \pm 3,4$ anos. Dos 22 animais, havia três indivíduos de raça Labrador Retriever, um Schnauzer, um Rottweiler, um Basset Hound, um Pittbull, um Husky, um Boxer, um cruzado de Pointer, um Pastor Alemão, um Golden Retriever, um Beagle, um Caniche, um Doberman, um Galgo Afegão e seis de raça indeterminada (Anexo III).

Das 22 amostras de linfonodo colhidos, todas apresentavam mRNA de qualidade suficiente serem utilizadas na realização deste estudo. Das 22 amostras de células mononucleares colhidas, apenas 18 estavam aptas a serem utilizadas, uma vez que 4 delas não apresentavam mRNA de boa qualidade. No entanto, após a necrópsia dos animais, chegou-se à conclusão que um apresentava mastocitomas de baixo grau e um apresentava um carcinoma gástrico com metastização no linfonodo gástrico. Por essa razão, estes dois animais foram excluídos de todos os resultados, perfazendo 20 amostras de linfonodo e 16 amostras de células mononucleares do sangue periférico que foram utilizados para a realização deste estudo.

2. Diagnóstico oncológico

Todos os animais do grupo em estudo foram sujeitos a uma biópsia de linfonodo, que foi posteriormente utilizada para análise histopatológica e imunohistoquímica com objetivo de caracterizar o linfoma em curso.

Dos 22 animais, 82% (18/22) foram diagnosticados com linfoma de células B, 13% (3/22) foram diagnosticados com linfoma de células T, e 5% (1/22) foi diagnosticado com linfoma considerado nem B nem T. 95% dos animais (21/22) foram diagnosticados com linfoma difuso, sendo que 71% (15/21) eram linfomas de grandes células blásticas e 29% (6/21) eram linfomas de células médias. 5% dos animais (1/22) foram diagnosticados com linfoma folicular. 45% (10/22) dos animais apresentavam-se no estadio Vb da *World Health Organization* (Owen, 1980), 50% (11/22) apresentavam-se no estadio IV, com 45% (10/22) no subestadio b e 5% (1/22) no subestadio a. 5% (1/22) apresentavam-se no estadio IIa.

Após o diagnóstico, todos os animais começaram a ser tratados com o protocolo CHOP, que ia sendo posteriormente adaptado consoante a resposta ao tratamento. 14% (3/22) dos animais tiveram imunoterapia com uma vacina personalizada com proteínas de choque térmico purificadas do próprio tumor acrescentada ao tratamento.

3. Níveis de expressão de mRNA do gene da IL-17

Os níveis de expressão de mRNA do gene da IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico foram determinados para o grupo em estudo e para os grupos controlo.

3.1. Linfonodo

No linfonodo, o valor da média do ΔCT nos 20 animais doentes é de $18,32 \pm 2,47$, e nos 8 animais saudáveis que correspondiam ao grupo controlo do linfonodo o valor da média do ΔCT é de $16,23 \pm 3,3$ (Gráfico 1 e Tabela 9). A análise através da fórmula $N-fold = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ demonstrou uma variação de $0,9066 \pm 0,392$ *fold* entre os animais doentes e os animais saudáveis. No entanto, através da realização do teste paramétrico *Two Sample t-test*, uma vez que os valores da expressão de IL-17 no linfonodo apresentavam uma distribuição normal ($p=0,051$), demonstrou-se que a diferença de ΔCT entre os dois grupos não era significativa ($p=0,16$).

Gráfico 1: Distribuição dos ΔCT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo no grupo controlo (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).

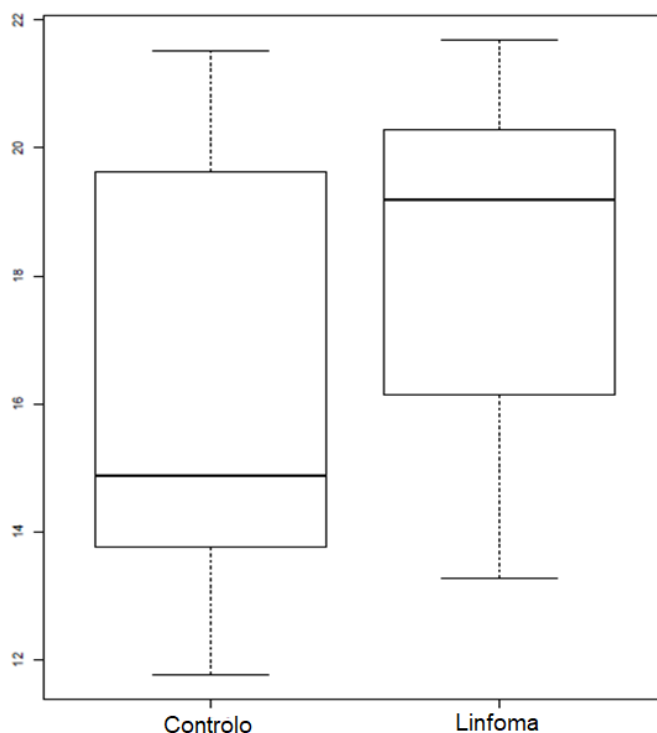


Tabela 9: Distribuição dos Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo no grupo controlo (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).

	Animais com linfoma	Animais saudáveis
Mínimo	13,27289	11,77046
Percentil 25%	16,29175	13,81587
Mediana	19,18488	14,88504
Percentil 75%	20,23445	19,37330
Máximo	21,68076	21,52170

Os linfomas foram divididos em linfomas B (16/20) e linfomas T(3/20), e foi excluído um linfoma nem B nem T (1/20). Foram comparados os valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 no linfonodo dos linfomas B com os valores dos linfomas T. Os valores apresentavam uma distribuição normal ($p=0,268$) e assim realizou-se o teste paramétrico *Two Sample t-test*, e observou-se que não havia uma diferença significativa nos valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 no linfonodo dos dois grupos ($p=0,18$).

Foram comparados os valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 dos linfomas B (16/20) no linfonodo com os valores do respetivo grupo controlo. Os valores não apresentavam uma distribuição normal ($p=0,024$), e assim realizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon, através do qual se verificou que não há uma diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,374$).

Foram comparados os valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 dos linfomas T (3/20) no linfonodo com os valores do respetivo grupo controlo. Os valores apresentavam uma distribuição normal ($p=0,52$), e assim realizou-se o teste paramétrico *Two Sample t-test*, e verificou-se que não há uma diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,658$).

3.2. Células mononucleares do sangue periférico

Nas células mononucleares do sangue periférico, o valor da média do Δ CT nos 16 animais doentes é de $15,28 \pm 2,078$, e nos 9 animais saudáveis que correspondiam ao grupo controlo para as células mononucleares o valor da média do Δ CT é de $12,48 \pm 2,97$ (Gráfico 2 e Tabela 10). A análise através da fórmula $N-fold = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ demonstrou uma variação de $0,65 \pm 0,37$ *fold* entre os animais doentes e os animais saudáveis. Uma vez que os valores da expressão de IL-17 nas células mononucleares não apresentavam uma distribuição normal ($p=0,001$), realizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon, e verificou-se que a diferença de Δ CT entre os dois grupos era significativa ($p=0,0053$).

Gráfico 2: Distribuição dos Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico no grupo controle (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).

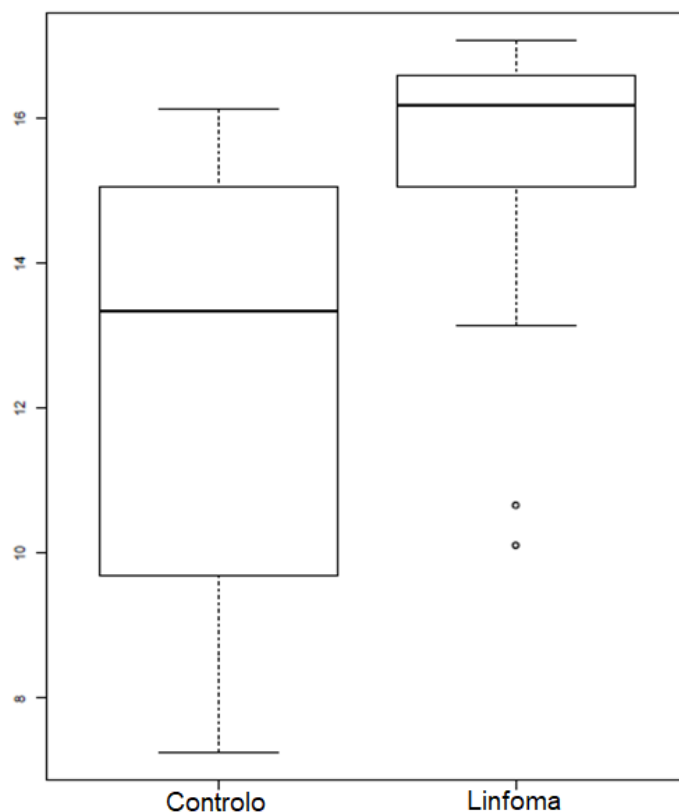


Tabela 10: Distribuição dos Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares no grupo controlo (animais saudáveis) e no grupo em estudo (animais com linfoma).

	Animais com linfoma	Animais saudáveis
Mínimo	10,11172	7,258174
Percentil 25%	15,09877	9,703537
Mediana	16,18424	13,334879
Percentil 75%	16,53063	15,067204
Máximo	17,07334	16,127597

Os linfomas foram divididos em linfomas B (13/16) e linfomas T(2/16), e excluído um linfoma nem B nem T (1/16). Foram comparados os valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico dos linfomas B com os valores dos linfomas T. Os valores não apresentavam uma distribuição normal ($p=0,001$) e por isso realizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon, e observou-se que não há uma diferença significativa nos valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico dos dois grupos ($p=0,076$).

Foram comparados os valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 dos linfomas B (13/16) nas células mononucleares do sangue periférico com os valores do respetivo grupo controlo. Os valores não apresentavam uma distribuição normal ($p=0,0005$), e assim realizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon, e verificou-se que há uma diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,0014$).

Foram comparados os valores de Δ CT correspondentes à quantificação de IL-17 dos linfomas T (2/16) nas células mononucleares com os valores do respetivo grupo controlo. Os valores apresentavam uma distribuição normal ($p=0,569$), e assim realizou-se o teste paramétrico *Two Sample t-test*, e verificou-se que não há uma diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,746$).

4. Correlação entre a expressão da IL-17 e a sobrevida dos animais

No grupo dos animais com linfoma, foi estudado o grau de associação entre a expressão da IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares e a sobrevida dos animais. Para esta análise, foram excluídos os animais que foram eutanasiados no dia do diagnóstico (2/20) e os que se encontravam vivos até à data de análise dos dados (2/20), num total de 4 animais excluídos. Assim sendo, para a correlação entre a sobrevida e a expressão da IL-17 no linfonodo foram incluídos 16 animais e para a correlação entre a sobrevida e a expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico foram incluídos 14 animais. Os animais incluídos nesta análise e respetivas sobrevidas estão evidenciadas no Anexo IV. Assim, utilizou-se um teste de correlação de Spearman, que nos permitiu verificar que existe uma correlação positiva entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 do linfonodo e a sobrevida dos animais ($Rho=0,23$), ainda que esta não seja estatisticamente significativa ($p=0,398$) (Gráfico 3). Com o mesmo teste, verificou-se também que havia uma correlação negativa entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico e a sobrevida dos animais ($Rho=-0,156$), ainda que esta associação não seja estatisticamente significativa ($p=0,594$) (Gráfico 4).

Gráfico 3: Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo dos animais com linfoma e a sua sobrevida.

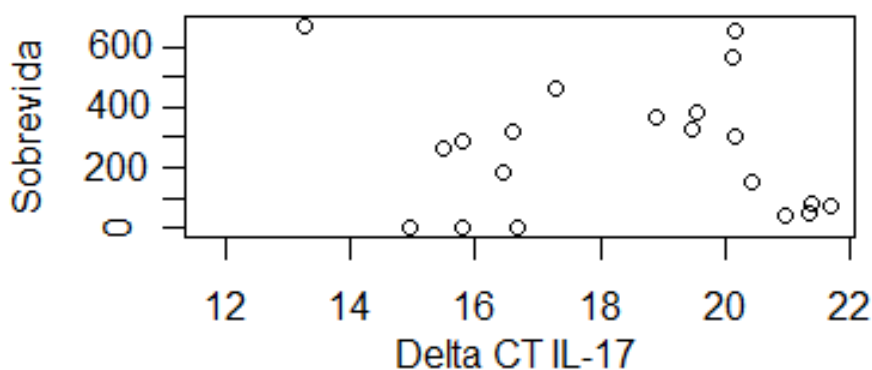
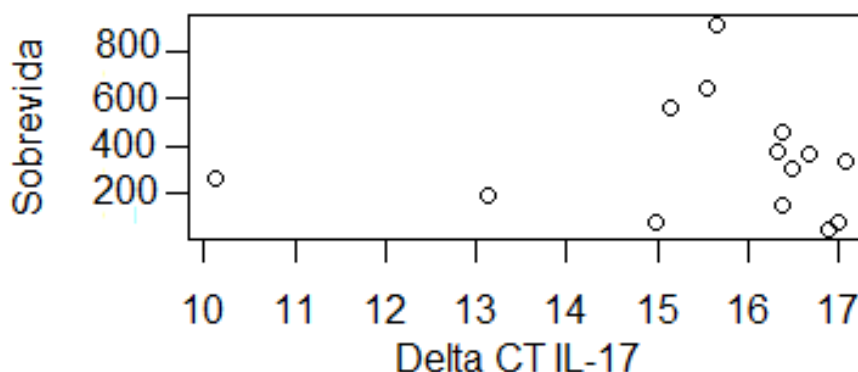


Gráfico 4: Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico dos animais com linfoma e a sua sobrevida.



Avaliámos também a correlação entre a sobrevida dos animais com linfoma B e T separadamente com os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico de cada grupo. No entanto, devido aos animais que foram previamente excluídos para esta análise, apenas um animal diagnosticado com linfoma T era elegível, e por essa razão esta análise não será feita.

Assim sendo, relativamente aos valores de IL-17 no linfonodo, e excluindo um animal com linfoma nem B nem T (1/16) e um animal com um linfoma T (1/16), temos uma amostra de 14 animais com linfoma B passíveis de serem incluídos nesta análise. Através da realização do teste de correlação de Spearman, conseguimos verificar que existe uma correlação negativa entre a sobrevida dos animais com linfoma B e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo ($Rho=-0,55$), e esta correlação é estatisticamente significativa ($p=0,046$), ou seja, há uma correlação positiva significativa entre os níveis de IL-17 no linfonodo de animais com linfoma B e a sua sobrevida (Anexo V).

Relativamente aos valores de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico, e excluindo um animal com linfoma nem B nem T (1/14) e um animal com um linfoma T (1/14), temos uma amostra de 12 animais com linfoma B passíveis de serem incluídos nesta análise. Através da realização do teste de correlação de Spearman, conseguimos verificar que existe uma correlação negativa entre a sobrevida dos animais com linfoma B e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico ($Rho=-0,329$), ainda que esta não seja estatisticamente significativa ($p=0,297$) (Anexo V).

5. Correlação entre a expressão de IL-17 e a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos

Foi também estudada a relação entre a expressão de IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico e a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos dos animais com linfoma. Para esta análise, foram excluídos os animais com valores de hemograma inválidos ou erráticos (4/20). Assim sendo, foram incluídos 16 animais no cálculo da correlação entre a expressão de IL-17 no linfonodo e os referidos valores de hemograma, enquanto que no cálculo da correlação entre a expressão de IL-17 nas células mononucleares e os valores de hemograma foram incluídos 13 animais. Foram utilizados vários testes de correlação de Spearman, que revelaram não existir nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo ou nas células mononucleares (Tabela 11 e Anexo VI).

Tabela 11: Valores de p e Rho obtidos através de testes de Spearman para avaliar a correlação entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo ou nas células mononucleares.

	Expressão de IL-17 no linfonodo	Expressão de IL-17 nas células mononucleares
Contagem de leucócitos	p=0,09; Rho=0,436	p=0,122; Rho=0,45
Contagem de neutrófilos segmentados	p=0,17; Rho=0,359	p=0,59; Rho=0,165
Contagem de linfócitos	p=0,506; Rho=0,18	p=0,197; Rho=0,382

Avaliámos também a correlação entre a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos dos animais com linfoma B e T separadamente com os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo e nas células mononucleares do sangue periférico.

Assim sendo, relativamente aos valores de IL-17 no linfonodo, e excluindo um animal com linfoma nem B nem T (1/16), temos uma amostra de 13 animais com linfoma B e 2 animais com linfoma T passíveis de serem incluídos nesta análise. Foram utilizados vários testes de correlação de Spearman, que revelaram não existir nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo (Tabela 12).

Tabela 12: Valores de p e Rho obtidos através de testes de Spearman para avaliar a correlação entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de ΔCT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo em linfomas B e T.

	Expressão de IL-17 no linfoma B	Expressão de IL-17 no linfoma T
Contagem de leucócitos	$p=0,348$; $Rho=0,284$	$p=1$; $Rho=1$
Contagem de neutrófilos segmentados	$p=0,448$; $Rho=0,231$	$p=1$; $Rho=1$
Contagem de linfócitos	$p=0,615$; $Rho=0,154$	$p=1$; $Rho=1$

Relativamente aos valores de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico, e excluindo um animal com linfoma nem B nem T (1/13), temos uma amostra de 10 animais com linfoma B e 2 animais com linfoma T passíveis de serem incluídos nesta análise. Foram utilizados vários testes de correlação de Spearman, que revelaram não existir nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de ΔCT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares (Tabela 13).

Tabela 13: Valores de p e Rho obtidos através de testes de Spearman para avaliar a correlação entre a contagem de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos e os valores de ΔCT correspondentes à expressão de IL-17 nas células mononucleares em linfomas B e T.

	Expressão de IL-17 no linfoma B	Expressão de IL-17 no linfoma T
Contagem de leucócitos	$p=0,802$; $Rho=0,091$	$p=1$; $Rho=1$
Contagem de neutrófilos segmentados	$p=0,387$; $Rho=-0,309$	$p=1$; $Rho=1$
Contagem de linfócitos	$p=0,137$; $Rho=0,505$	$p=1$; $Rho=1$

Capítulo V – Discussão: Expressão do gene da IL-17 no linfoma canino

As neoplasias, como o linfoma, podem ser promovidas por uma desregulação das citocinas do hospedeiro, e à medida que estas progredem, as células neoplásicas e o seu microambiente podem por sua vez influenciar a produção de citocinas aberrantes ou níveis de expressão alterados. Assim, citocinas circulantes podem representar importantes marcadores da progressão tumoral e podem estar diretamente envolvidas na patogénese de certos tumores através da interação entre as células tumorais e o seu microambiente (Calvalido *et al*, 2016).

No nosso estudo, foi identificada uma diminuição significativa dos níveis de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico nos animais com linfoma, assim como no subgrupo dos linfomas de células B. Estes resultados são consistentes com o estudo de Lu *et al* de 2016, que reporta uma diminuição significativa das células Th17 no sangue periférico de pacientes humanos com Linfoma Não-Hodgkin e no Linfoma Não-Hodgkin de células B.

Identificámos também uma diminuição ligeira, não significativa, na expressão de IL-17 no linfonodo dos animais com linfoma com comparação com animais saudáveis. Yang, Novak, Ziesmer, Witzig e Ansel, num estudo de 2009, identificaram uma diminuição significativa na percentagem de células Th17 em biópsias de linfonodo de pacientes com Linfoma Não-Hodgkin, comparativamente à percentagem de células Th17 de pessoas nas tonsilas e sangue de pessoas saudáveis. Possivelmente, num estudo com uma amostra mais numerosa, resultados significativos podiam ser atingidos.

Estes resultados parecem validar a certeza de que o linfoma canino é um bom modelo de estudo para o Linfoma Não-Hodgkin dos humanos, uma vez que os nossos resultados, quer nas células mononucleares do sangue periférico e possivelmente no linfonodo, são consistentes com o que já tinha sido previamente apontado para a quantificação de células Th17 nestes dois compartimentos para o Linfoma Não-Hodgkin.

No entanto, a tendência de diminuição dos níveis de IL-17 que se verifica no linfoma parece não ir ao encontro do que foi verificado na maioria dos outros tumores. Foram identificados níveis elevados de IL-17 no sangue de pacientes humanos com carcinomas mamários comparativamente com os controlos, apesar deste aumento não se correlacionar com o prognóstico (Lyon, McCain, Walter & Schubert, 2008). Foi também proposta uma associação entre a IL-17 infiltrativa nos carcinomas mamários e a invasão tumoral (Zhu *et al*, 2008). Foram também descobertos níveis diminuídos de IL-17 em tecido prostático saudável e elevados em células cancerígenas (Steiner *et al*, 2003), e experiências em ratinhos demonstraram que parece haver uma promoção da progressão do cancro prostático mediada pela IL-17 (Zhang *et al*, 2017). No carcinoma gástrico, foi sugerido que a IL-17 estivesse implicada na amplificação e persistência dos processos inflamatórios associados

ao desenvolvimento tumoral, e que a ausência ou o bloqueio dos seus recetores leva a uma inibição a sua resposta, e consequentemente das suas acções cancerígenas (Zhou, Toh, Zrioual & Miossec, 2007). Nos carcinomas do cólon, os níveis de IL-17 revelaram-se mais elevados do que nos adenomas, que por sua vez são mais elevados do que nos tecidos do cólon saudáveis, e estes níveis relacionam-se com a severidade da displasia (Cui, Yuan, Goll & Florholmen, 2012). No cancro do pulmão de células não pequenas, a IL-17 parece estar aumentada relativamente aos controlos e os seus níveis correlacionam-se com um pior prognóstico (Pan *et al*, 2015), e com um aumento da vascularidade tumoral (Numasaki *et al*, 2005).

Apesar das células Th17 já terem sido intensamente estudadas no contexto das doenças infecciosas e auto-imunes, o seu papel específico na patogénese dos tumores não está ainda bem esclarecida. Vários estudos realizados, relativamente ao mRNA da IL-17 ou à proteína, revelaram que, dependendo dos tumores, os seus níveis podem ir de indetetável a abundante (Yang *et al*, 2009). A título de exemplo, um estudo realizado em pacientes humanos e em ratinhos com neoplasias diversificadas demonstrou um aumento significativo das células Th17 nos tecidos neoplásicos, quer nos ratinhos com melanoma, quer nos humanos com carcinoma ovárico, renal ou pancreático. O mesmo se verificou com as células T reguladoras (Treg), com um aumento ainda mais marcado do que as células Th17 nos tecidos neoplásicos, revelando um aumento síncrono destas duas populações celulares com o desenvolvimento tumoral, atingindo o seu pico em tumores em estadios avançados (Kryczek *et al*, 2007).

Por outro lado, um estudo em pacientes humanos com carcinoma ovárico demonstrou que células Th17 infiltrativas no tumor estavam diminuídas em pacientes com doença mais avançada, assim como os níveis de IL-17 no líquido ascítico, e estão positivamente relacionadas com o prognóstico dos pacientes. Este estudo demonstrou que as células Th17 parecem estar associadas a uma imunidade tumoral protetora, através do recrutamento de células efetoras para o microambiente tumoral. A inibição das células Th17 parece ser um novo mecanismo de evasão tumoral, validando a possível utilização de novas estratégias de estimulação imunitária, através da indução de populações celulares Th17 em pacientes oncológicos (Kryczek *et al*, 2009).

Parece haver uma relação síncrona entre as células Th17 e as células Treg em estudos que sugerem que as células Th17 contribuem para a progressão tumoral e que estas duas populações celulares vão aumentando à medida que o tumor progride (Kryczek *et al*, 2007). No entanto, em estudos que mostram que a IL-17 se correlaciona positivamente com a sobrevida, não só as células Th17 se correlacionam negativamente com as células Treg, como parece que estas últimas são capazes de inibir as primeiras durante a progressão tumoral (Kryczek *et al*, 2009).

Um dos pontos que parece consensual, como já foi referido anteriormente, é que a ação benéfica ou deletéria da IL-17 pode ser resultante de uma influência multifatorial, nomeadamente a fonte de onde provem a IL-17, por que células é produzida, e se o indivíduo foi exposto a algum tratamento, e principalmente o tipo de estímulos que induzem a sua produção (Bailey *et al*, 2014). Inclusivamente, foi reportado que os níveis de IL-17 variam consoante a fase da doença em pacientes humanos com leucemia mielóide aguda, com os níveis mais baixos em pacientes recentemente diagnosticados comparativamente com pacientes em remissão completa, pacientes que recidivaram e controlos, sendo que os pacientes em remissão completa apresentavam os valores mais elevados de IL-17 (Tian *et al*, 2013). Estes resultados também são consistentes com os do presente estudo, sendo que todos os animais com linfoma incluídos tinham sido diagnosticados recentemente.

Estas descobertas levantam questões relativamente ao possível papel das interleucinas pró-inflamatórias nas novas imunoterapias para o tratamento de tumores e outras doenças. Para além disso, o efeito hematopoiético da IL-17, e em particular a sua capacidade de induzir uma neutrofilia aguda, pode ter aplicações terapêuticas no contexto da imunossupressão, nomeadamente nos transplantes de medula óssea. Por outro lado, pode ser um alvo para inibição terapêutica em doenças auto-imunes dependentes das células T, doenças inflamatórias crónicas, rejeição de órgãos transplantados e em alguns cancros, como vários estudos acima referidos parecem sugerir (Lebecque *et al*, 2000).

Relativamente ao possível valor de prognóstico da IL-17, não identificámos nenhuma correlação significativa dos seus valores no linfonodo ou nas células polimorfonucleadas do sangue periférico do grupo total de animais com linfoma e a sobrevida dos mesmos. No entanto, ao analisar os subgrupos, verificámos que existe uma correlação negativa significativa entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo de animais com linfomas B e a sua sobrevida. Isto significa que, segundo o nossos resultados, quanto menor a quantidade de IL-17 expressa no linfonodo de animais com linfoma B, menor a sobrevida dos animais. Apesar deste resultado significativo, temos de ter em conta que, por razões éticas, os animais não receberam todos o mesmo tratamento. A resposta de cada animal foi avaliada, e o protocolo CHOP, que foi o protocolo inicial de todos os animais, foi alterado em alguns casos e outros fármacos foram acrescentados, consoante a resposta de cada animal, o que influencia a sua sobrevida.

Apesar de a IL-17 já ter sido identificada como um fator de prognóstico noutros estudos, os resultados nem sempre são consistentes. Os níveis de IL-17 no líquido ascítico de pacientes humanos com carcinoma ovárico foram identificados como um indicador de prognóstico válido, revelando que pacientes com níveis mais elevados de IL-17 no líquido ascítico apresentavam uma tendência para terem uma sobrevida aumentada (Kryczek *et al*, 2009), o que é consistente com os nossos resultados, no entanto, em carcinomas hepatocelulares e cancro colorretal, níveis intratumorais aumentados de células Th17 correlacionam-se com

um pior prognóstico, assim como com uma densidade vascular aumentada do tumor (Zhang *et al*, 2009; Tosolini *et al*, 2011). São várias as evidências das diversas ações e significados que as células Th17 e a IL-17 podem ter consoante o contexto tumoral em que se encontram.

No estudo de Lu *et al* de 2016 em pacientes humanos com Linfoma Não-Hodgkin, os níveis circulantes de células Th17 elevaram-se significativamente após um ou dois ciclos de quimioterapia comparativamente aos pacientes recém diagnosticados e não tratados, e os níveis de células Th17 normalizavam após o fim do tratamento. Os resultados deste estudo são consistentes com os nossos, uma vez que animais tratados têm tipicamente uma sobrevida aumentada relativamente a animais não-tratados.

Contrastantemente, noutro estudo, verificou-se que os níveis circulantes de células Th17 em pacientes humanos com leucemia mielóide aguda também aumentavam em pacientes que recidivavam comparativamente com os animais recém diagnosticados e com os controlos (Tian *et al*, 2013).

No mesmo estudo, foi também proposto que as células Th17 estejam associadas com uma imunidade tumoral protetora que está diminuída em animais recentemente diagnosticados mas está aumentada em animais tratados em remissão completa e nos controlos (Tian *et al*, 2013). No entanto, o facto de os animais refratários ou em recidiva também terem valores aumentados relativamente aos recém diagnosticados parece pôr em causa esta teoria. Por outro lado, estes resultados podem também sugerir que, na leucemia mielóide aguda, as células Th17 se correlacionem com a progressão tumoral, e assim sendo estão diminuídas nos animais recentemente diagnosticados, com um tumor em estadios iniciais, e aumentada em animais com recidiva. Neste caso, é difícil atribuir uma causa o facto dos animais controlo e em remissão completa terem os valores de células Th17 aumentadas em relação aos animais recentemente diagnosticados.

Relativamente à correlação entre os valores de IL-17 e a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos, também não foi identificada nenhuma relação significativa. Este resultado pode estar relacionado com os valores diminuídos de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico e no linfonodo que foram identificados neste estudo. Apesar da IL-17 induzir neutrofilia por desmarginalização dos neutrófilos (Lebecque *et al*, 2000), uma vez que no nosso caso os valores de IL-17 estão diminuídos, será então de esperar que os referidos valores de hemograma sejam influenciados por outros fatores não estudados por nós, e por isso não é possível identificar nenhuma relação. Também na análise dos subgrupos de linfomas B e T não foi identificada nenhuma relação entre os valores de hemograma e a quantificação de IL-17.

Relativamente ao subgrupo dos linfomas T, não obtivemos nenhum resultado significativo em nenhuma das análises relativas à quantificação de IL-17 no linfonodo ou nas células mononucleares do sangue periférico comparativamente com o subgrupo de linfomas B e os

grupos controlo, na correlação com a sobrevida ou na correlação com os valores de hemograma. Não seria de esperar nenhum resultado significativo em nenhuma das análises feitas neste estudo a partir deste subgrupo, uma vez que a nossa amostra variava entre 2 e 3 animais, que muito dificilmente daria origem a resultados significativos. No entanto, achámos importante fazer uma análise separada dos dois subgrupos de linfomas T e B, uma vez que se tratam de entidades clínicas com diferenças relevantes, com comportamentos, tratamentos e prognósticos distintos, como já foi sublinhado anteriormente.

1. Perspetivas futuras

Outros estudos prospetivos seriam interessantes como complemento aos resultados deste trabalho. Seria importante realizar estudos semelhantes com uma amostra superior, no sentido de aumentar a significância dos resultados. Por outro lado, fazer a quantificação da proteína da IL-17, paralelamente ao mRNA, complementaria os resultados que foram obtidos, para confirmar se a transcrição que é observada pela quantificação do mRNA corresponde a uma tradução para proteína equivalente, ou seja, a interleucina propriamente dita.

Seria pertinente uma análise das células infiltrativas no tumor, nomeadamente das células Th17 e das células Treg, com vários objetivos. Em primeiro lugar, perceber se os níveis de IL-17 são paralelos aos níveis de células Th17, pois apesar de empiricamente ser um resultado esperado, reforçar esta relação é importante para conclusões posteriores. Por outro lado, perceber a relação das células Th17 e Treg no linfoma canino seria um passo importante na compreensão da função das células Th17 e da IL-17 neste tipo de neoplasia. Assim sendo, e para além de perceber que tipo de populações celulares estão presentes nos linfonodos afetados em animais com linfoma canino, um perfil de citocinas dos mesmos seria também importante no sentido de perceber que tipo de estímulos levam à diferenciação das células Th17 neste contexto, e que outras interleucinas estão presentes e de que modo afetam o comportamento da IL-17.

Uma vez que os nossos pacientes eram animais com um diagnóstico de linfoma recente, cujos níveis de IL-17 nas células mononucleadas do sangue periférico estavam diminuídos, e uma vez que verificámos uma correlação negativa entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo dos animais com linfomas B e a sobrevida dos mesmos, impõe-se uma avaliação dos níveis de IL-17 ao longo do período de tratamento dos animais e durante a progressão do tumor. Esta análise seria importante no sentido de perceber como os níveis de IL-17 evoluem, e se são comparáveis com os resultados já obtidos para o Linfoma Não-Hodgkin, como foi referido anteriormente.

Assim sendo, e para reforçar a validade do linfoma canino como modelo de estudo do Linfoma Não-Hodgkin, verificar que tipo de evolução têm os valores de IL-17 e de células Th17 seria crucial na compreensão do seu papel no linfoma canino.

Conclusão

O presente estudo realizado no âmbito dissertação de mestrado “Caracterização imunológica no Linfoma canino: avaliação da expressão de IL-17” teve como objetivo contribuir para a caracterização imunitária desta doença.

Fomos capazes de concluir, através da recolha de dados e sua posterior análise estatística, que existe uma diminuição significativa dos níveis de expressão de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico nos animais diagnosticados com linfoma canino relativamente aos animais pertencentes ao grupo controlo. Também foi identificada um diminuição da expressão de IL-17 no linfonodo dos animais doentes relativamente aos animais pertencentes ao grupo controlo, ainda que esta diferença não seja significativa. Estes resultados são consistentes com achados anteriores relativamente ao Linfoma Não-Hodgkin dos humanos, e reforça o valor do linfoma canino como modelo animal desta doença.

Concluimos também que existe uma correlação negativa significativa entre a sobrevida dos animais com linfoma B e os valores de Δ CT correspondentes à expressão IL-17 no linfonodo, o que significa que quanto menor a expressão de IL-17 no linfonodo destes animais, menor a sua sobrevida. Estes resultados levantam questões relativamente ao papel da IL-17 na fisiopatologia desta doença e das suas possíveis ações na progressão ou na protecção contra o tumor, à semelhança do que acontece com outras neoplasias, em que estudos se multiplicam e contradizem relativamente ao papel desta interleucina.

Nas restantes análises efetuadas não foram alcançados resultados significativos.

A compreensão do papel da IL-17 no linfoma canino representa um passo importante na compreensão do estadio imunitário dos animais que padecem desta doença. Este conhecimento pode abrir portas para diagnósticos mais precoces e para novas imunoterapias que sejam benéficas e que prolonguem a sobrevida dos animais com linfoma canino.

Bibliografia:

- Antonysamy, M. A., Fanslow, W. C., Fu, F., Li, W., Qian, S., Troutt, A. B. & Thomson, A. W. (1999). Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *Journal of Immunology*, 162, 577-584.
- Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S. & Paulos, C.M. (2014). Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Frontiers in Immunology*, 5, 276.
- Bannink, E.O., Sauerbrey, M.L., Mullins, M.N., Hauptman, J.G. & Obradovich, J.E. (2008). Actinomycin D as rescue therapy in dogs with relapsed or resistant lymphoma: 49 cases (1999-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233(3), 446-51.
- Beaver, L.M., Strottner, G. & Klein, M.K. (2010). Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell Or T-cell lymphoma: 41 cases (2006–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237, 1052–1055.
- Belardelli, F. & Ferrantini M. (2002). Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends in Immunology*, 23(4). 201-8.
- Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. (2010). An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annual Review of Immunology*, 28, 157-83.
- Brody, J., Kohrt, H., Marabelle, A. & Levy, R. (2011). Active and passive immunotherapy for lymphoma: proving principles and improving results. *Journal of Clinical Oncology*, 29(14), 1864-75.
- Burger, D. & Dayer, J.M. (2002). Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966, 464-73.
- Burra, P. & Rodriguez-Castro, K.I. (2015). Neoplastic disease after liver transplantation: Focus on de novo neoplasms. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8753-68.
- Burton, J.H., Garrett-Mayer, E. & Thamm, D.H. (2013). Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11, 306–315.
- Callahan, G.N. (2014a). T-Cell Activation. In G.N. Callahan & R.M. Yates, *Basic Veterinary Immunology*. (pp. 161 - 179). Colorado: University Press of Colorado.
- Callahan, G.N. (2014b). The Immune System and Cancer. In G.N. Callahan & R.M. Yates, *Basic Veterinary Immunology*. (pp. 287 - 293). Colorado: University Press of Colorado.
- Callahan, G.N. & Yates, R.M. (2014). Overview of Mechanisms of Defense. In G.N. Callahan & R.M. Yates, *Basic Veterinary Immunology*. (pp. 1-16). Colorado: University Press of Colorado.
- Calvalido, J., Wood, G.A., Mutsaers, A.J., Wood, D., Sears, W. & Woods, J.P. (2016). Comparison of serum cytokine levels between dogs with multicentric lymphoma and healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182, 106-114.

- Cartwright, R., Brincker, H., Carli, P.M., Clayden, D., Coebergh, J.W., Jack, A., McNally, R., Morgan, G., de Sanjose, S., Tumino, R. & Vornanen, M. (1999). The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985–1992. *European Journal of Cancer*, 35, 627–633.
- Chun, R., Garrett, L.D. & Vail, D.M. (2000). Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(2), 120-4.
- Chun, R., Garrett, L.D. & Vail, D.M. (2007). Cancer chemotherapy. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (4th ed.). (pp. 163–192). Philadelphia: WB Saunders.
- Chun, R. (2009). Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? *Topics in Companion Animal Medicine*, 24(3), 157-62.
- Comazzi, S. & Gelain, M.E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Veterinary Journal*, 188(2), 149-55.
- Cui, G., Yuan, A., Goll, R. & Florholmen, J. IL-17A in the tumor microenvironment of the human colorectal adenoma-carcinoma sequence. (2012). *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47, 1304–1312.
- Day, M.J. & Schultz, R.D. (2014a). Antigen presentation and cytokines. In M.J. Day, R.D. Schultz, *Veterinary Immunology – Principles and Practice*. (2nd ed.). (pp. 81 – 94). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Day, M.J. & Schultz, R.D. (2014b). Cancer Immunology and Immune System Neoplasia. In M.J. Day, R.D. Schultz, *Veterinary Immunology – Principles and Practice* (2nd ed.). (pp. 167 – 179). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Del Prete, G. (1998). The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *International Reviews of Immunology*. 16(3-4), 427-55.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R. & Roitt, I.V. (2011a). The production of effectors. In P.J. Delves, S.J. Martin, D.R. Burton, I.V. Roitt, *Roitt's Essential Immunology*. (12th ed.). (pp. 290 – 336). Oxford: Wiley – Blackwell.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R. & Roitt, I.V. (2011b). Tumor immunology. In P.J. Delves, S.J. Martin, D.R. Burton & I.V. Roitt, *Roitt's Essential Immunology*. (12th ed.). (pp. 563 – 601). Oxford: Wiley – Blackwell.
- Dickinson, R.M. (2008). Canine lymphosarcoma: Overcoming diagnostic obstacles and introduction to the latest diagnostic techniques. *Canadian Veterinary Journal*, 49, 305-308.
- Dobson, J.M., Blackwood, L.B., McInnes, E.F., Bostock, D.E., Nicholls, P., Hoather, T.M. & Tom, B.D. (2001). Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, 42(8), 377-84.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43, 240–246.
- Dutcher, J.P. (2002). Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. *Oncology*, 16, 4-10.

- Ettinger, S.N. (2005). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 92-97.
- Fabre-Guillevin, E., Tabrizi, R., Coulon, V., Monnereau, A., Eghbali, H., Soubeyran, I. & Soubeyran, P. (2006). Aggressive non-Hodgkin's lymphoma: concomitant evaluation of interleukin-2, soluble interleukin-2 receptor, interleukin-4, interleukin-6, interleukin-10 and correlation with outcome. *Leukemia & Lymphoma*, 47, 603–611.
- Fabre, J., Giustiniani, J., Garbar, C., Antonicelli, F., Merrouche, Y., Bensussan, A., Bagot, M. & Dacak, R. (2016). Targeting the Tumor Microenvironment: The Protumor Effects of IL-17 Related to Cancer Type. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1433.
- Feldmann, M. & Brennan, F. (2000). Cytokines and Disease. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola & J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host*. (pp 35 – 52). Waltham: Academic Press.
- Feldmann, M., Brennan, F.M. & Maini, R.N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology*, 14, 397-440.
- Fialová, A., Partlová, S., Sojka, L., Hromádková, H., Brtnický, T., Fučíková, J., Kocián, P., Rob, L., Bartůňková, J. & Spíšek, R. (2013). Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *International Journal of Cancer*, 132(5), 1070-9.
- Filopovich, A., Heinritz, K.J., Robison, L.L. & Frizzera, G. (1987). The Immunodeficiency Cancer Registry. A research resource. *American Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 9(2), 183-4.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarar, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J. & Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, 183, 2593–2603.
- Garrett, L.D., Thamm, D.H., Chun, R., Dudley, R. & Vail, D.M. (2002). Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16, 704–709.
- Gavazza, A., Lubas, G., Fridman, A., Peruzzi, D., Impellizeri, J.A., Luberto, L., Marra, E., Roscilli, G., Ciliberto, G. & Aurisicchio, L. (2013). Safety and efficacy of a genetic vaccine targeting telomerase plus chemotherapy for the therapy of canine B-cell lymphoma. *Human Gene Therapy*, 24(8), 728-38.
- Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G. & Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15, 190–195.
- Gramer, I., Kessler, M. & Geyer, J. (2015). Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma. *Veterinary Comparative Oncology*, 13(4), 363-72.
- Greenlee, P.G., Filippa, D.A., Quimby, F.W., Patnaik, A.K., Calvano, S.E., Matus, R.E., Kimmell, M., Hurvitz, A.I. & Lieberman, P.H. (1990). Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer*, 66, 480-90.

- Griessmayr, P.C., Payne, S.E., Winter, J.E., Barber, L.J. & Shofer, F.S. (2009). Dacarbazine as Single-Agent Therapy for Relapsed Lymphoma in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 1227–1231
- Group VCO. (2011). Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Veterinary Comparative Oncology*.
- Hahn, K.A., Richardson, R.C., Hahn, E.A. & Chrisman, C.L. (1994). Diagnostic and Prognostic Importance of Chromosomal Aberrations Identified in 61 Dogs with Lymphosarcoma. *Veterinary Pathology*, 31, 528-540.
- Hahn, K.A., Richardson, R.C., Teclaw, R.F., Cline, J.M., Carlton, W.W., DeNicola, D.B. & Bonney, P.L. (1992). Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma? *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(1), 3-10.
- Harrington, LE. Hatton, RD. Mangan, PR., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. & Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123–1132.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A. & Bloomfield, C.D. (1999). *World Health Organization* classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*, 17(12), 3835-49.
- Hill, F.W.G., Klein, W.R., Hoyer, M.J., Rutten, V.P.M.G., Kock, N., Koten, J.W., Steerenberg, P.A., Ruitenber, E.J. & Den Otter, W. (1994). Antitumor effect of locally injected low doses of recombinant human interleukin-2 in bovine vulval papilloma and carcinoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(1), 19-29.
- Howlander, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M.P., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J. & Cronin, K.A. (eds). (2012). SEER cancer statistics review, 1975–2009 (vintage 2009 populations). Bethesda, MD: National Cancer Institute.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6, 279-284.
- Impellizeri, J.A., Howell, K., McKeever, K.P. & Crow, SE. (2006). The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. *Veterinary Journal*, 171, 556–558.
- Jagielski, D., Lechowski, R., Hoffmann-Jagielska, M. & Winiarczyk, S. (2002). A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *Journal of Veterinary Medicine. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 49(8), 419-24.
- Janeway, C.A. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197-216.

- Janowska-Wieczorek, A., Andrews, E.J., Khaliq, A. & Pilarski, L.M. (1987). Deficiency of mature B and T lymphocyte subsets in the blood of non-Hodgkin lymphoma patients. *American Journal of Hematology*, 26(2), 125-34.
- Jeglum, K.A., Winters, W.D. & Young, K.M. (1989). In vitro immune monitoring of antibody response in dogs given chemoimmunotherapy for lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*, 50(4), 488-92.
- Jeglum, K.A., Young, K.M., Barnsley, K., Whereat, A., McGrath, D. & Hutson, C. (1986). Intralymphatic autochthonous tumor cell vaccine in canine lymphoma. *Journal of Biological Response Modifiers*, 5(2), 168-75.
- Jeglum, K.A., Young, K.M., Barnsley, K. & Whereat, A. (1988). Chemotherapy versus chemotherapy with intralymphatic tumor cell vaccine in canine lymphoma. *Cancer*, 61(10), 2042-50.
- Jubala, C.M., Wojcieszyn, J.W., Valli, V.E., Getzy, D.M., Fosmire, S.P., Coffey, D., Bellgrau, D. & Modiano, J.F. (2005). CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Veterinary Pathology*, 42, 468–476.
- Kano, R., Inoiue, C., Okano, H., Yamazaki, J., Takahashi, T., Watari, T., Tokuriki, M., & Hasegawa, A. (2005). Canine CD20 gene. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108, 265–268.
- Keller, E.T., MacEwen, E.G., Rosenthal, R.C., Helfland, S.C. & Fox, L.E. (1993). Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(5), 289-95.
- Keller, E.T. (1992). Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. *Cancer*, 70, 2334–2337.
- Kimby, E. (2015). Serum cytokines in follicular lymphoma. *Blood*, 125(6), 892-3.
- Kiupel, M., Teske, E. & Bostock, D. (1999). Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology*, 36, 292–300.
- Kolls, J.K. & Lindén, A. (2004). Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity*, 21(4), 467-476.
- Kost, E.R., Mutch, D.G. & Herzog, T.J. (1999). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce synergistic cytolytic effects in ovarian cancer cell lines-roles of the TR60 and TR80 tumor necrosis factor receptors. *Gynecologic Oncology*, 72(3), 392-401.
- Kristal, O., Rassnick, K.M., Gliatto, J.M., Northrup, N.C., Chretin, J.D., Morrison-Collister, K., Cotter, S.M. & Moore, A.S. (2004). Hepatotoxicity associated with CCNU (lomustine) chemotherapy in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(1), 75-80.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., Chang, A., Coukos, G., Liu, R. & Zou, W. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 114(6), 1141-9

- Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Altuwaijri, S., Szeliga, W., Kolls, J., Chang, A. & Zou, W. (2007). Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology*, 178(11), 6730-3.
- Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E., & Linden, A. (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *Journal of Immunology*. 162, 2347- 2352.
- Langer, S.W. Sehested, M. & Jensen, P.B. (2000). Treatment of anthracycline extravasation with dexrazoxane. *Clinical Cancer Research*, 6(9), 3680-6.
- Lautscham, E.M., Kessler, M., Ernst, T., Willimzig, L. & Neiger, R. (2017). Comparison of a CHOP-LAsp-based protocol with and without maintenance for canine multicentric lymphoma. *Veterinary Record*, 180(18), 303.
- Lebecque, S., Fossiez, F. & Bates, E. (2000). IL-17. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola & J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host*. (pp. 241 – 251). Waltham: Academic Press.
- Lenz, J.A., Robat, C.S. & Stein, T.J. (2016). Vinblastine as a second rescue for the treatment of canine multicentric lymphoma in 39 cases (2005 to 2014). *Journal of Small Animal Practice*, 57(8), 429-34.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25 (4), 402-408.
- Lu, T., Yu, S., Liu, Y., Yin, C., Ye, J., Liu, Z., Ma, D. & Ji, C. (2016). Aberrant Circulating Th17 Cells in Patients with B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *PLoS One*, 11(1).
- Lucroy, M.D., Phillips, B.S., Kraegel, S.A., Simonson, E.R. & Madewell, B.R. (1998). Evaluation of single-agent mitoxantrone as chemotherapy for relapsing canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(5), 325-9.
- Lyon, D.E., McCain, N.L., Walter, J. & Schubert, C. (2008) Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. *Nursing Research*, 57, 51–58.
- MacDonald, V. (2009). Chemotherapy: Managing side effects and safe handling. *Canadian Veterinary Journal*, 50(6), 665–668.
- MacEwen, E.G., Rosenthal, R.C., Fox, L.E., Loar, A.S. & Kurzman, I.D. (1992). Evaluation of L-asparaginase: polyethylene glycol conjugate versus native L-asparaginase combined with chemotherapy. A randomized double-blind study in canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6, 230-4.
- Maloney, D.G. (1999). Preclinical and phase I and II trials of rituximab. *Seminars in Oncology*, 26(14), 74-8.
- Marconato, L., Stefanello, D., Valenti, P., Bonfanti, U., Comazzi, S., Roccabianca, P., Caniatti, M., Romanelli, G., Massari, F. & Zini, E. (2011). Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238, 480–485.

- Marconato, L., Stefanello, D., Sabattini, S., Comazzi, S., Riondato, F., Laganga, P., Frayssinet, P., Pizzoni, S., Rouquet, N. & Aresu, L. (2015). Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma. *Vaccine*, 33, 5080–5086.
- Mauldin, G.E., Fox, P.R., Patnaik, A.K., Bond, B.R., Mooney, S.C. & Matus, R.E. (1992). Doxorubicin-induced cardiotoxicosis. Clinical features in 32 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(2), 82-8.
- McGeachy, M.J. & Cua, D.J. (2008). Th17 cell differentiation: The long and winding road. *Immunity*, 28, 445–453.
- McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A.D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. & Dallaire, B.K. (1998). Rituximab Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy for Relapsed Indolent Lymphoma: Half of Patients Respond to a Four-Dose Treatment Program. *Journal of Clinical Oncology*, 16, 2825-2833.
- Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428–35.
- Meuten, D.J., Cooper, B.J., Capen, C.C., Chew, D.J. & Kociba, G.J. (1981). Hypercalcemia associated with an adenocarcinoma derived from the apocrine glands of the anal sac. *Veterinary Pathology*, 18, 454 – 471.
- Modiano, J.F., Breen, M., Burnett, R.C., Parker, H.G., Inusah, S., Thomas, R., Avery, P.R., Lindblad-Toh, K., Ostrander, E.A., Cutter, G.C. & Avery A.C. (2005). Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Research*, 65, 5654-5661.
- Moore, A.S., London, C.A., Wood, C.A., Williams, L.E., Cotter, S.M., L'Heureux, D.A. & Frimberger, A.E. (1999). Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 395-8.
- Morris, J. & Dobson, J. (2001). Haematopoietic System. In J. Morris, J. Dobson, *Small Animal Oncology*. (pp. 228 – 239). Oxford: Blackwell Science.
- Morris, L.G. & Chan, T.A. (2015). Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*, 121(9), 1357-68.
- Munn, D.H. (2009). Th17 cells in ovarian cancer. *Blood*, 114(6), 1134-5.
- Muraille, E. & Leo, O. (1998). Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scandinavian Journal of Immunology*. 47(1), 1-9.
- Niitsu, N., Okamoto, M., Nakamine, H., Yoshino, T., Tamaru, J., Nakamura, S., Higashihara, M. & Hirano, M. (2002). Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Haematology*, 68, 91 – 100.
- Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H. & Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 101, 2620–2627.

- Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M.T., Kolls, J.K. & Sasaki, H. (2005). IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *Journal of Immunology*, 175, 6177–6189.
- Oleinika, K., Nibbs, R.J., Graham, G.J. & Fraser, A.R. (2013). Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clinical & Experimental Immunology*, 171(1), 36-45.
- Oppenheim, J. & Feldmann, M. (2000). Introduction to the Role of Cytokines in Innate Host Defense and Adaptive Immunity. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola & J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host*. (pp 3 – 20). Waltham: Academic Press.
- Owen, L.N. (1980). TNM classification of tumours in domestic animals. Geneva, *World Health Organization*.
- Page, R.L., Macy, D.W., Oglivie, G.K., Rosner, G.L., Dewhirst, M.W., Thrall, D.E., Withrow, S.J., McEntee, M.C., Cline, J.M., Heidner, G.L., Novotney, C.A. & Gilettes, E.L. (1992). Phase III evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma. *International Journal of Hyperthermia*, 8, 187-97.
- Pan, B., Che, D., Cao, J., Shen, J., Jin, S., Zhou, Y., Liu, F., Gu, K., Man, Y., Shang, L. & Yu, Y. (2015). Interleukin-17 levels correlate with poor prognosis and vascular endothelial growth factor concentration in the serum of patients with non-small cell lung cancer. *Biomarkers*, 20, 232–239.
- Park, H., Li, Z., Yang, X., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. & Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6(11), 1133–1141.
- Passam, F.H., Sfiridaki, A., Pappa, C., Kyriakou, D., Petreli, E., Roussou, P.A. & Alexandrakis, M.G. (2008). Angiogenesis-related growth factors and cytokines in the serum of patients with B non-Hodgkin lymphoma; relation to clinical features and response to treatment. *International Journal of Laboratory Hematology*, 30, 17–25.
- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C. & Ponce, F. (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 301–310.
- Pawlak, A., Rapak, A., Zbyryt, I. & Obmińska-Mrukowicz, B. (2014). The effect of common antineoplastic agents on induction of apoptosis in canine lymphoma and leukemia cell lines. *In Vivo*, 28(5), 843-50.
- Pedersen, L.M., Klausen, T.W., Davidsen, U.H. & Johnsen, H.E. (2005). Early changes in serum IL-6 and VEGF levels predict clinical outcome following first-line therapy in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Hematology*, 84, 510 – 516.
- Penn, I. & Starzl, T.E. (1973). Immunosuppression and Cancer. *Transplant Procedure*, 5(1), 943–947.
- Peruzzi, D., Gavazza, A., Mesiti, G., Lubas, G., Scarselli, E., Conforti, A., Bendtsen, C., Ciliberto, G., La Monica, N. & Aurisicchio, L. (2010). A vaccine targeting

telomerase enhances survival of dogs affected by B-cell lymphoma. *Molecular Therapy*, 18(8), 1559-67.

- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L. & 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. *Veterinary Pathology*, 47, 414–433.
- Price, G.S., Page, R.L., Fischer, B.M., Levine, J.F. & Gerig, T.M. (1991). Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5, 259–262.
- Quesada, J.R., Reuben, J., Manning, J.T., Hersh, E.M., & Gutterman, J.U. (1984). Alpha Interferon for Induction of Remission in Hairy-Cell Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 310, 15-18.
- Reif, J.S., Lower, K.S. & Ogilvie, G.K. (1995). Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *American Journal of Epidemiology*, 141, 352–359.
- Ricklin, D. & Lambris, J.D. (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1265-75.
- Robbins, H.A., Pfeiffer, R.M., Shiels, M.S., Li, J., Hall, H.I. & Engels, E.A. (2015). Excess cancers among HIV-infected people in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(4).
- Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 85(1), 9-18.
- Rosenberg, M.P., Matus, R.E. & Patnaik, A.K. (1991). Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5(5), 268-71.
- Rosol, T.J., Nagode, L.A., Couto, C.G., Hammer, A.S., Chew, D.J., Peterson, J.L., Ayl, R.D., Steinmeyer, C.L. & Capen, C.C. (1992). Parathyroid hormone (PTH)-related protein, PTH, and 1,25-dihydroxyvitamin-D in dogs with cancer-associated hypercalcemia. *Endocrinology*, 131(3), 1157-1164.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Denizot, F. & Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *Journal of Immunology*, 150(12), 5445–5456.
- Saba, C.F., Thamm, D.H. & Vail, D.M. (2007). Combination chemotherapy with L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed or refractory canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(1), 127-32.
- Sakals, S., Peta, H., Fernandez, N. & Allen, A. (2006). Determining the cause of hypercalcemia in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, 47(8), 819–821.
- Salavati, S., Garden, O., Werling, D. & Allenspach, K. (2012). Gene expression of selected signature cytokines of T cell subsets in duodenal tissues of dogs with and without inflammatory bowel disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(1), 87-91.

- Santoro, D., Marsella, R. & Hernandez, J. (2007). Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. *Veterinary Dermatology*, 18(2), 101–106.
- Sauerbrey, M.L., Mullins, M.N., Bannik, E.O., Van Dorp, T.E. Kaneene, J.B. & Obradovich J.E. (2007). Lomustine and prednisone as a first-line treatment for dogs with multicentric lymphoma: 17 cases (2004–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(12), 1866–1869.
- Schenten, D. & Medzhitov, R. (2011). The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Advances in Immunology*, 109, 87-124.
- Schreiber, T.H. & Podack, E.R. (2009). A critical analysis of the tumour immunosurveillance controversy for 3-MCA-induced sarcomas. *British Journal of Cancer*, 101(3), 381-386.
- Shin, H.C., Benbernou, N., Esnault, S. & Guenounou, M. (1999). Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine*, 11(4), 257–266.
- Simon, D., Moreno, S.N., Hirschberger, J., Moritz, A., Kohn, B., Neumann, S., Jurina, K., Scharvogel, S., Schwedes, C., Reinacher, M., Beyerbach, M. & Nolte, I. (2008). Efficacy of a continuous, multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent protocol in dogs with lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(6), 879-85.
- Simon, D., Nolte, I., Eberle, N., Abbrederis, N., Killich, M. & Hirschberger, J. (2006). Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 948–954.
- Smith, L.K. & Cidlowski, J.A. (2010). Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Progress in Brain Research*, 182, 1–30.
- Starrak, G.S., Berry, C.R., Page, R.L., Johnson, J.L. & Thrall, D.E. (1997). Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 38(6), 411-8.
- Steiner, G.E., Newman, M.E., Paikl, D., Stix, U., Memaran-Dagda, N., Lee, C. & Marberger, M.J. (2003). Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate*, 56, 171–182.
- Strehlau, J., Pavlakis, M., Lipman, M., Shapiro, M., Vasconcellos, L., Harmon, W., & Strom, T. B. (1997). Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 695-700.
- Symmons, D.P.M. (1985). Neoplasms of the immune system in rheumatoid arthritis. *American Journal of Medicine*, 78(1), 22-8.
- Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., Sastre-Garau, X., Couturier, J., Mosseri, V., Vives, V., Banchereau, J., Fridman, W.H., Wijdenes, J., Lebecque, S. & Sautès-Fridman, C. (1999). Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Research*, 59(15), 3698–3704.

- Teske, E., Besselink, C.M.L.T., Blankenstein, M.A., Rutteman, G.R. & Misdorp, W. (1987). The occurrence of estrogen and progesterone receptors and anti-estrogen binding sites (AEBS) in canine non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Research*, 7(4), 857-60.
- Teske, E., van Heerde, P., Rutteman, G.R., Kurzman, I.L., Moore, P.F. & MacEwen, E.G. (1994a). Prognostic factors for treatment of lymphoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205(12), 1722 - 1728.
- Teske, E., Wisman, P., Moore, P.F. & van Heerde, P. (1994b). Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Experimental Hematology*, 22(12), 1179 - 1187.
- Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-hodgkin's lymphoma. *Veterinary Quarterly*, 16(4), 209–219.
- Thalheim, L., Williams, L.E., Borst, L.B., Fogle, J.E. & Suter, S.E. (2013). Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1509-16
- Tian, T., Yu, S., Wang, M., Yuan, C., Zhang, H., Ji C & Ma, D. (2013). Aberrant T helper 17 cells and related cytokines in bone marrow microenvironment of patients with acute myeloid leukemia. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 915873.
- Tizard, I.R. (2004). Cytokines and the Immune System. In I.R. Tizard, *Veterinary Immunology: An Introduction* (7th ed.). (pp. 133 – 143). Missouri: Elsevier.
- Tizard, I.R. (2013). Resistance to tumors. In I.R. Tizard, *Veterinary Immunology*. (9th ed.). (pp. 388-399). Missouri: Elsevier.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berge, A., Bruneval, P., Fridman, W.H., Pagès, F. & Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research*, 71(4), 1263–71.
- Turek, M.M., Saba, C., Paoloni, M.C. & Argyle, D.J. (2008) Canine Lymphoma and Leukemia. In: D.J. Argyle, M.J. Brearley & M.M. Turek, *Decision Making in Small Animal Oncology*. (pp. 171 – 183). Malden: Wiley Blackwell.
- Vail, D.M. & Young, K.M. (2007). Hematopoietic Tumors. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen, *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (4th ed). (pp 699-722). Missouri: Saunders Elsevier.
- Vail, D.M. (2011). Tumours of the haemopoietic system. In J. Dobson & B. Lascelles, *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. (3rd ed). (pp 285-303). Gloucester: BSAVA.
- Valerius, K.D., Ogilvie, G.K., Mallinckrodt, C.H. & Getzy, D.M. (1997). Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210(4), 512-6.
- Valli, V.E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E.J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H. & Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas

according to the *World Health Organization* criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198-211.

- Van Kooten, C., Boonstra, J. G., Paape, M. E., Fossiez, F., Banchereau, J., Lebecque, S., Bruijn, J. A., De Fijter, J. W., Van Es, L. A., & Daha, M. R. (1998). Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9, 1526-1534.
- Vendrame, E. & Martínez-Maza, O. (2011). Assessment of pre-diagnosis biomarkers of immune activation and inflammation: insights on the etiology of lymphoma. *Journal of Proteome Research*, 10(1), 113-9.
- Vicini, D.S., Oglivie, G.K., Katzenellenbogen, I. & Carlson, K. (1991). Measurement of estrogen receptors in normal and neoplastic lymph node tissue from dogs. *Journal of Veterinary Research*, 52(12), 2055-9.
- Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H.M., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A.G., Amin, A., Helderich, W.G., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Keith, W.N., Bilsland, A., Bhakta, D., Halicka, D., Fujii, H., Aquilano, K., Ashraf, S.S., Nowsheen, S., Yang, X., Choi, B.K. & Kwon, B.S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, 185-98.
- Yang, Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.W. & Ansell, S.M. (2009). Malignant B Cells Skew the Balance of Regulatory T Cells and Th17 Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Research*, 69(13), 5522-5530.
- Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau, M.R., Cohen, J.I. & Spriggs, M.K. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3(6), 811-21.
- Waldmann, T.A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nature Medicine*, 9(3), 269–277.
- Wang, S.L., Lee, J.J. & Liao, A.T. (2016). Comparison of efficacy and toxicity of doxorubicin and mitoxantrone in combination chemotherapy for canine lymphoma. *Canadian Veterinary Journal*, 57(3), 271-6.
- Wang, X., Zhao, H.R., Gu, X., Liu, P. & Bikmituofu, H. (2011). Plasma interleukin-6 and interleukin-10 levels in different subtypes of lymphoma and their clinical significance. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao*, 31(8), 1360–1364.
- Weiden, P.L., Storb, R., Kolb, H.J., Ochs, H.D., Graham, T.C., Tsoi, M.S., Schroeder, M.L. & Thomas, E.D. (1974). Immune reactivity in dogs with spontaneous malignancy. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(4), 1049-56.
- Weller, R.E., Theilen, G.H. & Madewell, B.R. (1982). Chemotherapeutic responses in dogs with lymphosarcoma and hypercalcemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181(9), 891-3.
- Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(2), 76-104.
- Zhang, J.M. & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27-37.

- Zhang, J.P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.H., Chen, M.S., Li, L., Wu, C., Li, S.P. & Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Hepatology*, 50(5), 980-9.
- Zhang, Q., Liu, S., Parajuli, K.R., Zhang, W., Zhang, K., Mo, Z., Liu, J., Chen, Z., Yang, S., Wang, A.R., Myers, L. & You, Z. (2017). Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*, 36(5), 687-699.
- Zhou, Y., Toh, M.L., Zrioual, S. & Miossec, P. (2007). IL-17A versus IL-17F induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Cytokine*, 38, 157–164.
- Zhu, X., Mulcahy, L.A., Mohammed, R.A., Lee, A.H., Franks, H.A., Kilpatrick, L., Yilmazer, A., Paish, E.C., Ellis, I.O., Patel, P.M. & Jackson, A.M. (2008). IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research*, 10, 95–106.

Anexo I – Abstract da comunicação oral “Clinical and immunological characterization of naturally occurring canine lymphoma”

Dias, J.1, Gil, S.1, Lopes, M.1, Aguiar, S.1, André, A.1, Peleteiro, C.1, Vicente, G.2, Duarte, A.1, Mateus, L.1, Tavares, L.1 and Aires-da-Silva, F.1

1. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal.

2. Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal.

Lymphoma is one of the most common tumors in dogs and its frequency is increasing. Canine lymphoma is a heterogeneous group of malignancies with a wide variation in clinical presentations and histological subtypes. Despite this potential variation, most dogs present generalized lymphadenopathy (multicentric form) and intermediate to high-grade lymphoma, most frequently of B-cell origin. Currently, chemotherapy is the treatment of choice for canine lymphoma and no target therapy is available. Most dogs that achieve remission will relapse or present recrudescence of lymphoma and will eventually die. Considering the success achieved using monoclonal antibodies (mAbs) in the treatment of lymphoma in humans and the significant similarities with non-Hodgkin human lymphoma, the scientific community has pursued the development of similar treatment options for canine lymphoma. Advances in antibody engineering were a major breakthrough, nevertheless increase understanding of how immunity, tolerance and immunosuppression work together to promote an anti-tumor immune response also contributed largely for immunotherapy success. Therefore, this study aims to develop an important fundamental research regarding immune profile characterization of canine naturally occurring lymphoma. Briefly, a canine lymphoma biobank was constructed from lymph nodes and blood collected from dogs diagnosed with naïve multicentric lymphoma. Study samples included: Lymphoma group - 22 lymph node biopsies and 18 PBMC and Control group – 8 lymph node biopsies and 9 PBMCs from healthy dogs. For total RNA extraction, lymph node and PBMC samples were processed using RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer’s instruction. In order to eliminate possible contaminant DNA, total RNA samples were subjected to DNase treatment. Thereafter, cDNA was synthesized and used as a template. To consolidate previous studies, pro-inflammatory (TNF α , IL1), Th1 (IL12, IL2, IFN γ), Th2 (IL4, IL6, IL10) and Th17 (IL17) cytokine relative expression were assessed by real-time qPCR. RPL27 was set as the housekeeping gene. The qPCR assays comprised, in each reaction, 2 μ l of each primer (final concentration of 100 nM), 2 μ l of cDNA (1ng) , 4 μ l of sterile water and 10 μ l of SYBr (Applied Biosystems) in a total volume of 20 μ l per reaction. .Real-time qPCR was performed using the StepOne Plus

realtime analyzer (Applied Biosystems), using the universal temperature cycles as suggested by the manufacturer. The melting curves obtained after each qPCR were used to verify the specificity of each amplicon. For analysis purposes, the delta–delta ct method was used as described by Perkin-Elmer Applied Biosystems to determine the relative levels of mRNA expression between lymphoma group and control group experiments. Preliminary results suggest that lymph node affected with lymphoma presented an increase of IL1 β , IL6, IL8, and IL17 mRNA expression and a decrease of IL2, IL4 and IL12 mRNA expression, when compared with healthy lymph nodes. Overall these preliminary data demonstrated that dogs with lymphoma have an imbalance in pro-and anti-inflammatory cytokine production. Therefore, immunotherapy strategies that target and regulate these cytokines might become a promising tool in the treatment of canine lymphoma.

1. Anderson, K.L. & Modiano, J.F. (2015). Progress in Adaptive Immunotherapy for Cancer in Companion Animals: Success on the Path to a Cure. *Vet. Sci.* 2, 363– 387.
2. Axiak-Bechtel, S.; Fowler, B., Yu, D.H., Amorim, J., Tsuruta, K. & DeClue, A. (2014) Chemotherapy and remission status do not alter pre-existing innate immune dysfunction in dogs with lymphoma, *Res. Vet. Sci.*, 97, pp. 230–237.
3. Marconato, L., Gelain, E. & Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review, *Hematological Oncology*, 31 (1), 1–9.
4. Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Vet. Q.* 36, 76–104.

Anexo II: Resumo do poster “Avaliação da sobrevivência associada a um protocolo de 12 semanas de Vinblastina + Prednisolona em comparação com o protocolo convencional de 8 semanas no tratamento de cães com mastocitoma de alto grau”

Mariana Lopes^(a), Ana Sá^(a), Tiago Gaspar^(a), Ana Rita Serras^(a), Joaquim Henriques^(a)
^(a)Hospital Veterinário Berna, Lisboa, Portugal

O mastocitoma é um tumor com localização principal na pele que é diagnosticado com frequência em cães. É caracterizado por um comportamento biológico imprevisível, podendo em alguns casos levar à morte dos animais devido aos síndromes paraneoplásicos associados. Um dos protocolos de quimioterapia utilizados no tratamento de cães com mastocitomas de alto grau é a combinação de prednisolona oral com vinblastina em quatro sessões semanais seguidas de quatro sessões quinzenais.

O objectivo do presente estudo é comparar a eficácia de um protocolo combinado de vinblastina com prednisolona de oito sessões semanais seguidas de quatro sessões quinzenais com o protocolo que está descrito de quatro sessões semanais seguidas de quatro sessões quinzenais, para o tratamento de mastocitomas de alto grau em cães. Foram elegíveis para o presente estudo 28 cães (16 fêmeas e 12 machos) diagnosticados com mastocitoma de grau Patnaik II e III e com uma idade média de 9 anos (de 5 a 14 anos).

Verificou-se que taxa de sobrevivência mediana de cães diagnosticados com mastocitomas de grau II e III e tratados com o protocolo combinado de 8 sessões semanais seguidas de 4 sessões quinzenais foi de 297 dias (de 75 a 1389 dias) e a taxa de sobrevivência média foi de 439 dias, com 54% dos animais com uma sobrevida superior a um ano, 25% com uma sobrevida superior a dois anos e 18% com uma sobrevida superior a três anos. Comparativamente, o que está descrito para o protocolo de 4 sessões semanais seguidas de 4 sessões quinzenais é de uma taxa de sobrevivência mediana de 331 dias, com 45% dos animais com uma sobrevida entre um e dois anos para mastocitomas de grau III, num estudo efectuado com 41 casos. Num follow-up mediano de 573 dias, a taxa de sobrevivência mediana não foi atingida para a população total de animais com mastocitomas de grau II.

Os resultados obtidos são comparáveis com os estudos anteriores relativamente a mastocitomas de grau III. No entanto, seria interessante um estudo prospectivo para tentar indentificar alguns estadios de mastocitomas que possam beneficiar de um protocolo de quimioterapia mais prolongado.

1. Thamm, D.H.; Mauldin, E.A. & Vail, D.M. (1999). Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumor—41 Cases (1992–1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 491-7.
2. W. Misdorp. (2004). Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Veterinary Quarterly*, 26:4, 156-169.
3. Rassnick, K.M.; Bailey, D.B.; Flory, A.B.; Balkman, C.E.; Kiselow, M.A.; Intile, J.L. & Autio, K. (2008). Efficacy of Vinblastine for Treatment of Canine Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 1390–1396.
4. Webster, J.D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Thamm, D.H.; Hamilton, E. & Kiupel, M. (2008). Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Veterinary Research*, 4, 32.

Anexo III – Dados dos animais diagnosticados com linfoma canino pertencentes ao grupo em estudo.

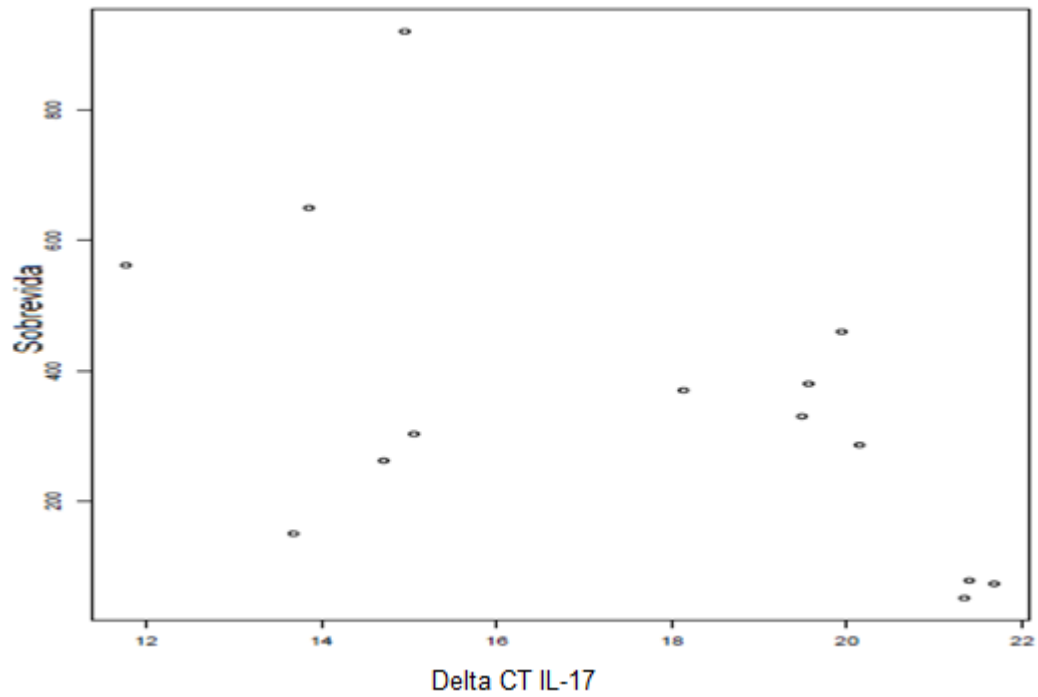
Animal	Idade	Sexo	Raça	Estadio WHO	Imunohistoquímica
A1	12	M	Schnauzer	Vb	B
A2	15	M	Indeterminada	Vb	T
A3	8	M	Labrador	Vb	B
A4	12	M	Labrador	Vb	Nem B nem T
B1	6	M	Rottweiler	IVb	B
B2	6	F	Basset Hound	IVb	B
B3	12	F	Pittbull	Vb	B
B4	12	F	Husky	Vb	B
B5	8	M	Indeterminada	IVb	B
B6	11	F	Indeterminada	Ila	B
B7	9	F	Boxer	Vb	B
B8	7	M	xPointer	IVa	B
B9	17	F	Indeterminada	IVb	B
B10	3	F	Pastor Alemão	IVb	B
B11	8	M	Indeterminada	IVb	B
B13	9	M	Indeterminada	IVb	T
B14	4	M	Golden Retriever	IVb	B
B15	8	M	Beagle	IVb	T
B16	5	M	Labrador	IVb	B
B17	9	F	Caniche	Vb	B
B18	11	F	Doberman	Vb	B
B19	9	M	Galgo Afegão	Vb	B

Anexo IV – Animais incluídos na análise da correlação entre a sobrevivência dos animais com linfoma e as quantificações de IL-17 no linfonodo e no sangue e respectiva sobrevivência

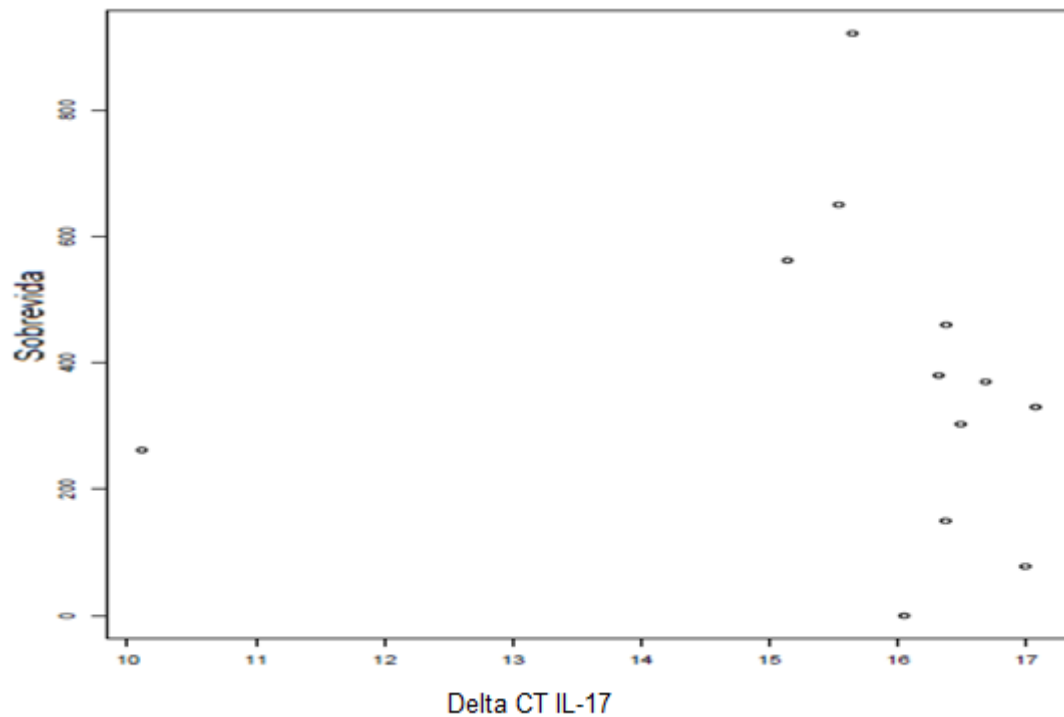
Animal	Sobrevivência (dias)
A1	69
A3	40
A4	42
B1	650
B2	303
B3	380
B5	921
B6	262
B7	330
B8	460
B9	78
B10	150
B11	562
B14	370
B15	185
B16	286
B17	51
B18	73

Anexo V – Gráficos relativos às correlações entre a sobrevivência dos animais com linfoma B e linfoma T e as quantificações de IL-17 no linfonodo e no sangue.

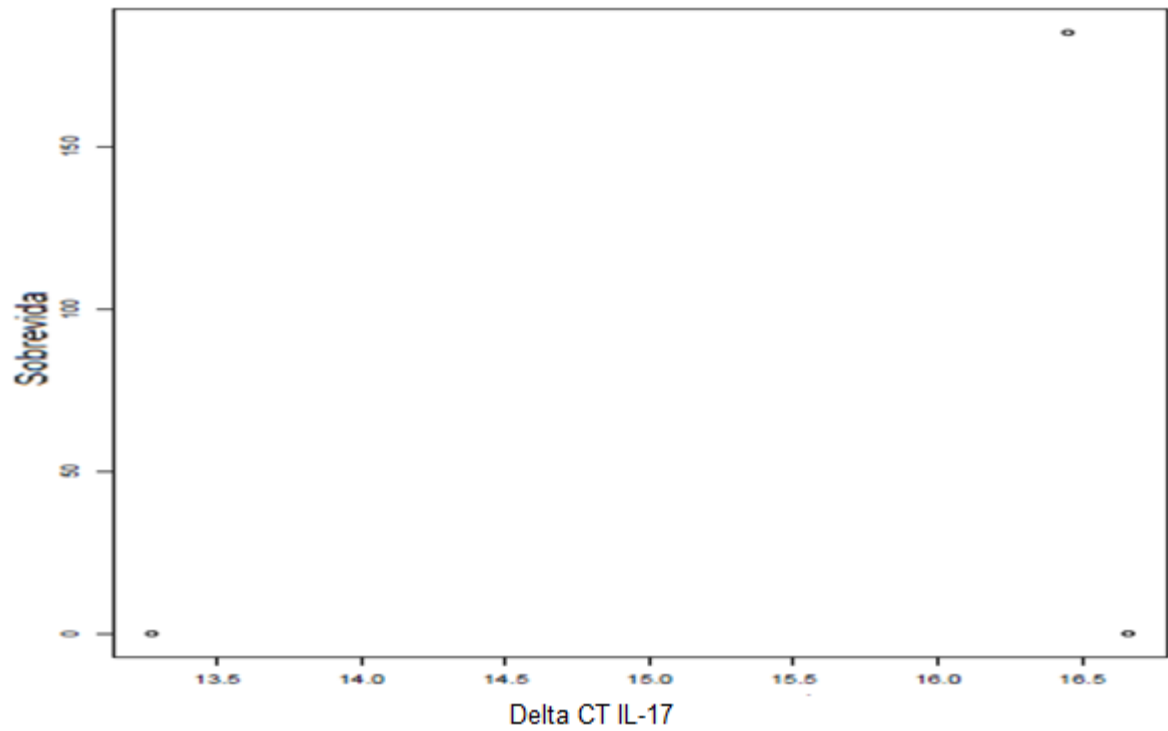
Correlação entre os valores de sobrevivência dos animais com linfoma B e a quantificação de IL-17 no linfonodo.



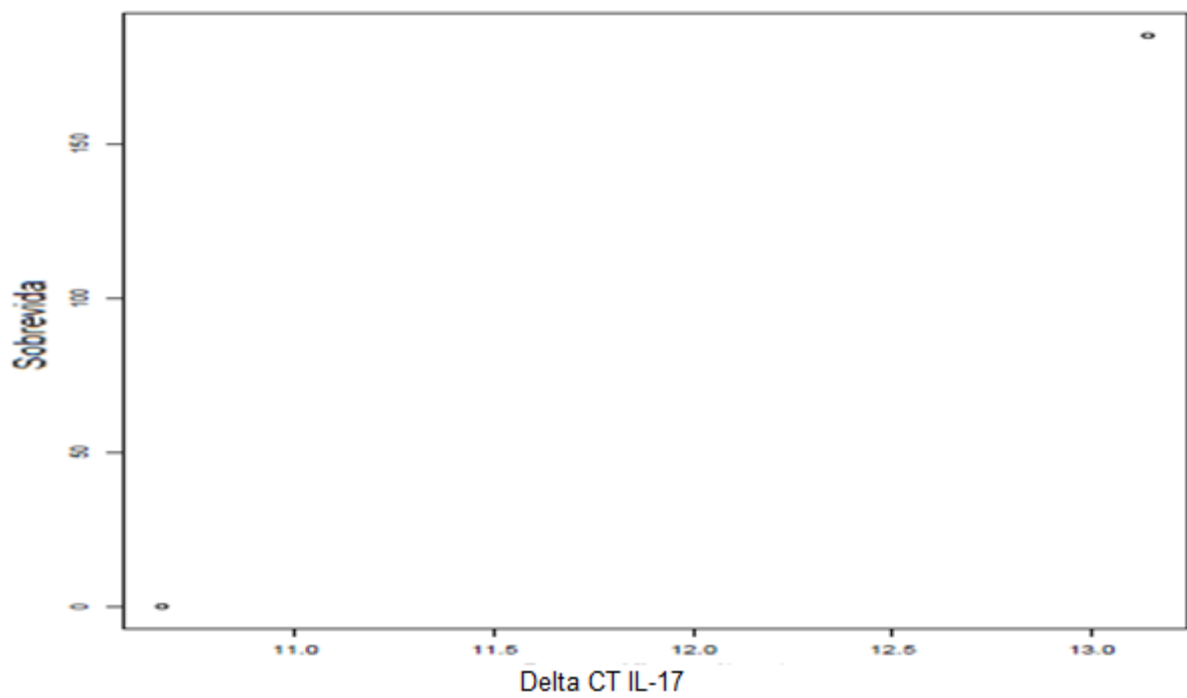
Correlação entre os valores de sobrevivência dos animais com linfoma B e a quantificação de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico.



Correlação entre os valores de sobrevivência dos animais com linfoma T e a quantificação de IL-17 no linfonodo.

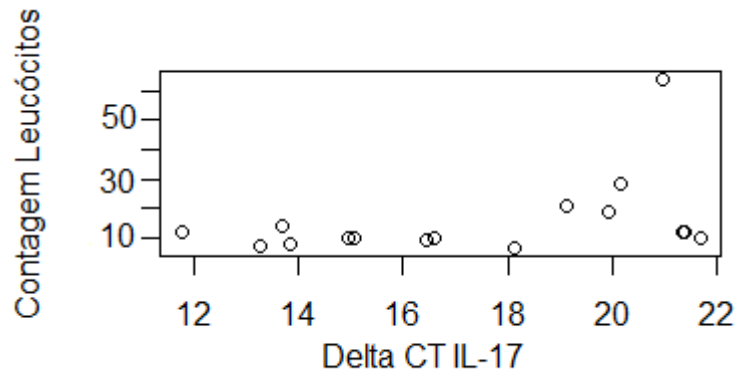


Correlação entre os valores de sobrevivência dos animais com linfoma T e a quantificação de IL-17 nas células mononucleares do sangue periférico.

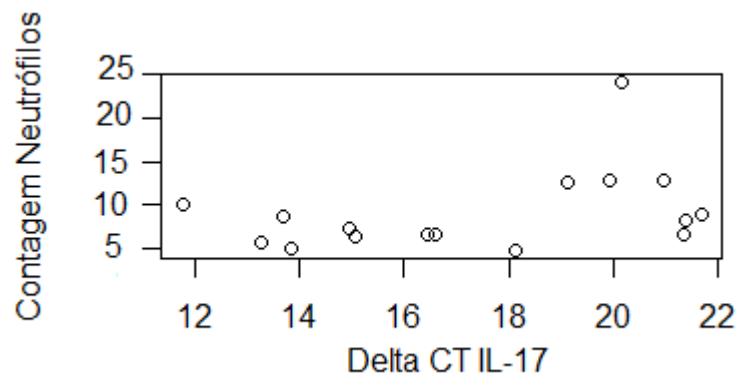


Anexo VI - Gráficos relativos às correlações entre os valores de hemograma dos animais com linfoma e as quantificações de IL-17 no linfonodo e no sangue.

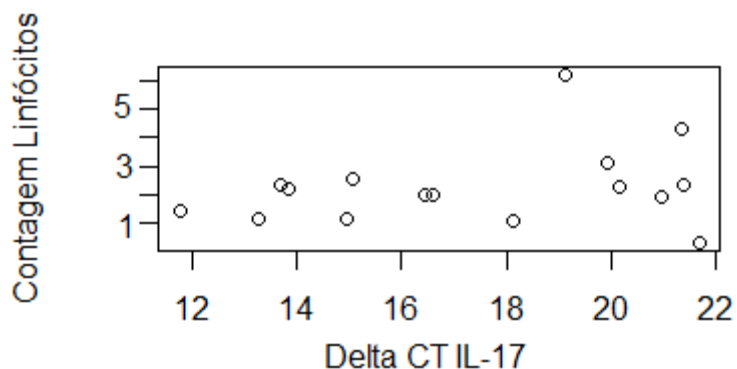
Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo dos animais com linfoma e a sua contagem de leucócitos ($\times 10^3$).



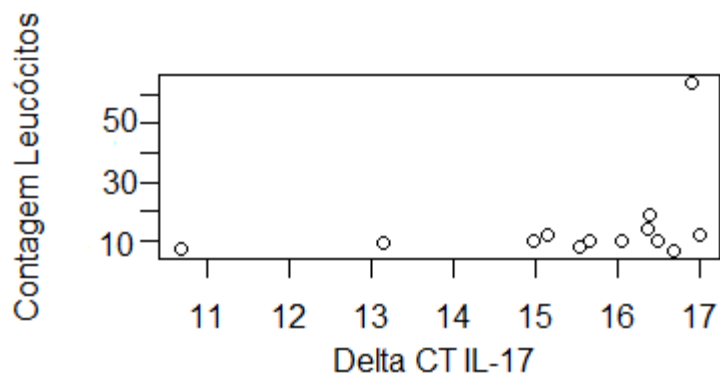
Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo dos animais com linfoma e a sua contagem de neutrófilos ($\times 10^3$).



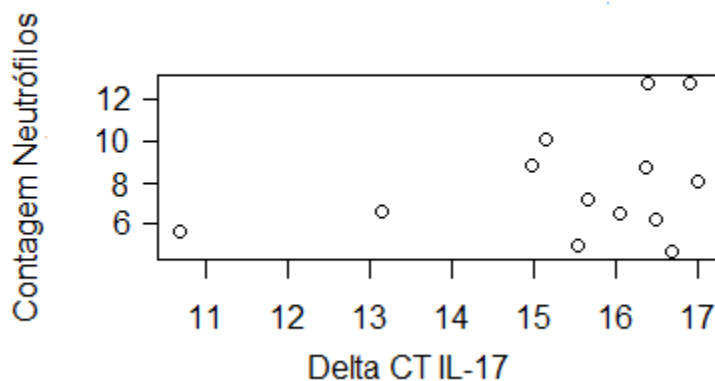
Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 no linfonodo dos animais com linfoma e a sua contagem de linfócitos ($\times 10^3$).



Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células polimorfonucleadas do soro dos animais com linfoma e a sua contagem de leucócitos ($\times 10^3$).



Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células polimorfonucleadas do soro dos animais com linfoma e a sua contagem de neutrófilos ($\times 10^3$).



Correlação entre os valores de Δ CT correspondentes à expressão de IL-17 nas células polimorfonucleadas do soro dos animais com linfoma e a sua contagem de linfócitos.

