

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E
9 EM CÃES COM LINFOMA: ASSOCIAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS**

Livia Maria Souza Semolin

Médica Veterinária

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E
9 EM CÃES COM LINFOMA: ASSOCIAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS**

Livia Maria Souza Semolin

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária

2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LIVIA MARIA SOUZA SEMOLIN – Nascida em nove de julho de 1986, na cidade de Guariba/SP, graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP/Jaboticabal, no ano de 2008, onde também realizou iniciação científica com o tema “Avaliação do perfil hepático de cães acometidos por linfoma e submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin”. Em fevereiro de 2009 iniciou Programa de Aprimoramento Profissional e Pós Graduação Lato Sensu em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais na Universidade de Rio Preto/UNIRP, com duração de dois anos. Em março de 2011 ingressou no programa de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária, curso de Mestrado, na FCAV/UNESP/Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Alba e Luiz Carlos, por serem meu porto seguro, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida e serem os grandes responsáveis pelo que sou.

Às minhas irmãs, Mara e Viviane, por serem minhas melhores amigas e torcerem tanto por mim.

Às minhas sobrinhas Maria Clara e Maria Fernanda, por terem se tornado a alegria da família.

Aos meus avós, tios e primos por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em minha vida, guiando meus passos.

Ao Prof. Aureo, pelo apoio e orientação desde minha graduação, por acreditar em mim e compartilhar seus conhecimentos comigo.

Ao “Grupo Linfoma”, Letícia, Manuela e Thiago, que juntos superamos todas as dificuldades, trabalhando para oferecer o melhor de cada um.

À equipe do serviço de Oncologia Veterinário, incluindo os professores Andrigo e Mirela, e os pós-graduandos.

À equipe do laboratório de Patologia Clínica, Eugênio, Matheus, Mônica, Nathan, Douglas e todos os pós-graduandos e estagiários, pela ajuda na realização dos exames.

Ao Ivan, por estar ao meu lado nesse último ano, torcendo e ajudando para que tudo saísse bem, tornando cada momento mais feliz e especial.

Aos meus amigos (as) pessoais Marília, Marcela, Rosana, Giovanna, Luciana, Dani, Talita, Érika, Letícia, Paulo, Manu, Marília e outros, pelo apoio e por tornarem mais felizes estes dois anos.

À todos os pós graduandos, funcionários, residentes, estagiários e alunos que direta ou indiretamente ajudaram na conclusão deste experimento, em especial à Aninha da anestesia que sempre esteve disponível a nos ajudar.

À CAPES e FAPESP pelo financiamento da pesquisa.

Ao pessoal do laboratório de imuno-histoquímica de Botucatu, em especial o Cadu e professora Renee, pela ajuda na técnica e leitura das lâminas.

Ao Professor Julio Lopes Sequeira, pela classificação histopatológica dos linfomas.

Ao Danilo do laboratório RheaBiotech de Campinas, pela realização da zimografia e esclarecimento de todas as minhas dúvidas.

Ao professor João Ademir pela ajuda na estatística.

À minha banca de qualificação e defesa, professor Andrigo, Márcia e Julio, pela leitura criteriosa e ajuda na melhoria deste projeto.

A todos os cães que participaram deste estudo, por serem a principal parte deste experimento.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
Palavras chave.....	iii
ABSTRACT	iv
Keywords.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Linfoma.....	2
2.2 Metaloproteinases de matriz	7
3 OBJETIVOS	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 Grupos Experimentais	12
4.2 Avaliação das parcelas experimentais	13
4.3 Obtenção das amostras	13
4.4 Classificação histológica e imuno- histoquímica	14
4.4.1 Anticorpos empregados na reação imuno-histoquímica.....	15
4.4.2 Imunofenotipagem.....	16
4.4.3 Expressão metaloproteinases	17
4.5 Eletroforese por zimografia	18
4.5.1 Protocolo de extração e quantificação das proteínas.....	18
4.5.2 Técnica zimográfica.....	19
4.6 Tratamento	19
4.7 Análise dos resultados	21
5 RESULTADOS	22
5.1 Estadiamento e sub-estadiamento tumoral	22

5.2 Classificação histológica e imunofenotipagem	23
5.3 Avaliação da resposta ao tratamento	24
5.4 Expressão tecidual das metaloproteinases	26
5.5 Eletroforese zimográfica dos linfonodos.....	30
5.6 Eletroforese zimográfica do soro.....	34
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	46
8 REFERÊNCIAS.....	47

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM CÃES COM LINFOMA: ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS

RESUMO – O linfoma é uma doença linfoproliferativa caracterizada pela multiplicação clonal de linfócitos malignos no seio dos órgãos linfóides, afetando principalmente os linfonodos, ou outros órgãos viscerais sólidos, com prognóstico dependente de vários fatores, incluindo invasão tecidual. Enzimas proteolíticas MMP-2 e MMP-9 estão sendo estudadas quanto à importância neste processo de progressão tumoral por propiciarem a penetração e infiltração celular. Considerando a importância atual destas enzimas e o papel ainda não fundamentado nas neoplasias hematopoiéticas, avaliou-se a expressão de MMP-2 e MMP-9 em cães acometidos por linfoma multicêntrico e cães hígidos, através de técnica imuno-histoquímica de linfonodo e eletroforese zimográfica de linfonodo e soro, estabelecendo a relação entre a expressão destas enzimas e os fatores prognósticos como estadiamento, imunofenotipo e grau histopatológico da neoplasia e resposta ao tratamento. Observou-se maior expressão tecidual de MMP-9 nos animais com linfoma, através de técnica imuno-histoquímica, sem correlação exata com prognóstico. Eletroforese zimográfica do linfonodo demonstrou correlação da MMP-9 com imunofenotipo T e animais em doença progressiva, inferindo possível prognóstico negativo quanto à sobrevida. Valores de MMP-2 não apresentaram relação clara com o processo tumoral, assim como os valores séricos das duas enzimas. Desta forma, a MMP-9 demonstrou participação no processo neoplásico, porém sem determinação prognóstica exata.

Palavras-chave: cão, linfoma, metaloproteinase, MMP-2, MMP-9

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 IN DOGS WITH LYMPHOMA: ASSOCIATION WITH PROGNOSTIC FACTORS

ABSTRACT – Lymphoma is a lymphoproliferative disease characterized by clonal proliferation of malignant lymphocytes within lymphoid organs, mainly affecting the lymph nodes, or other solid visceral organs, with prognosis depends on several factors, including tissue invasion. Proteolytic enzymes MMP-2 and MMP-9 have been studied as to the importance of tumor progression in this process by propitiating the penetration and cellular infiltration. Considering the current importance of these enzymes and the role not grounded in hematopoietic malignancies, we evaluated the expression of MMP-2 and MMP-9 in dogs affected by multicentric lymphoma and healthy dogs by immunohistochemistry technique of lymph node and zymography electrophoresis of lymph node and serum, establishing the relationship between the expression of these enzymes and prognostic factors such as tumor staging, immunophenotyping, histological grade and response to treatment. We observed increased expression of MMP-9 tissue in animals with lymphoma by immunohistochemistry technique, no exact correlation with prognosis. Zymography electrophoresis of lymph node demonstrated correlation of MMP-9 with T-cell phenotype and progressive disease, inferring possible negative prognosis regarding survival. Values of MMP-2 showed no clear relation with the tumoral process as well as serum levels of the two enzymes. Thus, MMP-9 demonstrated involvement in the neoplastic process, but without accurate prognostic determination.

Keywords: dog, lymphoma, metalloproteinase, MMP-2, MMP-9

LISTA DE ABREVIATURAS

μm – Micrometro

°C – Graus Celsius

Acs – Anticorpos

DAB – Diaminobenzidina

DE – Doença estável

DP – Doença progressiva

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

GC – Grupo controle

GL – Grupo linfoma

IL-6 - Interleucina 6

IM – Intramuscular

IV – Intravenoso

kg – Quilograma

m² – Metro quadrado

mg – Miligrama

mL – Mililitros

MMP – Metaloproteinase de matriz

MMP-2 int. – MMP-2 inativa

OMS - Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial hidrogeniônico

RC – Remissão completa

RP – Remissão parcial

SRD – Sem raça definida

TIMP – Fator Inibidor de Metaloproteinase

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano, componente de solução tampão

UA – Unidade arbitrária

UI – Unidade internacional

VO – Via oral

LISTA DE TABELAS

	Página	
Tabela 1	Classificação Clínica do Linfoma segundo a OMS.	3
Tabela 2	Fatores prognósticos do linfoma canino. Adaptado de Vail e Young (2007).	6
Tabela 3	Protocolo quimioterápico antineoplásico de Madison-Wisconsin totalizando 19 semanas (CHUN, 2009).	20
Tabela 4	Estadiamento tumoral dos animais portadores de linfoma multicêntrico atendidos pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel e pelo Centro Avançado de Veterinária CAVET. Jaboticabal, 2013.	22
Tabela 5	Classificação histopatológica segundo Kiel (LENNERT;FELLER, 1990) e imunofenotipagem dos animais com linfoma multicêntrico atendidos pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel e pelo Centro Avançado de Veterinária CAVET. Jaboticabal, 2013.	24
Tabela 6	Resposta ao tratamento nos animais do grupo linfoma observada na quinta semana do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, relacionada às diferentes variáveis clínico-histopatológicas. Jaboticabal,2013.	25
Tabela 7	Associação entre os dados clínico-histopatológicos e o escore de distribuição da proteína MMP-2 detectada pela imuno-histoquímica em cães com linfoma multicentrico e cães hígdos. Jaboticabal, 2013.	28
Tabela 8	Associação entre os dados clínico-histopatológicos e o escore de distribuição da proteína MMP-9 detectada pela imuno-histoquímica em cães com linfoma multicêntrico e cães hígdos. Jaboticabal, 2013.	29

Tabela 9	Associação entre os valores encontrados (média e desvio padrao) das atividades gelatinolíticas teciduais da MMP-2 Inativa (MMP-2 Int.), MMP-2 Ativa , MMP-2 Total e porcentagem de ativação da MMP-2 (% MMP-2 ativa), com as variáveis clínico-histopatológicas em cães com linfoma multicentrico e cães hígidos. Jaboticabal, 2013.	32
Tabela 10	Associação entre os valores encontrados (média e desvio padrao) das atividades gelatinolíticas teciduais da Pró MMP-9, MMP-9 Ativa , MMP-9 Total e porcentagem de ativação da MMP-9 (% MMP-9 ativa), com as variáveis clínico-histopatológicas em cães com linfoma multicentrico e cães hígidos. Jaboticabal, 2013.	33
Tabela 11	Associação entre os valores encontrados média \pm desvio padrao das atividades gelatinolíticas séricas das MMPs 2 e 9 com as variáveis clínico-histopatológicas em cães com linfoma multicentrico e cães hígidos. Jaboticabal, 2013.	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	
Biópsia excisional de linfonodo submandibular em cão com linfoma. A – Palpação de linfonodo; B – Área cirúrgica com tricotomia e delimitação do linfonodo; C – Exposição do linfonodo, após divulsão de tecido adjacente; D – Macrotomia do linfonodo para procedimentos laboratoriais. Jaboticabal, 2013.	14
Figura 2	
Fotomicrografias evidenciando imunofenotipagem do linfoma. Imunomarcção do anticorpo anti CD79 α em corte de linfonodo (1A) e ausência da expressão do anticorpo anti CD3 em 1B, caracterizando o imunofenótipo B; expressão imunohistoquímica do anticorpo anti CD3 em corte de linfonodo (2A) e ausência da expressão do anticorpo anti CD79 α em 2B, caracterizando o imunofenótipo T. Jaboticabal, 2013.	23
Figura 3	
Fotomicrografia evidenciando imunomarcção citoplasmática da proteína MMP. A e B marcação citoplasmática de MMP-2 em linfócitos neoplásicos (A setas) e linfócitos normais (B). C e D marcação citoplasmática de MMP-9 nos linfócitos neoplásicos. Jaboticabal, 2013.	26
Figura 4	
Zimografia de linfonodo em gel de poliacrilamida 10%. Padrão de peso molecular (1); Animais saudáveis (2 e 3); animais com linfoma (4 a 10). Géis com diferentes animais (A, B e C). MMP-9 latente (92Kda); MMP-9 ativa (82Kda); MMP-2 intermediária (68Kda); MMP-2 ativa (62Kda).	30
Figura 5	
Zimografia de soro em gel de poliacrilamida 10%. Padrão de peso molecular (1); Animais saudáveis (2 e 3); animais com linfoma (4 a 10). Géis com diferentes animais (A, B e C). MMP-9 latente (92Kda); MMP-2 intermediária (68Kda).	34

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em linfonodos caninos, em cortes parafinados, com os respectivos clones e diluições.	15

1 INTRODUÇÃO

O linfoma é uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas no cão e corresponde a cerca de 90% das neoplasias hematopoiéticas nesta espécie (OGILVIE; MOORE, 1995; DHALIWAL et al., 2003), sendo caracterizado pela proliferação de células originadas do tecido linfóide, histiócitos, seus precursores e derivados. É a neoplasia que melhor responde à quimioterapia, e que por sua vez proporciona consideráveis melhorias na duração e qualidade de vida do paciente (OGILVIE; MOORE, 1995). Por outro lado, quando não tratado, o linfoma pode levar muitos cães a óbito em poucas semanas (MACEWEN et al., 2001).

A disseminação das neoplasias pode estar associada a produção de enzimas proteolíticas que possuem a capacidade de degradar a membrana basal e a matriz extracelular, permitindo o contato das células neoplásicas com o estroma e consequente penetração e infiltração celular, ocasionando metástases e crescimento tumoral (HIRATSUKA et al., 2002; GOMES et al., 2009). Dentre estas proteases, as metaloproteinases de matriz tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) possuem papel importante na expansão da massa tumoral, com suas expressões aumentadas nestes tecidos, proporcionalmente à agressividade tumoral (HAYASHIBARA et al., 2002; NAKAICHI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008). Apesar dos diversos relatos da relação destas enzimas com os tumores sólidos, estudos mais aprofundados ainda são necessários para o esclarecimento de sua interferência nos tumores hematopoiéticos tais como o linfoma.

Desta forma, revela-se bastante alvissareiro o estudo da associação entre as concentrações séricas e teciduais destas proteases e os fatores prognósticos do linfoma canino, bem como sua utilização como marcadores tumorais e indicadores prognósticos. Alterações precoces nas concentrações séricas das metaloproteinases, durante a vigência de protocolos quimioterápicos, poderão propiciar uma intervenção terapêutica, igualmente precoce, minimizando o processo invasivo do tumor e certamente conferindo melhor e maior qualidade de vida ao paciente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfoma

O linfoma pode ser caracterizado pela proliferação clonal de linfócitos malignos nos órgãos linfóides (DHALIWAL et al., 2003), afetando principalmente os linfonodos ou outros órgãos viscerais sólidos, como fígado e baço (VAIL; OGILVIE, 1998; COUTO, 2001; VAIL; YOUNG, 2007). Entretanto esta neoplasia pode surgir em quase todos os tecidos do corpo (MACEWEN et al., 2001).

De acordo com Dobson e Gorman (1994) o linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum em cães e representa de 5 a 10 % de todas as neoplasias que acometem esta espécie. Corresponde a aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hematopoético nos cães (MORRISON, 1998; FAN; LORIMIER, 2005; VAIL; YOUNG, 2007). No Brasil, poucos são os levantamentos feitos sobre a frequência em cães. Fráguas (2008) registrou entre 2003 e 2006, no Hospital Veterinário da FCAV UNESP/Jaboticabal, 108 cães acometidos, com predominância de cães sem raça definida (SRD), adultos jovens e sem predisposição sexual. Resultados semelhantes também foram reportados após estudos retrospectivos da frequência de linfomas caninos, realizados, na região de Botucatu – SP (CARDOSO et al., 2003) e na região norte do Paraná (MORENO; BRACARENSE, 2007).

A etiologia do linfoma canino é considerada multifatorial, porém, entre os fatores predisponentes que suscitam a apresentação do linfoma, estão: exposição prolongada a substâncias potencialmente cancerígenas (GREENLE et al., 1990; VALLI, 1993; JONNES et al., 1997); alterações genéticas herdadas ou adquiridas podendo levar a ativação de proto-oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (p53); imunossupressão (DALECK et al., 2008). Etiologia viral foi identificada em algumas espécies animais tais como felinos, bovinos, roedores e

aves, assim como em alguns primatas, porém não está firmada em cães (GREENLE et al., 1990; VALLI, 1993; JONNES et al., 1997; MORRISON, 2005).

Quanto à localização anatômica, os linfomas podem ser classificados em linfoma multicêntrico, digestivo ou alimentar, mediastínico ou tímico, cutâneo e extranodal (MOULTON; HARVEY, 1990; VAIL; OGILVIE, 1998).

O estadiamento clínico do linfoma proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) leva em consideração a extensão da doença neoplásica, a presença de síndromes paraneoplásicas e outras enfermidades associadas e, ainda, o estado geral do paciente e seus parâmetros fisiológicos, classificando-os em estádios (I a V) e subestádios (a e b), conforme especificado na Tabela 1 (OWEN, 1980; FAN; KITCHELL, 2002).

Tabela 1 Classificação Clínica do Linfoma segundo a OMS.

Estádio I	Envolvimento limitado a um linfonodo
Estádio II	Envolvimento de linfonodos regionais
Estádio III	Aumento generalizado dos linfonodos
Estádio IV	Envolvimento do fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia
Estádio V	Envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos

Subestádios: a- sem sinais sistêmicos; b- com sinais sistêmicos

Os sinais clínicos do linfoma variam de acordo com a sua apresentação anatômica e histológica. O linfoma multicêntrico é caracterizado por linfadenopatia generalizada, envolvimento hepático, esplênico ou da medula óssea, ou a combinação destes. Os linfonodos acometidos apresentam-se acentuadamente aumentados (cinco a 15 vezes o tamanho normal), indolores e com mobilidade livre, podendo em caso de obstrução mecânica da drenagem linfática levar à ocorrência de edema (NELSON; COUTO, 2006).

Os pacientes com linfoma comumente desenvolvem anemia de leve à moderada, em decorrência da liberação de fatores neoplásicos que deprimem a eritropoese (anemia hipoplásica, normocítica e normocrômica). Outras formas de anemia são também descritas, dentre elas a anemia hemolítica autoimune, a anemia

hemorrágica e a anemia das doenças crônicas (FIGHERA, 2001; DALECK et al., 2008).

O animal acometido por linfoma pode apresentar leucometria normal, diminuída ou elevada, porém um quadro de linfocitose quase sempre é observado (LEIFER; MATUS, 1986; RASKIN; KRENBIEL, 1989; AVERY; AVERY, 2007). Observou-se em um estudo com 25 cães portadores de linfoma, média de leucócitos no momento do diagnóstico dentro do padrão de normalidade, porém, 24 % destes animais apresentaram leucocitose, acompanhada ou não de linfocitose (ANAI, 2011)

Quando há anemia, linfocitose, neutropenia, trombocitopenia e presença de linfócitos atípicos ou linfoblastos circulantes, estes achados sugerem o envolvimento da medula óssea, como ocorre em pacientes em estágio V do linfoma. Diante dessa suspeita, a punção da medula óssea objetivando o mielograma, pode auxiliar na confirmação de seu comprometimento, sendo muitas vezes difícil a diferenciação entre linfoma e leucemia (DALECK et al., 2008).

O diagnóstico pode ser firmado com base no exame físico e nas avaliações complementares (hematológicas, bioquímico-séricas, radiográficas e ultrassonográficas). Porém, o diagnóstico definitivo só pode ser concluído com a avaliação citológica ou histopatológica do(s) órgão(s) afetado(s) (FAN; KITCHELL, 2002; NELSON; COUTO, 2006; SANTANA et al., 2008).

A citologia aspirativa com agulha fina permite a avaliação tumoral e classificação desta neoplasia no grupo dos tumores de células redondas, com esfoliação tumoral em quantidade moderada a significativa, com características citológicas importantes como a presença de células redondas dispostas individualmente, com limites citoplasmáticos definidos, sem apresentarem junções célula-a-célula (SANTANA et al., 2008).

Quanto à classificação histológica com base no grau de malignidade podem ser classificados como sendo de alto, médio ou baixo grau, sendo que na maioria dos casos, os linfomas apresentam-se com alto grau de malignidade (MOULTON; HARVEY, 1990; TESKE et al., 1994; JONES et al., 1997; DE MOURA et al., 1999; SEQUEIRA et al., 1999). De acordo com o esquema de classificação histológica

(Kiel ou *National Cancer Institute*), 80% dos linfomas caninos são similares aos linfomas não-Hodgkin humanos de médio e alto grau (SEQUEIRA et al., 1999; VAIL, 2000), permitindo a formulação de um sistema de classificação comparativa e a utilização do linfoma canino como um modelo espontâneo para o homem (GENTILINI et al., 2005). O linfoma alto grau caracteriza-se pela predominância de células com alto grau de malignidade, mais indiferenciadas, na forma de blastos, enquanto o baixo grau caracteriza-se pelo sufixo “cítico”, com células na sua maior parte de menores tamanhos e mais diferenciados (LENNERT; FELLER, 1990; PARODI, 2001; DALECK et al., 2008; ARESU et al., 2012). Há ainda o sistema de classificação padronizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO), que se utiliza das características celulares aliadas à classificação imunofenotípica nos linfomas (VALLI et al., 2011).

O imunofenótipo de neoplasia linfóide em cães pode ser obtido através de citometria de fluxo, imunocoloração de cortes de tecido ou de preparações citológicas obtidas por aspiração com agulha fina (RASKIN; MEYER, 2003). Segundo Vail e Ogilvie (1998) aproximadamente 70 a 80% dos linfomas caninos têm derivação imunofenotípica de célula B e o restante é derivado de células T.

Como já descrito anteriormente, o linfoma é a neoplasia que melhor responde à quimioterapia antineoplásica (OGILVIE; MOORE, 1995), e que proporciona consideráveis melhorias na duração e qualidade de vida do paciente (OGILVIE; MOORE, 1995). Observa-se maior risco de morte após a primeira sessão quimioterápica, como consequência da neutropenia mais intensa sete dias após o início do tratamento (LANORE; DELPRAT, 2004). Coleta (2009) obteve taxa de sobrevivência estável até a quarta semana de tratamento, porém, queda progressiva da mesma no decorrer das semanas. Quando não tratado, o linfoma pode levar muitos cães a óbito em quatro a seis semanas (MACEWEN et al., 2001).

Utilizando-se da classificação de Kiel os linfomas de baixo e alto grau respondem de forma diferente ao tratamento oncológico. Os linfomas de baixo grau, compostos por células pequenas e com índice mitótico baixo, progredem lentamente e estão associados a tempos de sobrevivência mais longos. Por outro lado, os de alto

grau, com um índice mitótico elevado, progridem rapidamente, mas respondem melhor à abordagem terapêutica com quimioterapia (VAIL; YOUNG, 2007).

O prognóstico do linfoma canino está relacionado à imunofenotipagem e subestadiamento da doença, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde. Os tumores derivados de células T têm remissão mais curta e os animais com sinais clínicos de linfoma (subestádio “b”) têm prognóstico reservado (VAIL, 2000; MACEWEN et al., 2001).

Segundo Vail e Young (2007) os fatores prognóstico para o linfoma canino podem ser agrupados segundo associação moderado a forte, como especificado na Tabela 2.

Tabela 2 Fatores prognósticos do linfoma canino. Adaptado de Vail e Young (2007).

Fator	Forte associação	Moderada associação	Comentários
Estadiamento Clínico OMS		X	Estádio I/II: Favorável. Estádio V com significante envolvimento da medula óssea: desfavorável.
Subestádio Clínico OMS	X		Subestádio b (com sinais sistêmicos): menor sobrevida.
Histopatologia		X	Graus médio/alto associados com alta taxa de resposta, mas reduzida sobrevida.
Imunofenótipo	X		Imunofenótipo de células T associado com menor sobrevida
Hipercalcemia		X	Fator negativo se associado com subtipo de células T e função renal reduzida.
Sexo		X	Alguns estudos sugerem que fêmeas possuem prognóstico favorável.
Pré tratamento prolongado com esteróides	X		Muitos estudos sugerem que prévio tratamento esteroideal diminui tempo de resposta, mas tempo crítico de exposição não é conhecido.
Expressão da glicoproteína-P		X	Pode ser associado com menor taxa de resposta e baixa remissão.
Linfadenopatia craniomediastinal	X		Grande quantidade de casos reportam menor remissão e sobrevida.
Localização anatômica	X		Leucemia, envolvimento cutâneo difuso e alimentar, e hepatoesplenomegalia são associados com prognóstico desfavorável.

A capacidade de células malignas invadirem outros tecidos e órgãos é uma característica frequentemente relacionada com o prognóstico desfavorável. Enzimas proteolíticas possuem fundamental importância na progressão do tumor por permitirem o acesso das células tumorais aos sistemas vascular e linfático, estabelecendo rotas para a disseminação tumoral (NABESHIMA et al., 2004; SAKATA et al., 2007; GOMES et al., 2009). Este acesso se deve à proteólise da membrana basal e da matriz extracelular, favorecendo tanto a nutrição do tumor quanto a abertura de rotas para que as células neoplásicas atinjam outros órgãos à distância (HAYASHIBARA et al., 2002; SAKATA et al., 2007; JOBIM et al., 2008) e permitindo sua penetração e infiltração (HIRATSUKA et al., 2002; GOMES et al., 2009). Dentre as proteases, as metaloproteinases de matriz estão intensamente relacionadas com o processo de invasão e metástase tumoral.

2.2 Metaloproteinases de matriz

Metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases zinco e cálcio dependentes, sintetizadas na maior parte sob a forma latente (pró-enzimas), proteoliticamente clivadas e ativadas no espaço extracelular (HIDALGO; ECKHARDT, 2001; NAKAICHI et al., 2007; PENNANEN et al., 2007; SAKATA et al., 2007; JOBIM et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008). As MMPs são produzidas por vários tipos de células, incluindo os queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, algumas células sinoviais e uma variedade de células malignas (NABESHIMA et al., 2004; JOBIM et al., 2008). A expressão gênica das MMPs pode ser estimulada pela interleucina-1, pelo fator de crescimento epidérmico, pelo fator de crescimento derivado de plaquetas, pelo fator alfa de necrose tumoral, oncogenes celulares e diversas citocinas (JOBIM et al., 2008). Em um estudo realizado com linfoma não-Hodgkin humano, observou-se uma indução da síntese de metaloproteinases pelo aumento de interleucina-6 (IL-6), afetando negativamente a evolução clínica dos pacientes (KOSSAKOWSKA et al., 2000). Além disto, o microambiente tumoral formado por componentes da matriz

extracelular como peptídeos, colágeno e elastina, induz a expressão das metaloproteinases pelas células tumorais e fibroblastos (JOHN; TUSZYNSKI, 2001).

A ativação extracelular da maioria das MMPs pode ser iniciada pela ação de outras MMPs ativadas ou por proteinases capazes de clivar a região da ligação peptídica específica, como a tripsina, catepsinas, elastases e ainda o sistema plasmina-plasminogenio (JOHN; TUSZYNSKI, 2001), entretanto, diferindo das demais, a metaloproteinase 2 sofre ativação na superfície da membrana celular (STERNLICHT; WERB, 2001). O controle da atividade das MMPs é realizado fortemente por inibidores endógenos presentes no meio extracelular como a alfa-2-macroglobulina e a trombospondina 1 (STERNLICHT; WERB, 2001). Os inibidores teciduais de metaloproteinases, TIMPs, perfazem o grupo dos inibidores endógenos de MMPs mais estudado, capazes de inibi-las, em suas formas latentes e ativas, de forma reversível em uma proporção de 1:1, diferindo entre si na expressão tecidual específica e na habilidade de inibirem diferentes MMPs (FERRARI et al., 2000; JOHN; TUSZYNSKI, 2001; STERNLICHT; WERB, 2001). Além disto, TIMPs possuem funções biológicas importantes como regulação do crescimento celular, apoptose e neovascularização (FERRARI et al., 2000).

O fenômeno de remodelação tecidual induzido por estas proteases esta presente em processos fisiológicos como involução uterina, reabsorção óssea, regeneração cutânea e embriogênese (HIDALGO; ECKHARDT, 2001; PENNANEN et al., 2007; JOBIM et al., 2008), e em outros processos patológicos como artrite, doenças cardíacas degenerativas e crescimento tumoral (NEWMAN et al., 2008).

Seus níveis são muito baixos ou não podem ser detectados em tecidos normais (HAZAR et al., 2004), porém estudos mais recentes têm demonstrado que há um aumento da expressão de MMPs no tecido pulmonar precedendo às metástases pulmonares de tumores primários, simulando o tropismo metastático do tumor, sempre precedido de um processo inflamatório e remodelamento de matriz extracelular (PAVELIC et al., 2011).

Pelo menos 26 diferentes MMPs já foram descritas (NEWMAN et al., 2008), diferindo entre si estruturalmente e em sua habilidade em degradar um grupo

particular de proteínas da matriz extracelular, sendo que, juntas, podem degradar todos os seus componentes protéicos (RIBEIRO et al., 2008). As MMPs da classe das gelatinases, como as MMPs dos tipos 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), apresentam capacidade peculiar de degradar o colágeno tipo IV, que compõe a lâmina basal, sendo por isso provavelmente relevantes na aquisição do fenótipo invasivo das neoplasias malignas (HAYASHIBARA et al., 2002; NAKAICHI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008). Ademais, interagem com as moléculas de adesão celular, como a laminina-5 e a e-caderina, alterando a adesão entre as células tumorais e facilitando o movimento destas através da matriz extracelular (JOBIM et al., 2008).

A mensuração destas gelatinases circulantes no momento do diagnóstico tem demonstrado relevância no prognóstico das neoplasias. Da mesma forma, a expressão tecidual de MMP-2 e MMP-9, em amostras de linfonodos em pacientes com linfoma, mostrou associação com menor resposta à quimioterapia, sobrevida e/ou período de remissão, tanto no cão quanto no homem (GENTILINI et al., 2005; PENNANEN et al., 2007; PENNANEN et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Os níveis de MMPs correlacionam-se com o tipo tumoral e comportamento biológico da neoplasia. Neoplasias produzem níveis mais elevados destas proteases em relação aos tecidos saudáveis, o mesmo podendo ser encontrado quando se compara neoplasias malignas e benignas (LOUKOPOULOS et al., 2003).

Uma relação direta entre o nível de MMP-9 produzido por células linfomatosas e seu potencial metastático foi estabelecido (THEMSCHE et al., 2004), porém seu papel fundamental no linfoma e demais neoplasias hematopoiéticas é pouco definido devido ao caráter naturalmente difuso destas células no organismo (NEWMAN et al., 2008). Em um estudo realizado por Vasku et al. (2010), em pacientes com micose fungóide (linfoma cutâneo), a expressão de mRNA de MMP-2 e MMP-9 mostrou-se significativamente elevada em estágios avançados da neoplasia.

Diferendo de oncogenes clássicos, a síntese de MMPs nas neoplasias não é provocada por amplificação genica ou mutações. Seu aumento nesses pacientes se deve a mudanças transcricionais, provavelmente resultado de ativação de oncogenes ou perda de supressores tumorais (EGEBLAD; WERB, 2002).

Em estudos com tumores humanos observou-se que algumas metaloproteinasas são produzidas pela própria célula tumoral, porém outras MMPs (incluindo as MMPs 2 e 9) são sintetizadas também pelas células do estroma, estimuladas pelo tumor de forma parácrina pela secreção de interleucinas, interferons e fatores de crescimento, e posteriormente recrutadas para a superfície da célula neoplásica (EGEBLAD; WERB, 2002).

Evidências têm demonstrado ainda que a angiogênese anormal, influenciada pela ativação de metaloproteinasas e fatores angiogênicos, além de seu papel bem conhecido no crescimento de tumores sólidos e metástases, também está criticamente envolvida em neoplasias malignas hematológicas, tais como mieloma múltiplo, leucemia, síndrome mielodisplásica e linfoma não-Hodking humano (MOELLER et al., 2001; GENTILINI et al., 2005).

Desta forma, a emergente e crescente quantidade e qualidade de dados, sinaliza que as metaloproteinasas, principalmente as gelatinases, e seus inibidores, associadas com a progressão tumoral e agressividade natural, servem como indicadores prognóstico em diversos tipos de tumores.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer associação entre os valores séricos e teciduais das metaloproteinases de matriz 2 e 9, obtidos por eletroforese zimográfica e imuno-histoquímica, e os fatores prognósticos do linfoma multicêntrico canino tais como estadiamento, imunofenotipo e grau histológico da neoplasia e resposta ao tratamento, avaliando desta forma se estas enzimas estão relacionadas com o processo tumoral e prognóstico do linfoma canino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais

As parcelas experimentais constituíram-se de 28 cães, machos ou fêmeas, dentre os quais, seis cães hígidos e 22 cães acometidos por linfoma multicêntrico, atendidos pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal e pelo Centro Avançado de Veterinária CAVET/Ribeirão Preto, inicialmente com o diagnóstico citológico a partir de punção aspirativa por agulha fina do(s) linfonodo(s).

As unidades experimentais foram divididas em grupos controle (GC) e linfoma (GL), sendo estes:

GC: Constituído por seis cães, dentre eles, três machos e três fêmeas, hígidos, sem raça definida, com idade entre três e sete anos, em bom estado de saúde verificado com base na história clínica, exame físico detalhado, testes hematológicos e bioquímicos séricos.

GL: Constituído por 22 cães acometidos por linfoma multicêntrico, dentre os quais, oito machos (36%) e quatorze fêmeas (64%). As raças predominantes foram Rottweiler e Sem Raça Definida – SRD, ambas com 18% dos casos, seguidas pelo Boxer (14%), Poodle (9%), Bull Terrier (9%), Dog Alemão (4,5%), Beagle (4,5%), Yorkshire (4,5%), Lhasa Apso (4,5%), Labrador (4,5%), Basset Hound (4,5%) e Pinscher (4,5%). A idade variou de quatro a doze anos (7 ± 2 anos), e o peso de quatro a 51 quilogramas (24 ± 13 quilogramas).

4.2 Avaliação das parcelas experimentais

Os animais com linfoma foram submetidos a exame físico detalhado, exames complementares de imagem (radiografia torácica e ultrassonografia abdominal), testes hematológicos e bioquímicos séricos incluindo avaliação de perfil hepático e renal. A punção de medula óssea foi preconizada para permitir avaliação citomorfológica da mesma, propiciando que, junto aos demais achados, os referidos animais fossem classificados de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde, em estádios (I a V) e subestádios (a ou b).

4.3 Obtenção das amostras

Pacientes apresentando linfadenomegalia foram submetidos ao exame citológico, obtido através da punção aspirativa por agulha fina do(s) linfonodo(s). Após confirmação do diagnóstico, foi realizada biópsia excisional do linfonodo para coleta de amostras. Seguiu-se o preparo anestésico do animal e pré operatório da região a ser biopsiada, com tricotomia e anti-sepsia. O linfonodo foi imobilizado firmemente em uma das mãos, com posterior incisão cutânea, dissecação do linfonodo a partir do tecido circundante e ligadura de vaso próximo ao hilo linfonodal para evitar hemorragia pós operatória. Em seguida, o linfonodo foi removido cuidadosamente, evitando-se distorção do tecido, e procedeu-se sutura tecidual de rotina (Figura 1).

O linfonodo excisado, de uma parte, foi fixado em solução de formol a 10% tamponado (pH 7,6) por 24 horas e posteriormente transferido para solução de álcool 70% e, de outra parte, estocado em eppendorf à temperatura de -80°C até posterior análises laboratoriais.

As amostras de sangue foram colhidas após anti-sepsia local por venipunção jugular, com base no sistema a vácuo, utilizando-se de tubos de 10 mL, sem

anticoagulante. Assim colhidas, as amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos, a 800 G, para separação da fração sérica. Ato contínuo, o soro foi recolhido e envasado em eppendorfs e armazenado à temperatura de -80°C , para posteriores análises laboratoriais.

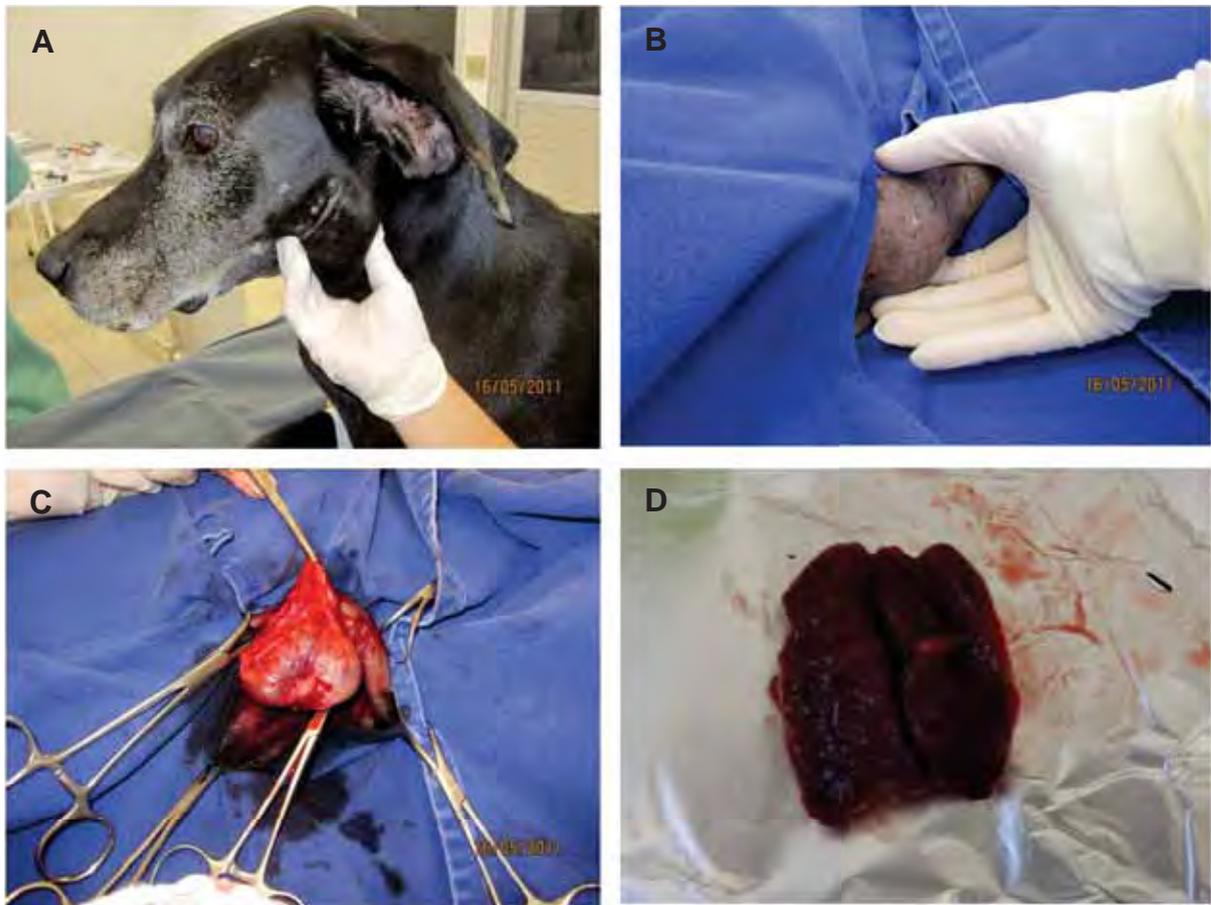


Figura 1 Biópsia excisional de linfonodo submandibular em cão com linfoma. A – Palpação de linfonodo; B – Área cirúrgica com tricotomia e delimitação do linfonodo; C – Exposição do linfonodo, após divulsão de tecido adjacente; D – Macrotomia do linfonodo para procedimentos laboratoriais. Jaboticabal, 2013.

4.4 Classificação histológica e imuno-histoquímica

As amostras de linfonodo fixadas em formol e álcool foram submetidas a processamento histológico de rotina e posterior graduação histológica realizada pelo

Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP/Botucatu, sob responsabilidade do Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira, utilizando-se da classificação já estabelecida por Kiel (LENNERT & FELLER, 1992), diferenciando em linfoma alto e baixo grau, com suas respectivas linhagens celulares. A imuno-histoquímica dos linfonodos foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP/Botucatu, sob responsabilidade da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, para imunofenotipagem dos linfonodos neoplásicos e expressão tecidual das metaloproteinases nos linfonodos normais e neoplásicos.

4.4.1 Anticorpos empregados na reação imuno-histoquímica

A caracterização do tipo celular predominante nos linfomas foi investigada, empregando-se para isso os anticorpos primários marcadores de linfócitos T (CD3) e de linfócitos B (CD79 α), ambos contra antígenos humanos. A expressão citoplasmática das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 nos linfonodos controle e linfomatosos foi avaliada empregando-se anticorpos anti-MMP2 e anti-MMP9, respectivamente, conforme especificações no Quadro 1.

Quadro 1 Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em linfonodos caninos, em cortes parafinados, com os respectivos clones e diluições.

Anticorpos	Clones	Diluições
CD3* (LinfócitosT)	<i>Dako F.7.2.38</i>	1/100
CD79 α ** (Linfócitos B)	<i>Dako HM57</i>	1/20
Anti-MMP2*	<i>Millipore A-gel VC2</i>	1/25
Anti-MMP9**	<i>Dako A0150</i>	1/200

* camundongo anti-humano (monoclonal)

** coelho anti-humano (policlonal)

4.4.2 Imunofenotipagem

O método de imuno-histoquímica empregado foi pelo polímero *horseradish peroxidase* (HRP - Dako K4068) e *3,3' diaminobenzidine tetrachloride* (DAB - Dako K3468-1). Resumidamente, os cortes de tecido (4 μ m) foram distendidos em lâminas carregadas e permaneceram em estufa a 57 °C por 24 horas e, posteriormente, foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes.

Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando uma solução de citrato pH 6,0 em panela de pressão (Pascal[®]; Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 segundos, à 128°C, aproximadamente. Após essa etapa, ao atingirem a temperatura ambiente, as lâminas contendo os cortes foram lavadas em água deionizada. A seguir foram incubadas em dois banhos de 10 minutos cada em peróxido de hidrogênio 3% (10V) para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água deionizada por cinco minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi conduzido com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum-free –catálogo n^o X0909 – DAKO Corp.).

As lâminas contendo os cortes foram incubadas com o anticorpo primário na diluição padronizada (Quadro 1) e, então, incubados a 4°C *overnight* (18 horas). Depois, foram novamente lavados em solução tampão de TRIS. Em seguida foram incubadas com polímero Envision (Dako, Carpinteria, CA, USA) e posteriormente lavadas com TRIS, por três vezes. A coloração foi obtida utilizando-se o DAB (DakoCytomation, Carpinteria, USA) e a contracoloração pela Hematoxilina de Harrys, seguida da desidratação em concentrações crescentes de álcool e xilol. As lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Linfonodos de cães hígidos e amostras de linfoma foram empregados como controle negativo e receberam tratamento com o Universal Negative Control Mouse (Dako[®] N1698-1). Os mesmos linfonodos foram também empregados como controle positivo das reações.

4.4.3 Expressão das metaloproteinases

Seguiram-se as etapas de desparafinização das lâminas com o corte tecidual e re-hidratação do material distendido, conforme especificado no item 4.5.2. Para o anticorpo monoclonal anti MMP-2 a recuperação antigênica ocorreu em banho maria a 96 °C, por 30 minutos, com tampão citrato 10Mm, ph 6,0, pré aquecido. Para o anticorpo monoclonal anti MMP-9 utilizou-se o mesmo método de calor, porém por 20 minutos, com tampão Tris-EDTA ph 9,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 8% e posteriormente procedeu-se a incubação em solução de leite em pó desnatado a 10%, para bloqueio de proteínas inespecíficas. A incubação de ambos os anticorpos se deu em câmara úmida, segundo diluição especificada no Quadro 1, durante 18 horas, a 4 °C. Como anticorpo secundário utilizou-se o sistema de amplificação de sinais HRP e, para a visualização da reação, DAB. Tampão TRIS pH 7,4 e água destilada foram utilizados entre as etapas para a lavagem das lâminas. Os cortes foram submetidos à contracoloração em Hematoxilina de Harrys, lavagem, desidratação, diafanização, montagem com resina sintética e análise em microscópio óptico.

Como controle positivo para os Acs anti-MMP2 e MMP9 foram utilizados amostras teciduais de placenta humana e para controle negativo, amostras de linfonodo canino foram incubadas com tampão TRIS pH 7,4.

Para a avaliação do número de linfócitos imunomarcados, distribuição, empregou-se os escores zero quando negativo e um, dois, três e quatro quando 1 a 25%, 26 a 50%, 51 a 75% e 76 a 100% das células do linfonodo avaliado apresentavam-se imunomarcadas, respectivamente.

4.5 Eletroforese por zimografia

As atividades séricas das metaloproteinases 2 e 9 foram mensuradas por intermédio de eletroforese zimográfica do soro congelado a -80°C , para animais controle e portadores de linfoma, antes do início do tratamento, obtendo-se valores numéricos para cada uma. As atividades das referidas metaloproteinases nos linfonodos foram mensuradas, da mesma forma, em géis de zimografia, a partir das amostras de linfonodos mantidas em temperatura -80°C , submetidas à extração protéica do tecido, permitindo obtenção de valores de MMP 2 e 9 em suas formas latentes e ativas. A soma das duas formas compreende a MMP (2 ou 9) total e a relação entre a forma ativa e total compreende a porcentagem de ativação. Ambos os procedimentos foram realizados no laboratório Rhea Biotech, Campinas/SP, com padronização e controle de qualidade das análises.

4.5.1 Protocolo de extração e quantificação das proteínas

As amostras de linfonodos previamente coletadas e armazenadas a -80°C , foram rapidamente pesadas evitando o descongelamento das amostras, em seguida triturados em um eppendorf de 2mL com o auxílio de um triturador Polytron (Kinematika) em tampão de extração contendo Tris-HCl 50mM (pH 7.4), NaCl 0,2M, Triton 0,1%, CaCl_2 10mM e 1% de coquetel inibidor de proteases (P8340-Sigma Chemical Co., Saint Louis MO, USA), na proporção de 100 μL de tampão para cada 100mg de tecido. O conteúdo total de proteína foi mensurado utilizando a albumina sérica como proteína padrão, de acordo com micrométodo de Bradford. As amostras de soro foram apenas homogeneizadas e divididas igualmente em alíquotas, porém a cada 100 μL de soro foi adicionado 1 μL de coquetel inibidor de protease.

4.5.2 Técnica zimográfica

A análise da atividade das MMPs 2 e 9, foi realizada através da técnica de Zimografia, por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, contendo 10% de SDS e 0,1% de gelatina. Aproximadamente 10µg de proteína de cada amostra foi resolvida no gel de eletroforese. Após eletroforese (150V por 2 horas), os géis foram lavados duas vezes, por 20 minutos, a temperatura ambiente com solução contendo Triton X-100 2.5% e em seguida incubados *overnight* (16h) em tampão de incubação (Tris-HCl 50mM pH 7.4, NaCl 0.1 M, CaCl₂ e azida sódica 0.03%) a 37°C. Após período de incubação os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 2,5% (Sigma), por 1 hora. Posteriormente, os géis foram descorados em solução composta por 30% de ácido acético, 10% de etanol e água destilada. Os géis foram armazenados em solução de conservação, metanol, glicerol e água destilada (0,3:3:6,7; v:v:v). Para análise da atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9, os géis foram escaneados (ImageScanner III, General Electric), as bandas identificadas em comparação com o padrão de peso molecular (Page ruler 26616, Thermo Scientific, USA) aplicado na coluna 1 de todos os géis, e avaliadas por densitometria através do programa Science Image software (Scion Corporation, Frederick, Md, USA). Como controle negativo as mesmas amostras foram aplicadas em dois géis idênticos. Após eletroforese e processo de lavagem, um dos géis foi incubado com tampão de incubação padrão e o outro foi incubado com tampão de incubação mais EDTA (20mM), uma vez que o EDTA é um agente quelante das MMPs de tal forma que as atividades das MMP-2 e MMP-9 são inibidas prejudicando ou até mesmo impedindo a visualização das bandas.

4.6 Tratamento

Os animais portadores de linfoma foram tratados de acordo com o protocolo quimioterápico antineoplásico de Madison-Wisconsin, totalizando 19 semanas, que

incluiu sulfato de vincristina, L-asparaginase, ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisona, tal qual ilustrado na Tabela 3.

Dentro do grupo linfoma, 19 cães foram submetidos ao protocolo quimioterápico antineoplásico e avaliados na quinta semana de tratamento quanto à sua resposta e classificados em remissão completa (RC; desaparecimento da doença clínica), remissão parcial (RP; diminuição em 50% do tamanho do tumor sem evidência de novos tumores), doença estável (DE; diminuição ou aumento em até 50% do tamanho do tumor, sem desenvolvimento de outro tumor) e doença progressiva (DP; aumento em pelo menos 50% do tamanho do tumor ou o aparecimento de novos tumores) (DHALIWAL et al. , 2003) . Os três animais que perfaziam o grupo experimental linfoma e não foram submetidos ao tratamento justificam-se por opção de seus proprietários.

Tabela 3 Protocolo quimioterápico antineoplásico de Madison-Wisconsin totalizando 19 semanas (CHUN, 2009).

Semanas	Vincristina (0,75mg/m ² /IV)	L-asparaginase (400 UI/kg/IM)	Ciclofosfamida (250 mg/m ² /VO)	Doxorrubicina (30 mg/m ² /IV)	Prednisona (VO)
1	X	X			2 mg/kg/dia
2			X		1,5 mg/kg/dia
3	X				1 mg/kg/dia
4				X	0,5 mg/kg/dia
5	Intervalo				
6	X				
7			X		
8	X				
9				X	
10	Intervalo				
11	X				
12			X		
13	X				
14				X	
15	Intervalo				
16	X				
17			X		
18	X				
19				X	

4.7 Análise dos resultados

Os dados foram avaliados de acordo com o protocolo de análise de variância do método do quadrado mínimo, utilizando o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS, cujos valores médios obtidos para as duas diferentes MMPs pela técnica zimográfica foram comparados pelo Teste de Tukey. Para avaliação dos valores de variáveis discretas obtidas pela técnica imunohistoquímica utilizou-se teste de Kruskal-Wallis, com posterior utilização do teste de comparação múltipla de Dunn, para os casos em que houve diferença estatística entre medianas. Possíveis correlações entre as MMPs foram avaliadas pelo teste de Pearson. Para todos os testes valores iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Estadiamento e sub-estadiamento tumoral

Com relação ao estadiamento tumoral observou-se maior prevalência do estágio IV (41%), seguido dos estádios III e V (22,5% cada). O estágio I, ou seja, envolvimento limitado a um único linfonodo apresentou ocorrência menor (14%), e o estágio II não foi observado em nenhum animal.

Subestadio b foi observado em 10 pacientes (45%), o qual foi representado por alterações oculares, edema de membros, perda de peso, apatia, hiporexia e/ou emese. Subestadio a foi encontrado em 12 animais (55%), como exemplificado na Tabela 4.

Tabela 4 Estadiamento tumoral dos animais portadores de linfoma multicêntrico atendidos pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel e pelo Centro Avançado de Veterinária CAVET. Jaboticabal, 2013.

Estádio	Subestadio		Total
	a	B	
I	2	1	3 (14%)
II	0	0	0
III	1	4	5 (22,5%)
IV	6	3	9 (41%)
V	3	2	5 (22,5%)
Total	12 (55%)	10 (45%)	22 (100%)

5.2 Classificação histológica e imunofenotipagem

Fotomicrografias representativas da positividade e negatividade das reações com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79, utilizados para classificação imunofenotípica dos linfomas, encontram-se na Figura 2.

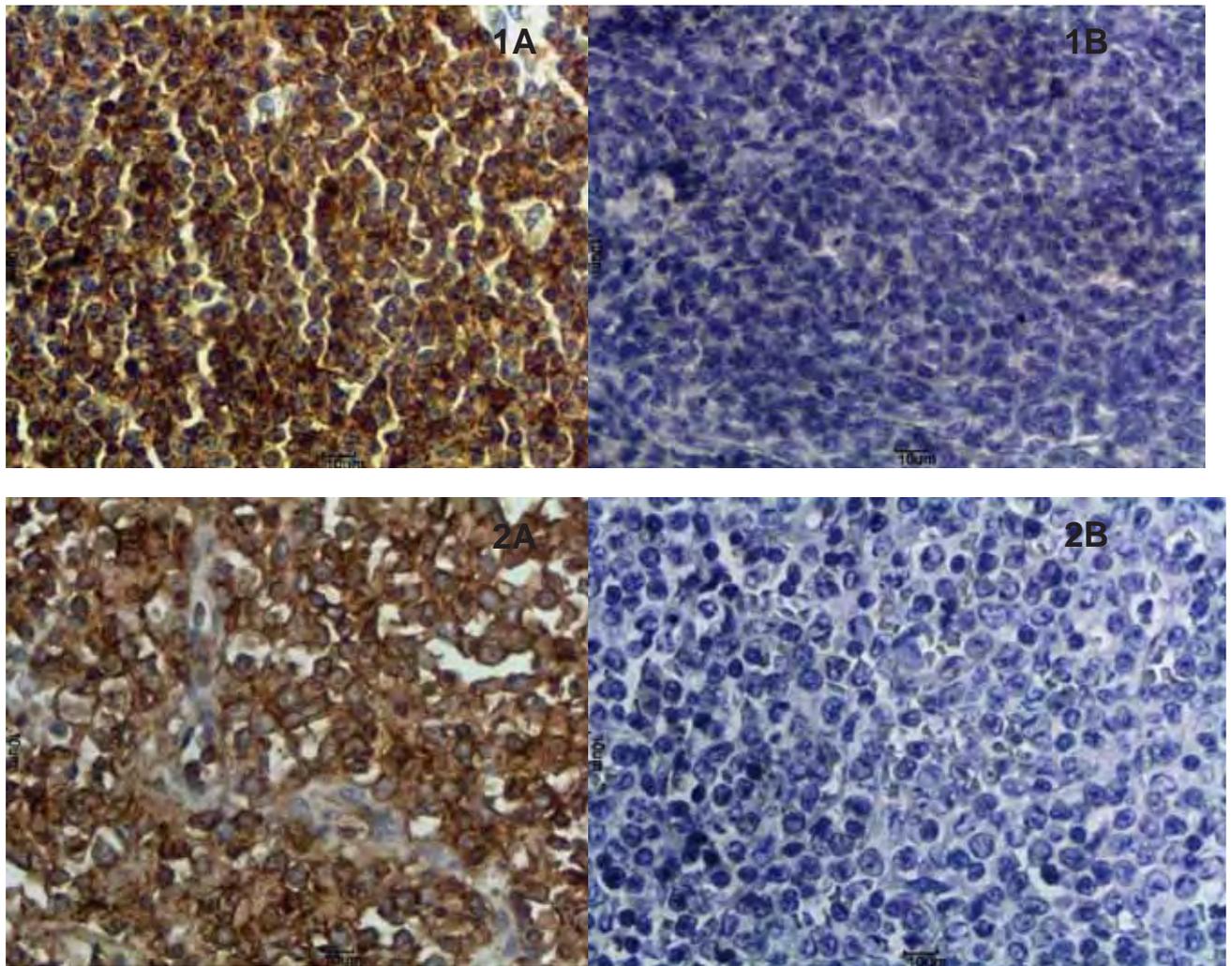


Figura 2 Fotomicrografias evidenciando imunofenotipagem do linfoma. Imunomarcção do anticorpo anti CD79 α em corte de linfonodo (1A) e ausência da expressão do anticorpo anti CD3 em 1B, caracterizando o imunofenótipo B; expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti CD3 em corte de linfonodo (2A) e ausência da expressão do anticorpo anti CD79 α em 2B, caracterizando o imunofenótipo T. Jaboticabal, 2013.

Segundo a imunofenotipagem os linfomas foram classificados em linfomas B e T, sendo quatorze (63,5%) e oito (36,5%) animais, respectivamente. Dentre os animais do grupo B, histologicamente, os mesmos foram divididos em baixo grau (7%) e alto grau (93%). Avaliando-se o grupo com linfoma T, observou-se 72% de linfoma baixo grau, e 28% alto grau. Comparando-se apenas a classificação histológica, obteve-se 27% de animais com baixo grau e 73% com alto grau de linfoma, com as linhagens celulares especificadas na Tabela 5.

Tabela 5 Classificação histopatológica segundo Kiel (LENNERT;FELLER, 1992) e imunofenotipagem dos animais com linfoma multicêntrico atendidos pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinario Governador Laudo Natel e pelo Centro Avançado de Veterinária CAVET. Jaboticabal, 2013.

Imunofenotipagem	Grau	Linhagem celular	Frequencia
Linfoma B	Baixo	Linfocítico	1
	Alto	Centroblástico	11
		Linfoblástico tipo Células B	1
		Linfoblástico tipo Burkitt	1
Linfoma T	Baixo	Linfocítico	1
		Células T pleomórficas	2
		Zona T	2
	Alto	Linfoblástico tipo células T	3
		Total	

5.3 Avaliação da resposta ao tratamento

Com relação à resposta ao tratamento na quinta semana de protocolo quimioterápico, observou-se maior prevalência de animais em remissão parcial, totalizando 10 cães (53%), seguidos dos animais em remissão completa (seis cães – 31%) e doença progressiva (três cães – 16%).

Ao comparar as respostas ao tratamento nos diferentes imunofenótipos tumorais, observou-se dentro do imunofenótipo B prevalência maior de animais em remissão parcial (77%), e menor em remissão completa (23%). Já com relação ao imunofenótipo T observaram-se equivalência de animais em remissão completa (50%) e doença progressiva (50%). Fazendo a mesma análise quanto aos diferentes graus histológicos observaram-se maiores taxas de remissão parcial e remissão completa (64% e 36% respectivamente) no alto grau, enquanto o baixo grau apresentou maior taxa de doença progressiva (60%). Os estádios tumorais avançados (IV e V) apresentaram maior taxa de remissão parcial (61%) e os iniciais (I e III) apresentaram equilíbrio para as taxas de respostas. O subestadio a obteve maior número de animais em remissão parcial (66,6%), assim como o subestadio b (40%), porém o último apresentou 30% de seus animais em doença progressiva (Tabela 6).

Tabela 6 Resposta ao tratamento nos animais do grupo linfoma observada na quinta semana do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, relacionada às diferentes variáveis clínico-histopatológicas. Jaboticabal,2013.

Variáveis	Resposta ao tratamento			Total
	RC	RP	DP	
Grupo linfoma	6 (31%)	10 (53%)	3 (16%)	19 (100%)
Imunofenotipagem				
B	3 (23%)	10 (77%)	-	13 (100%)
T	3 (50%)	-	3 (50%)	6 (100%)
Grau histológico				
Baixo	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	5 (100%)
Alto	5 (36%)	9 (64%)	-	14 (100%)
Estadiamento tumoral				
I e III	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	6 (100%)
IV e V	4 (31%)	8 (61%)	1 (8%)	13 (100%)
Subestadio tumoral				
a	3 (33,3%)	6 (66,6%)	-	9 (100%)
b	3 (30%)	4 (40%)	3 (30%)	10 (100%)

RC: remissão completa; RP: remissão parcial; DP: doença progressiva.

5.4 Expressão tecidual das metaloproteinasas

Fotomicrografias representativas da expressão tecidual das metaloproteinasas de matriz 2 e 9, através de técnica imuno-histoquímica, em linfonodos controle e linfomatosos, encontram-se na Figura 3.

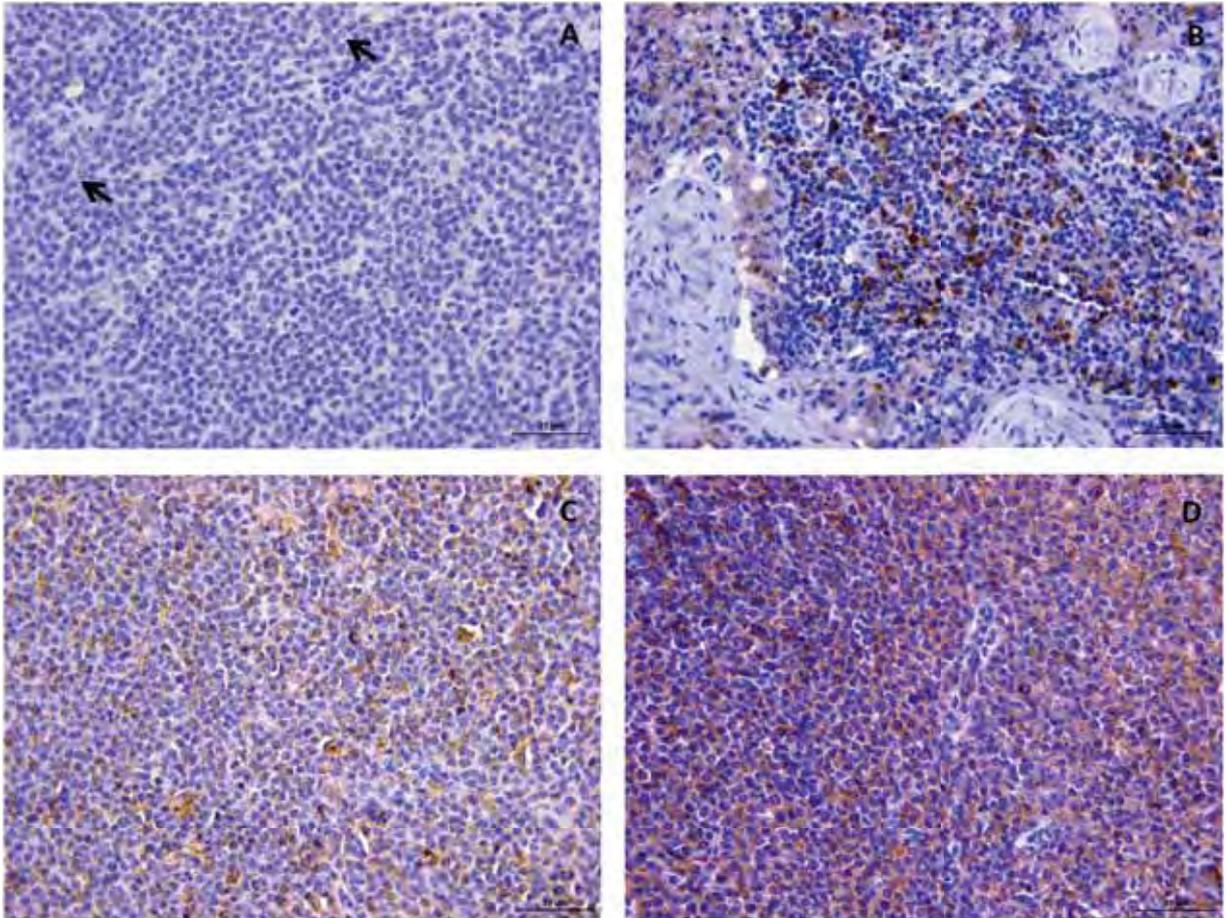


Figura 3 Fotomicrografia evidenciando imunomarcção citoplasmática da proteína MMP. A e B marcação citoplasmática de MMP-2 em linfócitos neoplásicos (A setas) e linfócitos normais (B). C e D marcação citoplasmática de MMP-9 nos linfócitos neoplásicos. Jaboticabal, 2013.

Os escores de expressão tecidual das metaloproteinasas, avaliados através de técnica imuno-histoquímica, encontram-se especificadas nas tabelas 7 a 8.

Com relação à marcação tecidual da MMP-2 e da MMP-9, observou-se diferença entre a expressão das mesmas, com maior marcação de MMP-9 no linfonodo.

Relativamente à quantidade de células imunomarcadas para a MMP-2, observou-se maior número de pacientes nos escores de distribuição 0 e 1 no GL e no GC, não apresentando diferença estatística entre si. O mesmo foi encontrado nas outras variáveis clínico-histopatológicas avaliadas (Tabela 7).

Com relação à distribuição da MMP-9, aumento significativo foi encontrado no GL quando comparado com o GC. Ao avaliar isoladamente os linfomas de alto e baixo grau, observou-se diferença significativa apenas entre o alto grau (com maior expressão) e o GC. Aumento significativo da MMP-9 nos pacientes com linfoma B foi encontrado apenas quando comparados aos pacientes do GC. Dentre os estádios tumorais observou-se aumento significativo do estágio IV com relação ao GC. Agrupando-se os animais em estádios mais avançados (IV e V) e estádios mais iniciais (I e III), observou-se maior número de células imunomarcadas nos primeiros. Diferença significativa com maior distribuição nos pacientes do subestádio a quando comparados com o GC foi encontrada, porém sem diferença entre os subestádios a e b, e b e GC. Entretanto, o grupo b apresentou maior número de animais com escore elevado de distribuição (3 e 4) quando comparado ao grupo controle. Observou-se aumento significativo da MMP-9 nos pacientes em RP quando comparados ao GC, porém sem diferença significativa entre os outros grupos de resposta ao tratamento (Tabela 8).

Através de teste de Pearson não foi observado correlação entre a distribuição da MMP-2 e MMP-9.

Tabela 7 Associação entre os dados clínico-histopatológicos e o escore de distribuição da proteína MMP-2 detectada pela imuno-histoquímica em cães com linfoma multicentrico e cães hígidos. Jaboticabal, 2013.

Variáveis	N	Escore					
		0	1	2	3	4	
Grupos experimentais							
Linfoma	a	22 (100%)	4 (18%)	18 (82%)	0	0	0
Controle	a	6 (100%)	1 (17%)	3 (50%)	1 (17%)	1(17%)	0
Grau histológico							
Baixo	a	6 (100%)	2 (33%)	4 (67%)	0	0	0
Alto	a	16 (100%)	2 (12%)	14 (88%)	0	0	0
Controle	a	6 (100%)	1 (17%)	3 (50%)	1 (17%)	1(17%)	0
Imunofenotipagem							
B	a	14 (100%)	2 (14%)	12 (86%)	0	0	0
T	a	8 (100%)	2 (25%)	6 (75%)	0	0	0
Controle	a	6 (100%)	1 (17%)	3 (50%)	1 (17%)	1(17%)	0
Estadiamento tumoral							
I	a	3 (100%)	0	3 (100%)	0	0	0
III	a	5 (100%)	2 (40%)	3 (60%)	0	0	0
IV	a	9 (100%)	1 (11%)	8 (89%)	0	0	0
V	a	5 (100%)	1 (20%)	4 (80%)	0	0	0
Controle	a	6 (100%)	1 (17%)	3 (50%)	1 (17%)	1(17%)	0
Subestadio tumoral							
A	a	12 (100%)	2 (17%)	10 (83%)	0	0	0
B	a	10 (100%)	2 (20%)	8 (80%)	0	0	0
Controle	a	6 (100%)	1 (17%)	3 (50%)	1 (17%)	1(17%)	0
Resposta ao tratamento							
Remissao parcial	a	10 (100%)	1 (10%)	9 (90%)	0	0	0
Remissao completa	a	6 (100%)	2 (33%)	4 (67%)	0	0	0
Doença progressiva	a	3 (100%)	1 (33%)	2 (67%)	0	0	0
Controle	a	6 (100%)	1 (17%)	3 (50%)	1 (17%)	1(17%)	0

p < 0,05 letras iguais na mesma coluna não diferem entre si

Tabela 8 Associação entre os dados clínico-histopatológicos e o escore de distribuição da proteína MMP-9 detectada pela imuno-histoquímica em cães com linfoma multicêntrico e cães hígidos. Jaboticabal, 2013.

Variáveis	N	Escore					
		0	1	2	3	4	
Grupos experimentais							
Linfoma	a	22 (100%)	0	4 (18%)	1 (5%)	4 (18%)	13 (59%)
Controle	b	6 (100%)	0	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	0
Grau histológico							
Baixo	ab	6 (100%)	0	1 (17%)	0	2 (33%)	3 (50%)
Alto	a	16 (100%)	0	3 (19%)	1 (6%)	2 (12%)	10 (63%)
Controle	b	6 (100%)	0	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	0
Imunofenotipagem							
B	a	14 (100%)	0	2 (14%)	1 (7%)	1 (7%)	10 (71%)
T	ab	8 (100%)	0	2 (25%)	0	3 (37%)	3 (37%)
Controle	b	6 (100%)	0	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	0
Estadiamento tumoral							
I	ab	3 (100%)	0	1 (33%)	0	2 (67%)	0
III	ab	5 (100%)	0	1 (20%)	1 (20%)	0	3 (60%)
IV	a	9 (100%)	0	1 (11%)	0	1 (11%)	7 (78%)
V	ab	5 (100%)	0	1 (20%)	0	1 (20%)	3 (60%)
Controle	b	6 (100%)	0	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	0
Subestadio tumoral							
A	a	12 (100%)	0	3 (25%)	0	1 (8%)	8 (67%)
B	ab	10 (100%)	0	1 (10%)	1 (10%)	3 (30%)	5 (50%)
Controle	b	6 (100%)	0	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	0
Resposta ao tratamento							
Remissão parcial	a	10 (100%)	0	1 (10%)	1 (10%)	0	8 (80%)
Remissão completa	ab	6 (100%)	0	3 (50%)	0	1 (17%)	2 (33%)
Doença progressiva	ab	3 (100%)	0	0	0	2 (67%)	1 (33%)
Controle	b	6 (100%)	0	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	0

p < 0,05 letras iguais na mesma coluna não diferem entre si

5.5 Eletroforese zimográfica dos linfonodos

Através da eletroforese zimográfica da proteína extraída a partir dos linfonodos, pode-se obter valores de atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, em suas variáveis inativas (MMP-2 int. e pró MMP-9) e ativas (MMP-2 ativa e MMP-9 ativa), diferenciadas através de seus respectivos pesos moleculares, conforme Figura 4. Os valores numéricos obtidos a partir desta técnica podem ser visibilizados nas Tabelas 9 e 10.

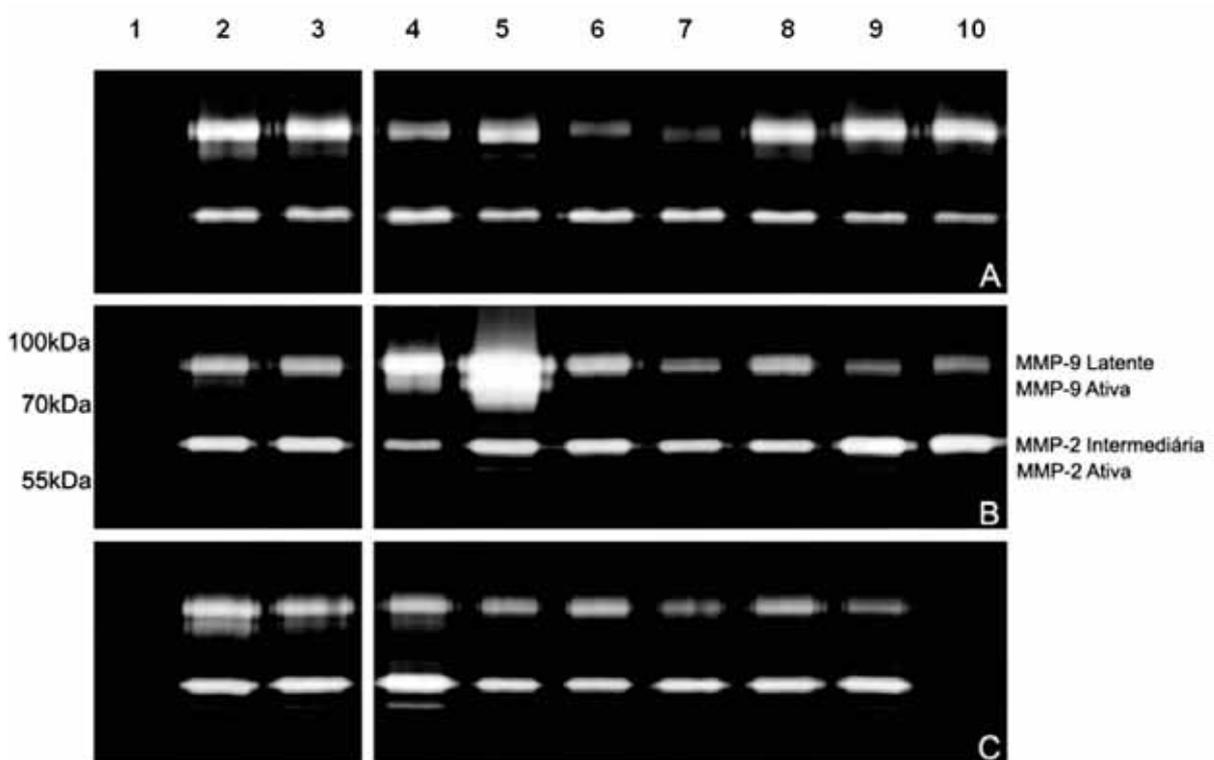


Figura 4 Zimografia de linfonodo em gel de poliacrilamida 10%. Padrão de peso molecular (1); Animais saudáveis (2 e 3); animais com linfoma (4 a 10). Géis com diferentes animais (A, B e C). MMP-9 latente (92Kda); MMP-9 ativa (82Kda); MMP-2 intermediária (68Kda); MMP-2 ativa (62Kda).

Não foi encontrada diferença significativa entre os valores de cada MMP-2 e MMP-9 nos linfonodos do GC e GL. Da mesma forma, quando comparados os valores obtidos das MMPs entre os diferentes estadiamentos e subestadiamentos tumorais, não foi encontrado diferença estatística em nenhuma variável.

Relativamente à imunofenotipagem, observou-se diminuição significativa dos valores obtidos de MMP-2 inativa nos pacientes com imunofenotipo T em relação aos animais com imunofenótipo B e o GC. Com relação à MMP-2 total, o grupo com linfoma T apresentou diminuição significativa em relação ao grupo B. Analisando-se a MMP-9 inativa e MMP-9 total encontrou-se aumento significativo no grupo de pacientes com linfoma T com relação ao B, porém sem diferença significativa entre estas e o grupo controle. A MMP-9 ativa e sua porcentagem de ativação não apresentaram significância entre os grupos de imunofenotipagem.

O grupo de animais com grau histológico baixo apresentou diminuição significativa de MMP-2 inativa e MMP-2 total em relação ao grupo com graduação alta e o GC. Não houve diferença entre os grupos de grau histológico quanto às variáveis de MMP-9.

Quanto à resposta ao tratamento, observaram-se menores valores de MMP-2 inativa e total nos pacientes em DP em comparação aos pacientes em RP, RC e GC, porém, não houve diferença entre RP, RC e GC. A porcentagem de ativação de MMP-2 apresentou diminuição significativa no RP em relação ao RC. Para a MMP-9 inativa, ativa e total observou-se diminuição significativa nos pacientes em RP quando comparados ao DP.

Através de teste de Pearson, observou-se correlação positiva entre as variáveis inativas e ativas da MMP-2, e inativas e ativas da MMP-9, ou seja, ambas aumentam em concordância. Houve correlação positiva entre MMP-2 ativa e MMP-9 ativa, da mesma forma que houve correlação positiva entre MMP-2 inativa e MMP-9 inativa. Entretanto não foi encontrada correlação entre MMP-2 e MMP-9 total.

Tabela 9 Associação entre os valores encontrados (média e desvio padrao) das atividades gelatinolíticas teciduais da MMP-2 Inativa (MMP-2 Int.), MMP-2 Ativa , MMP-2 Total e porcentagem de ativação da MMP-2 (% MMP-2 ativa), com as variáveis clínico-histopatológicas em cães com linfoma multicentrico e cães hígdidos. Jaboticabal, 2013.

Variáveis	N	MMP-2 Int. B.I x 10 ⁵ (UA)	MMP-2 Ativa B.I x 10 ⁵ (UA)	MMP-2 Total B.I x 10 ⁵ (UA)	% MMP-2 ativa
Grupos experimentais					
Linfoma	22	243,7 ± 86,8 a	23,8 ± 18,6 a	267,5 ± 98,4 a	8,6 ± 4,3 a
Controle	6	270,1 ± 58,6 a	19,8 ± 5,2 a	289,9 ± 59,8 a	7 ± 2,1 a
Grau histológico					
Baixo	6	166,7 ± 60 a	14,8 ± 6,6 a	181,5 ± 62,6 a	8,4 ± 3,2 a
Alto	16	269,3 ± 79,9 b	26,8 ± 20,5 a	296,1 ± 92,3 b	8,6 ± 4,6 a
Controle	6	270,1 ± 58,6 b	19,8 ± 5,2 a	289,9 ± 59,8 ab	7 ± 2,1 a
Imunofenotipagem					
B	14	275,9 ± 76,6 a	24,7 ± 20,4 a	300,6 ± 89,6 a	7,7 ± 4,4 a
T	8	168,4 ± 60,7 b	21,7 ± 15,2 a	190,1 ± 75,3 b	10,6 ± 3,5 a
Controle	6	270,1 ± 58,6 a	19,8 ± 5,2 a	289,9 ± 59,8 ab	7 ± 2,1 a
Estadiamento tumoral					
I	3	157,3 a	20,7 a	178 a	11,7 a
III	5	186,8 ± 55,3 a	13,2 ± 4,9 a	200 ± 58,7 a	6,7 ± 1,6 a
IV	9	267,3 ± 67,8 a	28,7 ± 23,7 a	296,1 ± 79,1 a	9,2 ± 5,8 a
V	5	275,2 ± 123,1 a	26,3 ± 17,4 a	301,4 ± 138,1 a	8,7 ± 2,9 a
Controle	6	270,1 ± 58,6 a	19,8 ± 5,2 a	289,9 ± 59,8 a	7 ± 2,1 a
Subestadio tumoral					
A	12	249,1 ± 81,6 a	18,2 ± 7,8 a	267,4 ± 86,1 a	7 ± 2,7 a
B	10	237 ± 97,4 a	30,7 ± 25,6 a	267,6 ± 117,2 a	10,5 ± 5,2 a
Controle	6	270,1 ± 58,6 a	19,8 ± 5,2 a	289,9 ± 59,8 a	7 ± 2,1 a
Resposta ao tratamento					
Remissao parcial	10	273 ± 74,9 a	19,6 ± 13,7 a	292,6 ± 86,5 a	6,4 ± 2,3 a
Remissao completa	6	226,3 ± 55,3 a	35,4 ± 25,9 a	261,7 ± 79 a	12,5 ± 5,1 b
Doença progressiva	3	118,4 ± 9,5 b	13,4 ± 5,2 a	131,8 ± 14,8 b	10 ± 2,8 ab
Controle	6	270,1 ± 58,6 a	19,8 ± 5,2 a	289,9 ± 59,8 a	7 ± 2,1 ab

p< 0,05 letras iguais na mesma coluna não diferem entre si

Tabela 10 Associação entre os valores encontrados (média e desvio padrao) das atividades gelatinolíticas teciduais da Pró MMP-9, MMP-9 Ativa , MMP-9 Total e porcentagem de ativação da MMP-9 (% MMP-9 ativa), com as variáveis clínico-histopatológicas em cães com linfoma multicentrico e cães hígdos. Jaboticabal, 2013.

Variáveis	N	Pró MMP-9 B.I. x 10 ⁵ (UA)	MMP-9 Ativa B.I. x 10 ⁵ (UA)	MMP-9 Total B.I. x 10 ⁵ (UA)	% MMP-9 ativa
Grupos experimentais					
Linfoma	22	235,8 ± 128,1 a	48,1 ± 92,4 a	283,9 ± 191,9 a	11,6 ± 12 a
Controle	6	338,4 ± 84,8 a	59,8 ± 26,3 a	398,1 ± 103,6 a	14,7 ± 4,2 a
Grau histológico					
Baixo	6	363,5 ± 143,2 a	69,7 ± 82,9 a	433,2 ± 198,8 a	13,9 ± 10,1 a
Alto	16	193,2 ± 92,9 a	40,9 ± 97 a	234,2 ± 167,6 a	10,9 ± 12,8 a
Controle	6	338,4 ± 84,8 a	59,8 ± 26,3 a	398,1 ± 103,6 a	14,7 ± 4,2 a
Imunofenotipagem					
B	14	170,3 ± 84,1 a	40,6 ± 100,8 a	211 ± 169,6 a	11,2 ± 13,2 a
T	8	388,5 ± 62,7 b	65,6 ± 74,2 a	454,1 ± 124,4 b	12,5 ± 9,5 a
Controle	6	338,4 ± 84,8 b	59,8 ± 26,3 a	398,1 ± 103,6 ab	14,7 ± 4,2 a
Estadiamento tumoral					
I	3	310 a	29,7 a	340,5 a	8,7 a
III	5	273,4 ± 144,8 a	20,1 ± 16,6 a	293,6 ± 160,7 a	5,6 ± 3,4 a
IV	9	223,4 ± 113,3 a	56,3 ± 124,7 a	279,7 ± 207,4 a	11,6 ± 15,8 a
V	5	205,5 ± 163,1 a	64,9 ± 87,3 a	270,5 ± 248,7 a	18,3 ± 8,2 a
Controle	6	338,4 ± 84,8 a	59,8 ± 26,3 a	398,1 ± 103,6 a	14,7 ± 4,2 a
Subestadio tumoral					
A	12	205,1 ± 125,4 a	18 ± 15,5 a	223,1 ± 137,8 a	8,5 ± 5,3 a
B	10	273,3 ± 128,1 a	84,9 ± 131,2 a	358,3 ± 229 a	15,4 ± 16,6 a
Controle	6	338,4 ± 84,8 a	59,8 ± 26,3 a	398,1 ± 103,6 a	14,7 ± 4,2 a
Resposta ao tratamento					
Remissao parcial	10	160,9 ± 58,1 a	13,8 ± 18,7 a	174,7 ± 69,9 a	6,9 ± 6,4 a
Remissao completa	6	285,1 ± 121 ab	86,5 ± 147,5 ab	371,7 ± 221,7 ab	16,9 ± 17,5 a
Doença progressiva	3	438,5 ± 38,5 b	122,5 ± 132,7 b	560,9 ± 171,2 b	19,1 ± 17,8 a
Controle	6	338,4 ± 84,8 ab	59,8 ± 26,3 ab	398,1 ± 103,6 ab	14,7 ± 4,2 a

p< 0,05 letras iguais na mesma coluna não diferem entre si

5.6 Eletroforese zimográfica dos soros

Através da eletroforese zimográfica do soro, pode-se obter valores de atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, sendo encontradas apenas em suas formas latentes, diferenciadas através de seus respectivos pesos moleculares, conforme Figura 5. Os valores numéricos obtidos a partir desta técnica podem ser visibilizados na Tabela 11.

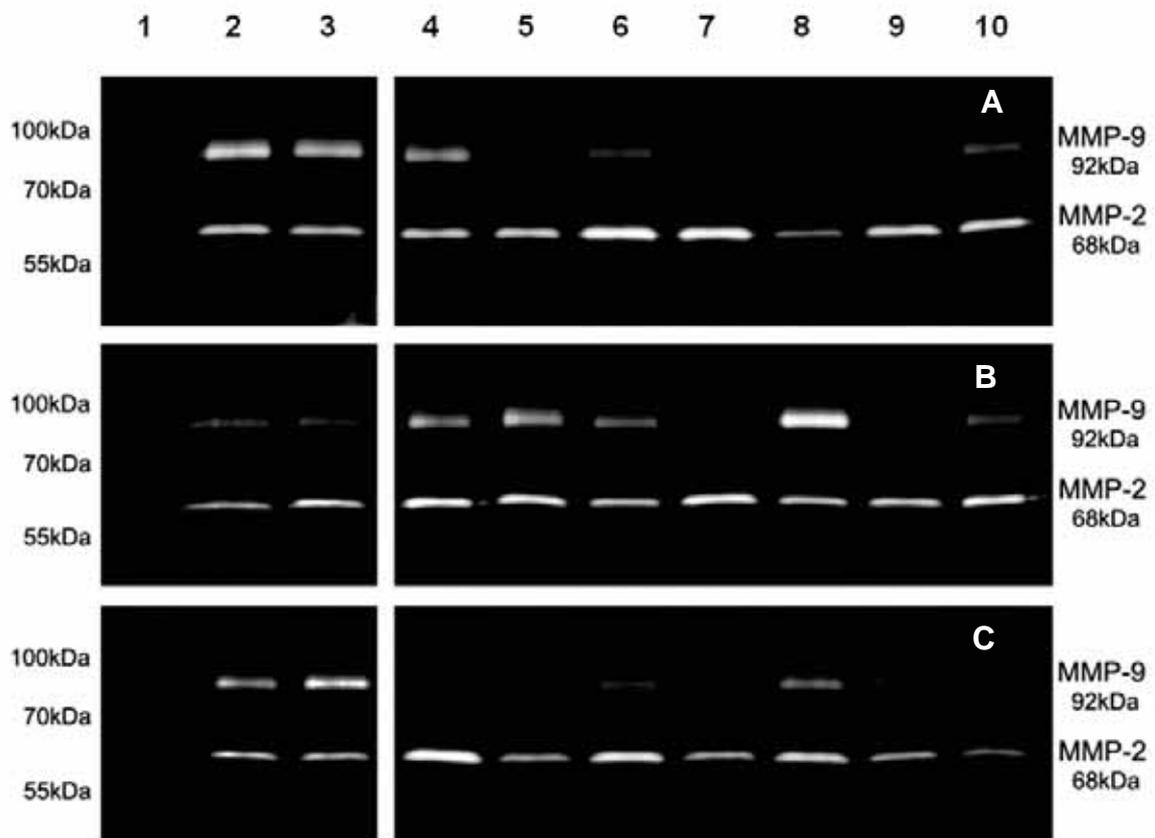


Figura 5 Zimografia de soro em gel de poliacrilamida 10%. Padrão de peso molecular (1); Animais saudáveis (2 e 3); animais com linfoma (4 a 10). Géis com diferentes animais (A, B e C). MMP-9 latente (92Kda); MMP-2 intermediária (68Kda).

Não foi observada diferença estatística entre o GL e o GC quanto à MMP-2 sérica, assim como com relação às diferentes variáveis clínico-histopatológicas.

Observou-se aumento significativo dos valores séricos encontrados de MMP-9 no GC com relação ao GL. Quando se comparou os estadiamentos neoplásicos e o GC observou-se aumento significativo no GC relativamente aos estádios I, III e V. Não houve diferença estatística entre os diferentes estádios, subestádios, imunofenótipos, graus histológicos, e entre os diferentes grupos de resposta ao tratamento, apenas entre estes e o GC.

Através de teste de Pearson, não foi encontrada correlação entre os valores de MMP-2 e MMP-9 séricas.

Tabela 11 Associação entre os valores encontrados média \pm desvio padrao das atividades gelatinolíticas séricas das MMPs 2 e 9 com as variáveis clínico-histopatológicas em cães com linfoma multicentrico e cães hígidos. Jaboticabal, 2013.

Variáveis	N	MMP-2 B.I.x10 ⁵ (UA)	MMP-9 B.I.x10 ⁵ (UA)
Grupos experimentais			
Linfoma	22	149,3 \pm 61,7 a	75,2 \pm 57,7 a
Controle	6	128,6 \pm 14,1 a	177,4 \pm 65,9 b
Grau histológico			
Baixo	6	136,5 \pm 67,4 a	48,3 \pm 21 a
Alto	16	153,3 \pm 61,6 a	83,6 \pm 63,3 a
Controle	6	128,6 \pm 14,1 a	177,4 \pm 65,9 b
Imunofenotipagem			
B	14	162,8 \pm 64,6 a	84,6 \pm 63,2 a
T	8	122,2 \pm 48,8 a	56,5 \pm 42,9 a
Controle	6	128,6 \pm 14,1 a	177,4 \pm 65,9 b
Estadiamento tumoral			
I	3	101,1 \pm 45,1 a	34,5 \pm 11 a
III	5	172,9 \pm 78,4 a	68,4 \pm 50,8 a
IV	9	139,6 \pm 54,9 a	106,6 \pm 75,7 ab
V	5	170,1 \pm 58,8 a	56,1 \pm 16,5 a
Controle	6	128,6 \pm 14,1 a	177,4 \pm 65,9 b
Subestadio tumoral			
a	12	148,3 \pm 65,6 a	68,8 \pm 69,7 a
b	10	150,5 \pm 60,8 a	82,3 \pm 43,6 a
Controle	6	128,6 \pm 14,1 a	177,4 \pm 65,9 b
Resposta ao tratamento			
Remissao parcial	10	162,5 \pm 68 a	73,4 \pm 37,8 a b
Remissao completa	6	167 \pm 49,7 a	72,4 \pm 54,7 a
Doença progressiva	3	136,6 \pm 68,7 a	48,2 \pm 21,2 a
Controle	6	128,6 \pm 14,1 a	177,4 \pm 65,9 b

p < 0,05 letras iguais na mesma coluna não diferem entre si

6 DISCUSSÃO

O estadiamento tumoral do linfoma propicia a avaliação da extensão do tumor, identificando precocemente os tecidos afetados pelas células neoplásicas e o grau de comprometimento dos mesmos (MORENO; BRACARENSE, 2007). Desta forma, auxilia na determinação do prognóstico do animal com linfoma, sendo importante para estabelecer um diagnóstico mais preciso e precoce, permitindo um tratamento adequado e uma melhora na taxa de sobrevivência dos animais portadores de linfoma (JAFFE et al., 2001; PONCE et al., 2004; MORENO; BRACARENSE, 2007).

No estudo em tela, o estadiamento tumoral apresentou maior número de animais nos estádios mais avançados IV e V, seguido do estágio intermediário III e inicial I, o que corrobora em parte com resultados encontrados em outros estudos (GARRETT et al., 2002; CARDOSO et al., 2003; ARESU et al. 2012; WOLFESBERGER et al., 2012). Nos ensaios em questão, entretanto, não foi encontrado nenhum animal em estágio I. Quanto ao subestadiamento tumoral, observou-se, aqui, pouca diferença entre o número de animais com e sem sintomatologia clínica, semelhante aos resultados obtidos por Wolfesberger et al. (2012). Em estudos anteriores, porém, o subestádio b mostrou-se predominante entre os animais com linfoma (GREENLEE et al., 1990; TESKE et al., 1994; STARRAK et al., 1997). Pode-se inferir, por consequência, que o diagnóstico do linfoma multicêntrico é, em grande parte, realizado tardiamente, após envolvimento de diversos tecidos, devido à dificuldade de identificação das alterações nos estádios iniciais. Entretanto, o número de animais diagnosticados com linfoma sem a presença de sinais clínicos sistêmicos tem aumentado, mostrando, possivelmente, maior atenção dos proprietários com relação aos seus animais.

A imunofenotipagem do linfoma permite a caracterização da linhagem linfocitária envolvida na referida neoplasia e esta altamente relacionada ao prognóstico (MACEWEN et al., 2001). Neste estudo, pode-se notar uma prevalência de animais com imunofenótipo B, o que corrobora a maioria dos autores consultados (TESKE et al., 1994; VAIL; OGILVIE, 1998; COSTA et al., 2005; ARESU et al., 2012;

WOLFESBERGER et al., 2012). A maior prevalência de células B nas neoplasias linfóides pode ser explicada, em parte, pelo fato de as células B, durante sua diferenciação, sofrerem um maior número de rearranjos genômicos devido à produção das imunoglobulinas, tornando-se, desta forma, mais susceptíveis a alterações neoplásicas (TASCA et al., 2009).

Segundo a classificação histopatológica de Kiel (LENNERT; FELLER, 1990), o linfoma pode ser diferenciado em alto e baixo grau, com suas respectivas linhagens celulares, de acordo com o grau de malignidade das células avaliadas no corte histológico. O método de coleta do material para a análise histológica, neste estudo, foi o da extirpação cirúrgica do linfonodo acometido e sua avaliação por completo, incluindo arquitetura, sendo esta a metodologia recomendado por outros autores (DICKINSON, 2008). O linfoma alto grau, tem sido descrito em diversos estudos precedentes como sendo o grau histopatológico de maior frequência e com predominância de células com alto grau de malignidade, mais indiferenciadas, na forma de blastos, enquanto o baixo grau caracteriza-se pelo sufixo “cítico”, com células na sua maior parte de menores tamanhos e mais diferenciados (LENNERT;FELLER, 1990; PARODI, 2001; DALECK et al., 2008; ARESU et al., 2012). Os resultados obtidos neste estudo concordam com aqueles citados por outros autores, mostrando o maior percentual de linfoma de alto grau no cão.

Quanto à linhagem celular encontrada na avaliação histopatológica dos linfonodos, observou-se maior ocorrência do subtipo centroblastico no linfoma B, e linfoblástico no linfoma T, concordando com os resultados obtidos em outros estudos (GREENLEE et al., 1990; TESKE et al., 1994; PONCE et al., 2004). Observou-se, ainda, ocorrência proporcionalmente maior de linfoma alto grau com imunofenótipo B, e linfoma baixo grau com imunofenótipo T, concordando com os resultados obtidos por Fournel-Fleury et al. (1997). Desta forma um grande número de animais com linfoma neste estudo apresenta associação prognóstica contraditória, ou seja, imunofenotipagem de pior prognóstico e grau histopatológico de melhor prognóstico, assim como o contrário, podendo interferir nas comparações prognósticas posteriores.

A avaliação do paciente quanto à resposta ao tratamento funciona como fator prognóstico para o linfoma canino, principalmente relacionado à sobrevida do animal, sendo esta maior para os animais em remissão completa e menor para o grupo em doença progressiva (JAGIELSKI et al., 2002). Em um estudo realizado por Aresu et al. (2012), observou-se maior número de animais em remissão completa após protocolo CHOP, seguidos do grupo em doença progressiva, porém o presente trabalho encontrou maior número de animais em remissão parcial. Tais resultados são de difícil comparação pelo fato de os animais receberem protocolos quimioterápicos diferentes e serem avaliados em semanas diferentes, entretanto pode-se observar que o protocolo realizado neste estudo levou a uma boa taxa de remissão, parcial ou total, com pequeno número de animais em doença progressiva.

Metaloproteinases de matriz são proteases atualmente estudadas com relação à interferência das mesmas em processos patológicos, incluindo as neoplasias. Dentre estas, as metaloproteinases 2 e 9, gelatinases, participam do processo invasivo tumoral, com papel já estabelecido principalmente em neoplasias de tecido sólido como neoplasias mamárias, mastocitoma e osteossarcoma (LEIBMAN et al., 2000; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005; GOMES et al., 2009; LOUKOPOULOS et al., 2003; ARESU et al., 2011; GIANTIN et al., 2012). Entretanto, as atividades gelatinolíticas das MMPs diferem entre neoplasias de origens celulares diferentes (ROOMI et al., 2009).

A evidência do papel das MMPs na progressão tumoral ficou demonstrada após estudos experimentais onde se observaram que tumores benignos adquiriam propriedades malignas na medida em que a expressão das referidas metaloproteinases aumentava e, contrariamente, células com alta malignidade tornavam-se menos agressivas quando a expressão ou atividade das MMPs diminuía (COUSSENS; WERB, 1996). Porém, além do papel destas proteases no processo de invasão e metástase tumoral, outras funções destas enzimas estão sendo estudadas relacionadas às suas capacidades básicas de clivagem protéica. MMPs são capazes de regular o crescimento de células tumorais devido a suas influências na regulação de fatores de crescimento (ativação e biodisponibilidade de citocinas na matriz extracelular); participam do processo de regulação da apoptose e

angiogênese; e ainda dos mecanismos de evasão do sistema imune (SHEU et al., 2001; EGEBLAD; WERB, 2002).

Neste estudo, ao avaliar a expressão tecidual da MMP-2 em linfonodo saudável e linfomatoso, observou-se baixa expressão, sem diferença estatística entre os dois grupos, assim como quando se associou às variáveis clinico-histopatológicas. Tais resultados concordam com Newman et al. (2008) que avaliaram a expressão de MMP-2 e TIMP-2 nos mesmos tecidos, em cães, e não encontraram diferença entre os grupos, assim como relação com fatores de agressividade tumoral como estadiamento, imunofenotipagem e grau histopatológico.

Resultados semelhantes de MMP-2 foram encontrados após avaliação dos mesmos linfonodos pela técnica de eletroforese zimográfica, quanto à comparação dos grupos controle e linfoma. Quando se avaliaram as atividades da MMP-2 nas diferentes formas de apresentação clinico-histopatológicas, obtiveram-se maiores valores das proteases inativa e total para os animais com grau histopatológico alto em relação ao baixo, e imunofenótipo B em relação ao T, e menores valores para os animais em doença progressiva. O grau histopatológico do linfoma guarda relação com o prognóstico e, particularmente, com a sobrevida dos pacientes (TESKE et al., 1994; VAIL; YOUNG, 2007), e os resultados obtidos demonstram uma possível relação da MMP-2 com a agressividade tumoral, porém, o imunofenótipo B é reconhecido pelos mesmos autores como uma condicionante de prognóstico favorável no linfoma canino. Além disto, animais em doença progressiva apresentam, como especificado anteriormente, menor sobrevida (JAGIELSKI et al., 2002). Desta forma, restam patentes os resultados contraditórios encontrados na correlação da MMP-2 com os fatores prognósticos já estabelecidos no linfoma canino.

Quando avaliada no soro, a MMP-2 não apresentou diferenças entre animais portadores de linfoma e controle e, tampouco, entre as diferentes formas de apresentação clinico-histopatológicas do tumor, tendo, inclusive, apresentado resultados que se assemelham àqueles obtidos ao nível tecidual. Resultados semelhantes foram encontrados a partir de estudos realizados em seres humanos (KUITTINEN, 2003; HAZAR et al., 2004) e em cães (ARESU et al., 2012), cuja

avaliação da MMP-2, em pacientes com linfoma, não revelou nexos entre a referida protease e diferentes fatores prognósticos do linfoma.

O papel da MMP-2 nas neoplasias ainda é controverso, visto que a mesma pode sofrer interferência de outras MMPs, como a MMP-9, que, por mecanismos ainda não esclarecidos, podem agir regulando negativamente sua expressão, tal como o encontrado em cultivo de células tumorais humanas por Roomi et al. (2009). Ademais, a MMP-2 é ativada diferentemente de outras metaloproteinases, posto que sua ativação não ocorre no meio extracelular, mas sim na superfície da membrana celular, sendo necessário um fator inibidor chamado TIMP-2 para sua ativação (EGEBLAD; WERB, 2002). Este mesmo inibidor, porém, desempenha papel bloqueador da ativação e da ação catalítica de outras metaloproteinases e, supostamente, poderia estar diminuído nos processos tumorais (HIDALGO; ECKHARDT, 2001; MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001). Corroborando a informação precedente, observou-se neste ensaio uma tendência a valores inversos entre MMP-2 e MMP-9, sendo que esta última apresentou-se elevada nos linfomas de imunofenótipo T e nos animais em doença progressiva.

Através da técnica imuno-histoquímica, observou-se maior número de linfócitos com expressão de MMP-9 nos linfonodos neoplásicos, quando comparados aos normais. Quando se associaram os valores da MMP-9 aos diferentes fatores prognósticos do linfoma, foi encontrado aumento de expressão de MMP-9 nos animais com grau histopatológico alto, imunofenótipo B, estágio IV, subestádio a e remissão parcial em relação ao controle, sem diferença entre si. O aumento da MMP-9 no tecido linfomatoso vem ao encontro das expectativas de maior síntese da mesma em tecidos neoplásicos, ensejando sua participação no processo de crescimento tumoral, tal qual asseverado por Hayashibara et al. (2002) e Themsche et al. (2004). Quanto à associação da MMP-9 com os fatores prognósticos do linfoma, o aumento da expressão apenas com relação ao grupo controle, sem diferença entre as variáveis estudadas, sugere que a mesma pode ser utilizada para distinção entre tecido saudável e patológico, mas não está relacionada com o grau de agressividade tumoral, em perfeita sintonia com os achados encontrados por Hazar et al. (2004). Entretanto, os resultados de outros estudos

evidenciaram associação entre a MMP-9 e o comportamento agressivo do linfoma como infiltração medular e estadiamento clínico, sugerindo a utilização da referida MMP-9 como marcador prognóstico negativo (KOSSAKOWSKA et al., 2000; LIU et al., 2009). Desta forma, agrupamos os estádios tumorais em avançados (IV e V) e iniciais (I e III) e encontramos maior número de células positivas nos primeiros, concordando então com Liu et al. (2009). Possivelmente, um fator importante que pode ter ocasionado a diferença de resultados, mas que os aproximou quando foram estabelecidos os estádios tumorais avançados (IV e V) e iniciais (I e III), diz respeito ao número (n) de parcelas experimentais, que aumentou na medida em que os animais portadores de linfomas foram agrupados.

De outra parte, uma possível explicação para o aumento da MMP-9 no tecido linfomatoso, sem correlação prognóstica, reside no fato de que esta protease tem sua produção estimulada por citocinas, dentre as quais a IL-6. Desta forma, o aumento de citocinas que ocorre comumente pela estimulação tumoral refletiria no aumento da síntese da protease, sem relação da mesma com a agressividade tumoral (KOSSAKOWSKA ET al., 2000).

Outra consideração relevante para o papel das metaloproteinases no linfoma está no fato de que tal neoplasia tem seu início, de modo geral, periféricamente, envolvendo células linfóides que fisiologicamente já possuem a capacidade de expressar MMP-9 em contato com a matriz extracelular, carregando dentro de si a capacidade de invasão (KUITTINEN, 2003; NEWMAN et al., 2008). Por conseguinte, tal fato justifica a capacidade que tem os diferentes tipos de linfoma de expressarem metaloproteinases e as mesmas não estarem relacionadas com o processo de invasão, devendo outros fatores inerentes à condição tumoral serem responsáveis pelo caráter de invasividade da neoplasia. A MMP-9 é referida, também, por seu envolvimento na regulação de respostas imunológicas e imunossupressão associadas ao câncer, fato que reforça seu papel biológico nas neoplasias malignas (GOETZL et al., 1996; SHEU et al., 2001), e que enseja sua participação num mecanismo regulatório complexo de inflamação e imunidade (PARKS et al., 2004).

Contrariamente ao que foi revelado aos achados imuno-histoquímicos, a eletroforese zimográfica dos linfonodos não apresentou diferença estatística entre os

valores obtidos de MMP-9, em suas diferentes formas, para animais portadores de linfoma e controle. Entretanto, apresentou maiores valores de pró-MMP-9 e MMP-9 total nos animais com imunofenótipo T comparados aos B. Além disto, apresentou maiores valores de pró-MMP-9, MMP-9 ativa e MMP-9 total nos animais em doença progressiva, comparativamente aos animais em remissão. O imunofenótipo T e a progressão da doença, mesmo após início do tratamento, estão associados com menor tempo de sobrevida no linfoma canino (TESKE et al., 1994; JAGIELSKI et al., 2002). Desta forma o aumento da MMP-9 pela eletroforese nestas duas variáveis poderia indicar prognóstico negativo quanto à sobrevida, porém sem diferença nítida com relação ao linfoma e controle. Outro resultado importante obtido por esta técnica foi a semelhança entre as taxas de ativação das metaloproteinases entre o grupo linfoma e controle, mostrando desta forma que o processo neoplásico não levaria ao aumento da ativação enzimática.

Inibidores de metaloproteinases (TIMPs) são substâncias capazes de impedir a ação das metaloproteinases através de suas ligações às formas inativas ou ativas, utilizando-se de mecanismos altamente regulados (FERRARI et al., 2000; JOHN; TUSZYNSKI, 2001; STERNLICHT; WERB, 2001). No processo tumoral, entretanto, as células neoplásicas podem ser capazes de alterar estes mecanismos, levando a menor inativação das metaloproteinases para favorecer o crescimento e invasão tecidual (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001). No presente trabalho, entretanto, o papel das TIMPs não foi avaliado, podendo de alguma forma estar envolvido nos resultados obtidos. O processo de eletroforese zimográfica é capaz de separar a ligação dos inibidores com as MMPs, fornecendo valores quantitativos das formas enzimáticas totais, sem levar em consideração se estão sendo inativadas ou não. Assim, com base nos resultados obtidos neste ensaio, não se pode concluir se o processo de inativação estava presente no tecido, sendo necessária a realização de técnica zimográfica reversa para esta avaliação, tal qual clamado por Beurden e Hoff (2005). Isto posto, se um dado paciente saudável apresentar maior inativação tecidual das MMPs, por parte das TIMPs, ou mesmo, o processo tumoral diminuir a atuação das TIMPs, resultados diferentes, *in vivo*, serão encontrados.

A diferença de resultados obtidos pela técnica imuno-histoquímica e eletroforese zimográfica pode estar relacionada aos objetivos principais de cada

método de determinação enzimática. A vantagem da eletroforese zimográfica está na sua capacidade de identificar e quantificar as formas inativas e ativas das metaloproteinases, porém sem determinar a localização exata destas proteases no tecido, ou seja, quantifica as proteases nas células neoplásicas e no estroma tecidual. Enquanto isso, a imuno-histoquímica ajuda a diferenciar a localização das enzimas, porém de forma a não mensurar e quantificar sua atividade (BEURDEN; HOFF, 2005).

No soro, a MMP-9 apresentou valores mais elevados de sua forma inativa no grupo controle em relação ao linfoma, sem diferenças entre as diversas expressões clínico-histopatológicas da doença. Resultados diferentes foram encontrados por Aresu et al. (2012) que observaram maior atividade plasmática da mesma nos animais com linfoma, e sem diferença para a forma inativa. O referido estudo observou ainda aumento da forma ativa de MMP-9 no estágio V em relação ao III/IV e no imunofenótipo T em relação ao B, ou seja, com associação prognóstica negativa. Hazar et al. (2004) encontrou no linfoma humano não-Hodgkin valores maiores de MMP-9 plasmática com relação ao grupo saudável.

É fato bem estabelecido que as metaloproteinases desempenham atividades gelatinolíticas tanto no estado fisiológico como patológico do organismo. São proteínas produzidas pelo processo de transcrição, liberadas na sua maior parte para o meio extracelular, onde são ativadas por mecanismos específicos e exercem suas funções principais e secundárias (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001). A ação destas enzimas concentra-se principalmente no tecido, na matriz extracelular, onde se encontram seus substratos (LOUKOPOULOS et al., 2003; MOTT; WERB, 2004). Desta forma, o encontro de uma menor concentração destas enzimas no soro dos pacientes portadores de linfoma poderia se justificar pelo fato das supracitadas enzimas estarem confinadas no tecido neoplásico exercendo suas funções auxiliares ao desenvolvimento tumoral. Outra possível explicação para os baixos níveis de atividades séricas das MMPs encontra apoio no fato de que as metaloproteinases mensuradas no soro refletem a liberação por parte de todo o organismo, e não apenas do tecido linfóide. Desta forma, os animais do grupo controle poderiam apresentar atividades elevadas das metaloproteinases em função de sua liberação fisiológica a partir de diferentes tecidos do organismo.

Um fator importante que pode justificar resultados contraditórios nas associações com fatores prognósticos das diferentes técnicas é a vasta gama de entidades distintas presente no linfoma canino, que apresenta como consequência comportamento biológico diferente (ARESU et al., 2012). Muitos são os fatores que interferem em sua evolução, dificultando com isto o estabelecimento preciso do prognóstico do paciente. Isto faz com que seja necessário maior número de animais nos estudos, possibilitando, portanto, diferentes formas de avaliação prognóstica em conjunto. Além disto, há muito a ser investigado sobre o verdadeiro papel das metaloproteinases e seus inibidores nas neoplasias hematopoiéticas.

7 CONCLUSÕES

Nas condições deste ensaio e diante dos resultados obtidos, analisados e interpretados pode-se concluir que:

- As atividades séricas e teciduais da MMP-2 aparentam não guardar relação exata com o processo linfomatoso.
- A avaliação sérica das metaloproteinases não possibilita diferenciação entre processos fisiológicos ou neoplásicos do organismo.
- A MMP-9 avaliada por técnica imuno-histoquímica revela sua participação na neoplasia linfomatosa, porém de forma incerta com relação ao prognóstico.
- A MMP-9 avaliada por eletroforese zimográfica pode contribuir com o estabelecimento do prognóstico do paciente portador de linfoma.

8 REFERÊNCIAS

ANAI, L. A. **Evolução da expressão de CD45+ e do leucograma de cães linfomatosos durante quimioterapia com o protocolo de Madison-Wisconsin.** 2011- 51f - Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

AVERY, A. C.; AVERY, P. R. Determining the significance of persistent lymphocytosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.** v. 37, n. 2, p. 267-282, 2007.

ARESU, L.; GIANTIN, M.; MORELLO, E.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; GARBISA, S.; ARICÒ, A.; BRADASCHIA, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. **BMC Veterinary Research.** v. 7, n.33, 10p, 2011.

ARESU, L.; ARICO, A.; COMAZZI, S.; GELAIN, M.E.; RIONDATO, F.; MORTARINO, M.; MORELLO, E.; STEFANELLO, D.; CASTAGNARO, M. VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma. **Veterinary and comparative oncology.** April, 8p, 2012.

BEURDEN, P. A. M. S.; HOFF, J. W. V. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques.** v. 38, p. 73-83, 2005.

CARDOSO, M. J. L. et al. Linfoma canino: revisao de cinquenta e quatro casos. **Bioscience Journal,** Uberlandia, v. 19, n. 3, p. 131-142, 2003.

CHUN. R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? **Topics in Companion Animal Medicine.**, v. 24, n. 3, p. 157-62, 2009.

COLETA, F. E. D. **Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma.** 2009.123f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. **Chem. Biol.** v. 3, p. 895–904, 1996.

COUTO, C. G. Oncologia: princípios de tratamento do câncer. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 78, p. 864-869, 2001.

COSTA, F.; PEREIRA, F.G.; VASSALO, J.; FREITAS, L.L.L.; LORAND-METZE, I. A utilidade da citologia por puncao com agulha fina aliada a imunofenotipagem no diagnostico dos linfomas nao-Hodgkin. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**. v. 27, n. 1, p. 16-20, 2005.

DALECK, C. R.; CALAZANS, S. G.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. Roca. Cap 31. p.481-506, 2008.

DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA E. P. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.

DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; AMORIM, R. L.; BANDARRA E. P. Classificação citohistológica dos linfomas caninos. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 4, n. 2, p. 53-59, 2001.

DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; MESSICK, J. B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.8, p.573-581, 2003.

DICKINSON, R. M. Canine lymphosarcoma: Overcoming diagnostic obstacles and introduction to the latest diagnostic techniques. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 49, n. 3, p. 305-308, 2008.

DOBSON, J. M.; GORMAN, N. T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response to two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 1994.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, p. 161-174, 2002.

FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, January. 2002.

FAN, T. M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p.285-294, apr. 2005.

FERRARI, F. G.; BRIGATI C. N.; BENELLI, R.; SANTI, L.; NOONAN, D. M.; ALBINI A. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. **Clin Exp Metas**. v.18, p.111–120, 2000.

FIGHERA, R. A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria : O autor, 2001. 214p. Cap.7: Anemias por insuficiência medular: p.145-158.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**. v. 117, n. 1, p. 35-59, 1997.

FRÁGUAS, M. S. **Estudo de casos de linfoma canino ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006 junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV-UNESP-Jaboticabal**. 2008. 64 f. Trabalho de iniciação científica (modalidade bacharelado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GARRETT, L. D.; THAMM, D.H.; CHUN, R.; DUDLEY, R.; VAIL, D. M. Evaluation of a 6-Month Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, n. 6, p. 704-709, 2002.

GENTILINI, F.; CALZOLARI, C.; TURBA, M. E.; AGNOLI, C.; FAVA, D.; FORNI, M.; BERGAMINI, P. F. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. **Leukemia Research**. v. 29, p. 1263–1269, 2005.

GIANTIN, M.; ARESU, L.; BENALI, S.; ARICO, A.; MORELLO, E. M.; MARTANO, M.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R-M.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mast Cell Tumours. **Journal Comparative Pathology**. v. 147, p. 419-429, 2012.

GOMES, E. G. A.; JUCÁ, M. J.; MENEZES, H. L.; NUNES, B. L. B. B. P.; COSTA, H.; LIMA, F. O.; MATOS, D. Correlation between the immunohistochemical expressions of MMP-1, MMP-7 and VEGF and prognostic factors in colorectal adenocarcinoma. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 24, n.4, p. 303-310, 2009.

GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, v.66, p.480-490, 1990.

HAYASHIBARA, T.; YAMADA, Y.; ONIMARU, Y.; TSUTSUMI, C.; NAKAYAMA, S.; MORI, N.; MIYANISHI, T.; KAMIHIRA, S.; TOMONAGA, M.; MAITA, T. Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor: a possible link in adult T-cell leukaemia cell invasion. **British Journal of Haematology**. v. 116, p. 94-102, 2002.

HAZAR, B.; POLAT, G.; SEYREK, E.; BAGDATOGLU, O.; KANIK, A.; TIFTIK, N. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. **Int J Clin Pract**, v. 58, n. 2, p. 139–143, 2004.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 93, n. 3, p. 178-193, 2001.

HIRATSUKA, S.; NAKAMURA, K.; IWAI, S.; MURAKAMI, M.; ITOH, T.; KIJIMA, H.; SHIPLEY, J.M.; SENIOR, R.M.; SHIBUYA, M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer Cell**. v. 2, p. 289-300, 2002.

JAGIELSKI, D.; LECHOWSKI, R.; HOFFMANN-JAGIELSKA, R.; WINIARCZYK, S. A Retrospective Study of the Incidence and Prognostic Factors of Multicentric Lymphoma in Dogs (1998–2000). **J.Vet. Med.** v. 49, p. 419–424, Berlin, 2002.

JOBIM, F. C.; SCHWARTSMANN, G. S.; XAVIER, N. L.; UCHOA, D. M.; SACILOTO, M.; CHEMELLO, N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 30, n. 6, p. 287-293, 2008.

JOHN, A., TUSZYNSKI, G. The Role of Matrix Metalloproteinases in Tumor Angiogenesis and Tumor Metastasis. **Pathology oncology research.** v. 7, n.1, p. 14-23, 2001.

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

KOSSAKOWSKA, A. E., URBANSKI, S. J., JANOWSKA-WIECZOREK, A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors – expression, role and regulation in human malign non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma.** v. 39, n 5–6, p. 485–93, 2000.

KUITTINEN, O. **Matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) and -9 (mmp-9) in hematological malignancies.** 2003 – 82f – Dissertação - Faculty of Medicine, University of Oulu, Finland, 2003.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena.** Sao Paulo: Roca, 191p, 2004.

LEIFER, C. E.; MATUS, R. E. Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-1984). **Journal of American Veterinary Medical Association,** Schaumburg, v.189, n.2, p.214-217, 1986.

LENNERT, K.; FELLER, A. C. **Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas,** 2ed. Berlim: Springer-Verlag, 312p, 1992.

LIU, A.; HU, H. I.; LIU, S.; HU, Y. The expressions of CD147 and MMP-9 in non-Hodgkin's lymphoma cells and the relation to prognosis. **Chinese-German Journal of Clinical Oncology**. v. 8, n. 12, p. 705-708, 2009.

LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B. A.; STRAW, R. C.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Involvement in Canine Tumors. **Veterinary Pathology**. Australia. v. 40, p. 382-394, 2003.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**. v. 13, p. 534–540, 2001.

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M; VAIL, D. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3. ed Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 558-590, 2001.

MOELLER, T. M.; MABEN K.; GOLDSCHMIDT, H. Angiogenesis in hematologic malignancies. **Ann Hematol**. v. 80, p. 695–705, 2001.

MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no periodo de 1990-2004 na regioao norte do Parana. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, Sao Paulo, v. 44, p. 46-52, 2007.

MORRISON, W. B. Commonly used protocols: Canine lymphoproliferative neoplasms: Doxorubicin. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer Chemotherapy - A Veterinary Handbook**. Malvern: Williams & Wilkins. p. 156, 1998.

MORRISON, W. B. **Lymphoma in dogs and cats**. Texas: Teton New Media, 2005.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 16, p. 558–564, 2004.

MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**, 3.ed. California: University of California. p.240-244, 1990.

NABESHIMA, K.; SUZUMIYA, J.; NAGANO, M.; OHSHIMA, K.; TOOLE, B.P.; TAMURA, K.; IWASAKI, H.; KIKUCHI, M. Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas. **Journal of Pathology**. v. 202, p. 341–351, 2004.

NAKAICHI, M.; YUNUKI, T.; OKUDA, M.; UNE, S.; TAURA, Y. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. **Research in Veterinary Science**. v. 82, p. 271–279, 2007.

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

NEWMAN, R. G.; KITCHELL, B. E.; WALLIG, M. A.; PARIA, B. The cloning and expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 in normal canine lymph nodes and in canine lymphoma. **Research in Veterinary Science**. v. 84, p. 206–214, 2008

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

OWEN, L. **TNM classification of tumors in domestic animals**. World Health Organization, p.46-47, 1980.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature reviews**. v. 4, p. 617-629, 2004.

PARODI, A. L. Classification of Malignant Lymphoma in Domestic Animals: History and Conceptual Evolution. **European Journal of Veterinary Patholog**.,v. 7,n. 2, 2001.

PAVELIC, S. K.; SEDIC, M.; BOSNJAK, H.; SPAVENTI, S.; PAVELIC, K. Metastasis: new perspectives on an old problem. **Molecular Cancer**. v. 10, n. 22, 2011.

PENNANEN, H.; KUITTINEN, O.; SOINI, Y.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Prognostic significance of p53 and matrix metalloproteinase-9 expression in follicular lymphoma. **European Journal of Haematology**. v. 81, p. 289–297, 2008.

PENNANEN, H.; KUITTINEN, O.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Plasma MMP-2-TIMP-2 complex levels measured during follow-up predict a risk of relapse in patients with malignant lymphoma. **European Journal of Haematology**. v. 80, p. 46-54, 2007.

PONCE, F.; MAGNOL, J.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**. v. 167, p. 158–166, 2004

RASKIN, R. E.; KRENBIEL, J. D. Prevalence of leukaemia blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.194, n.10, p.1427-1429, 1989.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003.

RIBEIRO, R. I. M. A.; BORGES JÚNIOR, P. C.; CARDOSO, S. V.; CANDELORI, I.; ESPÍNDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteinasas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **J Bras Patol Med Lab**. v. 44, n. 2, p. 115-121, 2008.

ROOMI, M. W.; MONTERREY, J. C.; KALINOVSKY, T.; RATH, M.; NIEDZWIECKI, A. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. **Oncology reports**. v. 21, p. 1323-1333, 2009.

SANTANA, A. E.; SEKI, M. C.; GAMA, F. G. V.; SOBREIRA, M. F. R.; NAKAGE, A. P. Citologia Aspirativa com agulha fina aplicada ao estudo das neoplasias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1. ed, São Paulo: Roca, 2008. Cap, 4, p. 76-91.

SAKATA, K.; SOMEYA, M.; OMATSU, M.; ASANUMA, H. The enhanced expression of the matrix metalloproteinase 9 in nasal NK/T-cell lymphoma. **Biomedcentral Cancer**. v.7, n.229, 8 p., 2007.

SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P. et al. Características anatômicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.51, n.3, p.1-11, 1999.

SHEU, B.; HSU, S.; HO, H.; LIEN, H.; HUANG, S.; LIN, R. A Novel Role of Metalloproteinase in Cancer-mediated Immunosuppression. **Cancer research**. v. 61, p. 237-242, 2001.

STARRAK, G. S.; BEARY, C. B.; PAGE, R. L.; JOHNSON, J. L.; THRALL, D. E. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v.38, n.6, p.411-418, 1997.

STERNLICHT, M. D., WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Reviews**. v. 17, p. 463-516, 2001.

TASCA, S., CARLI, E., CALDIN, M., MENEGAZZO, L., FURLANELLO, T., GALLEGO, L. S. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 201 cases (2002-2006). **Veterinary Clinical Pathology**. v. 38, n. 1, p. 2-12, 2009.

TESKE, E.; HEERDE P. V.; RUTTERMAN, G. R.; KURZMAN I. D.; MOORE, P. F.; MACEWEN E. G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994.

THEMSCHE, C. V.; ALAIN, T.; KOSSAKOWSKA, A. E.; URBANSKI S.; POTWOROWSKI, E. F.; ST-PIERRE, Y. Stromelysin-2 (Matrix Metalloproteinase 10) Is Inducible in Lymphoma Cells and Accelerates the Growth of Lymphoid Tumors In Vivo. **The Journal of Immunology**. v.173, p.3605–3611, 2004.

TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. **Biochimie**. v. 87, p. 287–97, 2005.

VAIL, D. M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 91, p. 620-625, 2000.

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small animal clinical oncology**. 4 ed. Saunders. cap. 31, p.699-722, 2007.

VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfoides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. Sao Paulo: Roca. cap. 6, p. 218-225, 1998.

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

VALLI, V. E.; SAN MYINT, M.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZKY, F.; DURHAM, A.; EHRHART, E. J.; JOHNSON, Y.; JONES, C.; KIUPEL, M.; LABELLE, P.; LESTER, S.; MILLER, M.; MOORE, P.; MOROFF, S.; ROCCABIANCA, P.; RAMOS-VARA, J.; ROSS, A.; SCASE, T.; TVEDTEN, H.; VERNAU, W. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. **Veterinary Pathology**. v. 48, p. 198-211, 2011.

VASKU, A.; VASKU, J. B.; NECAS, M.; VASKU, V. MatrixMetalloproteinase-2 Promoter Genotype as a Marker of Cutaneous T-Cell Lymphoma Early Stage. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 5 p., may, 2010.

WOLFESBERGER, B.; TONAR, Z.; FUCHS-BAUMGARTINGER, A.; WALTER, I.; SKALICKY, M.; WITTER, K.; THALHAMMER, J. G.; PAGITZ, M.; KLEITER, M. Angiogenic markers in canine lymphoma tissues do not predict survival times in chemotherapy treated dogs. **Research in Veterinary Science**. v. 92, p. 444-450, 2012.