

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA DO LINFOMA CUTÂNEO CANINO À LOMUSTINA –
ACHADOS CLÍNICOS, IMUNOHISTOQUÍMICOS E EXPRESSÃO
DO MDR-1**

AMANDA RESENDE DUARTE

BOTUCATU - SP

Dezembro 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA DO LINFOMA CUTÂNEO CANINO À LOMUSTINA –
ACHADOS CLÍNICOS, IMUNOHISTOQUÍMICOS E EXPRESSÃO
DO MDR-1**

AMANDA RESENDE DUARTE

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Ass. Luiz Henrique de Araújo Machado.

Botucatu - SP

Dezembro 2013

Nome do Autor: Amanda Resende Duarte

Título: **RESPOSTA DO LINFOMA CUTÂNEO CANINO À LOMUSTINA –
ACHADOS CLÍNICOS, IMUNOHISTOQUÍMICOS E EXPRESSÃO DO MDR-1**

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Ass. Luiz Henrique de Araújo Machado

Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP -Botucatu

Prof^a. Ass. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Adj. Mauro José Lahm Cardoso

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

UENP - Bandeirantes

Data da defesa: 11 de Dezembro de 2013

*Dedico essa dissertação aos meus pais, **Fátima e Nilson**, que com muito amor e carinho, fazem de mim, uma pessoa melhor. Meus melhores amigos, sempre me apoiando em todos os momentos da minha vida. Amo vocês!*

*Dedico também à minha querida professora **Suely Beloni**, por todos os ensinamentos, amizade e por ter acreditado e incentivado a realização desta obra. Saudades.*

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, pelo amor incondicional, pela proteção diária, por me dar força em todos os momentos da minha vida e por iluminar sempre meus caminhos.

À minha **Família** (Fátima, Nilson, Estevão, Jackellyne, Ana Clara, João Guilherme e coragem), pelo apoio incondicional, amor e união. Sou muito abençoada em tê-los na minha vida.

Agradeço ao meu orientador, **Luiz Henrique**, por confiar em mim, pela paciência nos momentos que precisei, pelos ensinamentos, orientação e principalmente pela amizade. Obrigada!

Aos **amigos** que conquistei, que foram minha família em Botucatu. Por todo carinho, companheirismo, boas risadas e amizade: Guadalupe Sereno, Carla Regina Barbieri, Luciana Carandina, Fernanda Chicharo, Denis Carvalho, Mariana Zorzella, Ana Rita Pereira e Natalie Merlini.

Obrigada a todos os **professores da Universidade Estadual de Londrina**, pela minha formação, em especial: Lucas Alécio, Kleber Moreno, Suely Beloni e Marcelo Zanutto, por todos os ensinamentos, conselhos, ajuda e amizade durante a graduação e a residência.

Muito obrigada a todos os **residentes e estagiários** da Clínica Médica de Pequenos Animais FMVZ-UNESP Botucatu, pelo auxílio na colheita de dados e acompanhamento dos animais, sendo de fundamental importância para a realização dessa dissertação.

Agradeço à Prof.^a **Maria Lucia Gomes de Lourenço**, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Agradeço aos professores **José Paes de Oliveira Filho e Alexandre Secorun Borges**, pela grande colaboração na realização das técnicas de biologia molecular e pela paciência em ensiná-las.

Muito obrigada ao pós graduando **Carlos Eduardo Fonseca** e à **Profa. Renée Laufer Amorim** pelo auxílio fundamental na realização e interpretação dos dados imunohistoquímicos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

Agradeço à **FAPESP** pelo apoio fornecido em forma de auxílio.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Mediana dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários de 15 cães com linfoma cutâneo ao longo do tratamento com lomustina.....	34
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Resultados referentes à análise imunohistoquímica para CD3, CD79, Ki-67 e Caspase 3 nas 15 amostras de linfoma cutâneo canino.....	52
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Lesão “figurada” com bordos elevados e eritema em um cão com Linfoma Cutâneo Epiteliotrópico. (Fonte: Setor de Dermatologia, FMVZ, UNESP-Botucatu, 2007).....7

FIGURA 2. Lesões nodulares em cavidade oral (lábio superior) em um cão com Linfoma Cutâneo. (Fonte: Setor de Dermatologia, FMVZ, UNESP-Botucatu, 2012).....8

FIGURA 3. Modelo de Higgins demonstrando o mecanismo de efluxo de substâncias promovida pela P-gp. (Fonte: HUBER *et al.*, 2010).....16

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Pele. Linfoma Cutâneo. Fotomicrografia de preparação imunohistoquímica mostrando imunorreatividade para CD3. (Fonte: Setor de Patologia, FMVZ, UNESP-Botucatu).....50

FIGURA 2. Pele. Linfoma Cutâneo. Fotomicrografia de preparação imunohistoquímica mostrando intensa imunorreatividade (> 75%) para KI-67. (Fonte: Setor de Patologia, FMVZ, UNESP-Botucatu).....50

FIGURA 3. Pele. Linfoma Cutâneo. Fotomicrografia de preparação imunohistoquímica mostrando pouca marcação celular (<25%) para atividade de caspase 3. (Fonte: Setor de Patologia, FMVZ, UNESP-Botucatu).....51

FIGURA 4. Expressão relativa do mRNA do MDR1 utilizando a qRT-PCR em 14 amostras de linfoma canino.....51

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO III

GRÁFICO 1 . Sobrevida em função da expressão genica de MDR-1.....	52
--	----

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
C°	graus Celsius
<	menor
>	maior
ALT	alanina aminotransferase
ATP	adenosina tri-fosfato
BCL-2	B – cell lymphoma/leukemia 2
BCL-W	proteína homóloga a Bcl-2
BCL-XI	proteína x homóloga a Bcl-2
CCNU	1-(2-chloroethyl) -3-cyclohexyl-1-nitrosourea
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
DISC	complexo de sinalização indutor de morte
DNA	ácido desoxirribonucléico
FA	fosfatase alcalina
FAS	receptor de superfície celular
FASL	proteína FAS ligante
GGT	gama glutamil transferase
g/dl	grama por decilitro
kDa	quilodáton
Kg	quilograma
Ki-67	Kiel 67
LC	Linfoma Cutâneo
LCE	Linfoma Cutâneo Epiteliotrópico
LCNE	Linfoma Cutâneo Não Epiteliotrópico
MDR	resistência a múltiplas drogas

MDR-1	gene de resistência a múltiplas drogas
MIB-1	antígeno Ki-67
MF	micose fungóide
mg	miligrama
ml	mililitro
μl	microlitro
μg	micrograma
ng	nanograma
PCNA	antígeno nuclear de proliferação
PCR	reação de polimerização em cadeia
P-gp	glicoproteína P
pb	pares de base
p53	gene p53
qRT –PCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RP	remissão parcial
RT	remissão total
SR	sem remissão
SRD	sem raça definida
SS	síndrome de sézary
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR	receptor de fator de necrose tumoral
U/L	unidade por litro

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	2
<u>CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA</u>	3
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	4
<u>2 - REVISÃO DE LITERATURA</u>	5
2.1- LINFOMA CUTÂNEO CANINO	5
2.2 - PROLIFERAÇÃO CELULAR, APOPTOSE E O CÂNCER	10
2.3 - MDR-1/P-gp E A RESISTÊNCIA TUMORAL	14
<u>3 - OBJETIVOS</u>	19
<u>CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO 1</u>	
<u>AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE CÃES COM LINFOMA CUTÂNEO</u> <u>TRATADOS COM LOMUSTINA</u>	21
<u>CAPÍTULO III - ARTIGO CIENTÍFICO 2</u>	
<u>RESPOSTA DO LINFOMA CUTÂNEO À QUIMIOTERAPIA COM LOMUSTINA -</u> <u>ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS E EXPRESSÃO DO MDR-1</u>	36
<u>DISCUSSÃO GERAL</u>	54
<u>CONCLUSÕES FINAIS</u>	58
<u>REFERÊNCIAS</u>	60
<u>NORMAS DAS REVISTAS</u>	70

DUARTE, A.R. Resposta do linfoma cutâneo à lomustina – Achados clínicos, imunohistoquímicos e expressão do MDR-1. Botucatu, 2013, 70p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O linfoma cutâneo canino é uma dermatopatia neoplásica incomum em cães, que apresenta baixa expectativa de vida, pouca responsividade à quimioterapia e prognóstico ruim. O objetivo deste estudo foi a avaliação clínica e laboratorial de cães com linfoma cutâneo mediante ao tratamento com lomustina, estabelecer o imunofenótipo, grau de proliferação celular e apoptose do linfoma cutâneo; determinar o nível de expressão gênica do MDR-1 e avaliar a correlação de todas as variáveis com os índices de resposta terapêutica e sobrevivência. Foram avaliados 15 cães com diagnóstico histopatológico de linfoma cutâneo. Todos foram tratados com lomustina na dose de 90 mg/m² a cada 21 dias. A taxa de resposta clínica à quimioterapia foi de 53,3 %, oito dos quinze animais apresentaram remissão parcial e sete cães (46,6%) não responderam ao tratamento testado. O tempo médio de sobrevivência nos animais tratados foi considerado baixo, 59,3 dias. As principais alterações hematológicas e bioquímicas encontradas durante a terapia foram: leucopenia (73,3%) trombocitopenia (60%) e anemia (46,1%). Toxicidade renal e hepática foi vista em 40% e 73,3% dos animais respectivamente. Em 93,3 % das amostras observou-se alto índice de proliferação celular e em 100% baixo índice apoptótico. Cerca de 93,3 % dos animais expressaram o gene MDR-1 nas células tumorais no momento do diagnóstico, com diferentes níveis de expressão. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com lomustina deve ser extensivamente monitorado, devido a sua baixa eficácia e comprovada ação deletéria em cães. A avaliação imunohistoquímica e da expressão gênica confirmaram o comportamento biológico agressivo e a baixa expectativa de vida, no entanto, não houve correlação entre as variáveis avaliadas e a sobrevivência dos animais.

Palavras – chave: Cão, CCNU, Linfoma Cutâneo, Proliferação Celular, Apoptose e MDR-1.

DUARTE, A.R. Response of cutaneous lymphoma to lomustine - clinical findings, immunohistochemical and MDR-1 expression. Botucatu, 2013. 73p. Master's Dissertation in Veterinary Medicine – School of Veterinary Medicine and Animal Science. São Paulo State University, Botucatu.

ABSTRACT

The cutaneous lymphoma is an uncommon neoplastic skin disease in dogs, with decreased survival length, poor response to chemotherapy and poor prognosis. This study aimed to: 1) evaluate clinical and laboratory animals treated with lomustine; 2) establish the immunophenotype and the degree of cell proliferation and apoptosis in cutaneous lymphoma; 3) determine the level of gene expression of MDR – 1; 4) Correlate those variables to the rates of clinical response to therapy and survival. Fifteen dogs with histopathological diagnosis of cutaneous lymphoma were evaluated and treated with lomustine at a dose of 90 mg/m² every 21 days. After chemotherapy, 53.3 % (8/15) of the animals showed partial remission and 7 dogs (46.6 %) did not respond to the treatment. The average survival time was considered short (59.3 days). The major hematological and biochemical changes observed during therapy were anemia (46.1%), leukopenia (73.3%) and thrombocytopenia (60 %). Kidney and liver toxicity was observed in 40% and 73.3 % of animals, respectively. Most of the samples (93.3 %) presented elevated rates of cell proliferation and 100% presented low apoptotic index. The majority of the animals (93.3 %) expressed MDR-1 gene in tumor cells at the moment of diagnosis, with levels of expression varying considerably. The results obtained in this work suggest that treatment with lomustine should be monitored, as its deleterious effects were demonstrated in dogs. The immunohistochemical evaluation and the gene expression confirm the aggressive biological behavior and low life expectancy, although there was no correlation between the assessed variables and the animals' survival length.

Keywords: Dog, CCNU, Cutaneous Lymphoma, Celular Proliferation, Apoptosis and MDR-1.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A prevalência das neoplasias em pequenos animais vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, devido ao aumento da expectativa de vida e maior atenção a saúde dos animais de estimação. O câncer constitui uma das principais causas de óbito em cães e gatos (MICHELL, 1999; BENTUBO *et al.*, 2007). O linfoma é uma das neoplasias mais frequentes na espécie canina, representando cerca de sete a 24% de todas as neoplasias caninas e 83% de todos os tumores de origem hematopoiética (TESKE *et al.*, 1994; MILNER *et al.*, 1996; VONDEHAAR & MORRISON, 1998). Este tumor geralmente surge de órgãos linfóides, tais como linfonodos, baço e medula óssea, porém pode ocorrer em qualquer tecido do corpo (WITHROW, 2007).

A pele é considerada o local mais comum para o surgimento de tumores em cães, representando em termos de localização, aproximadamente um terço de todas as neoplasias encontradas nessa espécie, sendo que 20 a 40% desses tumores são malignos (WITHROW, 2007).

O Linfoma Cutâneo (LC) é considerado uma forma rara do linfoma canino, representando somente 1% das neoplasias cutâneas em cães (FONTAINE *et al.*, 2009). Pode ser classificado com epiteliotrópico, em que possui tropismo pela epiderme ou não epiteliotrópico, que se localiza somente na derme. De etiologia idiopática, caracteriza-se pela presença de células linfóides neoplásicas (linfócitos T ou B) na epiderme, derme ou tecidos anexos (FONTAINE *et al.*, 2009).

Apesar da apresentação incomum, essa neoplasia, quando presente, possui comportamento biológico agressivo e prognóstico ruim, com expectativa de vida de meses há dois anos. Diversas modalidades de tratamento como cirurgia, radioterapia e quimioterapia já foram utilizadas, sendo a última a mais promissora.

O uso de agentes quimioterápicos constitui um dos tratamentos eletivos contra o câncer. Contudo muitas neoplasias, inicialmente responsivas, tornam-se resistentes após o primeiro ciclo de quimioterapia. A resistência tumoral é um problema comum em pacientes com câncer e é a principal causa

de falha terapêutica nas doenças oncológicas (GINN, 1996). Muitos agentes quimioterápicos são capazes de induzir rápida remissão em determinados tipos de tumor, como no caso do linfoma canino, no entanto a possibilidade de tratar esses pacientes com eficácia na recidiva pode ser bastante desafiadora e frustrante (BERGMAN, 2003).

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos possuem a propriedade de proliferação além dos limites impostos às células normais. A expansão de uma célula transformada depende do descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de entrar em apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resistência representam diversas formas de proteção da célula e do organismo e estão presentes na maioria das células normais. Infelizmente, muitos tumores utilizam esses mecanismos para a sua própria proteção (BERGMAN, 2003). Dentre todos os mecanismos de resistência tumoral, o gene de resistência a múltiplas drogas, denominado MDR-1, que codifica uma proteína transmembrana de alto peso molecular, a Glicoproteína P (P-gp) é o principal responsável pelo fenômeno MDR e o mais estudado até o momento em Medicina, tanto humana quanto veterinária (BATES, 1999).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- LINFOMA CUTÂNEO CANINO

O linfoma cutâneo (LC) é considerado uma neoplasia incomum em cães, representando apenas 3 - 8 % de todos os tipos de linfoma nesta espécie. Se compararmos com todos os tumores de pele em cães, representa somente 1% (FONTAINE *et al.*, 2009). Caracteriza-se pela infiltração de linfócitos T ou B, na derme, epiderme ou tecidos anexos.

Sua etiologia é desconhecida (FONTAINE *et al.*, 2009), entretanto diversas teorias foram propostas, como a associação com compostos químicos em regiões industriais que poderiam levar a estimulação antigênica crônica dos linfócitos presentes na pele desses animais (MOORE AND OLIVRY, 1994). A possibilidade de uma origem viral já foi descrita em felinos e humanos, no

entanto em cães, não foi possível realizar tal associação (FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002). Um possível fator de risco discutido na Medicina é a inflamação crônica da pele. A ativação e proliferação crônica de linfócitos pode ser estimulada pelo contato com antígenos do ambiente e/ou anormalidades na função das células de Langherans e sugere-se que a proliferação desses linfócitos ativados pode ser a origem do linfoma cutâneo (FONTAINE *et al.*, 2009). SANTORO *et al.*, (2007) sugeriu associação entre o linfoma cutâneo e a dermatite atópica em cães, baseado em estudo retrospectivo que concluiu que existe 12 vezes mais chance de um animal atópico desenvolver linfoma cutâneo do que um animal hígido.

A forma clínica do LC é bastante pleomórfica e pode mimetizar diversas dermatopatias (FONTAINE *et al.*, 2009). Representa um grupo heterogêneo de apresentações clínicas que podem ser classificadas histologicamente em linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE) e não epiteliotrópico (LCNE).

O linfoma cutâneo epiteliotrópico é considerado a forma mais comum do LC em cães (RIBSON *et al.*, 2006). É caracterizado pelo tropismo de linfócitos T ou B neoplásicos pela epiderme e anexos cutâneos. Muitos aspectos do linfoma cutâneo humano e canino são semelhantes, devido a esse fato a classificação usada na Medicina foi adaptada para a Medicina Veterinária. Assim, o LCE ainda pode ser subdividido em Micose Fungóide (MF) e Síndrome de Sézary (SS).

A Micose fungóide é o tipo mais comum de linfoma cutâneo epiteliotrópico. Sua definição é baseada em aspectos clínicos, citohistológicos e fenotípicos como epiteliotropismo, imunofenótipo de linfócitos T, eritema cutâneo, placas e nódulos e núcleos hiperconvolutos com aspecto cerebriforme (FOURNEL-FLEURY, 2002).

A Síndrome de Sézary é extremamente rara em cães. Caracteriza-se pela associação dos sinais clínicos cutâneos com envolvimento de outros órgãos como o baço, linfonodos e medula óssea, além da presença de linfócitos neoplásicos na corrente sanguínea. Essa apresentação clínica está relacionada com prognóstico desfavorável (RIBSON *et al.*, 2006).

O Linfoma cutâneo não epiteliotrópico (LCNE) é descrito com menos frequência que o LCE (MOORE AND OLIVRY, 1994; FONTAINE *et al.*, 2009). Histologicamente caracteriza-se por infiltração dérmica e subcutânea difusa. Lesões nodulares, firmes, não pruriginosas e ulceradas são comuns, com progressão rápida, resposta à terapia incipiente e menor taxa de sobrevivência (MOORE AND OLIVRY, 1994).

No cão, a classificação do LC apenas com base nos sinais cutâneos é difícil, pois esses são inespecíficos. As principais apresentações clínicas são: eritroderma esfoliativo, placas e nódulos, doença ulcerativa na mucosa oral e a forma mucocutânea (FONTAINE *et al.*, 2009). O eritroderma esfoliativo é caracterizado por eritema local ou generalizado, associado a prurido e acomete mais frequentemente tronco e cabeça. Placas e nódulos são as formas mais descritas em cães, possivelmente porque a fase de eritema não é facilmente reconhecida pelos proprietários. Pode estar associada a alopecia local, crostas e ulceração. Inicialmente apresentam-se como lesões pequenas e únicas, que aumentam gradualmente e se coalescem podendo formar lesões “figuradas”, arciformes ou serpiginosas (Fig.1). Necrose pode ser observada no centro da lesão em alguns casos. As formas oral e mucocutânea são comuns em cães, sendo os lábios, gengiva, espelho nasal e pálpebras as regiões mais afetadas (Fig. 2) (FONTAINE *et al.*, 2009).

Figura 1. Lesão “figurada” com bordos elevados e eritema em cão. Linfoma Cutâneo Epiteliotrópico. (Fonte: Setor de Dermatologia, FMVZ, UNESP-Botucatu, 2007).



Figura 2. Lesões nodulares em cavidade oral (lábio superior) em cão. Linfoma Cutâneo. (Fonte: Setor de Dermatologia, FMVZ, UNESP-Botucatu, 2012)



O diagnóstico definitivo do LCC é sempre realizado pela análise histopatológica, uma vez que o exame citológico não fornece dados sobre o epiteliotropismo e pode não ser conclusivo. A citologia por agulha fina ou *imprint* de uma lesão pode revelar a presença de “células redondas”, sugerindo tumor hematopoiético, no entanto pode não se observar linfócitos atípicos, o que dificulta a diferenciação de uma expansão clonal (FONTAINE *et al.* 2009).

A classificação imunomorfológica do linfoma cutâneo tem por base descobrir a origem das células tumorais (células B ou T). Essa classificação pode ser feita através de técnicas de imunohistoquímica, utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais, que demonstram a presença de antígenos marcadores de tipo celular (MILNER *et al.*, 1996). Para linfócitos T, utilizam-se os marcadores CD3, CD4 e CD8, e para linfócitos B os marcadores são CD79, CD20 e CD21. A determinação do imunofenótipo em neoplasias malignas tem se tornado um passo importante na classificação tumoral, devido a sua relação direta com o comportamento biológico e resposta à terapia (FOURNELL-FLEURY *et al.*, 2002). A partir da identificação fenotípica foi possível constatar que cães com linfoma de células T respondem menos a quimioterapia,

apresentam períodos de remissão mais curtos e expectativas de vida menor que cães com linfoma de células B.

Diversos protocolos terapêuticos foram propostos para o tratamento do linfoma cutâneo em cães. A remoção cirúrgica de nódulos únicos apenas é recomendada quando a possibilidade de lesões adicionais e de disseminação sistêmica da doença for descartada através do estadiamento clínico (LORIMIER, 2006). O linfoma sempre deve ser considerado uma doença potencialmente sistêmica, por isso recomenda-se que remoções cirúrgicas sejam acompanhadas de quimioterapia adjuvante (LORIMIER, 2006).

Terapia tópica com corticosteróides é bastante utilizada em estágios iniciais de linfoma cutâneo na Medicina (KNOBLER, 2004). Na Medicina Veterinária existem poucos relatos do seu uso para este fim, mas acredita-se que o uso de xampus, loções ou sprays com corticóide possam melhorar os sinais como inchaço, dor, e prurido, porém sem induzir remissão clínica (LORIMIER, 2006).

Como o linfoma cutâneo na maioria dos casos é diagnosticado em estágios avançados da doença, com lesões multifocais ou disseminação para outros órgãos, a quimioterapia sistêmica é a terapia mais recomendada e utilizada na literatura veterinária (LOREMIER, 2006).

Diversas abordagens terapêuticas sistêmicas têm sido descritas, mas ainda não foi possível estabelecer nenhuma terapia padrão para o tratamento do LCC. As taxas de resposta relatadas pelo uso de retinóides, ciclosporina, ácidos graxos, L-asparaginase e dacarbazine são inferiores a 50% e de curta duração (RISBON *et al.*, 2006).

Como linfócitos normais e neoplásicos são sensíveis à corticoterapia sistêmica resultando em apoptose, o uso desse fármaco para o tratamento do linfoma é bastante descrito, resultando em melhora clínica inicial (LOREMIER, 2006). Porém seu uso como monoterapia também está associado a períodos de remissão curtos, recidivas precoces e resistência tumoral.

A utilização da lomustina (CCNU), um agente alquilante da família das nitrosureias, como monoterapia no tratamento do LC canino tem sido bastante

estudada, tanto no tratamento inicial, quanto na recidiva. WILLIANS *et al.*, (2006) e RIBSON *et al.*, (2006) relataram respostas terapêuticas superiores a 70% com o uso do CCNU no tratamento do linfoma cutâneo em cães. Bons resultados, associados a um custo relativamente baixo, fácil administração e toxicidade previsível fazem da lomustina uma opção terapêutica bastante promissora.

Estudos que utilizaram tratamento quimioterápico com lomustina, associada ou não a outras drogas, em cães com linfoma, verificaram que a principal alteração laboratorial causada pela utilização da mesma foi neutropenia (FLORY *et al.*, 2008; SABA *et al.*, 2009; HEADING *et al.*, 2011). A neutropenia é um achado laboratorial relativamente comum nos tratamentos quimioterápicos em animais de companhia (THAMM e VAIL, 2007), podendo levar ao quadro de sepse. Outros achados hematológicos como trombocitopenia e anemia também foram observados (FLORY *et al.*, 2008; SABA *et al.*, 2009; HEADING *et al.*, 2011). Diversos estudos comprovam sua hepatotoxicidade através da elevação de enzimas hepáticas, principalmente a ALT e hipoalbuminemia (KRISTAL *et al.*, 2004; HOSOYA *et al.*, 2009). Na maioria dos casos, essa elevação é reversível com a diminuição da dosagem ou a interrupção do tratamento, resultando em uma baixa prevalência de hepatotoxicidade clínica (HOSOYA *et al.*, 2009).

O linfoma cutâneo canino é considerado uma doença de prognóstico ruim, pouco resposta à terapia, além da recidiva precoce. Esse comportamento biológico agressivo pode estar associado a características existentes nas células tumorais que dificultam ou impedem a ação do fármaco, tornando-as resistentes e diminuindo a resposta terapêutica e consequentemente a sobrevida (HUBER *et al.*, 2010).

2.2 - PROLIFERAÇÃO CELULAR, APOPTOSE E O CÂNCER

O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais, a duração do ciclo celular, a porcentagem das células em proliferação e o número de células perdidas (FRANKS, 1990). A detecção e quantificação das

células em proliferação constituem parâmetros importantes no prognóstico de diferentes tumores, uma vez que a capacidade proliferativa tem sido considerada como um importante parâmetro de identificação de neoplasias e associada ao grau de malignidade (BACCHI e GOWN, 1993; RABENHORST *et al.*, 1993).

Utilizando-se a imunohistoquímica é possível determinar a taxa de proliferação celular através de anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos de antígenos expressados por células em proliferação. A identificação de algumas proteínas presentes somente em células em proliferação trouxe novas perspectivas nos estudos da proliferação celular, com o uso de métodos *in situ*, onde a grande vantagem é que a atividade proliferativa pode ser mensurada sem a perda da integridade tecidual, o que possibilita a análise histológica simultânea e a diferenciação entre as células tumorais e não tumorais (BACCHI e GOWN, 1993).

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e o Ki67 são antígenos largamente utilizados para avaliar o potencial proliferativo celular. O Ki67 é uma proteína nuclear não histona ligada à replicação, expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 (repouso). O anticorpo monoclonal de camundongo (denominado clone MIB-1) contra o antígeno Ki-67 tem sido aplicado como um marcador de proliferação celular útil em muitas neoplasias no homem e nos animais. A avaliação da fração do crescimento pelo índice proliferativo do Ki-67 é altamente preditivo no comportamento de várias neoplasias em humanos (BACCHI e GOWN, 1993; ABADIE *et al.*, 1999).

A utilização do Ki-67 no painel imunohistoquímico de várias neoplasias tem aumentado, uma vez que estes marcadores de expressão de proliferação celular auxiliam na seleção de tumores mais agressivos com índice proliferativo elevado, permitindo, desta forma, a aplicação de uma terapia mais apropriada ao comportamento biológico da célula maligna.

Um trabalho, realizado em cães com linfoma, correlacionou uma alta expressão de MIB-1 com um período de remissão mais longo após a quimioterapia. Esse resultado sugeriu que células tumorais com alta taxa de proliferação são mais sensíveis ao primeiro ciclo de tratamento quimioterápico

(PHILLIPS, 2000). FOURNELL–FLEURY *et al.*, 1997 também analisaram cães com linfoma e encontraram correlação entre o MIB-1 com o grau histológico. Baixas taxas de MIB-1 foram relacionadas com tumores de baixo grau e altas taxas de MIB-1 se relacionaram com tumores de alto grau de malignidade.

A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular graças ao equilíbrio entre proliferação e morte das células. A morte celular é uma estratégia essencial para o controle do equilíbrio dinâmico do organismo, e duas formas distintas de morte celular, apoptose e necrose, foram definidas. A necrose é um processo acidental passivo, resultando na ruptura precoce da membrana celular e no colapso das estruturas celulares em resposta a insultos ambientais, tais como hipoxia/isquemia, mudanças extremas de temperatura e trauma mecânico (VERMEULEN *et al.*, 2005). A apoptose é caracterizada pela autodestruição programada, que ocorre em estados de doença, bem como parte da renovação celular fisiológica normal. É um mecanismo de defesa, que é ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou quando o DNA for lesado (WITHROW, 2007).

Todos os sinais típicos de apoptose são os resultados finais de uma complexa cascata de eventos bioquímicos. A sinalização para morte celular desencadeia a ativação das caspases, proteases que pertencem à família das cisteínas, capazes de clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Uma vez ativada, as caspases clivam e então ativam outras procaspases, resultando em uma cascata de amplificação proteolítica (LUCINDA, 2009). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (DENAULT *et al.*, 2002). São conhecidas 14 caspases, sendo que 6 (caspases 3,6,7,8,9 e 10) participam da apoptose. As caspases podem ser classificadas de acordo com o seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras, que estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica e caspases efetoras, responsáveis pela clivagem de substratos (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A caspase-3, uma caspase efetora, é a mais estudada. Esta enzima relaciona-se com a apoptose em muitos distúrbios hemato-linfoproliferativos no homem. Investigações sugerem que tanto o nível da expressão da caspase-3

como a sua forma de marcação intracitoplasmática tem relação com a progressão tumoral. Neoplasias altamente agressivas possuem uma expressão citoplasmática menor de caspase-3 que as de grau baixo. A localização da imunomarcação é mais importante que a imunopositividade, e tem sido relacionada ao prognóstico (DONOGHUE *et al.*, 1999). A inibição da atividade das caspases, por mutação ou mesmo por ação farmacológica, pode retardar ou até impedir a morte celular por apoptose (NICHOLSON, 1999).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH *et al.*, 2007). A via extrínseca é mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática da célula. Os ligantes FASL (proteína FAS ligante) e TNF (fator de necrose tumoral) se ligam aos receptores de morte celular FAS e TNFR (receptor de fator de necrose tumoral), induzindo a formação do DISC (complexo de sinalização indutor de morte). Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que ativa a caspase-3 efetora, executando a morte por apoptose. A via intrínseca é ativada por estresse extracelular e/ou intracelular. Os sinais que são transferidos em resposta a este estresse convergem diretamente para a mitocôndria que integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes como citocromo C. No citosol, o citocromo C cliva a caspase 9 que ativa a caspase 3, levando a apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A quimioterapia induz a morte das células neoplásicas, em parte, por ativação da apoptose. A resistência das células cancerígenas à quimioterapia pode ser o resultado de alterações nos mecanismos promotores de apoptose (SANO *et al.*, 2003).

A resistência a apoptose pode ser adquirida pela célula tumoral através de uma série de estratégias. Entre as mais importantes estão a mutação do gene supressor de tumor p53 e a superexpressão de genes da família Bcl-2. (LOWE *et al.*, 2000). As mutações podem ser herdadas ou ocorrem por exposição a carcinógenos ambientais ou agentes infecciosos. A proteína p53

está diretamente relacionada ao bloqueio do ciclo celular e no reparo de dano ao DNA, também pode induzir a apoptose ao regular a expressão de mediadores anti ou pró-apoptóticos (HANAHAHAN, 2000). A inativação funcional da proteína p53 é vista em mais de 50% dos cânceres em humanos e resulta na remoção de um componente capaz de induzir a cascata apoptótica efetora (HANAHAHAN, 2000). A mutação do gene p53 em diversos tumores caninos como osteossarcoma, carcinoma mamário e linfoma canino está diretamente associada com comportamento biológico mais agressivo, resistência à quimioterapia e recidivas precoces.

Outro mecanismo utilizado pelas células tumorais para superar a apoptose é a superexpressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, Bcl-XI e Bcl-w (LUCINDA, 2009). Essas proteínas bloqueiam a liberação de citocromo C pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo a ativação das caspases. SANO *et al.*, (2003) utilizando a técnica de RT-PCR identificou a expressão de Bcl-XL em células de linfoma canino, sugerindo o envolvimento dessa proteína anti-apoptótica no mecanismo de resistência tumoral.

2.3 - MDR-1/P-gp e a Resistência Tumoral

Um dos maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia no tratamento do câncer é o desenvolvimento por parte das células tumorais do fenômeno de resistência a múltiplas drogas, sendo a principal causa de falha terapêutica nas doenças oncológicas.

Refere-se à resistência tumoral como a habilidade das células neoplásicas de sobreviverem à exposição a agentes tóxicos em doses máximas toleradas por células normais (REZENDE, 2004). Clinicamente, o fenômeno de resistência é observado quando ocorre falha no tratamento, quer seja pela recidiva precoce ou pela refratariedade a ação de drogas citotóxicas, indicando a presença de células quimioresistentes.

Os mecanismos de resistência representam diversas formas de proteção da célula e do organismo e estão presentes na maioria das células normais. Infelizmente, muitos tumores utilizam esses mecanismos para a sua própria proteção (BERGMAN, 2003). De maneira geral, esses mecanismos podem ser

classificados em duas categorias: resistência intrínseca: manifestada no primeiro ciclo de tratamento e vinculada ao processo original de transformação maligna da célula e, resistência adquirida: encontrada após exposição a agentes citotóxicos, possivelmente como um resultado da seleção de populações celulares tolerantes (HUBER *et al.*, 2008). Depois da seleção para resistência a uma única droga, as células podem mostrar resistência cruzada a outras drogas estruturalmente diferentes, um fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR). Isso pode explicar porque protocolos de tratamento que combinam múltiplos agentes podem não ser mais efetivos (GOTTESMAN *et al.*, 2002).

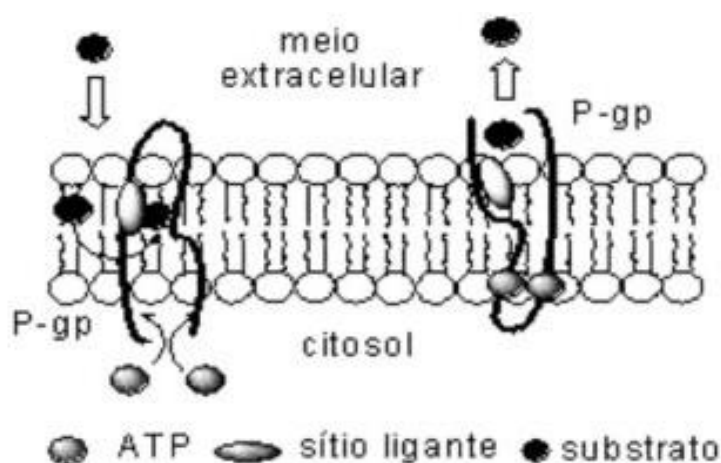
Muitos agentes quimioterápicos são capazes de induzir rápida remissão em determinados tipos de tumor, como no caso do linfoma canino, no entanto, a habilidade de tratar esses pacientes com eficácia na recidiva pode ser bastante desafiadora e frustrante (BERGMAN, 2003).

A amplificação gênica e/ou aumento da expressão de algumas proteínas pertencentes à superfamília ABC (ATP-binding cassette), está diretamente relacionada a linhagens celulares resistentes a múltiplas drogas. O gene de resistência a múltiplas drogas, denominado MDR-1 (multidrug resistance gene-1), é responsável pela expressão de um tipo de glicoproteína, a glicoproteína-P (P-gp), que utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP, promove o efluxo do quimioterápico (HUBER *et al.*, 2010). Existem estudos que relacionam a expressão gênica da glicoproteína deste gene com a resistência tumoral, mas ainda não há a associação da expressão gênica do MDR-1 com a resposta à quimioterapia nos linfomas caninos (CULMSEE *et al.*, 2004).

A P-gp é uma glicoproteína transmembrana, de 170 kDa, constituída por 1280 aminoácidos e se apresenta com duas subunidades, cada uma com 12 segmentos transmembrana (AMBDUKAR *et al.*, 2003). É um tipo de glicoproteína que funciona como uma bomba de efluxo, dependente de energia, que resulta em uma diminuição do acúmulo intracelular de agentes citotóxicos em células tumorais (BRENN *et al.*, 2008).

Vários modelos já foram propostos para explicar o mecanismo de efluxo promovido pela P-gp. Atualmente o mais aceito propõe que o substrato é particionado da bicamada lipídica, para uma parte mais interna da proteína chamada “folheto interno”, entrando em um bolsão que constitui o sítio ligante (Fig.3) (HUBER *et al.*,2010). O ATP liga-se ao sítio de ligação do nucleotídeo, causando uma grande mudança conformacional, expondo o sítio ligante para o lado extracelular e expulsando o substrato para fora da célula, mesmo contra o gradiente de concentração (HUBER *et al.*, 2010).

Figura 3. Modelo de Higgins demonstrando o mecanismo de efluxo de substâncias promovida pela P-gp (Fonte: HUBER *et al.*,2010).



Em mamíferos, a P-gp pode ser encontrada em tecidos normais, como glândulas adrenais, rins, fígado, intestino, placenta, barreira hematoencefálica, pulmão, células sanguíneas/medula óssea e em algumas linhagens de células fetais (BERGMAN, 2003). A habilidade da P-gp em bombear compostos funcionalmente ativos do cérebro para a corrente sanguínea demonstra a sua função importante na barreira hematoencefálica, protegendo os neurônios contra compostos neurotóxicos (HUBER *et al.*, 2010).

A distribuição tecidual e a localização celular da P-gp em tecidos normais de cães são muito similares a seres humanos, como por exemplo, no

fígado, cérebro, córtex da adrenal, rins e cólon (GINN *et al.*, 1996). Porém a expressão no fígado e cérebro foi mais elevada do que a observada em humanos. Demonstrou-se ainda a expressão dessa glicoproteína em diversas neoplasias caninas como linfomas, carcinomas de glândula mamária, tireóide e melanomas a exemplo do que ocorre em seres humanos (GINN *et al.*, 1996).

Animais que possuem mutações no gene MDR-1 como os cães da raça collie e border collie apresentam uma sensibilidade aumentada aos efeitos da ivermectina, uma vez que a P-gp produzida é funcionalmente deficiente (ROULET, 2003). ROULET, 2003, relatou um cão da raça collie que apresentou uma mutação por deleção no gene MDR-1. Notou-se que o RNA mensageiro era transcrito, mas não levava a tradução da proteína funcionante, ou seja, não se detectava a P-gp.

A P-gp possui uma ampla especificidade de substratos, transportando drogas com diversas estruturas químicas, incluindo agentes anticancerígenos como (alcalóides da vinca, doxorubicina), imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus), antiparasitários (ivermectina), hormônios esteróides e outros. Muitos destes agentes não são apenas substratos bombeados para fora da célula, mas também são capazes de induzir a formação do fenótipo MDR e promover assim, uma superexpressão de glicoproteína-P (BRENN *et al.*, 2008).

O Linfoma canino é normalmente tratado com alcalóides da vinca e antraciclinas, sendo frequente o sucesso inicial, seguido por um quadro de resistência a esses medicamentos (MOORE *et al.*, 1995; REZENDE, 2004). Especula-se que um dos mecanismos envolvidos no linfoma canino seja mediado pela expressão de P-gp (MOORE *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996).

REZENDE (2004) encontrou uma alta positividade para P-gp em cães com linfoma multicêntrico no ato do diagnóstico, porém na recidiva, a expressão de P-gp aumentou consideravelmente chegando a 100% dos animais avaliados. Assim, o aumento significativo da expressão da P-gp na recidiva tumoral em relação ao diagnóstico sugeriu que o mecanismo P-gp poderia estar envolvido no insucesso do tratamento e constituir um fator prognóstico negativo em relação à recidiva do linfoma canino.

Fármacos efetivos e atóxicos têm sido estudados pela sua capacidade modular a resistência tumoral. Esses são chamados de reversores, moduladores ou inibidores da MDR (HUBER *et al.*, 2010). Existem muitos compostos, tais como verapamil, ciclosporina, tamoxifeno entre outros, que se ligam competitivamente à P-gp evitando a sua ação. Um exemplo disso é a coadministração de ciclosporina e suco de uva, um inibidor de P-gp, que foi capaz de aumentar a absorção oral de ciclosporina em cães (MEALEY, *et al.*, 2003). No entanto, para atingir o efeito desejado, na maioria dos casos é necessária a utilização de altas doses desses fármacos, podendo induzir muitos efeitos colaterais como a mielossupressão (BERGMAN, 2003).

Uma nova evolução no diagnóstico das neoplasias de forma geral é a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) e da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR), sendo apontada atualmente como forma mais rápida de diagnóstico (JEON *et al.*, 2007). O método teve início em meados da década de 1990 para o estudo dos linfomas, sendo sensível a sequências aberrantes de DNA, inclusive mutações, rearranjos, deleções e translocações (JEON *et al.*, 2007).

CULMSEE, (2004) utilizou a técnica de qRT-PCR (PCR em tempo real) para quantificar o nível de expressão de MDR-1 em tecidos normais e neoplásicos em cães. Altos níveis de MDR-1 foram detectados nas amostras de fígado de animais saudáveis e nos tumores hepáticos (colangiocarcinoma e carcinoma hepatocelular). Nas amostras provenientes de linfoma multicêntrico, gastrointestinal e cutâneo, o nível de expressão foi considerado baixo em comparação com os outros tecidos avaliados, demonstrando que a técnica utilizada permite a detecção sensível e a quantificação do MDR-1 canino em biopsia incisionais.

3 – OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a resposta do linfoma cutâneo canino frente ao tratamento com lomustina e correlacionar todas as variáveis estudadas com o índice de resposta terapêutica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliação clínica e laboratorial os animais, antes, durante e após a quimioterapia com lomustina;
- b) Realizar imunofenotipagem dos casos de linfomas cutâneos caninos e estabelecer a origem, T ou B, das células neoplásicas;
- c) Estabelecer grau de proliferação (Ki67) e apoptose (caspase 3) dos linfomas caninos, pelo método de imunohistoquímica;
- d) Estabelecer correlação entre a expressão gênica do MDR-1 com índices de resposta terapêutica;

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO 1

AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL EM CÃES COM LINFOMA CUTÂNEO TRATADOS COM LOMUSTINA

Amanda Resende Duarte¹, Jéssica de Assis Marques², Fabíola Soares Zahn³, Luiz Henrique de Araujo Machado^{4*}.

¹Mestranda do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP Botucatu;

²Residente do Departamento de Clínica Veterinária;

³Professora substituta do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

⁴Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp Botucatu.

*Autor para correspondência: Distrito de Rubião Jr, s/n Depto de Clínica Veterinária, CEP: 18618-070 cx postal: 560 Botucatu SP. E-mail: henrique@fmvz.unesp.br

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a resposta clínica dos cães com linfoma cutâneo tratados com lomustina (CCNU) e identificar os possíveis efeitos adversos durante o tratamento. Foram selecionados quinze cães, sete fêmeas e oito machos com faixa etária entre cinco e dezessete anos, com diagnóstico de linfoma cutâneo através de análise histopatológica e tratados com lomustina na dose de 90mg/m² a cada três semanas. Realizado acompanhamento laboratorial que consistiu na avaliação hematimétrica e bioquímica sérica antes e durante o tratamento. Em 53,3% (8/15) dos animais apresentaram remissão parcial (RP) do quadro. Sete cães (46,6%) não responderam ao tratamento testado. O tempo médio de sobrevivência nos animais avaliados foi de 59,3 dias. As principais alterações hematológicas e bioquímicas encontradas após a terapia foram leucopenia (73,3%), trombocitopenia (60%) e anemia (46,1%). Alterações renais e hepáticas foram vistas em 40% e 73,3% dos animais respectivamente. Comprovou-se que os parâmetros hematócrito, proteína total, contagem de leucócitos e neutrófilos, creatinina, ALT, fosfatase alcalina GGT e densidade urinária pioraram com o tratamento. O uso da lomustina como monoterapia no tratamento do LCC mostrou-se eficaz, no entanto, os efeitos adversos podem agravar a apresentação clínica e o prognóstico.

Palavras-chave: Cães, CCNU, linfoma cutâneo, oncologia, efeitos adversos

ABSTRATC

The aim of this study was to evaluate the clinical response of dogs with cutaneous lymphoma treated with lomustine (CCNU) and to identify their possible adverse effects and toxicity during treatment. Fifteen dogs, seven females and eight males aged between five and seventeen years old, diagnosed with cutaneous lymphoma by histopathological analysis were selected and treated with lomustine at a dose of 90mg / m² every three weeks. Monitoring was carried out which consisted in the assessment laboratory hematology and serum chemistry before and during treatment. 53, 3% of the animals showed partial remission. Seven dogs (46, 6%) did not respond to the tested treatment. The median survival time was 59, 3 days. The major hematological and biochemical changes found after therapy were leukopenia (73,3), thrombocytopenia (60%) and anemia (46,1%). Renal and liver toxicity was seen in 40 % and 73,3% of dogs, respectively. It was shown that the parameters hematocrit, total protein, leukocyte count and neutrophils, creatinine, ALT, GGT, alkaline phosphatase and urine density worsened with treatment. The use of lomustine as monotherapy in the treatment of canine cutaneous lymphoma was effective; however, adverse effects on clinical presentation and prognosis may worsen.

Key-words: CCNU, cutaneous lymphoma, dogs, oncology, adverse effects

INTRODUÇÃO

A pele é considerada o local mais comum para o surgimento de tumores em cães, representando aproximadamente um terço de todas as neoplasias encontradas nessa espécie (Withrow, 2007).

O Linfoma Cutâneo (LC) é considerado uma forma rara do linfoma canino, representando somente 1% das neoplasias cutâneas em cães (Fontaine *et al.*, 2009). Caracteriza-se pela proliferação e infiltração de linfócitos T ou B neoplásicos na epiderme, derme e anexos cutâneos (Fontaine *et al.*, 2010).

Sua etiologia é desconhecida, no entanto, associações com compostos químicos, infecções virais e inflamação crônica da pele já foram descritas (Moore e Olivry, 1994; Fournel-Fleury *et al.*, 2002; Fontaine *et al.*, 2009). Acomete animais idosos, média de nove a doze anos, não havendo predileção quanto ao sexo (Moore e Olivry, 1994).

Segundo a literatura, as raças Cocker Spaniel e Boxer, são predispostas (Fontaine *et al.*,2009).

O Linfoma cutâneo canino representa um grupo heterogêneo de apresentações clínicas que podem ser classificadas histologicamente em linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE) e não epiteliotrópico (LCNE), sendo o LCE o mais descrito na Medicina Veterinária. As principais apresentações clínicas são: eritroderma esfoliativo, placas e nódulos, doença ulcerativa na mucosa oral e a forma mucocutânea (Fontaine *et al.*,2009).Existe importante variabilidade no comportamento clínico no linfoma cutâneo, desde um curso clínico indolente até uma doença sistêmica rapidamente fatal, com tempo de sobrevida de 3 a 6 meses para doença avançada (Heading *et al.*, 2011). Como o linfoma cutâneo na maioria dos casos é diagnosticado em estágios avançados, com lesões multifocais ou disseminação para outros órgãos, a quimioterapia sistêmica é a terapia mais utilizada (Loremier, 2006).

O uso da lomustina (CCNU), um agente alquilante da família das nitrosureias, já foi relatado em diversas neoplasias como tumores cerebrais, mastocitomas, linfoma recidivante e sarcoma histiocítico (Heading *et al.*, 2011). Sua utilização como monoterapia ou associada a outros quimioterápicos no tratamento do LCC tem sido bastante estudada, tanto no tratamento inicial, quanto na recidiva. Willians *et al.*, 2006 e Ribson *et al.*,(2006) relataram respostas terapêuticas superiores a 70 % com o uso do CCNU no tratamento do linfoma cutâneo em cães. Resultados satisfatórios, associados a um custo relativamente baixo e fácil administração fazem da lomustina uma proposta terapêutica bastante promissora. No entanto, o potencial tóxico da lomustina tem sido avaliado e considerado deletério para cães, sendo a mielossupressão o efeito adverso mais comum, seguido por sinais gastrintestinais (Kristal *et al.* ,2004 ; Heading *et al.*,2011). Hepato e nefrotoxicidade também são descritas, diminuindo a sobrevida dos animais em tratamento.

Objetivou-se nesse estudo caracterizar a população canina acometida pelo linfoma cutâneo, avaliar a resposta terapêutica ao tratamento com lomustina e descrever os efeitos adversos associados à quimioterapia. Secundariamente tentou-se definir parâmetros clínicos ou laboratoriais que pudessem estar correlacionados com o prognóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais selecionados para esse estudo foram provenientes do serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais da FMVZ-UNESP Campus de Botucatu, todos provindos de proprietários que forneceram consentimento prévio para participação na pesquisa e autorizaram a colheita de sangue e urina de seus animais. Após aprovação pelo comitê de ética da UNESP, Botucatu (protocolo 131/2010), foram incluídos no projeto 15 cães com Linfoma Cutâneo, diagnosticados por biópsia cutânea e análise histopatológica, sendo 8 animais sem raça definida e 7 com raça definida, com faixa etária entre 5 e 17 anos.

Após confirmação, os 15 cães selecionados foram submetidos ao tratamento com Lomustina[®], nome comercial, Citostal[®] de 10 ou 40 mg e a dose utilizada foi de 90mg/m² administrada por via oral a cada 3 semanas. Não foi realizada nenhuma associação com outros agentes quimioterápicos durante todo o estudo. A administração do quimioterápico não foi realizada quando os animais apresentavam neutrófilos abaixo de 3.000/ μ L e/ou plaquetas abaixo de 50.000/ μ L.

Os 15 animais foram acompanhados a fim de estabelecer a evolução do tratamento, tanto na fase de indução da remissão, quanto na fase de manutenção. O acompanhamento clínico foi baseado na avaliação macroscópica das lesões. A partir do tamanho dos nódulos foram imputadas à resposta ao tratamento às seguintes hipóteses: 1) sem remissão (SR - 0% de diminuição dos tumores), 2) remissão parcial (RP - 50% de diminuição), 3) remissão total (RT - 100% de diminuição) e 4) recidiva (aumento posterior dos tumores), sendo que no primeiro momento esta avaliação não foi aplicada.

Realizou-se acompanhamento laboratorial antes e durante o tratamento quimioterápico a fim de se avaliar os efeitos adversos consequentes do uso da lomustina. Esse acompanhamento consistiu na avaliação hematimétrica (eritrograma, leucograma e contagem plaquetária) e bioquímica sérica (uréia, creatinina, ALT, FA, GGT, proteína plasmática total, albumina, globulina, densidade urinária, pH urinário e proteína urinária). Os valores de referência utilizados foram propostos por Kaneko *et al.*, 2008.

Todos os parâmetros clínicos e laboratoriais foram avaliados no Dia 1, primeiro dia de tratamento (M1) e antes de cada aplicação da quimioterapia, a cada 3 semanas. O grau de elevação dos parâmetros avaliados (hematológicos, bioquímicos e urinários) foi

baseado na maior elevação registrada (M3). De acordo com a necessidade de cada animal, foram feitas avaliações clínicas e/ou laboratoriais também nos períodos entre as aplicações.

Baseado nos dados colhidos no exame inicial de todos os animais foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, onde se constatou que os parâmetros não tem distribuição normal. Por esse motivo, toda análise estatística foi baseada em métodos não paramétricos. Para verificar a influência do tratamento nos diversos parâmetros avaliados foi utilizado o Teste de Mediana de Mood, com nível de significância de 95%. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliação da correlação entre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários e o tempo de sobrevivência. Para este teste foi adotado o valor crítico de 0,514.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram selecionados 15 cães com linfoma cutâneo. Desses, 53,3% (8/15) eram sem raça definida (SRD) e 46,7% (7/15) com raça definida, sendo que destes houve 14,3% (1/7) de cada uma das raças a seguir: Border Collie, Boxer, Dálmata, Labrador Retriever, Lhasa Apso, American Pit Bull Terrier e Poodle. Das raças analisadas, apenas o boxer foi descrita como predisposta. No entanto, análises de predisposição racial são variáveis, pois os relatos de casos de linfoma cutâneo advêm de diversos países e regiões diferentes, e na maioria dos casos, a distribuição de raças no local não é conhecida (Fontaine *et al*, 2009).

A idade média no momento do diagnóstico foi de $10,7 \pm 4$ anos e, quanto ao sexo, 53,3% eram machos e 47,7% fêmeas. Em um total de 72 casos relatados na literatura, a idade média no ato do diagnóstico foi de 8,6 anos (Fontaine *et al*, 2009) e no presente trabalho, a média foi de 10,6 anos, o que nos permite concluir que os cães acometidos pelo Linfoma Cutâneo sejam de meia idade a idosos.

Em relação à avaliação histopatológica, 13 amostras foram classificadas como linfoma cutâneo não epiteliotrópico (LCNE) e 2 como linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE). Dados de literatura mostram o LCE como a forma mais comum de linfoma cutâneo em cães (Moore e Olivry, 1994), porém, neste trabalho, o LCNE foi predominante, 86,6% (13/15) dos animais avaliados.

Nos casos incluídos nessa pesquisa, a taxa de resposta ao tratamento com Lomustina foi de 53,3%, 8/15 animais, sendo que não houve remissões completas (RC), somente remissões parciais (RP). A avaliação da resposta terapêutica no linfoma cutâneo pode ser bastante subjetiva, pois como todos os animais apresentavam lesões difusamente distribuídas, a análise de cada uma delas pode tornar-se inviável. No entanto, a diminuição ou melhora clínica das lesões pré-existentes foi considerado um parâmetro para avaliar a resposta ao tratamento.

A dose cumulativa média de CCNU foi de 204 mg/m² e número médio total de ciclos necessários para remissão clínica foi de 2 ciclos, com variação de 1 a 5 ciclos. Sete cães (46,6%) apresentaram doença progressiva sem resposta ao tratamento, com média de sobrevida de 13 dias.

A taxa de resposta global ao tratamento foi de 53,3%, menor que a descrita por Williams *et al*, 2006 que relataram taxa de resposta de 78%, colocando a lomustina como opção de tratamento viável para o linfoma cutâneo canino. Outro estudo realizado por Ribson *et al*; 2006 avaliaram a resposta ao tratamento com a utilização de CCNU na dose de 60m/m² a cada 3 semanas e encontraram uma taxa de resposta superior a 80% (Ribson *et al.*, 2006). A diminuição ou ausência de resposta à terapia vista neste estudo em comparação com os outros dois trabalhos semelhantes deve ser analisada com cautela, pois nos estudos anteriores houve sensibilização prévia ou associação com outros quimioterápicos como os glicocorticóides e sabe-se que a terapia com prednisona inicialmente pode levar há um quadro de remissão do linfoma cutâneo.

O tempo médio de sobrevivência nos animais avaliados foi de 59,3 dias, menor do que o relatado por Willians *et al.*, (2006). Este fato pode estar relacionado ao diagnóstico tardio da doença, visto que o linfoma cutâneo possui uma apresentação clínica bastante variável. Assim, no ato do diagnóstico, esses animais provavelmente já passaram por outros tratamentos dermatológicos, sem sucesso e possuem um estadiamento clínico mais avançado.

O predomínio de cães com linfoma cutâneo não epiteliotrópico neste estudo pode explicar o menor tempo de sobrevida e menor resposta terapêutica, visto que nos estudos realizados por Ribson *et al.*,(2006) e Williams *et al.*,(2006) todos os cães tinham linfoma cutâneo epiteliotrópico,sugerindo que o epiteliotropismo pode

1 influenciar na resposta terapêutica e que o linfoma cutâneo não epiteliotrópico pode
2 representar um pior prognóstico em relação ao linfoma cutâneo epiteliotrópico.

3 A utilização da lomustina em tratamentos quimioterápicos pode levar a
4 diferentes quadros de toxicidade. Utilizando-se a dose de 90mg/m^2 , o primeiro indício
5 de toxicidade observado é mielossupressão, principalmente neutropenia, após sete dias
6 da administração (Kristal *et al.*, 2004; Ribson *et al.*, 2006). Sabe-se que a lomustina
7 assim como outros agentes quimioterápicos, atua destruindo células de uma forma não
8 específica, tanto células neoplásicas, como normais, particularmente células de
9 crescimento rápido, como as gastrintestinais e do sistema imunológico (Almeida *et al.*,
10 2005). Em noventa e três por cento (14/15) dos animais avaliados apresentaram
11 diminuição nos valores do leucograma de M1(início) para M3(fim), principalmente por
12 neutropenia. Em 26% (4/15) detectou-se leucopenia importante, média de 465
13 células/ μL , 26% (4/15) mostraram leucopenia com média de 1.662 células/ μL e 20%
14 (3/15) dos animais tiveram leucopenia com média de 4.700 células/ μL no final do
15 tratamento.. Um animal apresentou queda no número de leucócitos totais, porém
16 manteve-se dentro dos valores de referência. A leucopenia torna os animais altamente
17 suscetíveis a infecções e sepse, no entanto não foi observado febre ou outros sinais
18 clínicos de sepse nos animais avaliados.

19 Anemia e trombocitopenia também foram parâmetros que pioraram com o
20 tratamento. Em 86,6% (13/15) dos cães observou-se anemia sendo que desses 53,8%
21 (7/15) previamente ao tratamento e 46,1% (6/15) após o tratamento quimioterápico com
22 lomustina. O valor de hemoglobina e hematócrito em M3(fim) foi 9,4 g/dl e 27%
23 respectivamente, indicando um quadro de anemia nesses animais, sem necessidade de
24 transfusão sanguínea em nenhum caso avaliado. Trombocitopenia foi detectada em 60%
25 (9/15) dos casos, após a administração de lomustina. A contagem plaquetária média em
26 M3 foi de 154.062 plaquetas/ μL , evidenciando a trombocitopenia, que não justificou
27 quadros hemorrágicos.

28 A mielossupressão encontrada nesse estudo ficou bastante evidente após várias
29 sessões de quimioterapia, sugerindo uma toxicidade cumulativa da lomustina nesses
30 animais, podendo ser revertida ou amenizada com a redução da dose utilizada e
31 tratamento suporte adequado. Rassnick *et al.*, 1999 avaliou a ação da lomustina em cães

com mastocitoma e relatou que 41% (7/17) dos animais avaliados apresentaram leucopenia, <1000 leucócitos totais, mas poucos mostraram sinais de infecção sistêmica.

Toxicidade gastrointestinal foi um achado importante descrito em 60% dos cães. Anorexia foi o sinal clínico mais descrito pelos proprietários (83,3%), seguido por êmese (16,6%) e diarreia (8,3 %). A anorexia é um sinal clínico comum em pacientes oncológicos e inespecífico, associada ao processo natural tumoral e às substâncias anorexígenas produzidas pelo tumor ou pelo organismo em resposta ao processo neoplásico (Silva, 2006).

A hepatotoxicidade causada pelo uso da lomustina é reconhecida pelo aumento sérico das enzimas hepáticas, especialmente ALT e pela hipoalbuminemia (Kristal *et al.*, 2004). Em 93,3% (14/15) dos animais avaliados houve elevação nos níveis séricos de ALT no momento 3 (final) em relação ao momento 1 (inicial) com média de 242 U/L, 86,6% (13/15) de FA com média de 381,9 U/L e 33,3% (5/15) de GGT com média de 6,1 U/L. Esses três parâmetros avaliados apresentaram diferença significativa entre os momentos de avaliação (Tab. 1). Esse achado reforça a teoria de Kristal *et al.*, (2004) e Hosoya *et al.*, (2009) de que o uso de CCNU pode levar a injúria hepatocelular e colestase.

Hosoya *et al.*; (2009) observaram em seu estudo que um dos animais com hepatopatia clínica não mostrou elevações significantivas nos níveis séricos de ALT, sugerindo que esse parâmetro não deva ser avaliado isoladamente como marcador de hepatotoxicidade e sim em conjunto com outras análises bioquímicas como a dosagem de ácidos biliares e bilirrubina. Durante todo o tratamento até o óbito, nenhum animal apresentou sinais clínicos de hepatopatia ativa ou insuficiência hepática, no entanto, estudos recentes avaliando a toxicidade da lomustina relataram a ocorrência de insuficiência hepática e óbito (Kristal *et al.*, 2004 ; Heading *et al.*, 2011) . Podemos sugerir que o resultado da avaliação hepática pode considerar uma hepatotoxicidade subclínica nesses animais, que deve ser monitorada.

A concentração sérica de albumina também mostrou variação entre os diferentes momentos avaliados, M1 2,3mg/dl e M3 2,1 mg/dl,(Tab.1) porém,essa diminuição não foi considerada significativa ($p = 0,058$).

Sinais de toxicidade renal, como azotemia, poliúria e polidipsia, também são relatadas, mas geralmente, em menor grau (Heading *et al.*, 2011; Flory *et al.*, 2008). Cerca de 66,6% dos animais avaliados (10/15) apresentaram elevação nos valores de uréia com média de 79 mg/dl e 40 % (6/15) tiveram aumento nos valores de creatinina com média de 1,55 mg/dl em M3 . A densidade urinária também foi mensurada durante a terapia e 93,3% (14/15) animais apresentaram diminuição da densidade, chegando a isostenúria em dois casos avaliados. Todos os animais exibiram proteinúria e 53,3% (8/15) dos animais apresentaram valores de proteína urinária superior a 100mg/dl e desses, somente dois animais (25%) apresentavam celularidade na urinálise, o que poderia influenciar na interpretação da origem da proteinúria.

Pelos resultados obtidos pôde-se comprovar a nefrotoxicidade, com a diminuição da densidade urinária induzida pelo tratamento e sabidamente é o primeiro sinal clínico de lesão tubular renal. Associado à baixa densidade urinária encontramos também proteinúria persistente considerada um indicador de lesão glomerular, sendo sua elevação, reflexo progressão da lesão (Jacob *et al.*,2005). A proteinúria pode estar presente no estágio inicial da doença renal antes do desenvolvimento de azotemia (Polzin, 2007).

Houve diferença significativa nos valores de uréia e densidade urinária entre os momentos M1(início) e M3(fim) evidenciando a ação deletéria do uso da lomustina nos cães avaliados (Tab.1). Um fato importante a ser considerado é que alguns desses animais apresentavam-se anoréticos, com êmese e diarreia durante o tratamento podendo levar a um quadro de desidratação e azotemia pré-renal, entretanto estes aspectos clínicos não coadunam com a densidade urinária.

O risco de toxicidade influencia a dosagem e a frequência de administração da lomustina. Estudos prévios com CCNU sugerem que seus efeitos adversos são dose-dependente, assim, o seu uso em doses mais baixas poderia induzir menos efeitos adversos e uma maior reversibilidade dos sinais clínicos (Kristal *et al.*,2004). Ribson *et al.*,(2006) utilizaram dosagens menores que o presente estudo (60mg/m² e 56,3mg/m²) e obtiveram uma maior resposta ao tratamento (82,6%), indicando que dosagens elevadas podem não apresentar o efeito citotóxico desejado e ainda prejudicar ou diminuir a sobrevida dos animais. Por ser uma droga de fácil apresentação e administração, supõe-se erroneamente que a CCNU tenha uma ação mais inofensiva do que outros

quimioterápicos e, por isso, é importante que seus efeitos colaterais e benéficos sejam profundamente avaliados, afinal deseja-se que o quimioterápico possua índices terapêuticos favoráveis e efeitos colaterais toleráveis.

Diante dos resultados obtidos neste estudo podemos corroborar os achados de literatura, pois comprovamos que os parâmetros hemácias, hemoglobina, hematócrito, proteína total, contagem de leucócitos e neutrófilos, uréia, ALT, fosfatase alcalina, GGT e densidade urinária pioraram ao longo do tratamento ($P \leq 0,05$) (Tab. 1). Contudo, não houve correlação entre os diversos parâmetros avaliados e a sobrevida desses animais.

Os resultados estatísticos não apontaram qualquer marcador de prognóstico entre os parâmetros avaliados quando do primeiro atendimento.

CONCLUSÃO

O linfoma cutâneo canino é uma doença de prognóstico ruim, devido a pouca resposta a terapia, recidiva precoce e tempo de sobrevida baixo, como pôde ser mostrado em nosso estudo.

O uso da lomustina como monoterapia no tratamento do linfoma cutâneo mostrou eficácia moderada, levando a consideráveis graus de remissão, no entanto, foi possível comprovar sua ação deletéria para cães, com destaque para mielossupressão e hepato/nefrotoxicidade, agravando a apresentação clínica e o prognóstico desses animais.

Conclui-se também que não foi possível estabelecer parâmetros prognósticos no momento do diagnóstico do linfoma cutâneo canino com as ferramentas disponíveis nesse trabalho. Estes resultados são relevantes e evidenciam a importância de se aprofundar nos estudos e estabelecer uma melhor conduta terapêutica e busca de marcadores prognósticos alternativos para o linfoma cutâneo canino.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflitos de interesse, finanças ou relacionamentos com outras pessoas ou organizações que poderiam de forma inadequada influenciar o seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos de mestrado, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio financeiro (processo nº2010/15928-0).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA L.C.B.; MONTARANI, C.A.; DONNICI, L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: Uma introdução. *Química Nova*, v.28, p.118-129, 2005.

FLORY, A.B.; RASSNICK, K.M.; AL-SARRAF, R.; BAILEY, D.B.; BALKMAN, C.E.; KISELOW, M.A.; AUTIO, K. Combination of CCNU and DTIC Chemotherapy for Treatment of Resistant Lymphoma in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, p.164–171, 2008.

FONTAINE, J., BOVENS.C; BETTENAY.S.; MUELLER, R.S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Veterinary and comparative oncology*, v.7, p.1-14, 2009.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell Lymphoma: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Veterinary Pathology*, v.32, p.92-109, 2002.

HEADING, K.L.; BROCKLEY, L.K.; BENNETT, P.F. CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002–07). *Australian Veterinary Journal*, v.89, p.109–116, 2011.

- 1 MOORE, P.F., OLIVRY.T. Cutaneous Lymphomas in Companion Animals. *Clinics in*
2 *Dermatology*, v.12, p.499-505, 1994.
- 3 HOSOYA,K.,LORD,L.K.,LARAGARCIAL,A.,KISSEBERTH,W.C.,LONDON,C.A.,
4 COUTO.C.G. Prevalence of elevated alanine transaminase activity in dogs treated with
5 CCNU (Lomustine). *Veterinary and comparative oncology*, v.7, p. 244-255, 2009.
- 6 KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic*
7 *animals*. 6. ed. San Diego: Academic, 916p, 2008.
- 8 KRISTAL, O.; RASSINICK, K.M.; GLIATOO, J.M et.al. Hepatotoxicity associated
9 with CCNU (lomustine) chemotherapy in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*
10 2004; 18:75–80
- 11 LORIMIER, L.P. Updates on the Management of Canine Epitheliotropic Cutaneous T-
12 Cell Lymphoma. *Veterinary Clinics of Small Animal Practice*, v.36, p.213-228, 2006.
- 13 MOORE, A.S, LONDON, C.A, WOOD, C.A, et al. Lomustine (CCNU) for the
14 treatment of resistant lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.
15 13, p. 395 –398, 1999.
- 16 POLZINI, D.J. Investigating proteinuric kidney disease. *Veterinary Medicine*, v.102,
17 n.12, p.784-785, 2007.
- 18 RASSNICK, K.M, MOORE, A.S, WILLIAMS, L.E, et al. Treatment of canine mast
19 cell tumors with CCNU (Lomustine). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 13, p.
20 601–605, 1999.
- 21 RIBSON,R.E.,DELORIMIER,L.P.,SKORUPSKI,K.,BURGESS,K.E.,BERGMAN,P.J.,
22 CARRERAS,J.,HAHN,K.,LEBLANC,A.,TUREK,M.,IMPELLIZERI,J.,WOJCIESZYN
23 ,J.W.,DROBATZ,K.,CLIFFORD,C.A. Response of Canine Cutaneous Epitheliotropic
24 Lymphoma to Lomustine (CCNU): A Retrospective Study of 46 Cases (1999–2004).
25 *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.20, p.1389–1397, 2006.
- 26 SABA, C.F.; HAFEMAN, S.D.; VAIL, D.M.; THAMM, D.H. Combination
27 Chemotherapy with Continuous L-Asparaginase, Lomustine, and Prednisone for
28 Relapsed Canine Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, p.1058–
29 1063, 2009.

SILVIA, M.P.N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.52, p.59-77, 2006.

WILLIAMS, L.E., RASSNICK, K.M., POWER, H.T., LANA, S.E., MORRISON-COLLISTER, K.E., HANSEN, K., JOHNSON, L. CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.20, p. 136-143, 2006.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. *Small Animal Clinical Oncology*. Missouri: Saunders - Elsevier, p. 995-1002, 2007.

Tabela 1: Mediana dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários de 15 cães com linfoma cutâneo ao longo do tratamento com lomustina.

Parâmetros	Início	Fim	P.value
Hemácias	5,51 ^a	3,83 ^b	0,049
Hemoglobina	12,95 ^a	9,4 ^b	0,007
Hematócrito	38,5 ^a	27 ^b	0,023
PT	8,2 ^a	6,7 ^b	0,021
Plaquetas	154000	154062	1
Leucócitos	9.300 ^a	1.890 ^b	0,002
Bastonetes	0	0	0,345
Segmentados	5.450 ^a	2.300 ^b	0,018
Linfócitos	600	210	0,431
Eosinófilos	300	0	0,224
Basófilos	0	0	0,172
Monócitos	550	250	0,431
Uréia	39,5	79	0,023
Creatinina	0,90	1,55	0,058
ALT	54 ^a	242,05 ^b	0,00015
FA	108,5 ^a	381,95 ^b	0,023
GGT	3 ^a	6,15 ^b	0,002
Albumina	2,3	2,1	0,058
Globulina	5,7	4,9	0,130
Densidade Urinária	1,026 ^a	1,015 ^b	0,00013
pH	6,5	6,35	0,308
Proteína Urinária	30	100	0,053

^{ab} Letras sobrescritas distintas na mesma linha diferem ($P \leq 0,05$)

CAPÍTULO III
ARTIGO CIENTÍFICO 2

RESPOSTA DO LINFOMA CUTÂNEO CANINO À QUIMIOTERAPIA COM LOMUSTINA - ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS E EXPRESSÃO DO MDR-1.

Amanda Resende Duarte*, Fúlvia Bueno de Souza[†], Carlos Eduardo Fonseca[‡]
Renée Laufer Amorim[§], José Paes de Oliveira Filho[¶], Alexandre Secorun
Borges^{**}, Fabíola Soares Zahn^{††} Luiz Henrique de Araújo Machado^{‡‡}.

*Mestranda do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP Botucatu;

[†]Residente do Departamento de Clínica Veterinária; FMVZ, UNESP Botucatu;

[‡]Doutorando do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP Botucatu;

[§]Professora Assistente Doutora do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP Botucatu;

[¶]Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP Botucatu;

^{**}Professor Adjunto Doutor do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP Botucatu;

^{††}Professora substituta do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP Botucatu;

^{‡‡}Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP-Botucatu;

Correspondência: Distrito de Rubião Jr, s/n Depto de Clínica Veterinária, CEP: 18618-070 cx postal: 560 Botucatu SP. E-mail: henrique@fmvz.unesp.br

Introdução: O linfoma cutâneo é considerado uma neoplasia incomum em cães, que apresenta pouca resposta à quimioterapia e baixa sobrevivência. A proliferação celular e a apoptose são importantes eventos na oncogênese que podem influenciar e contribuir para o prognóstico ruim. A resistência tumoral é a principal causa de falha terapêutica nas doenças oncológicas, sendo o gene MDR-1 o principal responsável pelo fenômeno de resistência a múltiplas drogas e o mais estudado até o momento tanto na Medicina como na Veterinária.

Hipóteses: Cães com Linfoma Cutâneo que apresentam altas taxas de proliferação celular, baixo índice de morte por apoptose e elevada expressão de MDR-1 possuem maior resistência tumoral, consequentemente menor resposta a quimioterapia e pior prognóstico.

Objetivos Correlacionar o índice de proliferação celular, apoptose e expressão gênica de MDR-1 com a resposta terapêutica ao uso de lomustina.

Animais Foram selecionados 15 cães com diagnóstico histopatológico de linfoma cutâneo.

Métodos: Os cães diagnosticados com linfoma cutâneo pela histopatologia foram submetidos à avaliação imunohistoquímica com os anticorpos anti-CD3, anti-CD79a, anti-caspase-3 e anti-MIB-1 e a expressão gênica do MDR-1 utilizando-se a técnica de qRT-PCR, todos os cães receberam tratamento quimioterápico com lomustina na dose de 90mg/m^2 por via oral, a cada 3 semanas e avaliou-se a resposta terapêutica a esta associação de resultados.

Resultados: Todos os animais foram diagnosticados com linfoma cutâneo de células T. A taxa de resposta clínica à quimioterapia foi de 53,3 % sendo que não houve remissões totais, apenas parciais. A média de sobrevida foi de 59,3 dias. Em 93,3 % (14/15) apresentaram alto índice de proliferação celular e todas as amostras analisadas (100%) apresentaram índice baixo de apoptose celular. Em 93,3 % dos animais expressaram o gene MDR-1 nas células tumorais no momento do diagnóstico, com níveis de expressão variando entre 1 e 148.

Conclusão: Observou-se moderada resposta ao tratamento com lomustina realizada com lomustina, porém não houve remissões totais e a sobrevida foi considerada baixa, reafirmando seu caráter altamente agressivo e pouco responsivo a quimioterapia. A alta taxa de proliferação celular, o baixo índice apoptótico e níveis consideráveis de expressão gênica de MDR-1 não foram significativamente correlacionados com a resposta clínica ou sobrevida dos animais avaliados. Acredita-se que a resistência tumoral tenha caráter multifatorial e que outros mecanismos de resistência possam estar envolvidos na oncogênese do linfoma cutâneo contribuindo assim para a pouca resposta terapêutica e prognóstico ruim nesta neoplasia em cães.

Introdução

O linfoma cutâneo canino é considerado uma doença incomum em cães, representando somente 1% das neoplasias cutâneas nessa espécie. Sua

apresentação clínica é bastante variável, podendo mimetizar diversas dermatopatias¹. Caracteriza-se pela infiltração de linfócitos T ou B neoplásicos, na derme, epiderme ou tecidos anexos². Apesar de infrequente, quando ocorre, essa neoplasia apresenta pouca resposta à quimioterapia, baixa expectativa de vida e altas taxas de recidiva, demonstrando um comportamento biológico agressivo.

A capacidade de se multiplicar descontroladamente somada à incapacidade de entrar em apoptose representam características importantes na carcinogênese de tumores malignos³. A identificação do índice proliferativo e do grau de apoptose pela técnica imunohistoquímica auxilia na identificação e seleção de tumores malignos auxiliando na escolha da terapia mais eficaz, além de estarem associados com valor prognóstico⁴. O prognóstico do linfoma cutâneo canino é difícil, pois varia de acordo com o estágio da doença no diagnóstico e com a resposta terapêutica⁵.

Uma das causas mais importantes de falha terapêutica nas doenças oncológicas na Medicina e na Veterinária é a resistência tumoral a múltiplas drogas (MDR)^{6,7}. Clinicamente, o fenômeno de resistência é observado quando ocorre falha no tratamento quer seja pela recidiva precoce ou pela refratariedade a ação de drogas citotóxicas, indicando a presença de células quimioresistentes.

Dentre os diversos mecanismos de resistência, o gene de resistência a múltiplas drogas denominado MDR-1, que codifica uma proteína transmembrana de alto peso molecular, a Glicoproteína P (P-gp) é o principal responsável pelo fenômeno MDR⁸. A P-gp atua como uma bomba de efluxo capaz de transportar compostos funcionalmente ativos para fora das células, diminuindo ou inativando sua ação⁹. Células tumorais que expressam glicoproteína P desenvolvem resistência a uma grande variedade de quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente distintos, representando um fator importante de insucesso no tratamento quimioterápico¹⁰.

A presença do gene MDR-1 e da P-gp na resistência tumoral intrínseca e na recidiva já foi detectada por diversos autores em diversas neoplasias caninas como no linfoma multicêntrico, carcinoma de células de transição e

osteossarcoma^{10,11,12,13,14,15}, no entanto, ainda não foi possível estabelecer uma correlação entre o grau de expressão gênica e a resposta terapêutica e sobrevivência desses animais. Apesar da grande quantidade de trabalhos científicos relacionados à resistência tumoral e fatores prognósticos no linfoma multicêntrico, pouco se conhece a respeito do comportamento biológico do linfoma cutâneo canino.

Objetivou-se nesse estudo estabelecer o grau de proliferação celular, apoptose e nível de expressão gênica do MDR-1 no linfoma cutâneo canino, a fim de se avaliar como esses fatores influenciam a resposta a quimioterapia com lomustina, sua relação com a resistência quimioterápica e prognóstica.

Materiais e Métodos

Os animais selecionados para esse estudo foram provenientes do serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais da FMVZ-UNESP Campus de Botucatu, todos provindos de proprietários que forneceram consentimento prévio para participação na pesquisa e autorizaram a colheita de sangue e urina de seus animais. Após aprovação pelo comitê de ética da UNESP, Botucatu (protocolo 131/2010), foram incluídos no projeto 15 cães com Linfoma Cutâneo, diagnosticados por biópsia cutânea e análise histopatológica, sendo 8 animais sem raça definida e 7 com raça definida, com faixa etária entre 5 e 17 anos.

Após o diagnóstico, os 15 cães selecionados foram submetidos ao tratamento com Lomustina (Citostal; Corden Pharma Latina S.p.A, Sermoneta, Itália) na dose de 10 ou 40 mg e a dose utilizada foi de 90mg/m² administrada por via oral a cada 3 semanas.

Os fragmentos de nódulos tumorais colhidos no momento do diagnóstico, e devidamente identificados foram fixados em formalina neutra tamponada a 10%. E em seguida submetidos aos procedimentos de rotina histológica e incluídos em parafina. Os cortes com espessura de 3µm foram corados pelo método de Hematoxilina & Eosina¹⁶ e examinados ao microscópio óptico.

Os estudos da linhagem celular dos linfomas foram realizados utilizando-se as técnicas padronizadas no Laboratório do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, baseada na metodologia descrita por HSU *et al.*, (1981)¹⁷, com algumas modificações e utilizando-se o seguinte painel de anticorpos: Anti-CD3(Dako,EUA), Anti-CD79a(Dako,EUA), anti-Caspase-3(Dako, EUA) e anti-MIB-1(Dako, EUA).

Os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79a foram utilizados para diferenciar os linfomas de acordo com a origem dos linfócitos, quer sejam linfócitos T ou B foram utilizados os mesmos protocolos já estabelecidos pelo Serviço de Patologia Veterinária¹⁸.

Os anticorpos anti-caspase-3, segundo descrito por Calderon (2005)¹⁹ e anti-MIB-1 (SUZANO *et al.*, 2008)¹⁸ foram utilizados para caracterizar o índice de apoptose e proliferação do tumor. Todas as lâminas foram analisadas quanto à presença de marcação, distribuição e localização das células com imunomarcação positiva. A avaliação da expressão do anticorpo anti-MIB-1 foi determinada pela coloração acastanhada dos núcleos e para o anticorpo anti-caspase-3, uma marcação acastanhada por todo o citoplasma da célula. Quando positivas, analisou-se a quantidade de células marcadas através de porcentagem, utilizando a classificação de cruces, proposta por Allred *et al.* (1998)²⁰, onde + (0 a 25%), ++ (25 a 50%), +++ (50 a 75%) e ++++ (acima de 75%) de células marcadas.

As amostras foram obtidas por *punch* e imediatamente acondicionadas em criotubos estéreis e imersas em nitrogênio líquido para congelamento, sendo posteriormente transferidas para “freezer” -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA foi extraído usando-se kit RNeasy Mini (Qiagen®) com a homogeneização das amostras utilizando-se colunas de centrifugação QIAshredder® (Qiagen®). O protocolo utilizado é o mesmo recomendado pelo fabricante. Ao final, o RNA foi diluído em 100 µL de água livre de RNase. Uma amostra de 1 µL RNA foi testada para pureza (A260/280) e a concentração analisada por espectrofotometria NanoDrop ND1000® (ThermoScientific®,USA), sendo imediatamente armazenada a -80°C.

Com o objetivo de eliminar algum DNA genômico residual extraído junto com o RNA, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima RQ1 RNase-Free DNase (PromegaTM; Madison, WI, USA). Em seguida, a concentração e pureza das amostras foram analisadas por espectrofotometria (Nano Drop®, ThermoScientific®,USA).

Para obtenção de cDNA foi utilizado o ImProm RT II (PromegaTM; Madison, WI, USA). Foram adicionados 800 µg de RNA, 500 ng de “random primer” e água (q.s.p.) livre de DNase e RNase até se obter um volume final de 10 µL. Após incubação a 70°C por 15 min para a desnaturação do RNA, a amostra foi rapidamente resfriada a 4°C para acréscimo de 2 µL (20 unidades) de RNase Out (Invitrogen®), 4 µL do tampão da reação (ImProm® II 5x reaction buffer), 2,4 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL da mistura de nucleotídeos (dNTP"s) à 20mM, 2 unidades da transcriptase reversa (ImProm® II RT) e 12,2 µL de água livre de DNase e RNase.

A expressão do mRNA (RNA mensageiro) do gene MDR1 (AF045016) foi realizada utilizando os primers forward 5'- CAGTGGTTCAGGTGGCCCT-3' e reverse 5'-CGAACTGTAGACAAACGATGAGCT-3' (gerando produto com tamanho 79pb) e a sonda 5'-FAM-CCAGAAAAGGCCGGACTACCATTGTGA-TAMRA-3, previamente descritos por CULMSEE *et al.*, (2004)²¹. O *Canis lupus familiaris* golgin A1 mRNA (GOLGA1) (XM_537849.3) foi utilizado como gene de referência (housekeeping gene). Os primers e a probe foram desenhados no programa Primer Express® for Real Time PCR (Applied Biosystems,USA).

As reações de qRT-PCR (reverse transcriptase PCR em tempo real) para a expressão do mRNA MDR1 e para o gene de referência foram realizadas utilizando a mesma concentração de primers e probes descrito por CULMSEE *et al.* (2004)²¹ e o master mix TaqMan® Universal PCR MasterMix (TaqMan® Gene Expression Master Mix Applied Biosystems, USA). A reação foi processada com o equipamento 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems USA). Uma curva de diluição seriada (5X) foi realizada, para cada um dos genes (alvo e referência), com o objetivo de verificar a eficiência de cada uma das qRT-PCR. A quantificação da expressão relativa do mRNA do gene MDR foi realizada utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizada pelo gene

de referência. O valor relativo de 1,0 foi atribuído aleatoriamente a uma amostra sendo a expressão das demais amostras foi calculada proporcionalmente.

De acordo com a distribuição das variáveis usadas, Ki67, caspase 3 e MDR-1 verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk, toda a análise estatística baseou-se em métodos não-paramétricos. Para verificar a influência das variáveis no tratamento foi utilizado o Teste de Mediana de Mood, com nível de significância de 95%. O teste de Correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre as variáveis Ki67, Caspase 3 e MDR-1 com o tempo de sobrevivência dos animais avaliados.

Resultados

Dos 15 cães selecionados, 53,3% (8/15) eram SRD e 46,7% (7/15) com raça definida, sendo que destes, houve 14,3% (1/7) de cada uma das raças a seguir: Border Collie, Boxer, Dálmata, Labrador, Lhasa Apso, Pit Bull e Poodle. A idade média no momento do diagnóstico foi de $128,4 \pm 48,7$ meses e, quanto ao sexo, 53,3% eram machos e 46,7% fêmeas. Em relação à avaliação histopatológica, 86,6 % (13/15) foram diagnosticados como linfoma cutâneo não epiteliotrópico (LCNE) e 13% (2/15) com linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE).

Todos os animais avaliados foram tratados com lomustina, apresentando uma taxa de resposta a quimioterapia de 53,3% (8/15), sendo que não houve remissões completas (RC), somente remissões parciais (RP). A média de sobrevida foi 59,3 dias.

Realizou-se imunofenotipagem, a fim de obter dados de valor prognóstico relacionados ao comportamento biológico desses tumores, tempo de sobrevida e escolha da terapia. Todos os 15 animais avaliados foram positivos para o anticorpo CD3+, ou seja, imunofenótipo T (Figura 1).

Para avaliar o grau de proliferação celular neste trabalho, foi realizada a técnica de imunohistoquímica com utilização do anticorpo Anti-MIB-1. Das 15

amostras avaliadas, 93,3 % (14) apresentaram alto índice de proliferação celular (75 a 100%) (Figura 2) e apenas um animal (6,6%) com baixo índice de proliferação celular (0 a 25%). O índice de apoptose celular foi avaliado e todas as amostras analisadas (100%) apresentaram índice baixo de apoptose celular, como demonstrado na figura 3.

Foram extraídos RNAs totais das amostras colhidas previamente à realização da quimioterapia nesses animais. A expressão do MDR1 foi obtida em 14 das 15 amostras de linfoma canino inicialmente previstas. Infelizmente, o cDNA gerado a partir do RNA extraído de uma das amostras de linfoma não apresentou expressão, quer do gene alvo ou do gene endógeno. Sendo assim, a expressão do mRNA do gene MDR foi excluída do experimento.

Os 14 cães avaliados expressaram o mRNA para o gene MDR-1, apresentando diferentes níveis de expressão, conforme ilustrado no gráfico 1. Os valores de expressão gênica variaram entre 1,0 e 148,0 para o gene MDR-1, no momento do diagnóstico.

Discussão

O tempo médio de sobrevivência nos animais avaliados foi de 59,3 dias, menor do que o relatado por Willians *et al.* (2006)²². Este fato pode estar relacionado ao diagnóstico tardio da doença, visto que o linfoma cutâneo possui uma apresentação clínica bastante variável podendo mimetizar diversas dermatopatias². O predomínio do imunofenótipo de células T nos linfomas cutâneos em todos os cães avaliados também pode ser uma das possíveis explicações para a baixa taxa de sobrevida nesses animais, pois se sabe que cães com linfoma de células T respondem menos a quimioterapia, apresentam períodos de remissão mais curtos, expectativa de vida menor e óbito mais precoce quando comparado aos cães com linfoma de células B^{23, 24}.

Comparando-se as características histológicas com a taxa de sobrevivência foi possível identificar que os animais que apresentaram menor tempo de sobrevida (9 e 10 dias respectivamente) foram ambos classificados como linfoma cutâneo epiteliotrópico. Contudo, esse achado não permite

afirmar que o LCE possui um comportamento biológico mais agressivo e um pior prognóstico em relação ao LCNE.

O presente estudo demonstrou que 93,3% das amostras analisadas apresentaram alto índice de proliferação celular, evidenciando que o linfoma cutâneo em cães possui elevado grau de malignidade e prognóstico desfavorável, visto que a média de sobrevida foi de apenas 59,3 dias. Em humanos, o alto índice de Ki-67 foi correlacionado com uma menor sobrevida em pacientes com linfoma Não Hodgkin²⁵, no entanto, baseado nos resultados obtidos, não foi possível estabelecer uma correlação entre a taxa de proliferação celular e a sobrevivência ($P > 0,05$).

A capacidade de evasão à apoptose é considerada uma das principais características das células tumorais malignas, permitindo uma maior sobrevida e pouca resposta ao tratamento quimioterápico²⁶. Investigações sugerem que tanto o nível da expressão da caspase-3 como a sua forma de marcação intracitoplasmática tem relação com a progressão tumoral. Neoplasias altamente agressivas possuem uma expressão citoplasmática menor de caspase-3 que as de grau baixo²⁷. O'DONOVAN *et al.*, (2003)²⁸ consideraram que a diminuição da expressão de caspase pode indicar um importante mecanismo de resistência celular. Todas as amostras avaliadas apresentaram pouca ou nenhuma atividade apoptótica, indicando um baixíssimo índice de morte celular no momento do diagnóstico. Portanto não foi possível estabelecer uma correlação entre o índice apoptótico e a sobrevivência dos animais.

Os resultados obtidos pela análise imunohistoquímica (Tab.1) demonstram que essas células tumorais apresentam um descontrole na sua capacidade proliferativa e uma incapacidade de entrar em apoptose. Baseado nessas características talvez seja possível explicar porque apesar dessas células mostrarem atividade proliferativa intensa não houve uma boa resposta ao tratamento quimioterápico, visto que só ocorreram remissões parciais. Segundo GRIVICICH *et al.*, (2007)²⁹, essas duas características associadas levam a um fenótipo de resistência tumoral, sendo uma das características mais marcantes dos tumores malignos.

REZENDE (2004)³⁰ avaliou a expressão de MDR-1 em cães com linfoma multicêntrico através da técnica de PCR convencional, encontrando uma frequência de expressão intrínseca de 93,3% no diagnóstico e de 100% na recidiva tumoral. BERGMAN *et al.*; (1996)³¹ e LEE *et al.*; (1996)¹² utilizaram métodos de análise imunohistoquímica em cães com linfoma e ambos encontraram um aumento progressivo na positividade das células para P-gp (proteína expressa pelo gene MDR-1) no diagnóstico e na recidiva, sugerindo que o mecanismo MDR-1/P-gp estivesse envolvido na resistência e principalmente na recidiva tumoral, justificando a pouca resposta ao tratamento. A constatação do aumento da expressão de MDR-1/P-gp na recidiva tumoral pode ajudar a elucidar porque a resposta à terapia é menor, pois quanto mais P-gp na célula tumoral, maior a sua capacidade de reverter a citotoxicidade. No presente trabalho não foi avaliado a expressão gênica na recidiva.

As análises utilizando técnicas de imunohistoquímica e PCR convencional revelam valores qualitativos, isto é, a presença ou ausência do gene na amostra, mas não são capazes de quantificar o nível de expressão genica de cada amostra. Não existe concordância entre os diversos trabalhos quanto às concentrações de MDR-1 capazes de determinar o fenótipo MDR³⁰. Alguns estudos afirmam que é necessário um determinado nível de expressão para sua manifestação.

Neste estudo, foi utilizada uma análise quantitativa, através da técnica q-RT-PCR, ou PCR em tempo real. Todas as amostras avaliadas apresentaram algum nível de expressão, revelando diferenças significativas entre elas no ato do diagnóstico. Esperava-se que com o aumento na expressão do gene MDR-1, ocorresse menor resposta à terapia e diminuição do tempo de sobrevida. No entanto, o presente trabalho constatou que os animais que apresentaram alta expressão do gene MDR-1, responderam bem a terapia inicial, enquanto que outros animais com baixa expressão de MDR-1 não mostraram qualquer resposta ao tratamento instituído. Esta constatação nos permite inferir que o gene MDR-1 apesar de estar presente em todas as amostras e em concentrações elevadas em algumas delas não teve influência na resposta

terapêutica e na sobrevida dos cães com linfoma cutâneo avaliados neste estudo ($p>0.05$) (gráfico 1).

Deve-se considerar que foi avaliado nesse estudo a presença e o grau de expressão gênica do MDR-1, mas não foi determinado o nível de expressão da P-gp nem a sua funcionalidade, o que poderia ajudar a explicar a pouca resposta à quimioterapia mesmo em altas concentrações de MDR-1, se a P-gp existente estivesse afuncional.

Desta forma, utilizando métodos quantitativos, foi possível verificar resposta à terapia de indução mesmo com altos níveis de expressão de MDR-1. Acredita-se que outros mecanismos de resistência tumoral estejam envolvidos na oncogênese do linfoma cutâneo em cães, visto que neste trabalho foi avaliada somente a influência do gene MDR-1. A avaliação imunohistoquímica do linfoma cutâneo nesse estudo revelou uma baixa taxa de positividade para caspase 3, podendo sugerir que a resistência tumoral é um evento multifatorial e que mecanismos relacionados à evasão a apoptose também possam estar envolvidos e contribuindo para a pouca resposta terapêutica e o mau prognóstico dessa neoplasia em cães.

Conflitos de Interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse, finanças ou relacionamentos com outras pessoas ou organizações que poderiam de forma inadequada influenciar o seu trabalho.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos de mestrado, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio financeiro (processo nº2010/15928-0).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fontaine J, Bovens C, Bettenay S et al. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Veterinary and Comparative Oncology* 2009; 7:1-14.
2. Bizikova P, Linder KE, Suter SE et al. Canine Cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with vesiculobullous lesions resembling human bullous mycosis fungoides. *Veterinary Dermatology* 2009; 20:281-288.
3. De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JPA. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *British Journal of Cancer* 2000; 82: 368–373.
4. Loremier LP. Updates on the Management of Canine Epitheliotropic Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Veterinary Clinics of Small Animal Practice* 2006; 36: 213-228.
5. Abreu E, Koiffman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2002; 48: 113-131.
6. Germann UA. P-glycoprotein - A Mediator of Multidrug Resistance in Tumour Cells. *European Journal of Cancer* 1996; 32: 927-944.
7. Lehnert M. Clinical Multidrug Resistance in Cancer: A Multifactorial Problem. *European Journal of Cancer* 1996; 32: 912-920.
8. Bates SE. Drug Resistance: Still on the Learning Curve. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 3346–3348.
9. Campa D, Butterbach K, Slager SL, A comprehensive study of polymorphisms in the ABCB1, ABCC2, ABCG2, NR1I2 genes and lymphoma risk. *International Journal of Cancer* 2012; 1- 34.
10. Mealey KL, Barhoumi R, Rogers K et al. Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. *Cancer Letters* 1998; 126:187-192.
11. Moore PF, Olivry T. Cutaneous Lymphomas in Companion Animals. *Clinics in Dermatology* 1994; 12:499-505.
12. Lee JJ, Hughes CS, Fine RL et al. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer* 1996; 77: 1892-1898.

13. Steingold SF, Sharp NJ, McGahan MC et al. Characterization of canine MDR1 mRNA: its abundance in drug resistant cell lines and in vivo. *Anticancer research* 1998; 18: 393-400.
14. Uozurmi K, Nakaichi M, Yamamoto Y et al. Development of multidrug resistance in a canine lymphoma cell line. *Research in Veterinary Science* 2005; 78: 217-224.
15. Lee JY, Tanebe S, Shimohira H et al. Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. *Research in Veterinary Science* 2007; 83: 210-216.
16. Luna LG. *Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology*. Washington: McGraw Hill, 1968, 258p.
17. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1981; 29: 577-580.
18. Suzano SMC, Sequeira JL, Pessoa AWP et al. Proliferação celular nos linfomas caninos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2008; 45: 313-319.
19. Calderón C. Avaliação do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica, imunohistoquímica e imunomarcagem de COX-2. 2005. 150f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
20. Allred CD, Harvey JM, Berardo M et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology* 1998; 11:155-168.
21. Culmsee K, Gruber AD, Von Samson-Himmelstjerna et al. Quantification of MDR-1 gene expression in canine tissues by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 2004; 77: 223-229.
22. Williams LE, Rassinick KM, Power HT et al. CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; 20: 136-143.

23. Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 292-300.
24. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice* 2001; 42: 377-384.
25. Broyde A, Boycov O, Strenov Y et al. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *American journal of hematology* 2009; 84: 338-343.
26. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
27. Donoghue S, Baden HS, Lauder I et al. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Research* 1999; 59: 5386-5391.
28. O'Donovan N, Crown J, Stunell H et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2003; 9:738-742.
29. Grivicich I, Regner, A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53: 335-343.
30. Rezende BCG Estudo da Resistência a Múltiplas Drogas no Linfoma Canino. (Study of multiple drug resistance in canine lymphoma). 2005.121f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
31. Bergman, PJ, Ogilvie, GK, Powers BE. Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1996; 10: 354-359.
32. Jillella P, Murren JR, Khawaja KH et al. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in cutaneous lymphoma. *Cancer Investigation* 2000; 18:609-613.

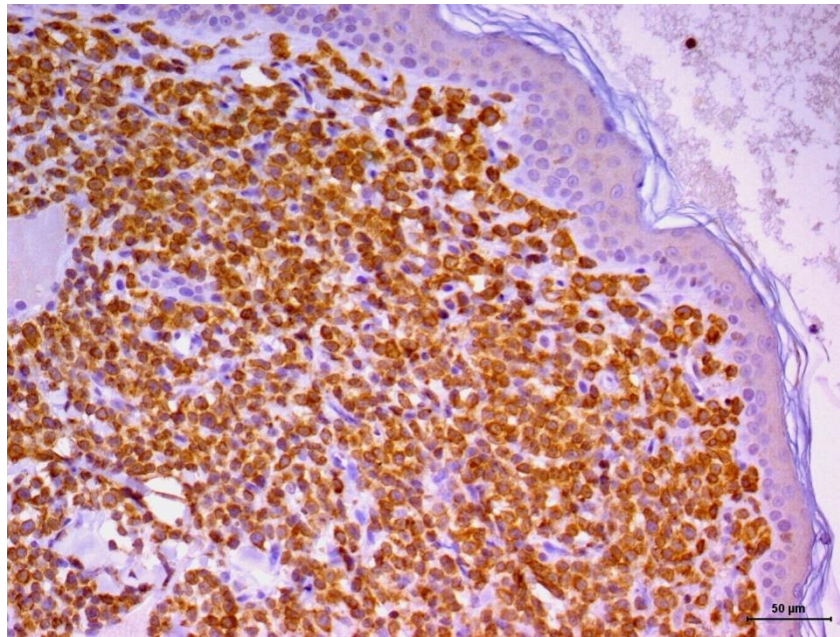


Figura 1. Pele. Linfoma Cutâneo em cão. Fotomicrografia de preparação imunohistoquímica mostrando imunorreatividade para CD3 (Obj 20x).

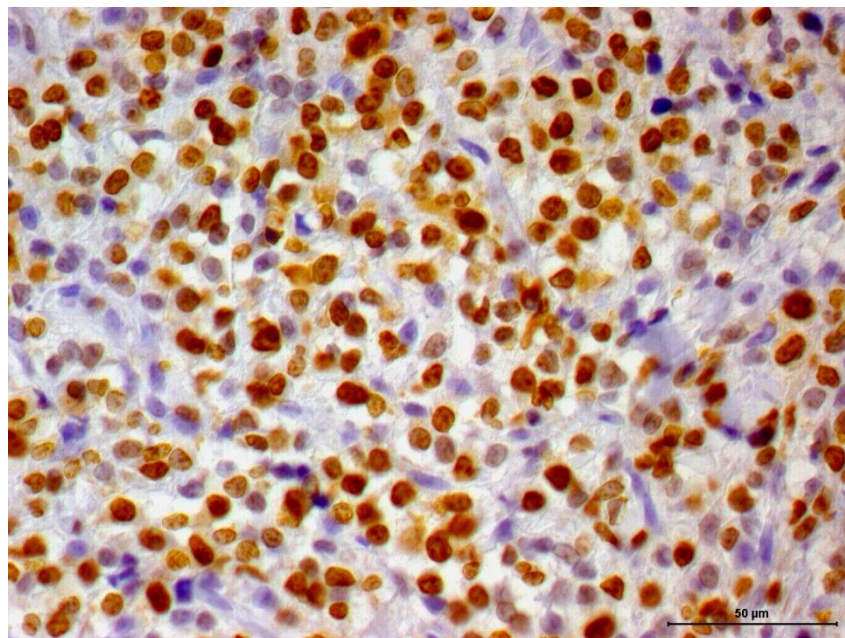


Figura 2. Pele. Linfoma Cutâneo em cão. Fotomicrografia de preparação imunohistoquímica mostrando intensa imunorreatividade (> 75%) para KI-67 (Obj 40x).

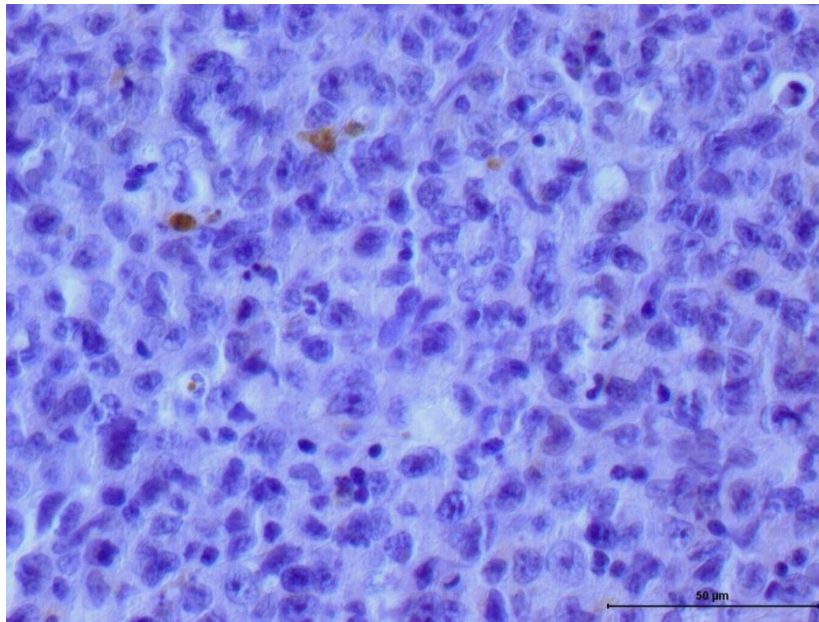


Figura 3. Pele. Linfoma Cutâneo em cão. Fotomicrografia de preparação imunohistoquímica mostrando pouca marcação celular (<25%) para atividade de caspase 3 (obj 40x).

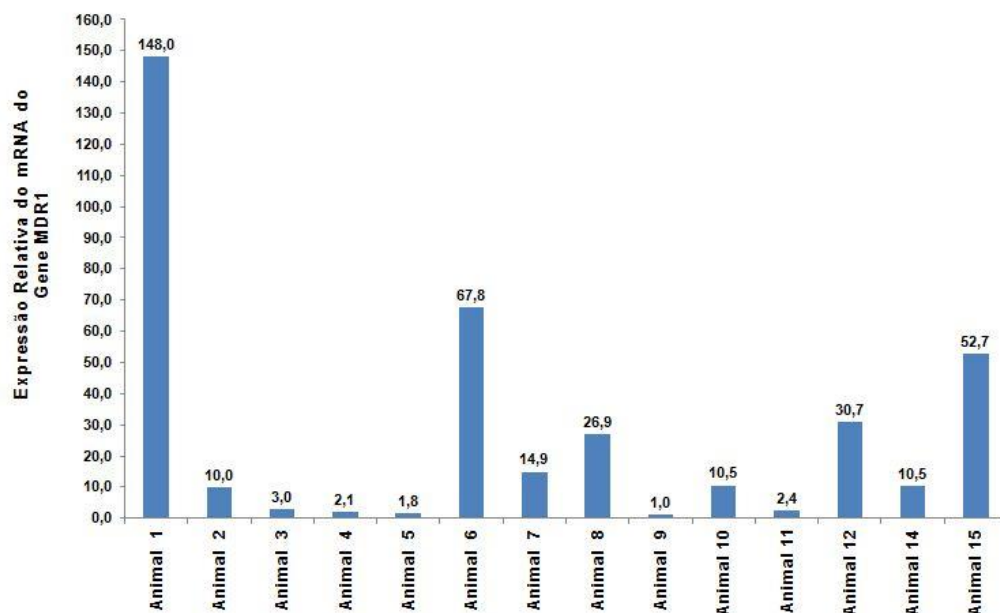


Figura 4. Expressão relativa do mRNA do MDR-1 utilizando a qRT-PCR em 14 amostras de linfoma canino.

Tabela 1. Resultados referentes à análise imunohistoquímica para CD3, CD79, Ki-67 e Caspase 3 nas 15 amostras de linfoma cutâneo canino.

Identificação	CD3+	CD79a	Ki- 67	Caspase 3
1	Positivo	Negativo	++++	+
2	Positivo	Negativo	++++	+
3	Positivo	Negativo	++++	+
4	Positivo	Negativo	++++	+
5	Positivo	Negativo	+	+
6	Positivo	Negativo	++++	+
7	Positivo	Negativo	++++	+
8	Positivo	Negativo	++++	+
9	Positivo	Negativo	+++	+
10	Positivo	Negativo	++++	+
11	Positivo	Negativo	++++	+
12	Positivo	Negativo	++++	+
13	Positivo	Negativo	++++	+
14	Positivo	Negativo	++++	+
15	Positivo	Negativo	++++	+

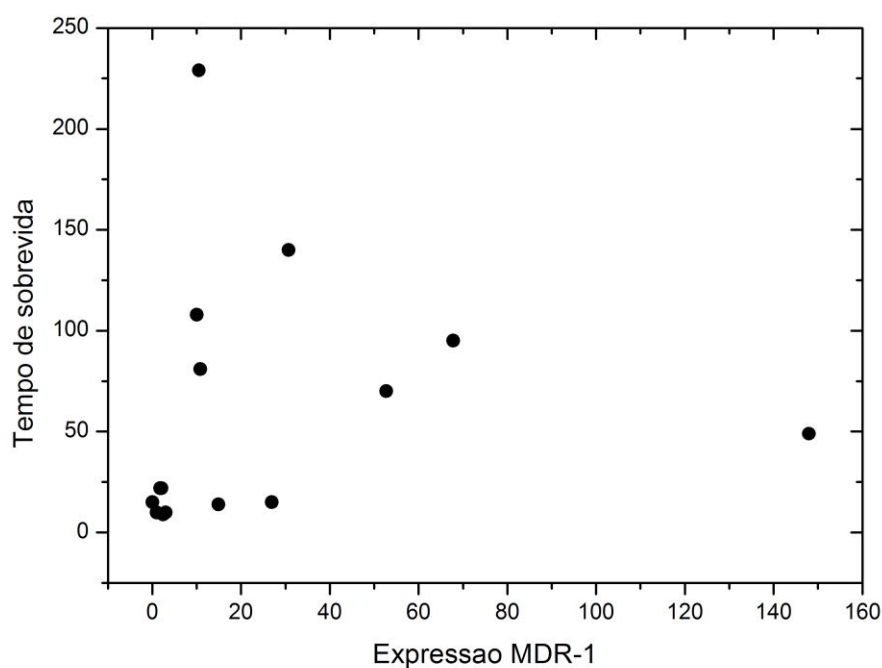


Gráfico 1 . Sobrevida em função da expressão genica de MDR-1.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

O linfoma cutâneo (LC) é considerado uma neoplasia incomum em cães, mais frequente em animais de meia idade e idosos, como pode ser visto neste trabalho, a média de idade no momento do diagnóstico foi de $10,7 \pm 4$ anos. Não houve predileção racial ou sexual nos animais avaliados.

Quanto à avaliação histopatológica, 86,6 % foram diagnosticados como linfoma cutâneo não epiteliotrópico (LCNE) e 13% com linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE). Esse achado contradiz RIBSON *et al*, (2006) e MOORE *et al*, (2013) que afirmam que o linfoma cutâneo epiteliotrópico é o tipo histológico mais comumente observado. No entanto, vale ressaltar, que o número de animais avaliados foi pequeno, podendo levar a resultados superestimados.

O uso da Lomustina (CCNU) como monoterapia neste estudo foi baseada nos trabalhos de WILLIAMS *et al*, (2006) e RIBSON *et al*, (2006) que obtiveram respostas terapêuticas superiores a 70% no tratamento do LCC. Contudo, no presente trabalho, a taxa global de resposta foi de 53,3 %, inferior aos trabalhos previamente realizados, porém deve-se considerar o estágio da doença no ato do diagnóstico e que a sensibilização e/ou associação com outros quimioterápicos realizadas nos estudos anteriores podem influenciar na resposta terapêutica. As características histológicas do linfoma cutâneo também podem ter influenciado na resposta terapêutica, visto que nesse estudo o predomínio da população foi de linfoma cutâneo não epiteliotrópico em comparação com os estudos acima citados, onde 100% dos cães apresentavam linfoma cutâneo epiteliotrópico.

Na avaliação laboratorial dos animais em tratamento com CCNU foi possível demonstrar sua intensa ação imunossupressora, principalmente por neutropenia, 93,3 % dos animais apresentaram-se leucopênicos, sendo que 26% apresentaram leucopenia importante <500 células/ μ L, o que reafirma os resultados obtidos por KRISTAL *et al*, 2004. Também foram observadas anemia e trombocitopenia, no entanto, sem necessidade de transfusões sanguíneas ou desenvolvimento de quadros hemorrágicos.

A toxicidade gastrointestinal foi reconhecida em 60% dos animais, representada neste estudo principalmente pela anorexia, seguida por êmese e diarreia. Hepato e nefrotoxicidade também foram achados importantes em nosso estudo. Em 93,3 % dos animais, apresentaram elevações significantes nos níveis séricos de ALT, FA E GGT no fim em relação ao início do tratamento, reforçando a teoria de KRISTAL *et al.*, (2004) e HOSOYA *et al.*, (2009) de que o uso de CCNU pode levar a injúria hepatocelular e colestase. Nenhum dos animais apresentou sinais clínicos de insuficiência hepática no presente trabalho.

Elevações nos níveis séricos de ureia e creatinina foram identificadas em 66,6% dos pacientes no momento 3, além de proteinúria evidente e baixa densidade urinária. Esses achados nos permite prever nefrotoxicidade, pois a diminuição da densidade urinária é o primeiro sinal de lesão tubular renal e a proteinúria é considerada um indicador de lesão glomerular e tubular renal e pode estar presente no estágio inicial da doença renal antes do desenvolvimento de azotemia (POLZIN, 2007). O uso de doses mais baixas de lomustina pode reduzir seu efeito cumulativo e diminuir sua toxicidade, levando a uma maior reversibilidade dos sinais clínicos.

A avaliação imunohistoquímica constatou que todos os animais avaliados (100%) foram positivos para o anticorpo CD3+, ou seja, imunofenótipo T, 93,3% apresentaram alto índice de proliferação celular e 100% das amostras avaliadas mostraram pouca ou nenhuma atividade apoptótica, indicando um baixíssimo índice de morte celular no momento do diagnóstico. Segundo KIUPPEL *et al.*(1999) e DOBSON *et al.*, (2001) cães com linfoma de células T respondem menos a quimioterapia, apresentam períodos de remissão mais curtos, expectativa de vida menor e óbito mais precoce que cães com linfoma de células B. A alta taxa de proliferação celular está diretamente relacionada ao grau de malignidade tumoral e neoplasias altamente agressivas possuem uma expressão citoplasmática menor de caspase-3 que neoplasias menos agressivas (DONOGUE *et al.*, 1999).

Portanto, a constatação do predomínio do imunofenótipo T associado à alta taxa de proliferação celular e baixo índice apoptótico afirma que LCC é um

tumor maligno, com comportamento biológico agressivo e baixa expectativa de vida, visto que a média de sobrevida dos animais foi de apenas 59,3 dias. Estatisticamente esses achados não tiveram correlação com a sobrevida.

Avaliou-se de forma quantitativa a expressão do gene MDR-1 no LCC através da técnica de qRT-PCR. Todas as amostras apresentaram algum nível de expressão, revelando diferenças significativas entre elas no ato do diagnóstico, variando entre 1,0 e 148,0. Esperava-se que animais com altos níveis de expressão de MDR-1 apresentassem menor resposta terapêutica e pior prognóstico, visto que quanto mais P-GP na célula tumoral, maior a sua capacidade de reverter a citotoxicidade quimioterápica. No entanto, apesar do gene MDR-1 estar presente nas amostras e em concentrações elevadas em algumas delas, não teve influência na resposta terapêutica e na sobrevida dos cães com linfoma cutâneo avaliados neste estudo.

CONCLUSÕES FINAIS

CONCLUSÕES FINAIS

O linfoma cutâneo canino é uma doença de prognóstico ruim, com pouca resposta a terapia, recidiva precoce e tempo de sobrevida baixo, como pôde ser mostrado em nosso estudo. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a lomustina como monoterapia é uma opção viável no tratamento do linfoma cutâneo canino, visto que apresentou resposta terapêutica superior a 50%, no entanto, comprovou-se sua ação deletéria cumulativa em cães, com destaque para mielossupressão e hepato/nefrotoxicidade podendo agravar a apresentação clínica. Na análise imunohistoquímica, a alta taxa de proliferação celular, o baixo índice apoptótico e a predominância do imunofenótipo T, confirmam um comportamento biológico agressivo, uma tendência à evasão a apoptose e um prognóstico ruim. Comprovou-se a expressão gênica do MDR-1 no linfoma cutâneo canino em níveis consideráveis, no entanto, não houve correlação entre a expressão gênica, a resposta terapêutica e a sobrevida desses animais. A resistência tumoral é considerada um evento multifatorial que não deve ser avaliado somente pelo mecanismo de resistência a múltiplas drogas e sim pela associação e interação dos diversos mecanismos existentes. O conhecimento aprofundado da carcinogênese proporciona avanços que conduzem à escolha da melhor terapia, podendo-se chegar a uma individualização da conduta terapêutica, visando qualidade de vida e bem estar para os pacientes com câncer.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIE, J.J.; AMARDEILH, M.A.; DELVERDIER, M.E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215 p.1629-1633, 1999.
- ABREU, E. E KOIFFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2002, v, 48, n.1, p. 113-131.
- ALLRED, C.D., HARVEY, J.M., BERARDO, M., CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern Pathology**, v.11, n.2, p.155-168, 1998.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA L.C.B.; MONTARANI, C.A.; DONNICI, L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.
- AMBUDKAR, S.V.; KIMCHI-SARFATY, C.; SAUNA, Z.E.; GOTTESMAN, M.M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v.22, p.7468-7485, 2003.
- BACCHI, C.E.; GOWN, A.M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.26, p.677-687, 1993.
- BATES, S.E. Drug Resistance: Still on the Learning Curve. **Clinical Cancer Research**, v.5, p.3346–3348, 1999.
- BENTUBO, H.D.L.; TOMAZ, M.A.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Expectativa de vida e causa de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v.37, p.121-126, 2007.
- BERGER, W.; SETINEK, U.; HOLLAUS, P.; ZIDEK, T.; STEINER, E.; ELBLING, L.; CANTONATI, H.; ATTEMS, J.; GSUR, A.; MICKSCHE, M. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, p.355 - 363, 2005.
- BERGMAN, P.J. Mechanisms of anticancer drug resistance. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.33, p. 651-667, 2003.
- BERGMAN, P.J.; OGILVIE, G.K.; POWERS, B.E. Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and

predictive ability in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10, p.354-359, 1996.

BIZIKOVA, P.; LINDER, K.E.; SUTER, S.E et al. Canine Cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with vesiculobullous lesions resembling human bullous mycosis fungoides. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p.281-288, 2009.

BRENN,S.H.;COUTO.S.S.;CRAFT,D.M.;LEUNG.C.;BERGMAN,P.J. Evaluation of P-glycoprotein expression in feline lymphoma and correlation with clinical outcome. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.3, p.201-211, 2008.

BROYDE, A.; BOYCOV, O.; STRENOV, Y.; OKON,E.; SHPILBERG,O.; BAIREY,O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. **American Journal of Hematology**, v.84, n.6, p.338-343, 2009.

CALAZANS, S. **Análise mutacional do gene supressor de tumor TP53 e imunorreatividade da p53 em linfomas caninos**. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CALDERÓN, C. **Avaliação do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica, imunoistoquímica e imunomarcagem de COX-2**. 2005. 150f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CAMPA, D.; BUTTERBACH, K.; SLAGER, S.L. A comprehensive study of polymorphisms in the ABCB1, ABCC2, ABCG2, NR1I2 genes and lymphoma risk. **International Journal of Cancer**, p.1- 34, 2012.

COLE,S.P.;BHARDAWAJE,G.;GERLACH,J.H.;MACKIE,J.E.;GRANT,C.E. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistance human lung cancer cell line.**Science**,v.248, p.1650-1654,1992.

CULMSEE, K., GRUBER, A.D., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., NOLTE, I. Quantification of MDR-1 gene expression in canine tissues by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v.77, p. 223-229, 2004.

DE JONG, J. S.; VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P .A. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 2, p. 368–373, 2000.

DENAULT, J.B, SALVESEN, G.S. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chemical Reviews**, v.102, p. 4489-500, 2002.

DOBSON, J.M.; BLACKWOOD, L.B.; MCINNES, E.F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T.M.; TOM, B.D.M. Prognostic variables in canine

multicentric lymphosarcoma. **Journal of Small Animal Practice**, v.42, p.377-384, 2001.

DONOGHUE, S.; BADEN, H.S.; LAUDER, I.; SOBOLEWSKI, S.; PRINGLE J.H. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. **Cancer Research**, v.59, p.5386-5391, 1999.

FISHER, D.E. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**, v.15, p.931-956, 2001.

FLORY, A.B.; RASSNICK, K.M.; AL-SARRAF, R.; BAILEY, D.B.; BALKMAN, C.E.; KISELOW, M.A.; AUTIO, K. Combination of CCNU and DTIC Chemotherapy for Treatment of Resistant Lymphoma in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p.164–171, 2008.

FONTAINE, J., BOVENS.C. BETTENAY.S.; MUELLER, R.S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.7, p.1-14, 2009.

FOURNEL-FLEURY,C.;MAGNOL,J.P.;CHABANNE,I.;GHERNATI,I.; MARCHAL,T.; BONNEFOND,C.; BRYON,P.A.; FELMAN,P. Growth Fractions in Canine Non-Hodgkin's Lymphomas as Determined *In Situ* by the Expression of the Ki-67 Antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v.117, p.61-72, 1997.

FOURNEL-FLEURY,C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell Lymphoma: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Veterinary Pathology**, v.32, p.92-109, 2002.

FRANKS, L.M. O que é câncer? In: FRANKS, L.M.; TEICH, N. (Eds.). **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. São Paulo: Roca, 1990. p.1-24.

GERMANN, U.A. P-glycoprotein - A Mediator of Multidrug Resistance in Tumour Cells. **European Journal of Cancer**, v. 32 ,n. 6, p. 927-944, 1996.

GESKE, F.J.; GERSCHENSON, L.E. The biology of apoptosis. **Human Pathology**, v. 32, p.1029-1038, 2001.

GINN, P.E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Veterinary Pathology**, v.33, p. 533-541, 1996.

GOTTESMAN, M.M.; FOJO, T.; BATES, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature**, v.2, p.48-58, 2002.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, p.335-343, 2007.

GROSCH, S.; MAIER, T.J.; SCHIFFMANN, S.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-2 (COX-2) – Independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 Inhibitor. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, p.736-747, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.

HEADING, K.L.; BROCKLEY, L.K.; BENNETT, P.F. CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002–07). **Australian Veterinary Journal**, v.89, p.109–116, 2011.

HOSOYA, K.; LORD, L.K.; LARAGARCIAL, A.; KISSEBERTH, W.C.; LONDON, C.A.; COUTO, C.G. Prevalence of elevated alanine transaminase activity in dogs treated with CCNU (Lomustine). **Veterinary and Comparative Oncology**, v.7, p. 244-255, 2009.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.29, p.577-580, 1981.

HUBER, C.P.; MARUIAMA, C.; ALMEIDA, W.P. Glicoproteína P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v.33, p. 2148-2154, 2010.

HUBER, C.P.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

ISHIKAWA, T.; LI, Z.S.; LU, Y.P.; REA, P.A. The GS-X Pump in Plant, Yeast, and Animal Cells: Structure, Function, and Gene Expression. **Bioscience Reports**, v.17, p.189-207, 1997.

JEON, S.; LEE, M.; PARK, J.; KANG, S.H. Fast molecular diagnostics of canine T-cell lymphoma by PCR and Capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detector. **Journal of Chromatography B**, v.854, p.268-272, 2007.

JILLELLA, A.P.; MURREN, J.R.; KHAWAJA, K.H.; LONGLEY, B.J.; EDELSON, R.L.; COOPER, D.L. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in cutaneous lymphoma. **Cancer Investigation**, v.18, p.609-613, 2000.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic, 916p, 2008.

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

KNOBLER, E. Current management strategies for cutaneous T-cell lymphoma. **Clinical Dermatology**, v.22, n.3, p.197-208. 2004.

KRISTAL, O.; RASSINICK, K.M.; GLIATTOO, J.M et.al. Hepatotoxicity associated with CCNU (lomustine) chemotherapy in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** v.18, p.75–80, 2004.

LAGE, H. ABC transporters: implications of drug resistance from microorganisms to human cancer. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, p.188-199, 2003.

LEE, J.J.; HUGHES, C.S.; FINE, R.L.; PAGE, R.L. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. **Cancer**, v.77, n.9, p. 1892-1898, 1996.

LEHNERT, M. Clinical Multidrug Resistance in Cancer: A Multifactorial Problem. **European Journal of Cancer**, v.32, n.6, p.912-920, 1996.

LEONARD, G.D.; FOJO, T.; BATES, S.E. The rule of ABC transporters in clinical practice. **The Oncologist**, v.8, p.411-424, 2003.

LOREMIER, L.P. Updates on the Management of Canine Epitheliotropic Cutaneous T-Cell Lymphoma. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v.36, p.213-228, 2006.

LOWE, S.W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v.21, p.485-495, 2000.

LUCINDA, L.M.F. **Mecanismos de indução da apoptose por glicocorticóides e seus efeitos no câncer**. Monografia-Universidade Estadual de Juiz de fora, 2009.

LUNA, L.G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: McGrawHill, 258p, 1968.

MEALEY, K.L.; NORTHRUP, N.C.; BENTJEN, S.A. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR-1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.223, n.10, p.145-1455, 2003.

MEALEY, K.L; BARHOUMI, R.; ROGERS, K.; KOCHEVAR, D.T. Doxorubicin induced expression of P-glicoprotein in a canine osteosarcoma cell line. **Cancer Letters**, v.126, p.187-192, 1998.

MICHELL, A.R. Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Records**, v.27, p. 625-629, 1999.

MILNER, R.J.; PEARSON, J.; NESBITT, J.W.; CLOSE, P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. Onderstepoort. **Journal Veterinary Research**. v.63, p.309-313, 1996.

MOORE, A.S; LEVEILLE, C.R.; REIMANN, K.A.; SHU, H.; ARIAS, I.M. The expression of p-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. **Cancer investigation**, v.13, n.5, p.475-479, 1995.

MOORE, A.S, LONDON, C.A, WOOD, C.A, et al. Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 395 –398, 1999.

MOORE, P.F; OLIVRY, T. Cutaneous Lymphomas in Companion Animals. **Clinics in Dermatology**, v.12, p.499-505, 1994.

MOSSINKI, M.H.; VAN ZON, A.; SCHEEPER, R.J.; SONNEVELD, P.; WEIMER, E.A.C. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? **Oncogene**, v.22, p.7458-7467, 2003.

NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ**, v.6, p.1028-1042, 1999.

O'BRIEN, M.L.; TEW, K.D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. **European Journal of Cancer**, v.32A, p.967–978, 1996.

O'DONOVAN, N.; CROWN, J.; STUNELL, H.; HILL, A.D.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M.J. Caspase 3 in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 738-742, 2003.

PHILLIPS, B.S.; KASSP, H.; NAYDAN, D.K.; WINTHROP, M.D.; GRIFFEY, S.M.; MADWEWELL, B.R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.12, n.2, p.111-7, 2000.

POLZINI, D.J. Investigating proteinuric kidney disease. **Veterinary Medicine**, v.102, n.12, p.784-785, 2007.

RASSNICK, K.M, MOORE, A.S, WILLIAMS, L.E, et al. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (Lomustine). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 601–605, 1999.

RENES, J.; De VRIES, E.G.E.; JANSEN, L.M.; MÜLLER, M. The (path) physiological functions of the MRP family. **Drug Resistance Updates**, v.3, p. 289-302, 2000.

REZENDE, B.C.G. **Estudo da Resistência a Múltiplas Drogas no Linfoma Canino**. (Study of multiple drug resistance in canine lymphoma). 2005.121f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RIBSON, R.E.; DELORIMIER, L.P.; SKORUPSKI, K.; BURGESS, K.E.; BERGMAN, P.J.; CARRERAS, J.; HAHN, K.; LEBLANC, A.; TUREK, M.; IMPELLIZERI, J.; WOJCIESZYN, J.W.; DROBATZ, K.; CLIFFORD, C.A. Response of Canine Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma to Lomustine (CCNU): A Retrospective Study of 46 Cases (1999–2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.1389–1397, 2006.

ROULET, A.; PUEL, O.; GESTA, S.; LEPAGE, J.F.; DRAG, M.; SOLL, M.; ALVINERIE, M.; PINEAU, T. MDR1-deficient genotype collie hypersensitive to the p-glicoprotein substrate ivermectin. **European journal of pharmacology**, v.460, p.85-9.

SABA, C.F.; HAFEMAN, S.D.; VAIL, D.M.; THAMM, D.H. Combination Chemotherapy with Continuous L-Asparaginase, Lomustine, and Prednisone for Relapsed Canine Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.1058–1063, 2009.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; HERNANDEZ, J. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. **Veterinary Dermatology**, v.18, n.2, p.101-106, 2007.

SHOIEB, A.M.; HAHN, K.A.; VAN LAACK, R.L.; BARNHILL, M.A. In vitro reversal of glutathione-S-transferase-mediated resistance in canine osteosarcoma (COS31) cells. **In Vivo**, v.5, p.455-462, 1998.

SILVIA, M.P.N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, p.59-77, 2006, 2003.

SONADI, K.; PATEL, A.; KATHAWALA, R.J.; CHEN, Z.H. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. **Chinese Journal of Cancer**, v.31, p.58-73, 2012.

STEINGOLD, S.F.; SHARP, N.J.; MCGAHAN, M.C.; HUGHES, C.S.; DUNN, S.E.; PAGE, R.L. Characterization of canine MDR1 mRNA: its abundance in drug resistant cell lines and in vivo. **Anticancer research**, v.18, p.393-400, 1998.

SUZANO, S.M.C.; SEQUEIRA, J.L.; PESSOA, A.W.P.; PORTO, C.D.; OLIVEIRA, D.E. Proliferação celular nos linfomas caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, n.4, p.313-319, 2008.

THAMM, D.H.; VAIL, D.M. Aftershocks of cancer chemotherapy: managing adverse effects. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.34, n.1, p.1-7, 2007.

TESKE, T. Malignant lymphomas in dogs: a review with reference to non-Hodgkin lymphoma in man. **The Veterinary Quarterly**, v.16, n.4, p.209-219, 1994.

UOZURMI, K.; NAKAICHI, M.; YAMAMOTO, Y.; UNE, S.; TAURA, Y. Development of multidrug resistance in a canine lymphoma cell line. **Research in Veterinary Science**, n. 78, p. 217–224, 2005.

van LUYN, M.J.; MÜLLER, M.; RENES, J.; MEIJER, C.; SCHEPER, R.J.; NIENHUIS, E.F.; JANSEN, P.J.; De VRIES, E.G. Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug –resistance protein I. **International Journal of Cancer**, v.76, p. 55-62, 1998.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v. 84, p.627-639, 2005.

VIEIRA, S.M.S. **Estudo da associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da glutathiona e a suscetibilidade a complicações microvasculares no diabetes melito tipo 1**. 2008. (Doutorado em Clínica Médica), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VONDERHAAR, M.A.; MORRISON, W.B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats**. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1998. p.667-95.

WILLIAMS, L.E., RASSNICK, K.M., POWER, H.T., LANA, S.E., MORRISON-COLLISTER, K.E., HANSEN, K., JOHNSON, L. CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.20, p. 136-143, 2006.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4^a ed Canada: Saunders -Elsevier, p.995-1002, 2007.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA. (BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES).

(CAPÍTULO II)

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. O texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. O texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título

e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos,

citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo.

As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se

reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p

.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-SummitRelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *VETERINARY DERMATOLOGY*

(CAPÍTULO III)

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Veterinary Dermatology operates a system of double-blinded review and the names of the authors will not be disclosed to the reviewers. Authors should therefore avoid including anything that could identify them within the text. This, for example, includes: the name of the institution at which the work was performed; initials of the authors; acknowledgements; and names of institutions on illustrations, etc. To enable double-blinded review, contributors (including acknowledgements) should only be named on the title page or uploaded separately as a supplementary file, and not on the manuscript. Authors should also avoid statements that could identify them through references (e.g. instead of 'we have previously shown that black is white', authors should write 'previous studies have shown that black is white').

The manuscript (including references and figure legends) must be A4 or 8.5x11 inch format with 2.5cm margins, single-spaced typed, left justified, 12 point font using sans serif typeface such as Helvetica (Swiss), Arial or Verdana style. Each line and page of the manuscript text should be numbered consecutively from the title page.

Authors are requested to write with the minimum of formatting and NOT to write over previous versions, which may contain hidden formatting. Do not enhance text and tables with unnecessary formatting (e.g. small capitals, headers). Software programs that automatically create endnotes and footnotes should not be used.

Review Articles

In general, review articles are only by invitation and by approval of the Editor in Chief. The structure will vary depending on content. Authors should study the format used in previous issues of the journal for further guidance. Authors wanting to submit a review article should contact the Editor in Chief with a brief description of the article and outline.

Scientific Papers and Brief Communications

Manuscripts should be arranged as follows: title; acknowledgements; abstract; text with subdivisions as given below; references; legends for illustrations.

Case Reports

These are usually a chronological description of the case describing the history, physical findings, differential diagnoses, diagnostic tests, specialist diagnostic procedures, diagnoses, treatments and outcome.

Title Page

The title of the article should be concise but informative. The first name, middle initial(s), and last name of each author must be given. Professional affiliations of the authors at the time of the study should be indicated using the symbols *, †, ‡, §, ¶, then **, †† etc., in this order; these are not superscripts. Titles (e.g. professor) and qualifications (e.g. DipACVD) are not required.

If an author's affiliation has changed since the study was performed, the author's new affiliation should be identified. The name of the corresponding author, any conflicts of interest and sources of funding (see section 2.5) should be stated. If information in the text has been presented at a scientific meeting, this should be indicated. A short running title of no more than 40 characters (counting letters and spaces) should also be included. The short running title will be used in the journal at the top of the page, see current publications. Keywords are NOT required.

Abstract

The abstract should be no more than 250 words and must be constructed using the subheadings given below. While this format is most appropriate for scientific studies, the authors of reviews, brief communications and case reports are encouraged to also provide a structured abstract using the following subheadings:

- **Background** – A brief explanation of why the study was performed.
- **Hypothesis/Objectives** – A statement of the principal hypothesis tested in the study, a brief statement of the major objectives, or both.
- **Animals** – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g. research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g. disease status).
- **Methods** – A statement of overall study design (e.g. randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and principal interventions or methods.
- – Reports of clinical trials should try to comply with the REFLECT guidelines <http://www.reflect-statement.org/statement/>.

- **Results** – Concise statement of important results including numerical description of critical variables and statement of statistical significance.
- **Conclusions and clinical importance**– A summary of conclusions based on results of the study and statement of clinical importance of these conclusions. The results should not be restated.

Introduction

State the purpose of the article. Summarise the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references and do not review the subject extensively. Materials and Methods

These should be described in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. References for study design and statistical methods should be to standard works (with pages stated) when possible rather than to papers where designs or methods were originally reported. Specify any statistics computer programs used. Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial).

The methods of data collection and use of statistical analysis will be checked by the referees, editors and, if necessary, a statistician. It is highly recommended that authors consult a professional statistician for advice on complex statistical analyses. It is also recommended that authors provide details of which statistical methods and the p-value, if relevant, have been used for each component of the data set (e.g. $P=0.08$; ANOVA).

Drugs and therapeutic agents should be given in the format: drug ingredient (trade name; manufacturer name, city, (state), country), e.g. fenbendazole (Panacur; Intervet-Schering Plough, Milton Keynes, UK).

Drug names should follow the recommended International Non-Proprietary Names (rINN) - for more information see the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA) website. Common examples include cefalexin, ciclosporin, meticillin and rifampicin.

Products such as equipment or methods should be given as: Product name (Company name; town or city, (state) and country). e.g. Datex CD 200-02 (Datex; Hatfield, UK); or SuperScript® III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The detailed information about drugs, therapeutic agents and products need only be given once.

Results

Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text data in the tables or illustrations. In manuscripts

describing more than one animal, all animals should be assigned a case number.

Discussion

The discussion should emphasise the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Include the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. Relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly indicate them as such.

Recommendations, when appropriate, may be included.

Acknowledgements (should be made on the title page or as a separate supplementary file and not included on the manuscript). These are to indicate support, advice or technical help that does not justify authorship. Please use first and second (family) names, e.g. The authors would like to thank Fred Flintstone for assistance with statistical analysis.

Funding sources should be included in the declared sources of funding (see section 2.5).

Language and style

The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript thoroughly, and preferably professionally, edited by an English speaking person before submission to make sure that the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

5.2. Units, Abbreviations and Nomenclature

All units of measurement must follow the SI system. Concentrations of solutions should be given as molar concentrations (e.g. mmol/L). All other concentrations should be expressed as percentages. Drug dosages should be given as: e.g. mg/kg; µg/kg; also use „once daily“, „twice daily“ etc. Spell out numbers one to nine, keep 10 onwards as numerals. However, use Arabic numerals for numbers used with units of measure (e.g. 9 kg, 5 h, 10 mmol/L). Use h, min, s, for hour, minute, second, respectively. Abbreviations of biological, medical, chemical and other terms should only be used when such abbreviations are both internationally recognized and unambiguous. The first use of an abbreviation must be explained by also giving the unabbreviated term.

All biological, medical, chemical, and other names should be given in keeping with the latest international nomenclature. If an animal or micro-organism is being mentioned in the text for the first time, the binomial name should be given, e.g. carp (*Cyprinus carpio*). Thereafter, this can be abbreviated to *C. carpio*. Please check recent articles for information about the spelling of dog and cat breeds.

5.3. Illustrations and Tables

Figure legends must be given at the end of the manuscript. Sufficient information should be included to allow the figure to be understood without reference to the text. Authors wishing to use any previously published figures must submit written permission from the copyright holder. Figure legends should be written in the following style:

1. Organ or tissue; animal identification, Case No. A sentence describing the change that is visible in the print. (For photomicrographs add: staining method with names of stains and counter stains and magnification, e.g. avidin biotin peroxidase complex method, Mayer's Haematoxylin counter stain)
2. Graph or Table: statement of how data is expressed. Identification of symbols in table, graph, or photo: e.g. N = nucleus.

Examples:

1. Photomicrograph: Intra-epidermal, intact sub-corneal pustule showing small numbers of acantholytic cells and numerous neutrophils. H&E. 3. Table: Comparison of eosinophil counts over time between the control and treatment groups. Error bars indicate the mean $\pm$ the standard deviation

5.3.1. Figures

Figures should be initially saved in a neutral data format such as TIFF or EPS (JPEG format can be accommodated but must fulfil the format criteria given below). PowerPoint and Word graphics are unsuitable for reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Photographic material should be of such quality that high-contrast reproductions can be made; photostats of photographs are unacceptable. Graphics created in the CMYK colour palette (print colours) are preferable to those created in RGB (screen colours) to maximise consistency of print reproduction. Images supplied in RGB will be converted to CMYK for printing; this may lead to some variations in colour representation.

5.3.2. Graphs

To ensure high-quality reproduction, symbols should be clear and even throughout and of sufficient size, that when reduced for publication, each item will still be legible. Graph axes should be labelled in sans serif (Helvetica or Arial) font. Letters, Numbers and Titles belong in the legends for illustrations, not on the illustrations themselves. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in a key.

5.3.3. Clinical Photographs

Clinical and histopathology (photomicrograph) figures must be no more than 19 cm in width and must be submitted at a resolution of 300 dpi.

Limit figures to those that reduce or clarify the text. These should be free of extraneous material, and, where possible, if portions of the handler, for example, fingers or hands are to be included, particularly adjacent to lesions, should be gloved.

5.3.4. Photomicrographs For lower power objectives, thicker histological sections are preferable. Thinner sections are advisable for higher power objectives. Optimal Haematoxylin & Eosin staining ensures the differential eosinophilia of tissue components. Harris's Haematoxylin is preferred as it produces a bluish-black, nuclear stain. The microscope must be set up for Koehler illumination. In general, the 10x or 20x objective provides the best contrast and visibility of the subject in most sections. The 4x objective should be used only when necessary to show the overall pattern.

Authors are not obliged to use length or scale bars, although reviewers/editors may recommend their use because it is deemed to be critical to the understanding of photomicrograph or electron micrograph images. Magnification (scale) bars should be approximately 1 cm long and placed in the lower right corner; 5mm above the lower margin and with the right end 5 mm from the right margin. For figures that consist of multiple parts, individual parts of the figure should be identified by capital letters embedded in the figure, rather than by describing the location of the part in the legend (e.g. top right).

5.3.5. Tables should be limited to those containing data important to understanding and interpreting results and reducing or clarifying the text. Tables may be include within the wordfile containing the main text, placed after the figure legends; alternatively large tables should be submitted as separate table files. Number tables consecutively in the order of the first citation in the text and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Place explanatory material in footnotes, not in the heading. Explain in the footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify

statistical measures of variations such as standard deviation and standard error of the mean. Ensure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source obtain written permission and acknowledge fully.

Poor quality images may be removed from a manuscript and where critical to the content may lead to rejection of a manuscript. For more information about formatting images please click [here](#).

Please ensure that individual figures files are no larger than 5 MB, if your file is substantially bigger than this please contact the Editorial Office: VDEedoffice@wiley.com Tel: +44 (0) 1865 476387 to discuss file saving options.

5.4. References (Please note that EndNote™ and Refman™ software for the Journal of the American Veterinary Medical Association can be used for Veterinary Dermatology; please adapt to Vancouver style)

Software programs for creating reference lists may be used but they should be set up so that they generate in-text citations and reference lists according to the instructions and examples given below. Authors bear primary responsibility for the accuracy of all references. References must be limited to those that are necessary and must be cited in the text by superscript numbers in order of citation. Journal titles in the Reference section should be abbreviated in accordance with the National Library of Medicine (NLM website) and *Index Medicus*. For references with more than 3 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by "et al." The following is the style used for common types of references:

Article in journal

1. Müntener T, Doherr MG, Guscetti F, et al. The canine hair cycle – a guide for the assessment of morphological and immunohistochemical criteria. *Vet Dermatol* 2011; 22: 383-395.

Book

2. Scott DW. *Large Animal Dermatology*. Philadelphia, PA: Saunders, 1988; 457–458.

Book

chapter

3. Muir P, Johnson KA, Manley PA. Fractures of the pelvis. In: Birchard SJ, Sherding RG, eds. *Saunders manual of small animal practice*. 2nd ed.

Philadelphia: WB Saunders Co, 2000; 1126–1132.

Proceedings

4. Moore MP, Bagley RS, Harrington ML, et al. Intracranial tumors, in *Proceedings*. 14th Annu Meet Vet Med Forum 1996; 331–334.

Electronic**material**

5. Animal and Plant Health Inspection Service website. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). Available at: www.aphis.usda.gov/lpa/issues/bse/bse.html. Accessed Feb 18, 2003.