

Contributo para o Estudo do Processo de Regressão do Histiocitoma Cutâneo Canino

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Marta de Jesus dos Santos Pereira

Orientador Científico: Professora Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires

Co-Orientador Científico: Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vila Real, 2009

Contributo para o Estudo do Processo de Regressão do Histiocitoma Cutâneo Canino

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Marta de Jesus dos Santos Pereira

Orientador Científico: Professora Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires

Co-Orientador Científico: Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vila Real, 2009

Mestranda:

(Marta de Jesus dos Santos Pereira)

Orientador:

(Professora Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires)

Co-Orientador:

(Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga)

Aos meus Pais,

RESUMO

O histiocitoma cutâneo canino (HCC) é um tumor histiocítico benigno, com origem nas células de Langerhans. Geralmente, ocorre como uma lesão solitária, frequente em animais jovens, não metastiza e sofre, na grande maioria das vezes, regressão espontânea.

Com o objectivo de contribuir para a compreensão do processo de regressão do histiocitoma, foram analisados 166 tumores classificados como histiocitoma cutâneo canino, recolhidos dos arquivos do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (LHAP-UTAD). De cada um deles, foram registados os dados referentes ao animal (idade, sexo e raça) e os dados referentes ao tumor (localização e tamanho) tendo sido feita, posteriormente, uma avaliação das lesões na coloração de rotina com hematoxilina-eosina, relativamente aos parâmetros histopatológicos definidos, nomeadamente padrão de crescimento, ulceração, infiltração inflamatória linfóide, grau de pleomorfismo nuclear, índice mitótico, estroma, necrose, células multinucleadas, foliculite/furunculose e vasculite. Baseado no grau de infiltração linfóide, foram classificados em 4 grupos tumorais, representando diferentes estádios da regressão tumoral. Para elucidar um pouco mais acerca dos mecanismos implicados na imunidade anti-tumoral, foram pesquisados, através da técnica de imunohistoquímica, linfócitos T e linfócitos B, usando, como marcadores, o CD3 e o CD79, respectivamente.

Na série de neoplasias estudada o histiocitoma cutâneo canino constituiu um tumor cutâneo solitário, encontrado com maior frequência em animais com menos de 2 anos de idade, de várias raças e cuja localização preferencial se situou ao nível da cabeça e extremidades distais dos membros.

As características apresentadas revelaram que o HCC é um tumor benigno, que, apesar de ser bastante proliferativo, não apresenta um fenótipo invasor.

A regressão nos histiocitomas esteve relacionada com a ulceração ($p=0,023$), o índice mitótico ($p<0,001$), o estroma ($p<0,001$), a quantidade ($p<0,001$) e localização da necrose ($p<0,0001$) e a presença de células multinucleadas ($p<0,001$). Os tumores com maior quantidade de linfócitos, ou seja, com maior evolução no processo de regressão, apresentaram úlceras de maior tamanho, áreas de maior quantidade e extensão de necrose, menor índice mitótico, estroma mais abundante e maior quantidade de células multinucleadas. A típica regressão dos histiocitomas esteve, também, relacionada com

um aumento progressivo de linfócitos B e T, desde a periferia basolateral até ao centro e superfície do tumor.

A regressão tumoral parece ser um processo condicionado por diferentes factores, dos quais se destacam a necrose e a diminuição da proliferação celular.

ABSTRACT

Canine cutaneous histiocytoma is a benign epidermotropic tumour of Langerhans cells which is very frequent in young dogs, associated to spontaneous regression.

In order to contribute to the understanding of the histiocytoma regression, 166 tumours from LHAP-UTAD archives, classified as canine cutaneous histiocytoma, were analysed. From each tumour we analysed clinical parameters, such as sex, age and animal breed, as well as the size and location of the lesions. Histologically, we evaluated the growth pattern, ulceration, nuclear grade, mitotic index, stroma, necrosis, multinucleated cells, folliculitis/furunculosis and vasculitis. The lymphoid infiltration was also evaluated, leading to the histiocytoma categorization into 4 histological groups. To elucidate further the mechanisms of the antitumour immune response, CD3 and CD79 inflammatory cells were differentiated by immunohistochemistry.

The tumours occurred mainly in young animals, less than 2 years, of different breeds. The lesions were unique, and were situated more frequently in the head and the extremities.

Microscopically, CCH is a benign tumour, with an elevated proliferation, but with a non invasive phenotype.

CCH regression appears associated with ulceration ($p=0,023$), mitotic index ($p=0,001$), stroma ($p<0,001$), necrosis ($p<0,001$) and multinucleated cells ($p<0,001$). Tumours with a higher lymphoid infiltration (the regression tumours) showed ulcers of greater size, prominent necrosis, mitotic index lower, more abundant stroma and greater quantity of multinucleated cells. The typical regression of histiocytoma was also related to a progressive increase of B and T lymphocytes, from the basolateral periphery to the center and surface of the tumor.

The regression appears as a multifactorial process justified by the interaction among different factors that we have analysed, like necrosis and decrease of cellular proliferation.

ÍNDICE GERAL

Resumo e Abstract	iii
Índice Geral	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Quadros	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas	ix
Agradecimentos	x
1. Introdução	1
1.1 A Epiderme	1
1.2 Os Histiócitos	1
1.2.1 As Células Dendríticas	2
1.2.2 As Células de Langerhans	2
1.3 As Doenças Histiocíticas no Cão	3
1.3.1 A Histiocitose Reactiva	4
1.3.2 O Sarcoma Histiocítico	5
1.3.3 O Histiocitoma Cutâneo Canino	6
1.4 O Diagnóstico do HCC	8
2. Objectivos	11
3. Material e Métodos	12
3.1 Material	12
3.2 Métodos	12
3.2.1 Avaliação Clínica	12
3.2.2 Avaliação das Características Histopatológicas	12
3.2.3 Avaliação do Infiltrado Inflamatório Linfóide por Técnicas de Imunohistoquímica	14
3.2.4 Análise Estatística	15
4. Resultados	16
4.1 Avaliação Clínica	16
4.2 Avaliação Histopatológica	21
4.3 Avaliação do Infiltrado Inflamatório Linfóide por Imunohistoquímica	28
4.4 Análise Comparativa entre os Grupos Histológicos	29
5. Discussão	33
6. Conclusão	44
Referências Bibliográficas	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aspiração por agulha fina de um histiocitoma cutâneo canino. São observadas células com núcleo redondo, oval a endentado, por vezes excêntrico, e citoplasma moderado, pálido e granular. Estalão=20 µm.	8
Figura 2: Aspecto macroscópico do histiocitoma cutâneo canino no pavilhão auricular de um canídeo da raça Retriever do Labrador (à direita) e respectiva ampliação (à esquerda).....	16
Figura 3: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por sexo.	17
Figura 4: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por idade.	17
Figura 5: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por raça.	18
Figura 6: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por tamanho (diâmetro) da lesão.....	19
Figura 7: Distribuição topográfica dos histiocitomas cutâneos caninos.	19
Figura 8: Invasão da epiderme pelas células neoplásicas com formação de ninhos intra-epidérmicos que lembram os agregados de Pautrier: a) Estalão= 60 µm; b) Estalão= 30 µm.	21
Figura 9: Extensas zonas de necrose num histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico III: a) Estalão= 300 µm; b) Estalão=60 µm.	22
Figura 10: Hiperplasia pseudocarcinomatosa da epiderme de um histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico III. Estalão=300 µm.	23
Figura 11: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico I. Células de contornos indistintos e núcleos vesiculados com nucléolo ocasional. Figuras de mitose abundantes. Estalão=30 µm.	24
Figura 12: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico II. O infiltrado linfóide forma folículos à periferia do tumor. Estalão=300 µm.	24
Figura 13: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico III. O infiltrado linfóide é abundante no centro e na periferia do tumor. Estalão=300 µm.	25
Figura 14: a) Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico IV. O infiltrado linfóide chega a atingir a junção dermo-epidérmica. Estalão=300 µm; b) Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico IV onde se observa um infiltrado linfóide mais abundante do que as células tumorais. Estalão=30 µm.	26
Figura 15: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico IV com marcada formação de tecido fibroso sub-epidérmico. Estalão =	26

Figura 16: Imunoreactividade para o CD3 em linfócitos T. **a)** Histiocitoma cutâneo canino do grupo II. Estalão=30 µm; **b)** Histiocitoma cutâneo canino do grupo IV. Estalão=120 µm. 28

Figura 17: Imunoreactividade para o CD79⁺ em linfócitos B. **a)** Histiocitoma cutâneo canino do grupo II. Estalão=120 µm; **b)** Histiocitoma cutâneo canino do grupo VI. Estalão=30 µm. 29

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Características citológicas dos tumores de células redondas mais frequentes no cão.. 9

Quadro 2: Variáveis clínicas e respectivas frequências absolutas e relativas. 20

Quadro 3: Grupos histológicos (adaptado de Cockerell e Slauson, 1979). 23

Quadro 4: Frequência relativa e absoluta dos histiocitomas cutâneos caninos relativamente aos diferentes parâmetros histológicos. 27

Quadro 5: Associação entre o grupo histológico e as variáveis clínicas. 30

Quadro 6: Associação entre o grupo histológico e as variáveis histológicas. 31

Quadro 7: Frequência relativa e absoluta dos histiocitomas cutâneos caninos relativamente à marcação por linfócitos T CD3 e CD79 e respectivas associações estatísticas. 32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ARNm - Ácido ribonucleico mensageiro
- CCB - Carcinoma das células basais
- CD - *Cluster differentiation*
- cm - Centímetro
- DHP - Doenças histiocíticas proliferativas
- GM-CSF - *Ggranulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Factor de estimulação de colónias granulócito-macrofágicas)
- HC - Histiocitose cutânea
- HCC - Histiocitoma cutâneo canino
- HE - Hematoxilina-eosina
- HS - Histiocitose sistémica
- ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular-1
- IFN- γ - Interferão-gamma
- Ig - Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- LHAP-UTAD - Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
- M-CSF - *Macrophage colony-stimulating factor* (Factor de estimulação de colónias de macrófagos)
- MHC - *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)
- mm - Milímetro
- NK - *Natural killer*
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBS - *Phosphate-Buffered Saline* (Tampão fosfato salino)
- PCR - *Polymerase chain reaction* (Reacção em cadeia da polimerase)
- SALT - *Skin-associated lymphoid tissue* (Tecido linfóide associado à pele)
- SH - Sarcoma histiocítico
- SHH - Sarcoma histiocítico hemofagocítico
- SNC - Sistema nervoso central
- TGF- β - *Transforming growth factor-beta* (Factor de crescimento transformador-beta)
- TNF- α - *Tumor necrosis factor-alpha* (Factor de necrose tumoral-alpha)
- UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
- UV - Ultravioleta
- VLA-4 - Antígeno de activação tardia-4
- μm - Micrómetro

AGRADECIMENTOS

Ao terminar esta tese de mestrado resta-me registar os meus sinceros agradecimentos às individualidades que, de várias formas, contribuíram para que esta se tornasse numa realidade.

À Professora Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires, pela competência com que orientou esta minha tese e o tempo que generosamente me dedicou, transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos com paciência, compreensão e confiança. Pela cordialidade com que sempre me recebeu e pela sua crítica sempre tão atempada, como construtiva. Estou-lhe muito, muito grata.

À Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga, por toda a dedicação, compreensão, discussão de ideias e amizade patenteadas, pelos desafios cada vez mais complexos que me foi colocando ao longo da realização deste trabalho.

Estou grata a ambas, pelo estímulo e exigência impostos à medida que caminhávamos para a conclusão do trabalho e, também, pela liberdade de acção que me conceberam, decisiva para o meu desenvolvimento pessoal.

Ao Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e professoras que nele desempenham, incansavelmente, um excelente trabalho, nomeadamente à Prof. Doutora Anabela Gouveia Antunes Alves, à Prof. Doutora Fernanda Aurora Gomes de Seixas Travassos, à Prof. Doutora Justina Marta Prada Oliveira e à Prof. Doutora Maria dos Anjos Clemente Pires, pela amável disponibilidade com que sempre me receberam.

Aos meus pais, pela sólida formação obtida até à minha juventude, por todo o esforço e sacrifício que passaram para me proporcionar a continuidade nos estudos, por todo o apoio, carinho, amizade e orgulho que sempre mostraram em relação ao sonho de me vir a tornar Médica Veterinária. Aqui lhes deixo os meus mais eternos agradecimentos.

Ao meu namorado, Nuno Filipe Pereira Gomes, por todo o carinho, apoio, companheirismo e paciência nos momentos de maior stress. O meu muito obrigado por todos os sorrisos e abraços sinceros, pela presença sempre tão gratificante e que em muito contribuiu para o que sou hoje. Sem dúvida que, sem a sua presença, nada teria sido possível.

À minha irmã, Andreia de Jesus dos Santos Pereira, pelo apoio e amizade que sempre demonstrou, mesmo estando longe.

Aos meus amigos e colegas do Hospital Veterinário da Figueira da Foz, nomeadamente à Dra. Ana Petra Costa, Dra. Ana Silva, Dr. Nuno Nazário, Dr. Ricardo Aleixo, Dr. Romano, Dra. Sara Dias e Dra. Teresa Teigão, pelas oportunas manifestações de companheirismo e encorajamento, pelo incentivo e partilha de saber que nunca deixaram de demonstrar.

A todos do Hospital Veterinário da UTAD, em especial à Dra. Teresa Santos Sargo, pela excelente orientação e por todos os momentos de aprendizagem, incentivo e companheirismo que sempre me proporcionou. Ao Dr. João Machado e ao Dr. Humberto, por toda a paciência e disponibilidade com que aceitaram a minha iniciativa, pelo seu saber, a sua colaboração e apoio crítico. A estes, a todos os internos e companheiras de estágio, o meu muito obrigado pelos bons momentos, pela companhia e por todas as palavras amigas.

Finalmente, a todos os que tornaram, directa e indirectamente, possível a execução deste trabalho.

A todos o meu profundo agradecimento.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Epiderme

A epiderme é considerada uma barreira efectiva entre o meio exterior e o ambiente interno do organismo, desempenhando, também, uma importante função na resposta imunitária aos factores externos com que interage. Para que o sistema imunitário adquira a capacidade para responder a esses factores externos, estes têm que ser reconhecidos, isto é, os antigénios têm de sofrer um processamento prévio para serem depois apresentados aos linfócitos. Geralmente, são os macrófagos os responsáveis por esse processamento, no entanto, eles não estão normalmente presentes na epiderme, sendo essa função desempenhada por outras células da pele: as células de Langerhans e os queratinócitos (Scott *et al.*, 1969). Estes dois tipos celulares, juntamente com os linfócitos T epidermotrópicos e os gânglios linfáticos periféricos, responsáveis pela drenagem cutânea, formam um sistema integrado de tecido linfóide associado à pele (SALT – *skin-associated lymphoid tissue*) responsável pela imunovigilância da pele (Scott *et al.*, 2001).

1.2 Os Histiócitos

Os **histiócitos** são células pertencentes ao grupo dos leucócitos e incluem os macrófagos e vários tipos de células dendríticas (Moore, 2004). Estão localizados em diferentes tecidos e desempenham um papel fundamental no funcionamento do sistema imunitário (Fulmer e Mauldin, 2007). Estas células têm como origem as células mãe precursoras da medula óssea CD34⁺, que sob a influência de determinadas citocinas e factores de estimulação, nomeadamente o GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e o TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*), se diferenciam em células dendríticas (Curti *et al.*, 2001; Withrow e Vail, 2007), com diferente fenótipo, distribuição e função (Gross *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de macrófagos a partir das mesmas células precursoras CD34⁺ é influenciado pelos factores GM-CSF e M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Os monócitos circulantes podem dar origem tanto a macrófagos, sob a influência de M-CSF, como a células dendríticas, influenciados pela GM-CSF e interleucina-4 (IL-4) (Ettinger e Feldman, 2005).

1.2.1 As Células Dendríticas

As células dendríticas incluem as células dendríticas epidérmicas ou células de Langerhans, as células dendríticas intersticiais, localizadas em vários órgãos, e as células dendríticas interdigitadas, nos órgãos linfóides periféricos (Ettinger e Feldman, 2005; Fulmer e Mauldin, 2007). São as chamadas células “apresentadoras de antígeno profissionais”, sendo responsáveis pela iniciação da resposta imune (Withrow e Vail, 2007), tendo uma forte influência no sistema imunitário específico ou adquirido (Jubb *et al.*, 2007).

Nos tecidos periféricos, as células dendríticas apresentam-se num estado imaturo o que vai permitir uma captura eficiente dos antígenos (Curti *et al.*, 2001). Posteriormente, as células dendríticas adquirem a capacidade de migrar para os gânglios linfáticos onde se diferenciam em células dendríticas maduras, caracterizadas por uma baixa actividade fagocitária e alto potencial na apresentação antigénica (Curti *et al.*, 2001).

As células dendríticas envolvidas em alterações proliferativas dos histiócitos que afectam a pele têm origem, fundamentalmente, nas células de Langerhans ou nas células dendríticas intersticiais/da derme (Gross *et al.*, 2005).

As células dendríticas expressam abundantemente CD1, que, em conjunto com as moléculas MHC (*major histocompatibility complex*) classe I e II, são responsáveis pela apresentação de péptidos, lípidos e glicolípidos às células T (Moore, 2004; Ettinger e Feldman, 2005). Destas moléculas, a CD1 é praticamente restrita às células dendríticas, enquanto as moléculas de MHC são expressas por um maior número de tipos celulares (Moore, 2004).

Diferentes moléculas de adesão, nomeadamente integrinas β -2 (CD11/CD18), são, também, marcadores importantes na diferenciação leucocitária, já que os macrófagos e as células dendríticas do cão expressam CD11/CD18, sendo o CD11c frequentemente expresso pelas células dendríticas e o CD11b pelos macrófagos (Ettinger e Feldman, 2005), ou CD11d no caso dos macrófagos residentes na polpa vermelha esplénica ou na medula óssea (Moore, 2004).

1.2.2 As Células de Langerhans

As **células de Langerhans** são células mononucleares dendríticas que se localizam a nível suprabasal, na epiderme, entre os queratinócitos (Gross *et al.*, 2005), actuando no processamento de antígenos (Scott *et al.*, 2001). Ligam-se aos antígenos ao nível da epiderme e apresentam-nos, posteriormente, no tecido linfóide (gânglio linfático) onde os linfócitos T são

activados. A ligação aos antígenos pode ser feita directamente à membrana celular, através de receptores especializados como as moléculas de MHC (Scott *et al.*, 1969), que se ligam aos fragmentos pépticos das proteínas estranhas para os apresentar às células T (Kumar *et al.*, 2005).

A distinção entre as células de Langerhans e as células dendríticas intersticiais é possível através da expressão da Caderina E, presente nas células de Langerhans (Withrow e Vail, 2007), e do CD90 (Thy-1) e factor XIIIa (enzima envolvida na cascata de coagulação), presentes nas células dendríticas intersticiais (Moore *et al.*, 1996). Grânulos de Birbeck foram identificados nas células de Langerhans do homem, rato, bovino (Wellman, 2007) e gato (Marchal *et al.*, 1997; Roosje, 2002) mas estão ausentes no cão (Wellman, 2007). A expressão de marcadores antigénicos e enzimáticos, como a S100 e a ATPase, comumente associados às células de Langerhans noutras espécies, não foi demonstrada pela células de Langerhans do cão, no entanto, a expressão abundante de CD1a, CD1c, CD11c e MHC classe II revela uma grande proximidade entre estas células e as células de Langerhans humanas (Moore *et al.*, 1996).

As células de Langerhans situadas na pele não estimulada carecem de expressão de determinadas moléculas indicativas de activação ou diferenciação, nomeadamente CD4, CD44, VLA-4 (antígeno de activação tardia-4) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) (Moore *et al.*, 1996). Numa cultura de células de Langerhans de rato foi observada a expressão de CD44, VLA-4, ICAM-1 e MHC classe II, tendo sido relacionado com a estimulação da activação funcional das células de Langerhans, fenómeno que ocorre durante a migração para os gânglios linfáticos, após apresentação antigénica (Moore *et al.*, 1996).

1.3 As Doenças Histiocíticas no Cão

No cão, a pele é o local mais frequentemente afectado por neoplasias, onde os tumores cutâneos e subcutâneos são contabilizados como 1/3 de todos os tumores desta espécie (Ettinger e Feldman, 2005).

Uma grande variedade de doenças histiocíticas reactivas ou neoplásicas, incluindo a proliferação de células dendríticas e macrófagos, tem sido reconhecida em cães e gatos (Affolter e Moore, 2000). São um grupo de doenças difíceis de diferenciar de doenças granulomatosas, de reacções inflamatórias ou de doenças linfoproliferativas, tendo como base a simples morfologia tumoral (Ettinger e Feldman, 2005), para além das variadas apresentações clínicas, evolução e resposta à terapia (Affolter e Moore, 2002; Withrow e Vail, 2007).

Avanços na caracterização das doenças histiocíticas proliferativas (DHP), em termos de características morfológicas, clínicas e fenótipos, têm permitido obter diagnósticos e prognósticos com maior fiabilidade (Jubb *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais espécie-específicos, para os macrófagos e células dendríticas apresentadoras de antigénio, tem permitido identificar as linhas celulares envolvidas nas doenças histiocíticas. A distinção das diferentes linhagens é efectuada, muitas vezes, através da técnica de imunohistoquímica, aplicando os diferentes anticorpos, de preferência, em tecido fresco ou congelado, o que dificulta a sua utilização nos laboratórios de rotina (Withrow e Vail, 2007) dado que muitos desses anticorpos não apresentam reacção nos tecidos fixados em formol (Fulmer e Mauldin, 2007).

Apesar da grande variação a nível clínico e patológico observada nas diferentes doenças, a maioria delas representa uma alteração na proliferação das várias linhagens das células dendríticas (Moore, 2004).

No momento, encontram-se bem definidas quatro DHP no cão: a histiocitose reactiva cutânea, a histiocitose reactiva sistémica, o sarcoma histiocítico (localizado e disseminado ou histiocitose maligna) e o histiocitoma cutâneo canino (Jubb *et al.*, 2007; Fulmer e Mauldin, 2007; Withrow e Vail, 2007). Algumas das doenças são consideradas benignas, enquanto outras têm altos índices de malignidade, revelando bastante agressividade e elevadas taxas de mortalidade (Fulmer e Mauldin, 2007).

1.3.1 A Histiocitose Reactiva

A **histiocitose reactiva**, quer a histiocitose cutânea (HC) quer a histiocitose sistémica (HS), representa um processo proliferativo histiocítico no cão cuja etiologia é desconhecida (Scott *et al.*, 2001; Withrow e Vail, 2007).

A HC é caracterizada por placas ou nódulos únicos ou múltiplos, não dolorosos, que invadem a pele, sendo formadas por uma proliferação de histiócitos acompanhada de linfócitos e neutrófilos (Jubb *et al.*, 2007). Uma grande variedade de raças pode ser afectada e a maior incidência é observada nos animais com menos de 6 anos (Jones *et al.*, 1997). Os histiócitos representam, aqui, células dendríticas da derme e são maiores que as do histiocitoma cutâneo canino. Expressam CD1c, CD4, CD11c, CD18, CD45, MHC classe II e CD90 (Wellman, 2007), característica de células dendríticas da derme activadas.

A HS tem sido descrita, mais frequentemente, nos cães da raça Boeiro de Berna, dos 2 aos 5 anos de idade. É caracterizada pela proliferação reactiva, não neoplásica, de histiócitos com localização perivascular, a nível subcutâneo e gânglios linfáticos periféricos, com variável envolvimento visceral, da conjuntiva e da medula óssea (Jones *et al.*, 1997). As células mostram reactividade para CD1c, CD4, CD11c/CD18, CD45, MHC classe II e CD90, característica de células dendríticas intersticiais activadas (Wellman, 2007).

A evolução clínica e a resposta à terapia imunossupressora são características que correlacionam a histiocitose reactiva com uma desregulação do sistema imunitário (Affolter e Moore, 2002).

1.3.2 O Sarcoma Histiocítico

O **sarcoma histiocítico** (SH) inclui as formas localizada e disseminada e representa uma proliferação neoplásica de células dendríticas (Affolter e Moore, 2000). Tem sido observado numa grande variedade de raças, mas parece existir uma maior incidência no Caniche, Rottweiler, Golden Retriever e Boeiro de Berna, este último com predisposição familiar (Fulmer e Mauldin, 2007). Os animais são geralmente de meia-idade a velhos, tendo também surgido em animais com menos de 3 anos de idade (Gross *et al.*, 2005).

A forma localizada ocorre, no geral, como uma lesão solitária que envolve a pele e tecido subcutâneo das extremidades, podendo, também, surgir a nível das articulações apendiculares, baço, gânglios linfáticos, pulmão ou medula óssea (Fulmer e Mauldin, 2007). O diagnóstico pode ser baseado no exame citológico ou histológico, no entanto, o diagnóstico definitivo pode estar dificultado em tumores que mostram grandes semelhanças morfológicas com outros sarcomas, carcinomas ou tumores de células redondas. Há uma marcada anisocariose e anisocitose, figuras de mitose frequentes e, por vezes, é observada eritrofagocitose e células gigantes multinucleadas (Withrow e Vail, 2007).

A forma disseminada parece representar uma evolução da forma localizada (Fulmer e Mauldin, 2007), sendo referida como a forma multicêntrica do SH localizado (Jubb *et al.*, 2007). O termo “Histiocitose maligna” é usado, muitas vezes, para indicar a mesma doença (Risbon *et al.*, 2007). A medula óssea, gânglios linfáticos, fígado e baço são os locais preferencialmente afectados, podendo surgir infiltrações neoplásicas também no pulmão, pele, rim, intestino e sistema nervoso central (SNC) (Wellman, 2007). É uma doença rapidamente progressiva e que não responde à quimioterapia ou radioterapia, sendo geralmente fatal (Withrow e Vail, 2007).

A maioria dos SH no cão, tanto na forma localizada como na disseminada, representam uma proliferação de células dendríticas apresentadoras de antígeno (Affolter e Moore, 2002). Estas expressam, de forma consistente, marcadores de células dendríticas como CD1, CD11c e MHC classe II (Affolter e Moore, 2002). Uma expressão difusa de Caderina E, Thy-1 e CD4 não tem sido observada no SH, o que juntamente com a citomorfologia, ajuda a diferenciar o SH do histiocitoma e da histiocitose reactiva (Ettinger e Feldman, 2005).

Uma variante distinta do SH, caracterizada por hemofagocitose, anemia do tipo regenerativo e teste de Coomb's negativo, foi recentemente descrita. Foi denominada por **sarcoma histiocítico hemofagocítico** (SHH) e partilha muitas características com o SH localizado ou disseminado, nomeadamente em relação às raças mais predispostas (Boeiro de Berna, Golden Retriever e Rottweiler), aos sinais clínicos (letargia, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas), aos órgãos afectados (baço, fígado, medula óssea e pulmão) e à evolução clínica agressiva e geralmente fatal (Moore *et al.*, 2006). No entanto, ao contrário do que acontece com os outros tipos de SH, o SHH não tem origem na proliferação de células dendríticas intersticiais, resultando, antes, de uma desordem nos macrófagos residentes na polpa vermelha esplénica ou na medula óssea (Ribson *et al.*, 2007). A análise imunohistoquímica confirma a sua origem macrofágica, dada a expressão positiva para CD11d, em vez de CD11c, e MHC classe II. A expressão de CD1 é uniformemente baixa ou, ocasionalmente, moderada mas de distribuição irregular (Ettinger e Feldman, 2005).

1.3.3 O Histiocitoma Cutâneo Canino

O **histiocitoma cutâneo canino** (HCC) é o tumor cutâneo mais frequente em cães com idade inferior a 3 anos. No entanto, pode ocorrer em animais de qualquer idade (Jones *et al.*, 1997), observando-se um decréscimo significativo na sua incidência a partir dessa mesma idade (Gross *et al.*, 2005), tendo, em mais de 70% dos casos, menos de 4 anos (Jubb *et al.*, 2007). É um tumor benigno que se apresenta como uma lesão única e solitária, geralmente na porção cranial do corpo do animal (Withrow e Vail, 2007). A face, pavilhão auricular, pescoço e extremidades distais dos membros são os locais mais afectados, mas outras regiões podem, também, ser sede de desenvolvimento do tumor (Jones *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 2005; Fulmer e Mauldin, 2007).

Tumores múltiplos e metastização nos gânglios linfáticos regionais têm sido descritos, estando, aparentemente, relacionados com a síndrome humana conhecida como histiocitose das

células de Langerhans (Withrow e Vail, 2007) que se julga ter origem numa desregulação imune e cujo fenótipo se assemelha ao de células de Langerhans activadas (Moore *et al.*, 1996). Casos de histiocitomas múltiplos têm sido vulgarmente observados na raça Shar Pei ou cruzados de Shar Pei (Gross *et al.*, 2005).

Uma maior incidência tem sido verificada em determinadas raças, nomeadamente no Boxer, Dachshund, Cocker Spaniel, Dogue Alemão, Scottish Terrier, Boston Terrier, American Staffordshire Terrier, Rottweiler, Shar Pei, West Highland White Terrier, Dobermann Pincher, Retriever do Labrador, Schnauzer Miniatura, English Springer Spaniel e Shetland Sheepdog (Scott *et al.*, 2001). Taylor *et al.* (1969) sugerem um maior risco de desenvolvimento do tumor em animais de raça pura e, dentro destes, uma maior predisposição no Boxer e no Dachshund, indicando um possível envolvimento de factores genéticos no surgimento do HCC. Não parece existir predisposição sexual (Bender e Muller, 1989; Scott *et al.*, 2001; Jubb *et al.*, 2007).

Tipicamente, o HCC aparece como uma placa ou nódulo de rápido crescimento (1-4 meses) (Withrow e Vail, 2007), eritematoso, em forma de cúpula, geralmente com um diâmetro inferior a 2,5 cm (Gross *et al.*, 2005), bem circunscrito e frequentemente ulcerado (Scott *et al.*, 2001). Se não excisado, sofre geralmente regressão espontânea ao final de semanas, ou, noutras ocasiões, meses (Jones *et al.*, 1997). Raros exemplos de invasão dos gânglios linfáticos são descritos e representam uma evolução mais agressiva da doença (Fulmer e Mauldin, 2007).

Microscopicamente, o HCC apresenta-se como um infiltrado não encapsulado, rico em células redondas ou poligonais, organizadas em cordões ou colunas (Gross *et al.*, 2005) e que seguem perpendiculares à junção dermo-epidérmica (Jones *et al.*, 1997). Solitariamente ou em pequenos agregados, as células podem invadir a epiderme, de forma ligeira, em cerca de 80% dos casos; a invasão folicular não é frequentemente observada (Moore *et al.*, 1996). Pequenos agregados de histiócitos, semelhantes a ninhos, com localização intra-epidérmica, lembram os agregados de Pautrier, característicos do linfoma epidermotrópico (*Mycosis fungoides*) (Moore *et al.*, 1996). Um sinal característico é o seu elevado índice mitótico (Scott *et al.*, 2001).

Com a evolução do tumor, aparecem áreas de infiltrado inflamatório de linfócitos, surgindo a partir da sua periferia, e áreas de necrose de coagulação associadas, geralmente, à regressão espontânea do HCC (Jones *et al.*, 1997).

No geral, nenhum tipo de tratamento está indicado, excepto naqueles casos em que as lesões não regridem, durante períodos de tempo demasiadamente longos, ou quando os animais são muito velhos e a cirurgia acaba por ser uma boa opção (Fulmer e Mauldin, 2007).

O manejo clínico pode incluir a excisão cirúrgica, a criocirurgia, a electrocirurgia ou, simplesmente, acompanhamento sem tratamento (Scott *et al.*, 2001).

1.4 O Diagnóstico do HCC

O diagnóstico do HCC é feito, geralmente, através de uma combinação das suas características clínicas e morfológicas, juntamente com a citologia por aspiração com agulha fina (Figura 1).

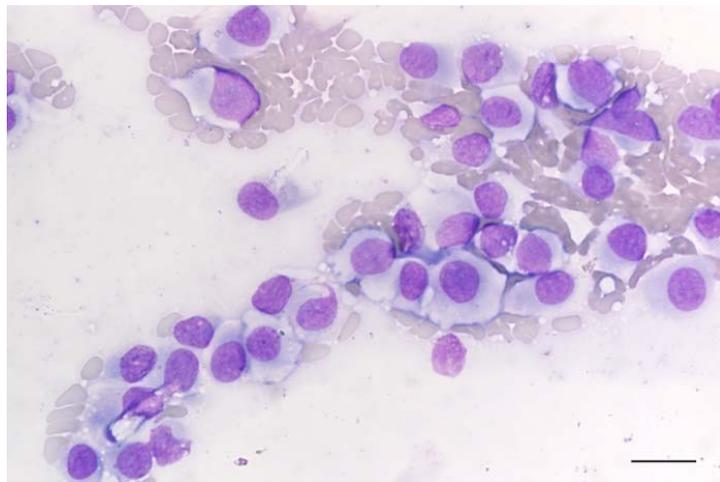


Figura 1: Aspiração com agulha fina de um histiocitoma cutâneo canino. São observadas células com núcleo redondo, oval a endentado, por vezes excêntrico, e citoplasma moderado, pálido e granular. Estalão=20 µm.

O diagnóstico diferencial inclui lesões inflamatórias e outras neoplasias de células redondas como o mastocitoma, o linfoma cutâneo, o plasmocitoma e o tumor venéreo transmissível (Gross *et al.*, 2005; Jubb *et al.*, 2007). Este tipo de tumores de células redondas, frequentes no cão, têm características citológicas distintas, tal como são apresentadas, de seguida, no quadro 1.

Quadro 1: Características citológicas dos tumores de células redondas mais frequentes no cão.

Característica	Histiocitoma Cutâneo Canino	Mastocitoma	Tumor Venéreo Transmissível	Plasmocitoma	Linfoma Cutâneo
Núcleo	Excêntrico, de redondo a oval	Normalmente obscurecido por grânulos metacromáticos	Redondo, com 1 único nucléolo	Excêntrico, de redondo a oval; células com 2-3 núcleos; possível anisocariose	Redondo a moderadamente indentado
Nucléolo	Pequeno, por vezes, imperceptível	Não visível excepto no caso de tumores indiferenciados	Único, pequeno e azul	Infrequente ou ocasional	Múltiplos
Citoplasma	Abundante, pálido a basófilo, não-vacuolado	Com numerosos grânulos de cor violeta	Moderado a abundante, pálido a azul com vacúolos distintos	Moderada abundância de um citoplasma azulado; Demarcação clara da zona perinuclear (Zona Golgi)	Citoplasma anelar, azul escuro e granular; Fragmentos citoplasmáticos ocasionais
Outras	Possível infiltrado de linfócitos; geralmente massas solitárias e ulceradas	Possível presença de eosinófilos	Mitoses abundantes; possível inflamação secundária	Presença de plasmócitos típicos	Usualmente estão presentes múltiplos tumores

Por vezes, estes tumores podem evidenciar uma morfologia celular muito semelhante e mesmo colorações específicas podem revelar-se inúteis na obtenção de um diagnóstico correcto (Fernandez *et al.*, 2005), nomeadamente no caso de tumores fracamente diferenciados (Cangul, 2001). Um diagnóstico preciso é extremamente importante na avaliação do prognóstico e possibilidade de tratamento, daí que a imunohistoquímica tenha servido, muitas vezes, como um adjuvante à microscopia óptica (Fernandez *et al.*, 2005).

A infiltração dérmica profunda de linfócitos, a presença de histiócitos típicos na região mais superficial, o alto índice mitótico, a presença infrequente de eosinófilos, os sinais clínicos e a localização anatómica, são informações importantes na obtenção de um diagnóstico preciso de HCC. O exame histopatológico é geralmente sugestivo de HCC (Fulmer e Mauldin, 2007), no entanto, a imunohistoquímica pode ter, aqui, um papel extremamente necessário e, muitas vezes, imprescindível, na diferenciação de tumores semelhantes (Jubb *et al.*, 2007), sendo considerado, por muitos autores, um meio de diagnóstico fiável e de grande sensibilidade (Hoinghaus *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado uma origem do HCC nas células de Langerhans através da expressão de CD1a, CD1b, CD1c, CD11c, Caderina E, MHC classe II e expressão negativa para Thy-1 e CD4. Esta expressão negativa ajuda na diferenciação entre os histiocitomas e a histiocitose reactiva (Withrow e Vail, 2007). Já a expressão de Caderina E é única nas células de

Langerhans, identificando, especificamente, o HCC como um tumor de células de Langerhans localizado e intra-epidérmico (Baines *et al.*, 2000; Fulmer e Mauldin, 2007).

A ausência de anticorpos específicos para as células de Langerhans do cão, passíveis de serem usados em material fixado, constitui, na maioria das vezes, um entrave à obtenção de um diagnóstico definitivo. O recurso ao azul de Toluidina, com expressão positiva nos mastocitomas (Gross *et al.*, 2005), e a técnicas de imunohistoquímica, podem, em alguns casos, fornecer informações valiosas para o diagnóstico final, auxiliando a eliminar possíveis diagnósticos diferenciais. A positividade para a Caderina E, para a vimentina e para a MHC classe II, na ausência de imunoreactividade para os marcadores linfóides, nomeadamente o CD3 e o CD79a, com expressão positiva nos linfomas cutâneos, sempre com base numa observação sistemática da coloração de rotina com hematoxilina-eosina (HE), podem, na grande maioria dos casos, ser indicativas do diagnóstico (Moore *et al.*, 1996; Fernandez *et al.*, 2005). A lisozima, como marcador histiocitário, pode, também, auxiliar no diagnóstico do HCC, mas nunca excluí-lo.

A aplicação de antigénios de superfície específicos, ainda não disponíveis para material fixado em parafina, poderá ser, no futuro, de real importância no auxílio do diagnóstico.

2. OBJECTIVOS

O histiocitoma cutâneo canino revela ser um bom exemplo de uma resposta imunitária eficaz frente a um processo neoplásico e os fenómenos de regressão tornam esta neoplasia um campo de interesse para os estudos da imunidade tumoral.

O objectivo do presente trabalho é contribuir para a caracterização clínico-patológica do histiocitoma cutâneo canino e para a compreensão da dinâmica do processo de regressão da neoplasia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

No presente estudo, foi avaliada uma amostra de 166 tumores. Todos eles foram recebidos no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (LHAP-UTAD), Vila Real, entre 1998 e 2008, para diagnóstico. O material teve como proveniência o Hospital Veterinário da UTAD e várias clínicas veterinárias privadas, localizadas em vários pontos de Portugal, predominantemente na zona norte e centro do país. Para cada um dos tumores foi efectuado o diagnóstico de histiocitoma cutâneo canino, tendo, por base, uma avaliação histopatológica detalhada.

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação Clínica

De cada um dos tumores, foram recolhidos dados referentes à identificação do animal, incluindo a raça, o sexo e a idade, e dados referentes ao tumor, nomeadamente a localização e o tamanho da lesão.

3.2.2 Avaliação das Características Histopatológicas

O material foi previamente fixado em formol comercial a 10%, processado e incluído em parafina Histoplast®- Shandon®, segundo a metodologia habitualmente utilizada. Foram efectuados cortes com uma espessura de 3 µm, procedendo-se, de seguida, à coloração de HE.

Posteriormente, procedeu-se à observação sistemática dos tumores, tendo sido feito o diagnóstico e a classificação dos histiocitomas por dois observadores independentes, segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Valli *et al.*, 2002).

As preparações foram ainda avaliadas, sempre pelo mesmo observador, num microscópio Nikon FXA[®], quanto aos seguintes elementos:

- Padrão de crescimento: expansivo ou infiltrativo;
- Ulceração: ausente (0), presente (1-3). O tamanho da úlcera foi quantificado em 3 graus: 1 (muito pequena, de dimensões microscópicas), 2 (moderada, mas não atingindo toda a superfície epidérmica do tumor) e 3 (extensa, atingindo a epiderme que reveste o tumor em toda a sua área);
- Infiltração inflamatória linfóide: avaliada quanto à quantidade relativa do infiltrado em: ausente ou mínima (1), moderada (2), abundante (3) e muito abundante (4); quanto ao padrão de distribuição dos linfócitos no tumor em: periférica (1), periférica com formação de estruturas foliculares (2), periférica e central (3) e difusa, estendendo-se até à superfície epidérmica (4);
- Grau de pleomorfismo nuclear: núcleos uniformes e regulares (1), aumento moderado do tamanho e variabilidade (2), variação marcada (3);
- Índice mitótico: IM (número de mitoses por campo de grande ampliação: 40x, contando-se em média 10 campos, nas diferentes regiões do tumor). Os tumores foram agrupados em 3 grupos: menos de 2 mitoses, 2 a 5 mitoses e mais de 5 mitoses;
- Epiderme que cobre o tumor: normal, com hiperplasia regular, irregular, pseudocarcinomatosa e ulcerada em toda a extensão do tumor;
- Estroma: escasso (1), moderado (2) ou abundante (3);
- Necrose: avaliada quanto à extensão em: ausente (0), escassa (1), moderada (2), extensa (3) e quanto à localização em: periférica e difusa (observando-se na periferia e no centro do tumor);
- Células multinucleadas: ausentes (0), presentes (1);
- Foliculite/furunculose: ausente (0), presente (1);
- Vasculite: ausente (0), presente (1).

Os tumores foram organizados em quatro grupos histológicos, segundo a classificação de Cockerell e Slauson (1979), tendo como base o grau e o padrão do infiltrado inflamatório de tipo linfóide. Sumariamente, a infiltração linfóide foi considerada mínima a ausente e restrita à periferia do tumor, no grupo I. No grupo II, estava presente uma infiltração moderada, tendo uma disposição nodular à periferia do tumor. Os histiocitomas, no grupo III, foram caracterizados por

uma marcada infiltração linfóide, tanto à periferia como no centro do tumor. Finalmente, no grupo IV, a população linfóide era muito abundante e ultrapassava, em proporção, a população histiocitária, formando um infiltrado que se estendia desde a profundidade do tumor até à superfície epitelial.

As imagens foram captadas numa câmara digital DXM1200, Nikon[®], acoplada a um microscópio Eclipse E600 do mesmo fabricante.

3.2.3 Avaliação do Infiltrado Inflamatório Linfóide por Técnicas de Imunohistoquímica

Para realização do estudo imunohistoquímico, foram seleccionados, aleatoriamente, 10 tumores de cada grupo histológico. De cada um dos tumores, foram efectuados cortes seriados, com 3 µm de espessura e colados em lâminas previamente revestidas com solução de Silane (3-Aminopropyltriethoxysilane, Sigma[®]), segundo a metodologia convencional.

Para identificação de linfócitos T e linfócitos B, foram utilizados o CD3 (Policlonal, Dako[®]) e o CD79 (HM57, Dako[®]), respectivamente, que, segundo trabalhos prévios, apresentavam reacção cruzada com tecido de cão (Ferrer *et al.*, 1992; Schulden *et al.*, 1998). A expressão das proteínas em estudo foi avaliada pelo método indirecto da estreptavidina-biotina-peroxidase, utilizando-se um kit comercial (Ultra Vision Detection System, Lab Vision Corporation), executado segundo instruções do fabricante e utilizando DAB como cromogéneo. A recuperação antigénica efectuada foi 3 ciclos de micro-ondas (P-750W, 5 min) em tampão citrato (0.01M, pH 6). Para o CD3, a concentração utilizada foi de 1:100 e a incubação foi efectuada durante 1 hora, à temperatura ambiente. Para o CD79, a concentração utilizada foi de 1:50 e a incubação foi efectuada durante a noite, a 4°C.

O controlo positivo utilizado foi gânglio linfático de cão. No controlo negativo, substituiu-se o anticorpo primário por tampão fosfato salino (PBS).

A reacção foi considerada positiva quando ocorria no citoplasma ou na membrana citoplasmática das células linfóides, tendo sido avaliada, posteriormente, de forma semi-quantitativa, quanto à densidade relativa de células positivas, na totalidade da área ocupada pelo tumor, em 0: ausente; 1: escassa ($\leq 10\%$); 2: moderada (11-25%); 3: extensa (26-50%) e 4: muito extensa ($\geq 51\%$).

3.2.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA, Versão 12.0).

Foi efectuada a análise dos parâmetros descritivos das variáveis categóricas, com obtenção das frequências absolutas e relativas das categorias em estudo.

As associações entre variáveis categóricas foram estudadas com aplicação do método de Qui-Quadrado (χ^2).

As associações foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação Clínica

Segundo as informações fornecidas pelos médicos veterinários, responsáveis por cada um dos casos observados, a maioria dos animais apresentava uma formação nodular, bem circunscrita, em forma de “botão”, solitária, alopecica e, frequentemente, ulcerada (Figura 2). Não foi possível, através da anamnese, obter informações precisas em relação à data de início de aparecimento do tumor e posterior evolução, no entanto, a maioria dos proprietários percepcionou uma evolução rápida, tendo decorrido, na maioria deles, um período não superior a 2 meses. Um dos casos revelou, excepcionalmente, uma evolução de 6 meses. À data de excisão, nos casos em que a informação foi cedida, todos os animais foram considerados saudáveis, sem qualquer sintomatologia associada ao tumor.



Figura 2: Aspecto macroscópico do histiocitoma cutâneo canino no pavilhão auricular de um canídeo da raça Retriever do Labrador (à direita) e respectiva ampliação (à esquerda).

❖ Sexo (n=163)

Dos tumores estudados, 79 (48,5%) ocorreram em animais do sexo feminino e 84 (51,5%) em animais do sexo masculino. Em 3 casos, não foi possível recolher informações acerca do sexo do animal (Figura 3).

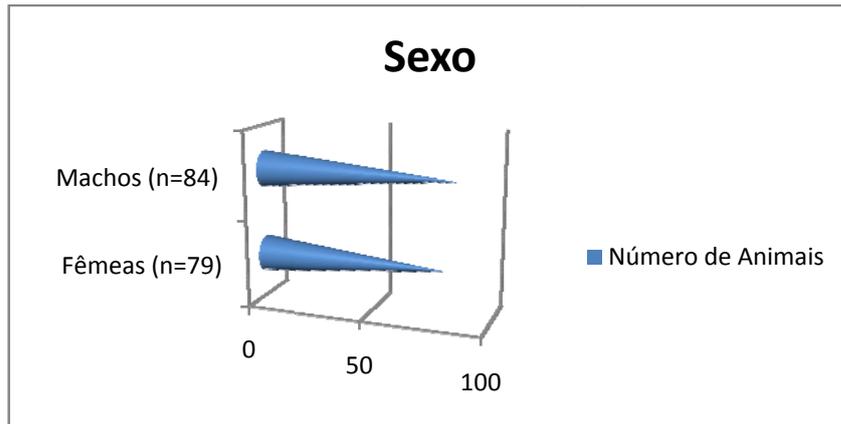


Figura 3: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por sexo.

❖ **Idade (n=143)**

Relativamente à idade dos animais em estudo, observou-se uma variação entre os 2 meses e os 13 anos de idade, com uma média de 2,21 anos. Na grande maioria dos casos (n=108; 75,5%), os animais tinham idade igual ou inferior a 2 anos; 27 animais tinham idade igual ou superior a 4 anos (18,9%) e apenas 8 animais tinham entre 2 e 4 anos (5,6%) de idade. A frequência foi superior nos animais mais novos (Figura 4). Em 23 casos, não foi possível determinar a idade do animal.

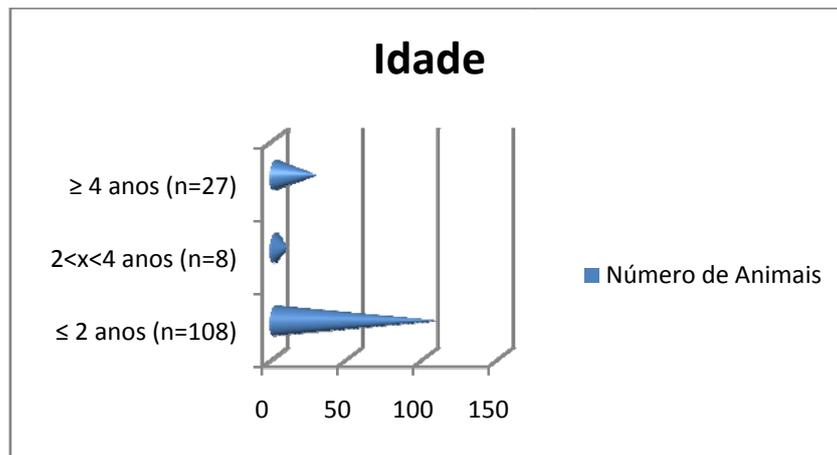


Figura 4: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por idade.

❖ Raça (n=166)

De entre as várias raças presentes no nosso estudo, observou-se um maior número de animais de raça Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Retriever do Labrador perfazendo um total de 37 (22,3%), 22 (13,3%), 16 (9,6%) e 13 (7,8%) animais, respectivamente. Animais de raça indeterminada (n=26; 15,7%) mostraram uma frequência relativamente mais baixa em relação aos animais de raça pura (n=140; 84,3%) (Figura 5).

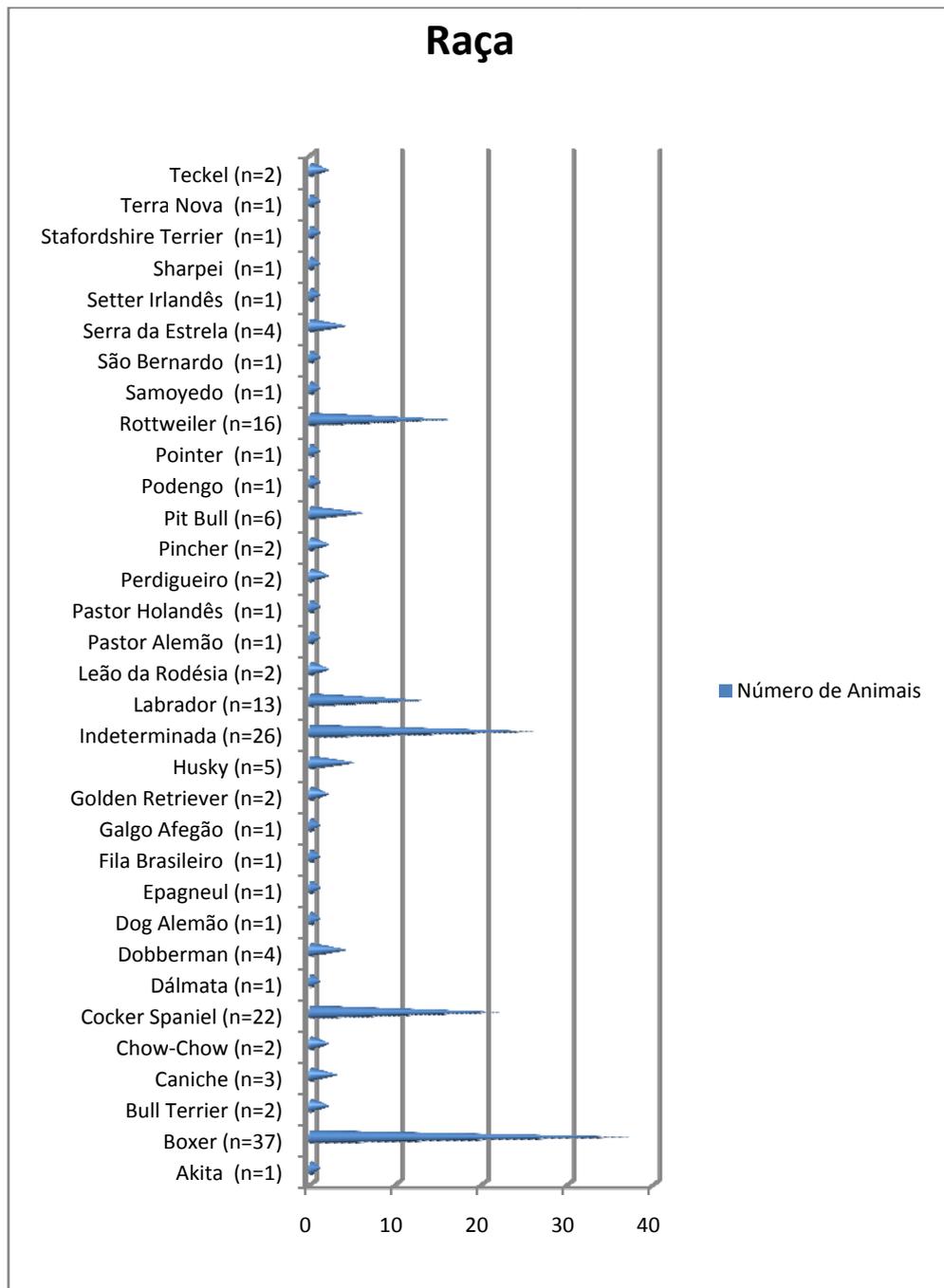


Figura 5: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por raça.

❖ Tamanho (n=166)

O tamanho médio da lesão foi de 1,4 cm, variando entre 0,4 cm e 3 cm de diâmetro. Na grande maioria dos tumores (n=140; 84,3%), observou-se um diâmetro inferior a 2 cm, e, em apenas 3 casos (1,8%), foi observado um diâmetro maior ou igual a 3 cm. Em 23 tumores, verificou-se um diâmetro intermédio (2-3 cm) (Figura 6).

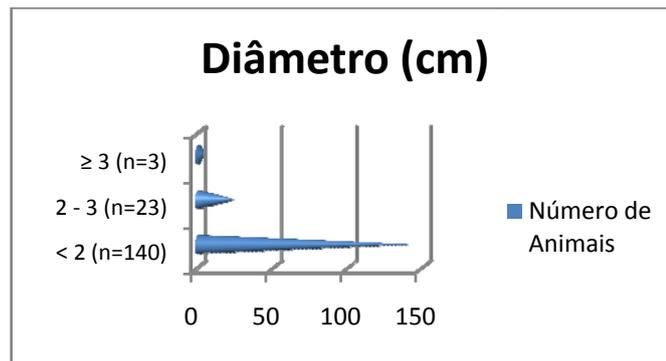


Figura 6: Distribuição dos histiocitomas cutâneos caninos por tamanho (diâmetro) da lesão.

❖ Localização (n=154)

Todos os 166 histiocitomas cutâneos caninos estavam localizados na pele. A grande maioria deles encontrava-se ao nível da cabeça (n=54; 35,1%), e dentro destes, cerca de metade, estava localizada no pavilhão auricular (n=27). Os membros foram a segunda região mais afectada, com 53 casos observados (34,4%). Os restantes tumores estavam distribuídos pela região torácica (n=20; 13,0%), cervical (n=15; 9,7%) abdominal (n=11; 7,1%) e cauda (n=1; 0,6%). Em 12 animais, não foi possível determinar a localização anatómica da lesão (Figura 7).

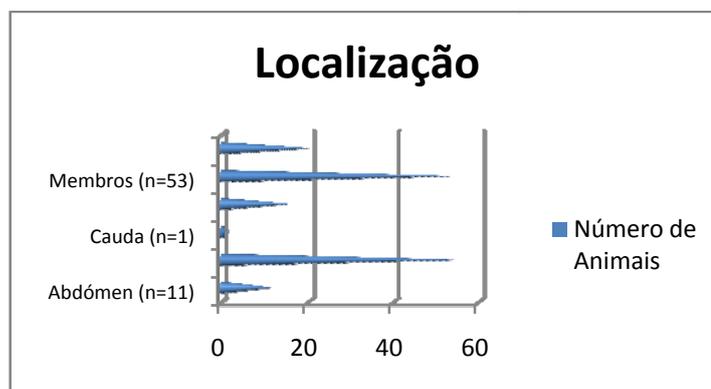


Figura 7: Distribuição topográfica dos histiocitomas cutâneos caninos.

No quadro 2, são apresentadas, resumidamente, as frequências absolutas e relativas das diferentes variáveis clínicas em estudo.

Quadro 2: Variáveis clínicas e respectivas frequências absolutas e relativas.

Variáveis clínicas	n	%
Sexo (n=163)		
Macho	84	51,5
Fêmea	79	48,5
Idade (n=143)		
≤ 2	108	75,5
2-4	8	5,6
≥ 4	27	18,9
Raça (n=166)		
Akita	1	0,6
Boxer	37	22,3
Bull Terrier	2	1,2
Caniche	3	1,8
Chow-Chow	2	1,2
Cocker Spaniel	22	13,3
Dálmata	1	0,6
Doberman	4	2,4
Dogue Alemão	1	0,6
Epagneul	1	0,6
Fila Brasileiro	1	0,6
Galgo Afegão	1	0,6
Golden Retriever	1	0,6
Husky	5	3,0
Indeterminada	26	15,7
Retriever do Labrador	13	7,8
Leão da Rodésia	2	1,2
Pastor Alemão	1	0,6
Pastor Holandês	1	0,6
Perdigueiro	2	1,2
Pincher	2	1,2
Pit Bull	6	3,6
Podengo	1	0,6
Pointer	1	0,6
Rottweiler	16	9,6
Samoyedo	1	0,6
São Bernardo	1	0,6
Serra da Estrela	4	2,4
Setter Irlandês	1	0,6
Sharpei	1	0,6
Stafordshire Terrier	1	0,6
Teckel	2	1,2
Terra Nova	1	0,6
Tamanho (n=166)		
<2	140	84,3
2-3	23	13,8
≥3	3	1,8
Localização (n=155)		
Abdómen	11	7,1
Cabeça	54	35,1
Cauda	1	0,6
Pescoço	15	9,7
Membro	53	34,4
Tórax	20	13,0

4.2 Avaliação Histopatológica

Uma avaliação cuidada e sistemática dos 166 histiocitomas cutâneos caninos em estudo, permitiu-nos verificar de que se tratavam de lesões do tipo nodular, circunscritas mas não encapsuladas, de crescimento expansivo, constituídas pela proliferação de células mononucleares, de moderado pleomorfismo e que ocupavam a derme superficial e profunda. As células apresentavam uma organização em forma de cordões uniformes que seguiam, depois, perpendicularmente à junção dermo-epidérmica. A invasão da epiderme pelos histiócitos foi relativamente frequente, tendo sido, em alguns casos, proeminente, com perda da evidência da membrana basal (Figura 8).

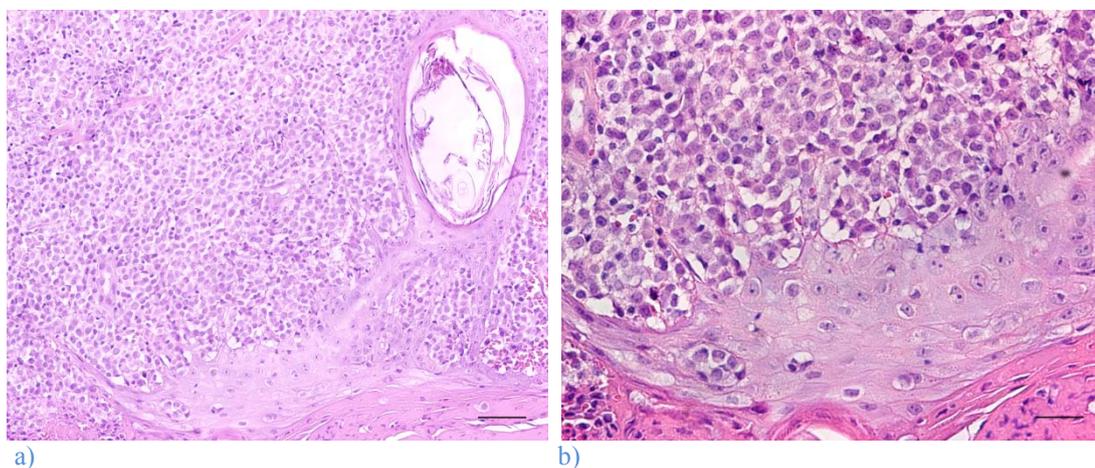


Figura 8: Invasão da epiderme pelas células neoplásicas com formação de ninhos intra-epidérmicos que lembram os agregados de Pautrier: a) Estalão= 60 µm; b) Estalão= 30 µm.

As células tumorais apresentavam uma imagem muito característica, com núcleos moderadamente pleomórficos, de redondos a ovais ou em forma de C, de limite bem definido, com cromatina dispersa e hiper cromática. Na grande maioria dos casos, era visível um único nucléolo. O citoplasma era normalmente volumoso e ligeiramente espumoso ou granular e acidófilo.

As figuras de mitose eram, geralmente, frequentes. Contagens individuais mostraram uma variação entre 0 e 19 mitoses, por campo de grande ampliação, com uma média de 3,05 mitoses. Imagens de morte celular eram, também, regularmente observadas.

O estroma era, na sua grande maioria, escasso (n=124; 74,7%), constituído, principalmente, por áreas de colagéneo e, menos frequentemente, por áreas de vascularização. Em 42 tumores, foi observado um estroma mais moderado (25,3%).

De todos os casos observados, apenas 18 tumores apresentavam epiderme não ulcerada, não se observando ulceração, nem no exame macroscópico nem no microscópico. Os restantes 148 tumores (89,2% dos casos) apresentavam ulceração mais ou menos evidente: 30 tumores (18,1%) apresentavam uma úlcera de pequenas dimensões, apenas observada ao microscópio; 55 (33,1%) apresentavam uma úlcera de moderadas dimensões mas que ainda não atingia, em profundidade, toda a epiderme adjacente ao tumor; e, em 63 casos, a úlcera era extensa atingindo a derme em profundidade. Na região superficial do tumor encontrava-se um infiltrado de células inflamatórias, constituído, principalmente, por linfócitos e neutrófilos.

As zonas de necrose foram achados frequentes, tendo sido observadas em 95 tumores, mais de metade dos casos em estudo. Relativamente à extensão da necrose, esta foi, no geral, moderada (n=45; 27,1%) e de localização preferencialmente difusa (n=66; 39,8%), i.e., tanto na periferia, principalmente basolateral, como no centro do tumor. Estas áreas caracterizaram-se como sendo de reduzido conteúdo celular, com detritos amorfos e acidófilos e restos de núcleos picnóticos (Figura 9). Em 71 tumores (42,8%), não foi possível visualizar qualquer área de necrose.

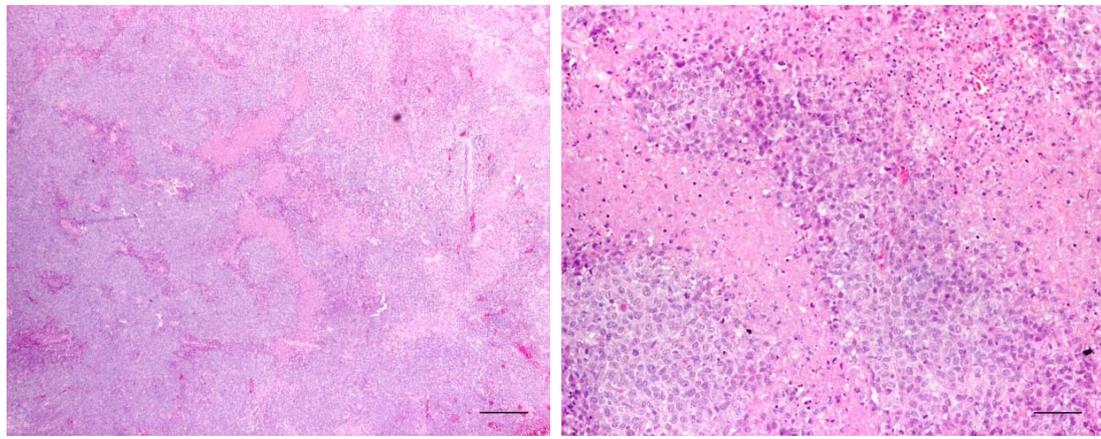


Figura 9: Extensas zonas de necrose num histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico III: a) Estalão= 300 µm; b) Estalão= 60 µm.

A epiderme apresentou-se normal (n=20; 12,0%), ulcerada (n=59; 35,5%) ou hiperplásica (n=87; 52,4%). A hiperplasia, em 16 casos, era regular, em 30 casos, irregular, e, na sua grande maioria (n=41; 24,7%), pseudocarcinomatosa (Figura 10).

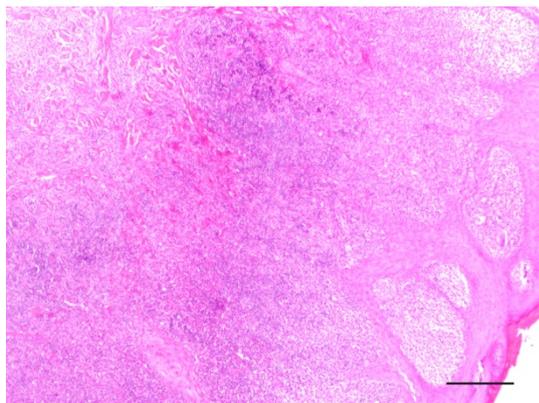


Figura 10: Hiperplasia pseudocarcinomatosa da epiderme de um histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico III. Estalão= 300 μ m.

Em 27 histiocitomas (16,3%), foram observadas áreas de foliculite e/ou furunculose e, em 10 tumores (6,0%), foram encontradas lesões de vasculite.

Na grande maioria dos tumores, foi observada infiltração inflamatória linfóide. Numa fracção deles, foi mais marcada a nível perivascular, perto da junção da zona subcutânea com a derme mais profunda, noutra, o infiltrado era mais difuso e radiado, desde a profundidade do tumor às zonas mais superficiais, invadindo, por vezes, praticamente todas as zonas da lesão. Esta variação na quantidade e distribuição do infiltrado linfóide permitiu classificar os vários tumores em 4 grupos histológicos distintos, segundo os critérios previamente descritos.

4.3 Grupos Histológicos

Os 166 tumores foram classificados em 4 grupos histológicos tendo como base a classificação de Cockerell e Slauson, (1979) (Quadro 3).

Quadro 3: Grupos histológicos (adaptado de Cockerell e Slauson, 1979).

Grupo Tumoral	Quantidade Relativa de Infiltrado	Padrão de Distribuição do Infiltrado
I	Ausente a mínimo (<10%)	Difuso e limitado à periferia
II	Moderado (10-25%)	Nodular à periferia
III	Abundante (25-50%)	Nodular, à periferia e no centro da lesão
IV	Muito abundante (>50%)	Nodular, da periferia até à superfície epidérmica

Deste modo, as neoplasias em estudo foram distribuídas da seguinte forma: 29 tumores (17,5%) no grupo I, 23 (13,9%) no grupo II, 76 (45,8%) no grupo III e 38 (22,9%) no grupo IV.

Nos tumores do grupo I, encontrava-se, quando existente, um escasso infiltrado inflamatório de linfócitos, localizado, essencialmente, à periferia do tumor. A restante lesão era constituída pela proliferação de células, de elevada densidade, organizadas em cordões e que ocupavam a derme até à junção dermo-epidérmica (Figura 11).

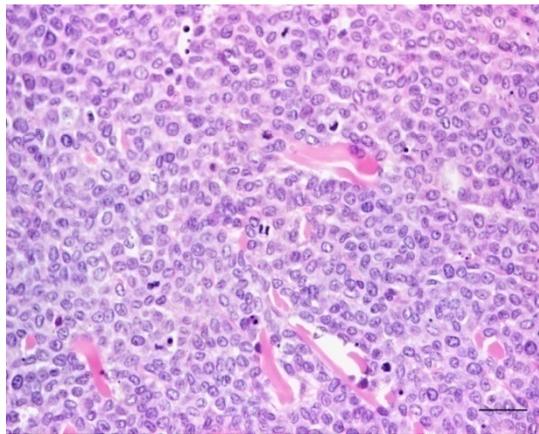


Figura 11: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico I. Células de contornos indistintos e núcleos vesiculados com nucléolo ocasional. Figuras de mitose abundantes. Estalão=30 μ m.

Nos tumores do grupo II, as neoplasias apresentaram uma infiltração inflamatória linfóide moderada, exibindo formações do tipo organóide, centradas por um vaso sanguíneo, localizadas à periferia da lesão (Figura 12). Poucos ou nenhuns linfócitos eram observados no centro do tumor.

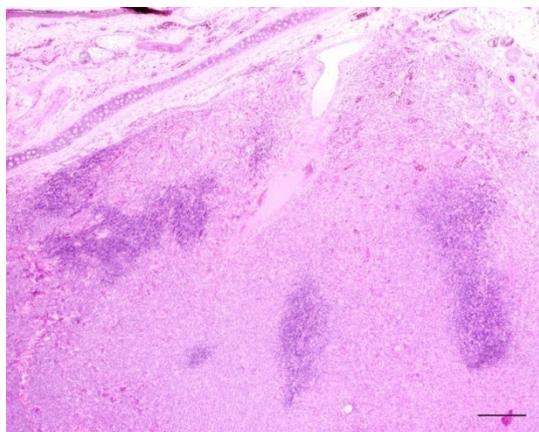


Figura 12: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico II. O infiltrado linfóide forma folículos à periferia do tumor. Estalão=300 μ m.

Nos histiocitomas dos grupos I e II, as células tumorais eram, no geral, uniformes, com forma redonda ou oval, de citoplasma acidófilo e granular, onde se observava um núcleo excêntrico e pleomórfico que apresentava, ocasionalmente, um único nucléolo. Nas zonas mais profundas da lesão, onde a densidade celular era mais elevada, os bordos celulares eram, muitas vezes, indistintos. À superfície, as células apresentavam contornos mais bem definidos. O estroma tumoral era escasso em praticamente todas as neoplasias dos grupos. O índice mitótico era, no geral, elevado, variando entre 2 e 19 mitoses e 2 e 12 mitoses, por campo de grande ampliação, nos grupos I e II, respectivamente.

Nos tumores do grupo III, o infiltrado linfóide era mais abundante e estendia-se desde a periferia ao centro do tumor (Figura 13). As células tumorais mostraram características diferentes relativamente aos tumores dos dois grupos anteriores. Apresentavam uma menor densidade celular, estando rodeadas, em várias áreas, por um denso infiltrado de linfócitos. O núcleo era menos denso, apresentando um nucléolo evidente, e o citoplasma, por vezes, vacuolizado. A forma das células variava de redondas a ovais ou poligonais.

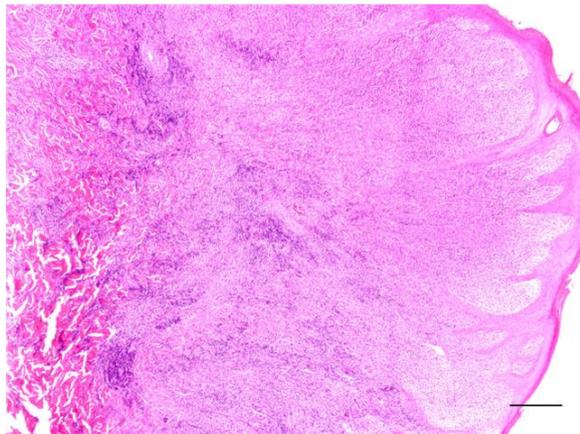
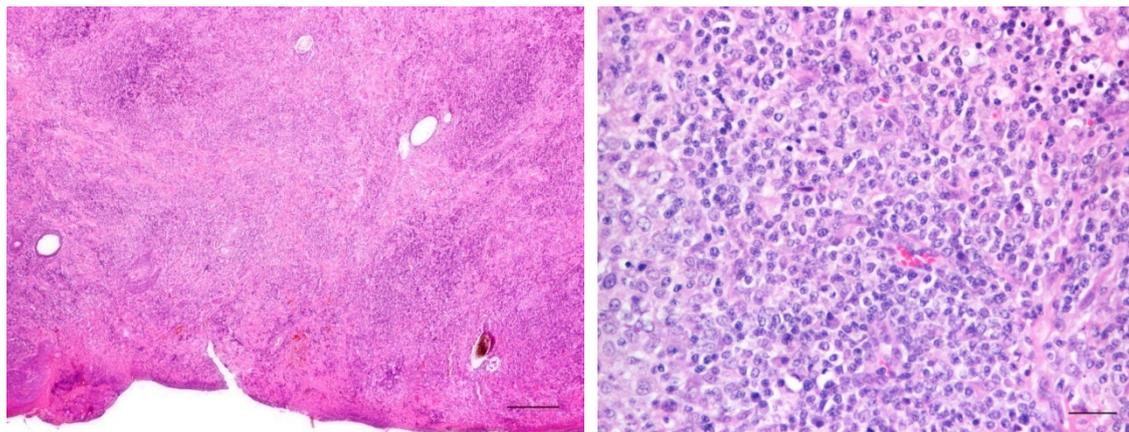


Figura 13: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico III. O infiltrado linfóide é abundante no centro e na periferia do tumor. Estalão=300 µm.

Nos histiocitomas do grupo IV, foi observado um infiltrado inflamatório linfóide muito abundante, estendendo-se desde a periferia da lesão até às zonas mais superficiais, incluindo a junção dermo-epidérmica (Figura 14_a).

Em algumas áreas, tornou-se mesmo difícil encontrar células neoplásicas por entre um infiltrado tão difuso, cuja densidade era superior à das células tumorais (Figura 14_b).



a) **Figura 14:** a) Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico IV. O infiltrado linfóide chega a atingir a junção dermo-epidérmica. Estalão=300 μ m; b) Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico IV onde se observa um infiltrado linfóide mais abundante do que as células tumorais. Estalão=30 μ m.

As células apareceram bem individualizadas, de contornos bem distintos, e com localização preferencial na superfície da lesão. A morfologia celular mostrou alguma variação, observando-se células de redondas a ovais ou poligonais, de citoplasma claro e núcleo pleomórfico, e outras com um aspecto degenerado, citoplasma acidófilo e núcleo de tamanho mais reduzido e em forma de “C”.

Num número considerável de casos (n=7; 18,4%), foi observada formação de tecido fibroso a separar a epiderme das áreas tumorais subjacentes (**Figura 15**).

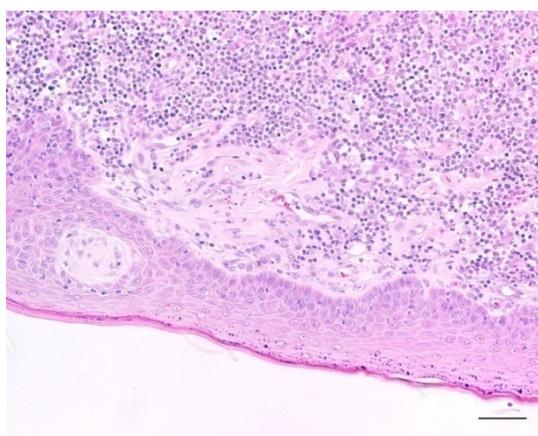


Figura 15: Histiocitoma cutâneo canino do grupo histológico IV com marcada formação de tecido fibroso sub-epidérmico. Estalão=60 μ m.

No quadro 4 são apresentadas, resumidamente, as frequências relativas e absolutas dos diferentes parâmetros histológicos avaliados, em cada um dos 166 histiocitomas cutâneos caninos.

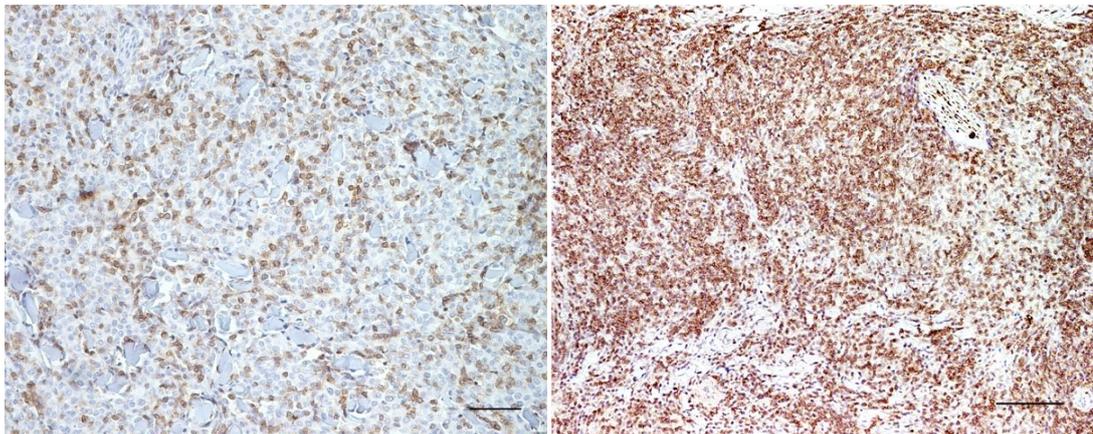
Quadro 4: Frequência relativa e absoluta dos histiocitomas cutâneos caninos relativamente aos diferentes parâmetros histológicos.

Parâmetros histológicos	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ulceração								
0	6	20,7	3	13,0	6	7,9	3	7,9
1	10	34,5	6	26,1	12	15,8	2	5,3
2	9	31,0	6	26,1	26	34,2	14	36,8
3	4	13,8	8	34,8	32	42,1	19	50,0
Índice mitótico								
< 2	0	0,0	2	8,7	18	23,7	28	73,7
2-5	14	48,3	11	47,8	46	60,5	9	23,7
>5	15	51,7	10	43,5	12	15,8	1	2,6
Infiltrado linfóide (Quant)								
Ausente	23	79,3	9	39,1	19	25,0	20	52,6
Escassa	4	13,8	8	34,8	11	14,5	3	7,9
Moderada	2	6,9	5	21,7	28	36,8	10	26,3
Extensa	0	0,0	1	4,3	18	23,7	5	13,2
Infiltrado linfóide (Loc.)								
Ausente	23	79,3	9	39,1	19	25,0	20	52,6
Periférico	5	17,2	10	43,5	10	13,2	4	10,5
Difuso	1	3,4	4	17,4	47	61,8	14	36,8
Epiderme								
Normal	5	17,2	1	4,3	11	14,5	3	7,9
Ulcerada	4	13,8	10	43,5	27	35,5	18	47,4
Hiperplasia regular	5	17,2	2	8,7	4	5,3	5	13,2
Hiperplasia irregular	5	17,2	2	8,7	16	21,1	7	18,4
Hiperplasia pseudocarc.	10	34,5	8	34,8	18	23,7	5	13,2
Estroma								
Escasso	29	100,0	21	91,3	61	80,3	13	34,2
Moderado	0	0,0	2	8,7	15	19,7	25	65,8
Abundante	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Necrose (Quantidade)								
Ausente	23	79,3	9	39,1	19	25,0	20	52,6
Escassa	4	13,8	8	34,8	11	14,5	3	7,9
Moderada	2	6,9	5	21,7	28	36,8	10	26,3
Abundante	0	0,0	1	4,3	18	23,7	5	13,2
Necrose (Localização)								
Ausente	23	79,3	9	39,1	19	25,0	20	52,6
Periferia	5	17,2	10	43,5	10	13,2	4	10,5
Difusa	1	3,4	4	17,4	47	61,8	14	36,8
Células multinucleadas								
Ausentes	27	93,1	18	78,3	52	68,4	13	34,2
Presentes	2	6,9	5	21,7	24	31,6	25	65,8
Foliculite/Furunculose								
Ausente	26	89,7	17	73,9	63	82,9	33	86,8
Presente	3	10,3	6	26,1	13	17,1	5	13,2
Vasculite								
Ausente	27	93,1	22	95,7	69	90,8	38	100,0
Presente	2	6,9	1	4,3	7	9,2	0	0,0
Fibrose superficial								
Ausente	27	93,1	22	95,7	69	90,8	31	81,6
Presente	2	6,9	1	4,3	7	9,2	7	18,4

4.3 Avaliação do Infiltrado Inflamatório Linfóide por Imunohistoquímica

❖ Linfócitos T (CD3)

Em todos os casos analisados observou-se infiltração linfóide por linfócitos T CD3⁺, variável em quantidade e distribuição. Nos tumores do grupo I, observou-se escassa infiltração por linfócitos CD3⁺ que se localizavam, principalmente, na periferia basal e lateral da lesão. Nos tumores do grupo II, observou-se infiltração moderada, focal, de células CD3⁺, organizadas em estruturas nodulares à periferia do tumor. Nos tumores do grupo III, a infiltração por linfócitos CD3⁺ foi abundante, tanto à periferia como no centro da neoplasia. Nos tumores do grupo IV, a infiltração foi muito abundante, sendo a área ocupada pelas células CD3⁺ maior do que a área ocupada pelas células tumorais (Figura 16).



a) b)
Figura 16: Imunorreatividade para o CD3 em linfócitos T. a) Histiocitoma cutâneo canino do grupo II. Estalão=30 µm; b) Histiocitoma cutâneo canino do grupo IV. Estalão=120 µm.

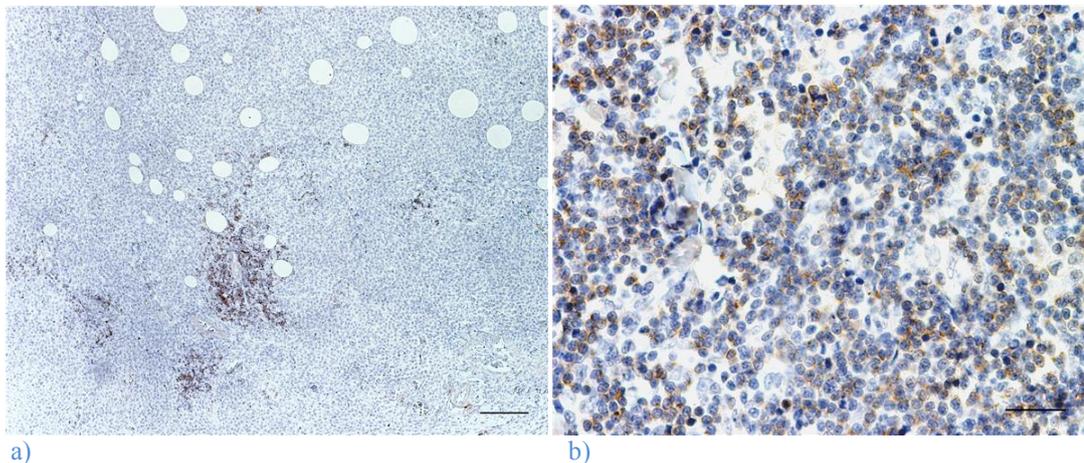
❖ Linfócitos B (CD79)

Em todos os casos, a infiltração por linfócitos B, positivos ao CD79, foi inferior aos CD3⁺, mas a sua distribuição no tumor foi semelhante. Como se resume no quadro 6, em 14 tumores (35,0%) a marcação foi ausente, escassa em 17,5% dos casos (n=7) e moderada em 47,5% (n=19). Nenhum dos casos apresentou uma infiltração por linfócitos CD79⁺ considerada extensa, assim como, em nenhum dos casos, o número de linfócitos CD79⁺ foi maior que o número de células neoplásicas.

Nos tumores do grupo I, predominou a infiltração escassa ou ausente de linfócitos CD79⁺. Nos tumores do grupo II, a infiltração foi, em geral, moderada e localizada na periferia

do tumor. Nos grupos III e IV, as neoplasias frequentemente possuíam infiltrado linfóide CD79⁺ moderado, que se estendia da periferia ao centro da lesão (Figura 17).

No quadro 6 são apresentadas, resumidamente, as frequências absolutas e relativas da marcação por linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD79, nos 40 histiocitomas avaliados.



a) **Figura 17:** Imunoreactividade para o CD79⁺ em linfócitos B. a) Histiocitoma cutâneo canino do grupo II. Estalão=120 μm; b) Histiocitoma cutâneo canino do grupo IV. Estalão= 30 μm.

4.4 Análise Comparativa entre os Grupos Histológicos

Com o objectivo de determinar quais as variáveis com possível associação com o processo de regressão do histiocitoma cutâneo canino, foi efectuada, para cada uma delas, uma análise estatística, de forma a facilitar a exposição e interpretação dos resultados. Deste modo, foram avaliadas as associações estatísticas entre cada um dos grupos histológicos e as diferentes variáveis estudadas, clínicas e histológicas.

- **Associações entre os grupos histológicos e as variáveis clínicas:**

A maioria dos tumores pertencentes ao grupo I, surgiram em animais com idade igual ou inferior a 2 anos (n=19; 76,0%) e foram, mais frequentemente, encontrados ao nível dos membros (n=11; 39,3%). Neste grupo, apesar de terem surgido mais animais do sexo masculino (n=17; 58,6%), não pareceu existir predisposição sexual.

No grupo II, houve um predomínio de animais com idade igual ou inferior a 2 anos (n=18; 85,7%), as lesões localizaram-se, preferencialmente, ao nível da cabeça (n=9; 45,0%), e os machos surgiram como o sexo mais frequentemente afectado (n=13; 59,1%).

Nos tumores do grupo III, uma grande fracção dos animais tinha idade igual ou inferior a 2 anos (n=50; 72,5%) e a localização variava, principalmente, entre a cabeça (n=24; 34,3%) e os membros (n=25; 35,7%). Neste grupo, predominaram os animais do sexo feminino (n=38; 50,7%).

Em relação ao grupo IV, mais uma vez predominaram os animais com idade igual ou inferior a 2 anos (n=21; 75,0%) e a localização foi mais frequente ao nível da cabeça (n=15; 41,7%). As fêmeas, neste grupo histológico, mostraram uma maior frequência (n=20; 54,1%).

Em todos os grupos, houve um predomínio de tumores com tamanho inferior a 2 cm de diâmetro. Apenas nos grupos II, III e IV, foi possível encontrar tumores com um diâmetro igual ou superior a 3 cm, no entanto, este achado só se verificou num tumor de cada grupo. Tumores com diâmetro compreendido entre 2 e 3 cm mostraram maior frequência absoluta dentro do grupo III (n=13; 17,1%), mas todos os outros grupos apresentaram lesões de tamanho incluído nesse intervalo, nomeadamente 5 tumores (17,2%) no grupo I, 4 tumores (17,4%) no grupo II e 1 tumor (2,6%) no grupo IV.

Os tumores do grupo I foram mais frequentes nos animais de raça indeterminada (n=8; 7,6%). Já nos grupos II, III e IV, estavam representados, maioritariamente, tumores de animais da raça Boxer. Estes incluíram 6 tumores (6,1%) no grupo II, 19 tumores (25,0%) no grupo III e 8 tumores (21,1%) no grupo IV.

Tal como é apresentado no quadro 4, nenhuma das variáveis clínicas avaliadas apresentou diferenças significativas entre os grupos histológicos.

Quadro 5: Associação entre o grupo histológico e as variáveis clínicas.

Variáveis clínicas	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Idade (Anos) (n=143)									
≤2	19	76,0	18	85,7	50	72,5	21	75,0	0,873
2-4	1	4,0	0	0,0	5	7,2	2	7,1	
≥4	5	20,0	3	14,3	14	20,3	5	17,9	
Localização (n=154)									
Abdómen	4	14,3	1	5,0	2	2,9	4	11,1	0,640
Cabeça	6	21,4	9	45,0	24	34,3	15	41,7	
Cauda	0	0,0	0	0,0	1	1,4	0	0,0	
Pescoço	2	7,1	1	5,0	10	14,3	2	5,6	
Membros	11	39,3	6	30,0	25	35,7	11	30,6	
Tórax	5	17,9	3	15,0	8	11,4	4	11,1	
Sexo (n=163)									
Macho	17	58,6	13	59,1	37	49,3	17	45,9	0,638
Fêmea	12	41,4	9	40,9	38	50,7	20	54,1	
Tamanho (n=166)									
<2	24	82,8	18	78,3	62	81,6	36	94,7	0,346
2-3	5	17,2	4	17,4	13	17,1	1	2,6	
≥3	0	0,0	1	4,3	1	1,3	1	2,6	

• **Associações entre os grupos histológicos e as variáveis histológicas:**

Da análise do quadro 6, podemos verificar que existiram associações significativas entre os grupos histológicos e a ulceração ($p=0,023$), o índice mitótico ($p<0,001$), o estroma ($p<0,001$), a quantidade ($p<0,001$) e localização da necrose ($p<0,001$) e a presença de células multinucleadas ($p<0,001$).

Quadro 6: Associação entre o grupo histológico e as variáveis histológicas.

Variáveis histológicas	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Ulceração									
0	6	20,7	3	13,0	6	7,9	3	7,9	0,023*
1	10	34,5	6	26,1	12	15,8	2	5,3	
2	9	31,0	6	26,1	26	34,2	14	36,8	
3	4	13,8	8	34,8	32	42,1	19	50,0	
Índice mitótico									
<2	0	0,0	2	8,7	18	23,7	28	73,7	<0,001*
2≤x<5	14	48,3	11	47,8	46	60,5	9	23,7	
≥5	15	51,7	10	43,5	12	15,8	1	2,6	
Epiderme									
Normal	5	17,2	1	4,3	11	14,5	3	7,9	0,120
Ulcerada	4	13,8	10	43,5	27	35,5	18	47,4	
Hiperplasia regular	5	17,2	2	8,7	4	5,3	5	13,2	
Hiperplasia irregular	5	17,2	2	8,7	16	21,1	7	18,4	
Hiperplasia pseudocarc.	10	34,5	8	34,8	18	23,7	5	13,2	
Estroma									
Escasso	29	100,0	21	91,3	61	80,3	13	34,2	<0,001*
Moderado	0	0,0	2	8,7	15	19,7	25	65,8	
Abundante	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Necrose (Quantidade)									
Ausente	23	79,3	9	39,1	19	25,0	20	52,6	<0,001*
Escassa	4	13,8	8	34,8	11	14,5	3	7,9	
Moderada	2	6,9	5	21,7	28	36,8	10	26,3	
Extensa	0	0,0	1	4,3	18	23,7	5	13,2	
Necrose (Localização)									
Ausente	23	79,3	9	39,1	19	25,0	20	52,6	<0,001*
Periférica	5	17,2	10	43,5	10	13,2	4	10,5	
Difusa	1	3,4	4	17,4	47	61,8	14	36,8	
Células multinucleadas									
Ausentes	27	93,1	18	78,3	52	68,4	13	34,2	<0,001*
Presentes	2	6,9	5	21,7	24	31,6	25	65,8	
Foliculite/Furunculose									
Ausente	26	89,7	17	73,9	63	82,9	33	86,8	0,443
Presente	3	10,3	6	26,1	13	17,1	5	13,2	
Vasculite									
Ausente	27	93,1	22	95,7	69	90,8	38	100,0	0,267
Presente	2	6,9	1	4,3	7	9,2	0	0,0	
Fibrose superficial									
Ausente	27	93,1	22	95,7	69	90,8	31	81,6	0,253
Presente	2	6,9	1	4,3	7	9,2	7	18,4	

(* - Associação significativa)

Relativamente à ulceração dos tumores, verificou-se que, nos grupos III e IV, as úlceras apresentavam maior extensão, predominando as úlceras que atingiam a derme em profundidade.

O índice mitótico foi mais acentuado nos tumores pertencentes ao grupo I e II, havendo uma grande percentagem de lesões com mais de 5 figuras de mitose, por campo de grande ampliação. No grupo III, predominou um índice mitótico moderado, com contagens compreendidas entre 2 e 4 mitoses, por campo de grande ampliação, e no grupo IV, observou-se que, no geral, os tumores apresentavam um índice mitótico reduzido, com contagens que não ultrapassavam, na maioria, 1 mitose, por campo de grande ampliação.

O estroma era, no geral, escasso, nos grupos I e II, variando entre o escasso e o moderado, nos tumores do grupo III, e tornando-se, maioritariamente, moderado, no grupo IV.

A necrose apresentou-se mais marcada e difusa nos grupos III e IV, sendo, preferencialmente, nula ou escassa, com localização periférica, nos grupos I e II.

Nos tumores dos grupos III e IV, a presença de células multinucleadas foi mais evidente, não ultrapassando os 7 e 22%, nos grupos I e II, respectivamente.

- **Associações entre os grupos histológicos e o infiltrado linfóide por linfócitos T e B:**

Pela análise do quadro 7, apresentado seguidamente, é possível verificar que as diferenças observadas entre os grupos histológicos, relativamente à presença de infiltrado inflamatório linfóide, foram estatisticamente significativas, tanto ao nível dos linfócitos T (CD3⁺) como ao nível dos linfócitos B (CD79⁺), tendo sido registados valores de p menores que 0,001 e iguais a 0,002, respectivamente, revelando uma forte associação.

Quadro 7: Frequência relativa e absoluta dos histiocitomas cutâneos caninos relativamente à marcação por linfócitos T CD3⁺ e CD79⁺ e respectivas associações estatísticas.

Marcador	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		p	
	n	%	n	%	n	%	n	%		
CD3⁺	1	10	100	0	0	0	0	0	<0,001*	
	2	0	0	10	100	2	20	0		0
	3	0	0	0	0	8	80	0		0
	4	0	0	0	0	0	0	10		100
CD79⁺	1	9	90	2	20	3	30	0	0	0,002*
	2	1	10	1	10	2	20	3	30	
	3	0	0	7	70	5	50	7	70	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	

(* - Associação significativa).

5 DISCUSSÃO

O histiocitoma cutâneo canino é considerado um tumor benigno epiteliotrópico, constituído por uma população celular com origem nas células apresentadoras de antigénio intraepidérmicas - as células de Langerhans (Affolter e Moore, 2002; Woods *et al.*, 2004). Na maioria dos casos, surge como uma lesão solitária, comum em animais jovens (Moore *et al.*, 1996; Fulmer e Mauldin, 2007), de forma nodular e que infiltra a derme, tanto superficial, chegando à junção dermo-epidérmica, como mais profundamente, até à zona subcutânea (Moore *et al.*, 1996).

A evolução biológica do tumor é caracterizada por um período de rápido crescimento, durante 1-4 semanas, seguido de um processo de regressão espontânea ao longo dos 1-3 meses seguintes (Baines *et al.*, 2008), processo que é caracterizado por uma infiltração de células inflamatórias, nomeadamente linfócitos, observada no exame citológico ou histopatológico (Fulmer e Mauldin, 2007).

A regressão espontânea representa uma fase da carcinogénese pouco compreendida, onde se observa a remissão parcial ou total de uma neoplasia, na ausência de um tratamento efectivo (Lowe *et al.*, 1997). Está descrita em alguns tumores, quer no Homem (Silva *et al.*, 2000; Printz, 2001; Halliday *et al.*, 2005; Penido *et al.*, 2007), quer nos animais (Burns *et al.*, 1976; Cui *et al.*, 2003; Drummond *et al.*, 2008), estando, aparentemente, associada a uma resposta imunitária eficiente.

Estudos recentes têm demonstrado que a infiltração tumoral por linfócitos está associada a uma evolução favorável da doença, nomeadamente em determinados tipos de cancro no homem, incluindo o melanoma e os carcinomas colórectal, ovárico, cervical, hepatocelular, urotelial (Lee *et al.*, 2008), mamário, prostático e renal (Zhang *et al.*, 2003). Nestes tumores, extensos infiltrados de células inflamatórias foram correlacionados com uma menor frequência de metastização ganglionar ou recorrência da doença e com um maior tempo de sobrevivência (Lee *et al.*, 2008), sendo, deste modo, considerados como um importante indicador de prognóstico (Tomsová *et al.*, 2007; Leffers *et al.*, 2008). A presença de um infiltrado intra-tumoral, por linfócitos, é considerada um reflexo da resposta imunitária do organismo à presença da neoplasia (Leffers *et al.*, 2008).

Ao longo do tempo, tem sido reconhecido que a imunosobrevivência tumoral representa apenas uma pequena dimensão da complexa relação existente entre o sistema imunitário e o cancro (Dunn *et al.*, 2004).

Os tecidos tumorais são frequentemente invadidos por um infiltrado leucocitário, sob a influência do sistema imunitário, numa tentativa de rejeição do tumor. Muitas destas células inflamatórias são capazes de destruir as células tumorais ou segregar factores anti-angiogénicos. No entanto, o infiltrado pode ter, também, um efeito promotor do crescimento tumoral, produzindo quimiocinas (citocinas quimiotácticas) que atraem os leucócitos que, por sua vez, produzem metaloproteinases que dissolvem a matriz extracelular, favorecendo a invasão pelas células tumorais. As quimiocinas actuam como factores de crescimento tumoral e são angiogénicas, promovendo a formação de neovasos que facilitam a invasão e metastização tumorais (Mareel e Leroy, 2002). Os mastócitos, eosinófilos e linfócitos T activados podem, também, contribuir para o desenvolvimento de neoplasias, nomeadamente através da libertação de proteases extracelulares, factores pró-angiogénicos e quimiocinas (Coussens e Werb, 2002).

Actualmente, a relação entre a inflamação, o sistema imunitário inato ou inespecífico e o cancro, é globalmente aceite, no entanto, muitos dos mecanismos moleculares e celulares que medeiam esta relação, permanecem desconhecidos e difíceis de explicar.

A nível experimental, os animais podem adquirir protecção contra determinado tipo de neoplasias e o tratamento através da imunoterapia pode causar a regressão tumoral, direccionando o sistema imunitário para eliminar, especificamente, as células tumorais que expressam determinados antigénios. Observações semelhantes podem constituir uma nova esperança na melhoria dos tratamentos contra o cancro (Jones *et al.*, 1997).

No nosso trabalho, os 166 histiocitomas cutâneos caninos foram classificados em 4 grupos histológicos, dependendo da quantidade relativa e do padrão de distribuição dos linfócitos no tumor, numa tentativa de estabelecer uma escala de regressão tumoral.

As diferentes variáveis estudadas, clínicas e histológicas, foram avaliadas em cada um dos grupos, na tentativa de as relacionar com o processo de regressão.

No estudo efectuado, não parece existir qualquer tipo de relação entre as **características clínicas** observadas e o **processo regressivo**, como referido por Cockerell e Slauson (1979).

Dos 166 histiocitomas, a maioria foi observada no **sexo** masculino (51,5%). No entanto, apesar de ter sido mais frequente nos machos, não parece existir predisposição sexual para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia. Taylor e seus colaboradores (1969) estudaram 226 HCC, dos quais, 151 ocorreram em machos e 75 em fêmeas (Taylor *et al.*, 1969). Cockerell e Slauson (1979) observaram 54 histiocitomas em machos, num total de 93 HCC. Num estudo efectuado por Kaim e colaboradores, dos 30 HCC avaliados, 15 ocorreram em machos (Kaim *et al.*, 2006).

A **faixa etária** mais afectada pelo HCC foi marcadamente diferente da observada noutro tipo de neoplasia benigna (Taylor *et al.*, 1969). A maioria dos animais tinha menos de 4 anos de idade, mostrando uma maior prevalência do tumor em animais mais jovens. No entanto, este tipo de neoplasia parece ocorrer em animais de qualquer idade, já que, no nosso estudo, estavam afectados animais com idades compreendidas entre os 2 meses e os 13 anos, tendo sido observados 27 animais com idade igual ou superior a 4 anos. Dados concordantes foram obtidos por outros autores (Taylor *et al.*, 1969; Cockerell e Slauson, 1979; Moore *et al.*, 1996; Kaim *et al.*, 2006).

A maioria dos tumores em estudo pertencia a animais de **raça** pura. A distribuição rácica foi bastante variável, observando-se um predomínio dos animais de raça Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Retriever do Labrador. Outros autores sugerem, também, uma aparente predisposição em determinadas raças, nomeadamente no Boxer e no Dachshund (Taylor *et al.*, 1969; Scott *et al.*, 2001; Wellman, 2007), no Cocker Spaniel, Dogue Alemão, Pastor de Shetland (Scott *et al.*, 2001; Wellman, 2007), Pastor Alemão, Bull Terrier, Rottweiler, Shar Pei, Retriever do Labrador (Scott *et al.*, 2001), Caniche e Bulldog Inglês (Woods *et al.*, 2004). Fulmer e Mauldin (2007) referem a existência de uma predisposição nos animais braquicéfalos como o Boxer e o Bulldog.

Apesar da concordância observada entre os dados obtidos no nosso estudo e os dados dos autores referidos anteriormente, é importante salientar que a existência de uma predilecção por determinadas raças, tornando-as mais frequentemente requeridas pelos proprietários, nomeadamente, em determinadas regiões do país, poderá ter tido uma forte influência nos resultados obtidos.

Pelo facto de ter sido observada uma maior ocorrência do HCC nos animais de raça pura, não será correcto deduzir com firmeza que existe uma predisposição destes animais para o desenvolvimento da doença, apesar das referências citadas indicarem uma predisposição em determinadas raças. Os animais de raça pura poderão ser alvo de maior preocupação e dedicação por parte da maioria dos proprietários e, muitos destes, ainda mantêm a concepção de que os animais de raça indeterminada são “mais fortes”, resistindo mais facilmente a todo o tipo de doença.

A sobrevalorização económica observada, relativamente aos animais de raça pura, pode também constituir um importante factor condicionante, assim como a possibilidade de se poderem vir a tornar importantes exemplares ao nível da reprodução, participação em campeonatos ou exposições caninas. Assim, o aparecimento de um nódulo cutâneo num animal

de raça pura é normalmente interpretado de forma distinta, constituindo um alerta para os proprietários.

No nosso estudo, a raça mais frequentemente afectada foi a Boxer, podendo indicar uma possível predisposição rácica. No entanto, estes animais são, muitas vezes, distinguidos como propensos ao desenvolvimento de outras neoplasias cutâneas mais agressivas, como o mastocitoma ou o melanoma cutâneo (Ettinger e Feldman, 2005), e qualquer desenvolvimento nodular na pele pode constituir motivo de preocupação. Por outro lado, é uma raça caracteristicamente de pêlo muito curto, o que facilita a visualização das lesões.

Neste trabalho, o **tamanho** médio do tumor foi de 1,4 cm, variando entre 0,4 e 3 cm. Apenas 15,6% dos tumores apresentavam um diâmetro maior ou igual a 2 cm. Outros autores referem tamanhos muito semelhantes, nomeadamente histiocitomas com diâmetros compreendidos entre 0,5 e 4 cm (Jubb *et al.*, 2007), geralmente menores que 2,5 cm (Gross *et al.*, 2005) ou menores que 3 cm (Ribson *et al.*, 2007), estando concordantes com os dados por nós obtidos.

A **localização** do HCC apresentou alguma variação de animal para animal, mas, na sua grande maioria, a lesão estava localizada na cabeça, principalmente ao nível do pavilhão auricular, e nos membros, principalmente nas extremidades distais. Kaim e seus colaboradores (2006) referem, também, estas duas localizações como as áreas mais frequentemente afectadas por este tipo de neoplasia (Kaim *et al.*, 2006). Num estudo efectuado por Taylor e colaboradores (1969), dos 520 HCC avaliados, 152 estavam localizados na cabeça, e destes, cerca de metade, estava localizada ao nível do pavilhão auricular (Taylor *et al.*, 1969). A maioria dos autores refere a cabeça (sobretudo o pavilhão auricular), os membros e o pescoço como os locais preferencialmente afectados, podendo, no entanto, desenvolver-se em qualquer parte do corpo (Scott *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2005; Jubb *et al.*, 2007; Ribson *et al.*, 2007).

As áreas supracitadas apresentam diferentes características e susceptibilidades relativamente às áreas menos afectadas pelo HCC, podendo actuar como factores condicionantes do desenvolvimento do tumor. São áreas frequentemente expostas aos raios solares, dada a sua localização mais dorsal. A radiação ultravioleta (UV) tem variadíssimos efeitos ao nível da pele. Um dos principais efeitos, predominantemente causados pela radiação UVB (280-315 nm), é a supressão da imunidade celular (Kolgen *et al.*, 2003). Com a imunossupressão, observada apenas a nível local e não sistémico (Kolgen *et al.*, 2003), ocorre o desaparecimento de células apresentadoras de antigénio, como as células de Langerhans (Kolgen *et al.*, 2002). A disfunção local observada pode resultar, assim, de uma apresentação antigénica incorrecta, inapropriada ou

ineficiente, podendo actuar como um factor favorecedor do desenvolvimento de neoplasias, nomeadamente do HCC. Aberer e colaboradores (1981) sugerem, também, uma maior probabilidade de ocorrer transformação maligna na epiderme exposta cronicamente à radiação UV, em comparação com a da pele protegida da luz solar (Aberer *et al.*, 1981).

As extremidades distais dos membros e os pavilhões auriculares são áreas frequentemente afectadas por ectoparasitas, nomeadamente carraças, e a cabeça e o pescoço são vulneráveis à picada de insectos. Estes parasitas podem, com as suas picadas, desencadear processos inflamatórios cutâneos que, mais uma vez, podem estar na génese deste tipo de neoplasia. No entanto, Taylor e colaboradores (1969) sugerem que o HCC poderá representar um tipo peculiar de inflamação uma vez que, apesar dos esforços efectuados na tentativa de por em evidência um agente etiológico, nomeadamente através de técnicas de isolamento de vírus, exames histológicos para visualização de fungos ou bactérias e inoculação de animais com as células tumorais, nenhum agente infeccioso e/ou oncogénico terá sido detectado (Taylor *et al.*, 1969).

A própria espessura da pele pode ser uma condicionante para a maior ou menor vulnerabilidade da pele a alterações de natureza oncológica, em determinadas localizações anatómicas. No geral, a pele do cão é bastante delgada, variando de 0,1 a 0,5 mm de espessura. A epiderme mais espessa é encontrada nas almofadinhas plantares e no plano nasal, onde pode medir até 1,5 mm (Scott *et al.*, 2001). É de notar que, os HCC em estudo, se desenvolveram sobretudo em zonas de pele cuja epiderme é considerada mais espessa, nomeadamente na cabeça, pescoço e extremidades distais. Pelo contrário, ao nível do abdómen e nas zonas axilar e inguinal, que são zonas de pele mais fina, notou-se uma menor ocorrência da lesão, desenvolvendo-se apenas 11 HCC no abdómen e 4 na axila.

No nosso trabalho, foram observadas associações estatisticamente significativas entre os grupos histológicos e algumas **variáveis histológicas**, nomeadamente a ulceração ($p=0,023$), o índice mitótico ($p<0,001$), o estroma ($p<0,001$), a quantidade ($p<0,001$) e localização da necrose ($p<0,001$) e a presença de células multinucleadas ($p<0,001$). As diferenças observadas entre os grupos tumorais permitiram-nos sugerir que as variáveis histológicas mencionadas poderão estar envolvidas no processo de regressão do HCC.

A **ulceração** foi observada num grande número de tumores, e, tal como foi constatado por Cockerell e Slauson (1979), estava presente em todos os grupos histológicos. No entanto, do grupo I ao grupo IV, foi observado um aumento da frequência de tumores ulcerados. No grupo I, uma grande percentagem dos tumores apresentava-se ulcerado mas a úlcera era geralmente de pequenas dimensões, sendo visível apenas ao microscópio. No grupo IV, metade dos HCC

apresentava já uma úlcera de grandes dimensões e que atingia a epiderme de revestimento do tumor, em toda a sua área. Neste grupo, praticamente todos os tumores estavam ulcerados com excepção de 3 HCC. Num estudo efectuado por Kaim e colaboradores (2006), todos os histiocitomas do grupo IV apresentavam uma úlcera de grau variável (Kaim *et al.*, 2006).

O aumento na percentagem de tumores ulcerados e na extensão da úlcera, observado com o aumento do grupo histológico, ou seja, com o infiltrado linfóide, parece sugerir que a ulceração poderá ser uma ocorrência precoce no processo de regressão do HCC. É de realçar que, na periferia das regiões ulceradas, ocorria um decréscimo no número de camadas epidérmicas, com consequente diminuição da espessura dos estratos germinativo e espinhoso. Desta forma, a ulceração deverá ter origem aparente na destruição das camadas epidérmicas mais internas, e não por uma erosão, processo que normalmente é observado anteriormente à ulceração. O facto de existirem tumores não ulcerados, no grupo IV, parece indicar que, numa fase final, poderá ocorrer um processo de regeneração, surgindo uma epiderme com normal constituição e organização histológica ou com diminuição do número de camadas celulares.

Num grande número de trabalhos, é feita referência a um moderado (Gross *et al.*, 2005) ou elevado **índice mitótico** presentes no HCC (Scott *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2004; Ribson *et al.*, 2007). Jubb e colaboradores (2007) fazem referência a um índice mitótico variável, mas numeroso, na grande maioria dos tumores, com mais de 10-15 mitoses observadas, por campo de grande ampliação (Jubb *et al.*, 2007).

No nosso trabalho, o índice mitótico estava compreendido entre 0 e 19 mitoses, por campo de grande ampliação, sendo, em mais de metade dos tumores do grupo I, igual ou maior que 5 mitoses e, na maioria dos tumores do grupo IV, menor que 2 mitoses, por campo de grande ampliação. No geral, era maior nos tumores do grupo I e II, decrescia no grupo III, sendo menor que 2, na grande maioria dos histiocitomas do grupo IV, sugerindo um decréscimo do número de mitoses nos histiocitomas em regressão. Num trabalho realizado por Taylor e colaboradores (1969), foi observado um índice mitótico compreendido entre 2,4 e 8,7, com uma média de 5,5 figuras de mitose (Taylor *et al.*, 1969). Cockerell e Slauson (1979) referem um índice mitótico compreendido entre 2 e 5 mitoses, por campo de grande ampliação, nos tumores do grupo I.

O facto de este parâmetro apresentar diferenças significativas entre os grupos histológicos avaliados, parece indicar que, na regressão tumoral, existirá um decréscimo na proliferação celular. Este processo de decréscimo do índice proliferativo poderá conferir ao tumor a capacidade de terminar o processo de diferenciação celular, regredindo posteriormente.

A quantidade de **estroma** tumoral sofreu um acréscimo do grupo I ao grupo IV, tendo revelado uma associação estatisticamente significativa com o grupo histológico. No grupo I, todos os tumores apresentavam um estroma escasso, no entanto, com o aumento do infiltrado inflamatório linfóide, era observado, também, um aumento na quantidade de estroma entre as células inflamatórias, tendo sido observado, na maioria dos tumores do grupo IV, um estroma moderado. Kaim e colaboradores (2006) referem a existência de grandes quantidades de tecido conjuntivo nos tumores classificados como grupo IV (Kaim *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que, ao longo da resolução do processo, ou seja, ao longo da regressão tumoral, o tecido neoplásico vai sendo progressivamente substituído por áreas de tecido de granulação, ocorrendo como que um processo de cicatrização da lesão.

Consoante o grupo histológico avaliado, foram observadas diferenças relativamente à quantidade e localização da **necrose** intratumoral. Foi observada uma maior quantidade de necrose nos grupos II e III, tendo-se destacado o grupo III como o grupo com maior quantidade de necrose. Nos grupos I e IV, foi observado um maior número de tumores sem necrose associada, que, quando existia, era, na sua grande maioria, escassa ou ausente. Desta forma, parece existir uma relação entre a regressão do tumor e a necrose intratumoral, observando-se um aumento na sua quantidade com o grupo histológico, observações, essas, concordantes com Cockerell e Slauson (1979). A ausência de necrose no grupo IV poderá ser explicada pela resolução do processo, com um aumento do infiltrado linfóide, num estroma moderado e, por vezes, áreas de tecido fibroso.

Em relação ao padrão de distribuição da necrose, existiram, também, diferenças significativas entre os grupos histológicos. Do grupo I ao grupo IV, observou-se um padrão de distribuição progressivo, desde uma localização mais periférica, nos grupos I e II, a uma localização mais difusa, atingindo o centro do tumor, nos grupos III e IV. Mais uma vez se constata que a morte celular, por necrose, poderá constituir um dos fenómenos relacionados com o processo de regressão do HCC.

Do grupo I ao grupo IV, foi observado um aumento no número de **células multinucleadas**, estando, no geral, ausentes no grupo I e presentes na maioria dos tumores do grupo IV. Cockerell e Slauson (1979) encontraram também uma maior frequência de tumores com células multinucleadas entre os tumores do grupo IV, estando concordantes com os resultados por nós obtidos. Dados como estes sugerem uma associação estatisticamente significativa entre o grupo histológico e a presença de células multinucleadas.

Um dos objectivos deste estudo foi o de tentar obter alguma informação acerca dos mecanismos implicados na resposta imunitária anti-tumoral no HCC em regressão.

No nosso estudo, os linfócitos B e T não podem ser correctamente diferenciados usando a coloração de HE. Como os linfócitos activados e os histiócitos podem apresentar uma imagem semelhante, é dada preferência ao uso de anticorpos para a caracterização do infiltrado mononuclear (Mueller *et al.*, 2002).

Para identificar a presença de **linfócitos T**, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-CD3. O CD3 é um complexo de proteínas presente em todas as células T e tem como função primordial actuar como transdutor de sinal (Tizard, 2000). No nosso estudo, existiu associação estatisticamente significativa entre o grupo histológico e o infiltrado inflamatório por células T ($p < 0,001$). À medida que aumentava o infiltrado linfóide total, ou seja, o grupo histológico, existia um acréscimo do número de linfócitos T que se localizavam na base dos tumores dos grupos I e II, atingiam o centro dos tumores do grupo III e mesmo a epiderme, nos tumores do grupo IV.

A possível intervenção dos **linfócitos B** na regressão do histiocitoma foi estudada, neste trabalho, através da sua identificação pelo método de imunohistoquímica, usando o anticorpo monoclonal anti-CD79. Existiu associação estatisticamente significativa entre a densidade relativa e distribuição de linfócitos B e o grupo tumoral, ou seja, a quantidade de linfócitos totais ($p < 0,001$). Apesar do aumento de linfócitos, que ocorreu na regressão tumoral, ser principalmente devido aos linfócitos T, parece existir uma intervenção dos linfócitos B na dinâmica da regressão.

Moore e colaboradores (1996) referem que a regressão no HCC é mediada, maioritariamente, por células T, estando concordantes com os resultados por nós obtidos. Trabalhos adicionais permitiram-lhes concluir que as células T, presentes nos histiocitomas em estudo, podiam ser subdivididas em células T CD4⁺ (*T helper cells*) e células T CD8⁺ (*T cytotoxic cells*), tendo sido observada uma dominância das células T CD8⁺ relativamente às células T CD4⁺ (Moore *et al.*, 1996).

Num trabalho realizado por Kaim e colaboradores (2006), foi igualmente realizada a quantificação imunohistoquímica do infiltrado linfóide associado ao HCC. Nela foi demonstrado um progressivo aumento de células CD3⁺ (células T), CD21⁺ (células B), CD4⁺ (*T helper cells*) e CD8⁺ (*T cytotoxic cells*) com o processo regressivo. A dominância de linfócitos T CD8⁺, referida por Moore, não foi confirmada para todos os grupos histológicos, tendo sido observada, no grupo

I, uma dominância de linfócitos T CD4⁺, relativamente aos linfócitos T CD8⁺, cujo predomínio apenas foi observado nos histiocitomas dos restantes grupos (Kaim *et al.*, 2006).

As células T CD4⁺ são conhecidas por iniciar uma resposta imunitária anti-tumoral, nomeadamente através da libertação de citocinas (Kaim *et al.*, 2006). Quando os linfócitos T CD4⁺ se ligam aos antígenos estranhos apresentados pelas células dendríticas ou pelos macrófagos, libertam citocinas que atraem leucócitos para a zona lesionada (Mcgavin e Zachary, 2007) influenciando, também, a função de outras células do sistema imunitário, nomeadamente outras células T, células B, macrófagos e células NK (*natural killer*) (Kumar *et al.*, 2005).

A grande proporção de células CD8⁺, nos histiocitomas em regressão, poderá resultar de uma participação inicial de células T *helper*. Kaim e colaboradores (2006) observaram, através da detecção do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm), pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), que, no HCC, com o progressivo aumento de infiltrado linfóide, do grupo I ao grupo IV, ocorria um aumento na expressão de citocinas, nomeadamente interleucina-2 (IL-2), interferão-gamma (IFN- γ), TNF- α , IL-10 e TGF- β (*transforming growth factor-beta*) (Kaim *et al.*, 2006). Estudos clínicos propõem que este grupo de citocinas poderá contribuir para o desenvolvimento de respostas anti-tumorais, actuando como uma protecção contra o crescimento de tumores, em parte, graças a uma possível rejeição imunomediada das neoplasias (Wrann *et al.*, 1987; Topalian *et al.*, 1988; Qin e Blankenstein, 1995; Berman *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996; Bellone *et al.*, 1999; Rosenberg, 2001; Ikeda *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2003; Dunn *et al.*, 2004; Mocellin *et al.*, 2005). Estas citocinas são produzidas por um grande número de neoplasias, no entanto, o significado biológico da sua produção continua por esclarecer. Estudos adicionais, direccionados para a investigação do seu papel anti-tumoral, seriam interessantes, de forma a contribuir para o esclarecimento do desenvolvimento de uma resposta imunitária efectiva, mediada, em parte, por determinado grupo de citocinas.

Os linfócitos B são células especializadas na produção de anticorpos. Podem ser activados por um mecanismo independente das células T ou dependente das células T. No primeiro, estão envolvidos antígenos com epitopos repetidos, nomeadamente polissacarídeos, que se ligam às imunoglobulinas das células B, promovendo a sua proliferação e diferenciação. O reconhecimento antigénico é feito através da imunoglobulina M (IgM) e da imunoglobulina D (IgD), presentes na superfície celular dos linfócitos B, e que actuam como receptores dos antígenos livres (Kumar *et al.*, 2005). No segundo, as células B reconhecem o antígeno indirectamente. O antígeno é apresentado à célula T, envolvendo, provavelmente, outras moléculas como MHC classe II, que é activada, libertando factores de crescimento para as

células B e mediando a sua divisão e transformação para células de memória ou a sua diferenciação para plasmócitos. Desta forma, após uma estimulação antigénica apropriada e posterior sinalização por parte das células T, os linfócitos B diferenciam-se, nos tecidos, em plasmócitos, responsáveis pela secreção de imunoglobulinas no ambiente circundante (Jones *et al.*, 1997), sendo estas consideradas os mediadores da imunidade humoral (Kumar *et al.*, 2005). As células dendríticas interagem, assim, com as células B, de uma forma indirecta, através dos linfócitos T, o que deverá justificar a associação estatística encontrada, no nosso trabalho, entre a densidade relativa de linfócitos T e B.

A forte capacidade das células dendríticas em estimular as células T deverá depender da fase de activação das células de Langerhans. Baines e colaboradores (2008) põem a hipótese das células tumorais do HCC apresentarem um estado de maturidade mais desenvolvido do que as células de Langerhans epidérmicas imaturas (Baines *et al.*, 2008). As células do HCC sofrem uma maturação intralesional e apresentam, posteriormente, os antígenos tumorais aos linfócitos, mediando a sua própria destruição (Baines *et al.*, 2008). A hipótese da maturação das células tumorais do histiocitoma é também proposta por Moore *et al.* (1996), baseado na observação da imunorreactividade para a integrina β -1 (VLA-4) em alguns histiocitomas.

Estudos realizados noutro tipo de tumores têm revelado uma associação forte entre o infiltrado inflamatório linfóide e a regressão tumoral. O melanoma, o carcinoma das células basais (CCB), e o queratoacantoma, em regressão, são neoplasias frequentemente associadas a um infiltrado abundante de células T activadas, nomeadamente, células $CD4^+$ (Lowe *et al.*, 1997; Halliday *et al.*, 2005). No melanoma, as células T $CD4^+$ são responsabilizadas pelo processo de regressão, através da secreção de determinadas citocinas (IL-2 e TNF- β) (Lowe *et al.*, 1997; Printz, 2001). No CCB é observado um predomínio de células T no infiltrado celular, sugerindo uma defesa imunitária mediada por linfócitos T, contra a proliferação do CCB (Habets *et al.*, 1988). Os linfócitos provocam, nestes casos, um fraccionamento da população de células tumorais, sugerindo uma destruição tumoral por parte das células T (Printz, 2001). Dados semelhantes parecem indicar uma contribuição dos linfócitos T no processo de regressão tumoral, não só no HCC, mas, também, noutro tipo de neoplasias, incluindo neoplasias malignas.

Dados adquiridos ao longo dos tempos, têm sugerido uma base celular na sobrevivência imunitária contra as neoplasias e demonstraram que os linfócitos, tanto do sistema imunitário inato como adquirido, têm capacidade para prevenir o desenvolvimento tumoral (Dunn *et al.*, 2004).

A imunosobrevivência tumoral parece ser um processo multivariado no qual as respostas do sistema imunitário são influenciadas por um grande número de factores, nomeadamente a origem das células tumorais, a transformação tumoral, a localização anatómica, a produção de citocinas e a imunogenicidade inerente ao hospedeiro. Seria necessário estudar os efeitos de tão variados componentes imunitários, envolvidos no desenvolvimento tumoral, empregando diferentes modelos, induzidos quimicamente ou espontâneos, de forma a determinar se a resposta imunitária, concebida para eliminar o tumor, é globalmente semelhante ou localmente distinta.

A grande frequência do HCC, observada entre a população canina, leva muitos autores a considerar o cão como um interessante modelo na compreensão das desordens proliferativas, com origem nas células de Langerhans, no entanto, outros estudos serão necessários de forma a determinar, com maior detalhe, o papel de tão variada população celular na regressão tumoral.

6 CONCLUSÃO

Na série de neoplasias estudada podemos concluir que o histiocitoma cutâneo canino é um tumor cutâneo solitário, frequentemente observado em animais jovens, de várias raças e cuja localização preferencial é a cabeça e as extremidades distais.

As características apresentadas revelam que o HCC é um tumor benigno, que, apesar de ser bastante proliferativo, não apresenta um fenótipo invasor. As células tumorais apresentam, também, características benignas, nomeadamente alto grau de diferenciação, moderado pleomorfismo, relação núcleo-citoplasma baixa, geralmente um único nucléolo, sendo, na maioria das vezes, pouco proeminente.

A regressão tumoral parece ser a evolução mais provável do HCC, onde vão actuar um conjunto de mecanismos que, isoladamente, não justificam a regressão, mas que, em conjunto, contribuem para a destruição das células neoplásicas. Tais mecanismos compreendem a ulceração, a necrose, o índice mitótico, o estroma tumoral e a presença de células multinucleadas. A típica regressão do HCC, observada neste estudo, está, também, associada a uma resposta imunitária de células inflamatórias, nomeadamente linfócitos B e T, estando os últimos em maior quantidade. Os linfócitos apresentam-se, inicialmente, na periferia basolateral, com invasão subsequente do restante tumor. Os tumores com maior quantidade de tecido linfóide, ou seja, com maior evolução no processo de regressão, apresentam úlceras de maior tamanho, áreas de maior quantidade e extensão de necrose, menor índice mitótico, estroma mais moderado e maior quantidade de células multinucleadas.

As células do histiocitoma, parecem, desta forma, regular o seu próprio destino, através da mediação de vários mecanismos que vão estimular a destruição celular, onde a infiltração por linfócitos e a morte celular parecem ser fenómenos intervenientes no processo de regressão neoplásica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberer W, Schuler G, Stingl G; Honigsmann H, Wolf K. Ultraviolet Light Depletes Surface Markers of Langerhans Cells. *J Invest Dermatol*. 1981;76(3):202-210.
- Affolter VK, Moore PF. Localized and Disseminated Histiocytic Sarcoma of Dendritic Cell Origin in Dogs. *Vet Pathol*. 2002;39(1):74-83.
- Baines SJ, Bujdoso R, Blacklaws BA, McInnes E, Moore PF, McConnel IM. Maturation stages of dendritic cells in canine cutaneous histiocytoma. *Vet Dermatol*. 2000;11(Suppl. 1):9-10.
- Baines SJ, Blacklaws BA, McInnes E, McConnel IM. (). CCH cells are potent stimulators in the allogeneic mixed leucocyte reaction. *Vet Immunol and Immunopathol*. 2008;119:316-321.
- Baron JA, Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med*. 2000;51:511-523.
- Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-Associated Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Contribute to a Systemic Th2 Immune Phenotype in Pancreatic Carcinoma Patients. *Am J Pathol*. 1999;155(2):537-547.
- Berman RM, Suzuki T, Tahara H, Robbins PD, Narula SK, Lotze M. Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice. *J Immunol*. 1996;157:231-238.
- Burns FJ, Vanderlaan M, Sivak A, Albert RE. Regression Kinetics of Mouse Skin Papillomas. *Cancer Research*. 1976;36:1422-1427.
- Cai XY, Gao Q, Qiu SJ, Ye SL, Wu ZQ, Fan J, Tang ZY. Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin Oncol*. 2006;132:293-301.
- Cangul IT. Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumours. *Veterinary Sciences Tomorrow - Issue 4*. 2001.
- Cockerell GL, Slauson DO. Patterns of lymphoid infiltrate in the canine cutaneous histiocytoma. *J Comp Pathol*. 1979;89(2):193-203.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:19-26.

Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, Delong CJ. Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *PNAS*. 2003;100(11):6682-6687.

Curti A, Fogli M, Ratta M, Biasco G, Tura S, Lemoli RM. Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34+ progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001;15:49-52.

Drumond KO, Quessada AM, Silva SMMS, Costa FAL, Gonçalves LMF, Silva LS, Lopes RRFB. Regressão Espontânea de Tumor Venéreo Transmissível Canino. Relato de Caso. 2008.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. (). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-360.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 2004;21:137-148.

Ettinger SJ, Feldman EC. Canine and Feline Histiocytic Diseases. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. 6^a ed., 2005:779-782.

Fernandez NJ, West KH, Jackson ML, Kidney BA. Immunohistochemical and Histochemical Stains for Differentiating Canine Cutaneous Round Cell Tumors. *Vet Pathol*. 2005;42:437-445.

Ferrer L, Fondevila D, Rabanal R, Ramis A. Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. *J Comp Pathol*. 1992;106(3):311-4.

Fulmer AK, Mauldin GE. Canine histiocytic neoplasia: An overview. *Can Vet*. 2007;48:1041-1050.

Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. (). Mesenchymal Neoplasms and other Tumors. In: Skin Diseases of the dog and cat. 2^a ed. Blackwell Science, 2005:837-850.

Habets WJM, Tank B, Vuzevski VD, Reede EC, Stolz E, Joost T. Characterization of the Mononuclear Infiltrate in Basal Cell Carcinoma: A Predominantly T Cell-mediated Immune Response With Minor Participation of Leu-7+ (Natural Killer) Cells and Leu-14+ (B) Cells. *J Invest Dermatol*. 1988;90:289-292.

- Halliday GM, Patel A, Hunt MJ, Tefany FJ, Barnetson RSC. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: Association with infiltrating CD4+ T cells. *World Journal of Surgery*. 2005;19(3):352-358.
- Hoinghaus R, Hewicker-Trautwein M, Mischke R. Immunocytochemical differentiation of canine mesenchymal tumors in cytologic imprint preparations. *Vet Clin Pathol*. 2008;37(1):104-111.
- Jones TC, Hunt RD, King NW. Inflammation and repair. In: *Veterinary Pathology*. 6^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1997:113-124.
- Jones TC, Hunt RD, King NW. The Skin and its Appendages. In: *Veterinary Pathology*. 6^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1997: 867.
- Jubb Kennedy; Palmer's. Skin and Appendages. In: *Pathology of Domestic Animals*. 5^a ed. Saunders Elsevier, 2007:768-770.
- Kaim U, Moritz A, Failing K, Baumgartner W. The regression of a canine Langerhans cell tumour is associated with increased expression of IL-2, TNF- α , IFN- γ and iNOS Mrna. *Blackwell Publishing Ltd, Immunology*. 2006;118:472-482.
- Kipar A, Baumgartner W, Kremmer E, Frese K, Weiss E. Expression of major histocompatibility complex class II antigen in neoplastic cells of canine cutaneous histiocytoma. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998;62:1-13.
- Kolgen W, Steeg H, Horst GTJ, Hoeijmakers JHJ, Vloten WA, Gruijl FR, Garssen J. Association of Transcription-Coupled Repair but Not Global Genome Repair with Ultraviolet-B-Induced Langerhans Cell Depletion and Local Immunosuppression. *J. Invest Dermatol*. 2003;121:751-756.
- Kolgen W, Both H, Weelden H, Guikers KLH, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Knol EF, Vloten WA, Gruijl F.R. Epidermal Langerhans Cell Depletion After Artificial Ultraviolet B Irradiation of Human Skin In Vivo: Apoptosis versus Migration. *J Invest Dermatol*. 2002;118:812-817.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Diseases of Immunity. In *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7^a ed. Elsevier Saunders, 2005:194-204.
- Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *British Journal of Cancer*. 2008;99:1704-1711.

Leffers N, Gooden MJM, Jong RA, Hoogeboom B, Hoor KA, Hollema H, Boezen HM, Zee AGJ, Daemen T, Nijman HW. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;58:449-459.

Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RC, Halliday GM. T Helper 1 Cytokine Mrna Is Increased in Spontaneously Regressing Primary Melanomas. *J Invest Dermatol.* 1997;108:914-919.

Marchal ISA, Dezutter-Dambuyant C, Willett BJ, Woo JC, Moore PF, Magnol JP, Schmitt D, Marchal T. Immunophenotypic characterization of feline Langerhans cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;58(1):1-16.

Mareel M, Leroy A. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Physiol Rev.* 2002;83:337-376.

McGavin MD, Zachary JF. Chronic Inflammation and Wound Healing. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* 4^a ed. Mosby Elsevier, 2007:153-208.

Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol.* 2005;78(5):1043-1051.

Moore PF, Schrenzel MD, Affolter VK, Olivry T, Naydan D. Canine Cutaneous Histiocytoma Is an Epidermotropic Langerhans Cell Histiocytosis That Expresses CD1 and Specific β 2-Integrin Molecules. *Am J Pathol.* 1996;148(5):1699-1708.

Moore PF. Canine histiocytic neoplasia: cell lineages and disease classification. In: *Genes, Dogs and Cancer: 2nd Annual Canine Cancer Conference,* 2002.

Moore PF, Affolter VK, Vernau W. Canine Hemophagocytic Histiocytic Sarcoma: A Proliferative Disorder of CD11+ Macrophages. *Vet Pathol.* 2006;43:632-645.

Nesbit EA, Bain PJ, Northrup NC, Latimer KS. Canine Round Cell Tumors. In: *Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program,* 2002

Obata M, Tagami H. Alteration in Murine Epidermal Langerhans Cell Population by Various UV Irradiations: Quantitative and Morphologic Studies on the Effects of Various Wavelengths of Monochromatic Radiation on Ia-Bearing Cells. *J Invest Dermatol.* 1985;84(2):139-145.

Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnick B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:2654-2666.

Penido NO, Tangerina RP, Kosugi EM, Abreu CEC, Vasco MB. Vestibular Schwannoma: Spontaneous tumor involution. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007;73(6):867-71.

Printz C. Spontaneous Regression of Melanoma May Offer Insight Into Cancer Immunology. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(14):1047-1048.

Qin Z, Blankenstein T. Tumor growth inhibition by limphotoxin: evidence of B lymphocyte involvement in the antitumor response. *Cancer Res*. 1995;55:4747-4751.

Risbon RE, Clifford CA, Skorupski K. An overview of canine histiocytic disorders, 2007.

Roosje P. Investigations on the Immunopathogenesis of Atopic Dermatitis in Cats, 2002.

Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, White DE. Experience with the Use of High-Dose Interleukin-2 in the Treatment of 652 Cancer Patients. *Annals of Surgery*. 1989;210(4):474.

Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med*. 2001;250(6):462-475.

Schulden U, Walter JH, Gutberlet K, Rudolph R. Immunohistochemical identification of B lymphocytes in canine lymphonodes embedded in paraffin wax by using an antibody to CD79a antigen. *European Journal of Veterinary Pathology*. 1998;4(2):81-83.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: Muller & Kirk's *Small Animal Dermatology*. 1st ed. Philadelphia: WB. Saunders Company, 1969:1076-1081.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: Muller & Kirk's *Small Animal Dermatology*. 6th ed. Philadelphia: WB. Saunders Company, 2001:1184-1248.

Scott KA, Moore RJ, Arnott CH, East N, Thompson RG, Scallon BJ, Shealy DJ, Balkwill FR. An Anti-Tumor Necrosis Factor- α Antibody Inhibits the Development of Experimental Skin Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2003;2:445-451.

Silva FM, Andrade FB, Portolan M, Figueiredo PJ. The Hemangioma. *FOL*. 2000;12:1-2.

Smolle J, Soyer H, Ehall R, Bartenstein S, Kerl H. Langerhans Cell Density in Epithelial Skin Tumors Correlates with Epithelial Differentiation but Not with the Peritumoral Infiltrate. *J Invest Dermatol*. 1986;87:477-479.

Taylor DON, Dorn CR, Luis OH. Morphologic and Biologic Characteristics of the Canine Cutaneous Histiocytoma. *Cancer Research*. 1969;29:83-92.

Tizard IR. *Veterinary Immunology- An Introduction*. 6^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000:47-68.

Tomsová M, Melichar B, Sedláková I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 2007;108:415-420.

Topalian S, Solomon D, Avis FP. Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J Clin Oncol*. 1988;6:839-853.

Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF. *Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals*. Ed. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology. (Washington, D.C.). Vol. VIII, 2002.

Wellman M. Histiocytic Disorders. In: SEVC Proceedings 2007, Southern European Veterinary Conference, 2007.

Withrow SJ, Vail DM. Miscellaneous Tumors. In: Withrow & MacEwen's *SMALL ANIMAL CLINICAL ONCOLOGY*. 4^a ed. Saunders Elsevier, 2007:814-819.

Woods JR, Latimer KS, Bain PJ. Canine Cutaneous Histiocytoma. In: *Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program*, 2004

Wrann M, Bodmer S, Martin R, Siepl C, Hofer-Warbinekl R, Frei K, Hofer E, Fontana A. T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor- β . *The EMBO Journal*. 1987;6 (6):1633 -1636.

Zhang MDL, Garcia JRC, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:203-13.

Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E, Li Z, Rong H, Chen J, Wang XY, Catino JJ, King I. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med.* 1996;184:579-584.