

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PROTEÍNAS DE FASE
AGUDA E DOSAGEM DE VITAMINA D DE CÃES COM
LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.**

Michelle do Carmo Pereira Rocha

Médica veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PROTEÍNAS DE FASE
AGUDA E DOSAGEM DE VITAMINA D DE CÃES COM
LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.**

Michelle do Carmo Pereira Rocha

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza DeNardi

Coorientadora: Profa^a Dr^a Josiane de Morais Pazzini

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

2021

R672a

Rocha, Michelle do Carmo Pereira

Avaliação prognóstica de proteínas de fase aguda e dosagem de vitamina d de cães com linfoma multicêntrico submetidos ao tratamento quimioterápico. : considerações gerais sobre linfoma em cães, proteínas de fase aguda e vitamina D / Michelle do Carmo Pereira Rocha. -- Jaboticabal, 2021
vi, 103 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista(Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andrigo Barboza De Nardi

Coorientadora: Josiane de Moraes Pazzini

1. Linfoma não-Hodgkin. 2. Oncologia clínica. 3. Prognóstico. 4. Reação de fase aguda. 5. Vitamina D. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PROTEÍNAS SÉRICAS E DOSAGEM DE VITAMINA D DE CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

AUTORA: MICHELLE DO CARMO PEREIRA ROCHA

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORIENTADORA: JOSIANE MORAIS PAZZINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Dra. JOSIANE MORAIS PAZZINI (Participação Virtual)
Universidade dos Grandes Lagos -UNILAGO / São José do Rio Preto/SP

Dr. OSCAR RODRIGO SIERRA MATIZ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. MARÍLIA GABRIELE PRADO ALBUQUERQUE FERREIRA (Participação Virtual)
Universidade Estadual do Centro-Oeste / Guarapuava/PR

Jaboticabal, 22 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Michelle do Carmo Pereira Rocha- Nascida em Recife-PE, Brasil em 30 de março de 1994. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2016). Tem experiência na área de Medicina Veterinária com ênfase em clínica e cirurgia de pequenos animais. Estagiou na UNESP (Universidade Paulista), na área de clínica e cirurgia de pequenos animais. Concluída a Residência em Cirurgia de Pequenos Animais, no HOVET-UFRPE (2017-2018). Mestranda do programa de Cirurgia Veterinária da UNESP- Jaboticabal com ênfase em oncologia.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por guiar meus passos sempre para oportunidades incríveis que mudaram a minha vida.

À minha família, que é minha base, minha fortaleza, à minha mãe Cláudia Rocha, pelo amor e apoio incondicional, pelo carinho, compreensão. Ao meu pai, Severino Rocha, pelo exemplo, pela coragem, inspiração e suporte máximo. À minha querida irmã, Beatriz Rochana Pereira Rocha, por torcer por mim sempre com todo o coração.

Agradeço à instituição UFRPE, minha casa, por me proporcionar o alicerce para construção da minha carreira, em especial à professora Grazielle Aleixo, professora Cristina Coelho e ao Dr Robério Silveira.

Agradeço à instituição UNESP –Jaboticabal e ao professor Andriago Barboza, meu orientador, pela oportunidade, pela confiança depositada em mim e principalmente por todo o apredizadoque tão generosamente me foi ofertado.

Agradeço a minha orientadora, a Prof^aDr^a Josiane Morais Pazzini, pelo carinho, pela orientação e empatia durante todo o período do mestrado. Obrigada por ser uma pessoa tão especial, Josi.

Agradeço a equipe SOV (Serviço em Oncologia Veterinária), pela receptividade, pela rotina compartilhada, pela convivência harmônica e respeitosa durante todo esse período, em especial destaque a participação de alguns membros como o Dr Jorge Alvarez, Celso, Dr Óscar, Laís, Mariana, Bruna e Christian, muito obrigada por tudo.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- Considerações gerais sobre linfoma em cães, proteínas de fase aguda e vitamina D.....	18
Introdução.....	18
1.1 Revisão de literatura.....	20
1.1.2 Linfoma Canino.....	20
1.1.3 Linfoma Multicêntrico.....	22
1.1.4 Classificação de WHO.....	23
1.1.5 Resistência ao tratamento quimioterápico em LC.....	24
1.1.6 Proteínas de Fase Aguda.....	25
1.1.7 Concentração de proteínas de fase aguda e prognóstico de neoplasias.....	28
1.1.8 Haptoglobina.....	29
1.1.9 Albumina.....	30
1.1.10 Alfa-1-antitripsina (AAT).....	31
1.1.11 Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP).....	32
1.1.12 Ceruloplasmina.....	33
1.1.13 Transferrina.....	33
1.1.14 IgA.....	34
1.1.15 IgG.....	35
1.1.16 Globulinemia em linfoma.....	35
1.2 Dosagem sérica de Vitamina D e o câncer.....	36
CAPÍTULO 2. Avaliação do proteinograma e dosagem de vitamina d séricos de cães com linfoma multicêntrico.....	41
2.1 Introdução.....	41
2.2 Objetivos.....	42
2.2.1 Objetivos gerais.....	42
2.2.3 Objetivos específicos.....	43
2.3. Material e métodos.....	43
2.3.1 Seleções dos animais.....	43
2.3.2 Estadiamento clínico.....	44

2.3.3 Coletas das amostras sorológicas e biópsia excisional	45
2.3.4 Histopatológico e Imunoistoquímica	46
2.3.5 Ensaio de Proteínas de fase Aguda e Fracionamento eletroforético	49
2.3.6 Tratamento quimioterápico.....	50
2.3.7 Dosagem de Vit D (Quimioluminescência)	51
2.3.8 Análise estatística	52
2.4 Resultados e discussão.....	53
2.4.1 Dados da População.....	53
2.4.2 Grau histológico das amostras de linfonodos dos pacientes com linfoma multicêntrico	61
2.4.3 Dosagem sérica de Vit D.....	65
2.4.4 Avaliação de valor prognóstico das variáveis avaliadas	79
2.4.5 Análise de correspondência múltipla.....	87
2.4.6 Considerações finais.....	88
Conclusões.....	89
Referências	90

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado **"Avaliação molecular, imunohistoquímica e de marcadores sorológicos de recidiva e remissão de linfomas em cães submetidos ao tratamento quimioterápico"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrégo Barboza de Nardi e Certificado CEUA protocolo nº 08948/18, aprovado em reunião ordinária em 13 de setembro de 2019, teve o título alterado para **"Avaliação imunohistoquímica, eletroforese de proteínas séricas e dosagem de Vit D de cães com linfoma multicêntrico submetidos ao tratamento quimioterápico"** aprovado em reunião ordinária de 25 de agosto de 2020.

Jaboticabal, 25 de agosto de 2020.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

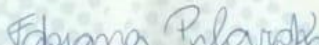
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação molecular, imunohistoquímica e de marcadores sorológicos de recidiva e remissão de linfomas em cães submetidos ao tratamento quimioterápico**", protocolo nº 010256/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de setembro de 2019.

Vigência do Projeto	18/03/2018 a 28/02/2021
Espécie / Linhagem	Cães
Nº de animais	25
Peso / Idade	Sem limites de peso e idade
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Rotina do Hospital Veterinário

Jaboticabal, 13 de setembro de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Síntese e metabolismo da vit D.....37
- Figura 2:** Esquema de reação de quimioluminescência52
- Figura 3:** Imagem fotográfica de linfadenomegalia em linfonodo axilar em canino com linfoma multicêntrico.....55
- Figura 4:** Imagem fotográfica de edema em membro posterior em canino com linfoma multicêntrico.....56
- Figura 5:** Imagem radiográfica de tórax de paciente com infiltração em pulmão de linfoma multicêntrico de estadiamento 5, subestadiamento B. A) Exame pré-quimioterapia antineoplásica. B)Exame pós primeiro ciclo do CHOP56
- Figura 6:** Imagem radiográfica de tórax de paciente com linfadenomegalia em linfonodo mediastínico, indicado por seta, em paciente canino com linfoma multicêntrico57
- Figura 7:** Imagem fotográfica de microscopia, em aumento de 40 x, de mielograma de paciente com linfoma, demonstrando hipoplasia medular, especialmente das séries eritróide e mielóide B: Mielograma de paciente com linfoma, não demonstrando infiltração neoplásica , seta indicando megacariócito.....58
- Figura 8:** Fotomicrografia de imunomarcção com o anticorpo CD3 para Linfoma de células T, em linfonodo canino, demonstrando a imunomarcção em membrana celular. Aumento da imagem acima (seta)63
- Figura 9:** Fotomicrografia de imunomarcção com o anticorpo PAX5, para linfoma de células B, em linfonodo canino, demonstrando a imunomarcção citoplasmática64
- Figura 10:** Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliacrilamida mostrando a separação das frações protéicas em cães.70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento clínico do linfoma proposto pela WHO	22
Tabela 2: Classificação da WHO para linfomas multicêntricos em cães.....	24
Tabela 3: Médias e desvios-padrão das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) Verificadas no proteinograma obtido em gel de poliacrilamida de cães sadios e cães com linfoma	30
Tabela 4: Anticorpos usados para imunohistoquímica de linfonodos de cães para imunofenotipagem do linfoma e Ki-67 (marcador de proliferação celular)	48
Tabela 5: Protocolo CHOP para tratamento de linfoma canino realizado no Setor de Oncologia Veterinária (SOV)	50
Tabela 6: Dados clínicos dos pacientes do GL	54
Tabela 7: Avaliação da resposta ao tratamento e desfecho dos pacientes do GL	60
Tabela 8: Informações hematológicas e dosagens bioquímicas dos pacientes do grupo GL, no momento do diagnóstico (T0)	61
Tabela 9: Avaliação histopatológica das amostras de linfonodos obtidas através de biópsia excisional dos pacientes do grupo GL (Grupo Linfoma)	65
Tabela 10: Dosagem sérica por quimioluminescência da 25(OH)D3 em ng/mL nos pacientes do grupo GL, realizadas em três momentos durante o tratamento quimioterápico CHOP.....	67
Tabela 11: Dosagem sérica por quimioluminescência da 25(OH)D3 em ng/dL, dos pacientes do grupo GC (Grupo Controle).....	67

Tabela 12: Comparação entre os valores médios de concentração da vitamina D3 entre os momentos da terapia antineoplásica	68
Tabela 13: Comparação entre os valores médios de concentração da vitamina D3 entre os grupos no momento pré- tratamento	69
Tabela 14: Proteínas séricas avaliadas por eletroforese e respectivos pesos moleculares	71
Tabela 15: Comparação entre os valores médios de concentração das proteínas séricas analisadas, entre os grupos no momento pré-quimioterapia.	73
Tabela 16: Comparação entre os valores médios de concentração das proteínas séricas analisadas, entre os momentos da terapia antineoplásica	74
Tabela 17: Comparação entre os pacientes com linfoma multicêntrico que recidivaram e que não recidivaram dentro do intervalo de tempo de corte para as observações.	81

Lista de Gráficos:

- Gráfico 1:** Comparação entre os valores médios das concentrações das proteínas de fase aguda em mg/dL entre o GL no T0 e do GC 75
- Gráfico 2:** Dispersão entre os valores de concentração da haptoglobina em mg/dL dos pacientes com Linfoma ao longo do tratamento quimioterápico e do GC 76
- Gráfico 3:** Dispersão entre os valores de concentração da IgA em mg/dL dos pacientes com Linfoma ao longo do tratamento quimioterápico e do GC..... 77
- Gráfico 4:** Comparação entre as médias da α 1-Glicoproteína ácida ao longo do tratamento quimioterápico e entre os Grupos experimentais (GC: Grupo Controle e GL) 79
- Gráfico 5:** Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de α 1-Glicoproteína ácida maior e menor que 34,8 mg/dL 83
- Gráfico 6:** Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de IgA maior e menor que 28,17 mg/dL 84
- Gráfico 7:** Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de transferrina maior e menor que 330 mg/dL 86
- Gráfico 8:** Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de haptoglobina maior e menor que 490 mg/dL 87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LC- Linfoma Canino

LNH-Linfoma Não-Hodgkin

HV-Hospital Veterinário

UNESP- Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho

WHO-World Health Organization

OMS- Organização Mundial da Saúde

VIT D-Vitamina D

CD3- Cluster of Differentiation 3

CD8- Cluster of Differentiation 8

CD20- Cluster of Differentiation 20

CD79a- Cluster of Differentiation 79 a

Pax5-Paired box gene 5

KI67- marcador utilizado na avaliação imunoistoquímica para indicar a proliferação celular

T0 – Tempo 0

T5- Tempo 5

T10- Tempo 10

mRNA- messenger Ribonucleic Acid

DNA- Deoxyribo Nucleic acid

GST- desintoxicante glutathione-S-transferase,

GSTT1 -GST teta 1

CHOP – Ciclofosfamida,doxorrubicina, vincristina e prednisona.

CHOP-L - Ciclofosfamida,doxorrubicina, vincristina e prednisona e L-asparginase

SNC- Sistema Nervoso Central

LCCF- I - Linfoma de Células do Centro Folicular-I,

LCCF-II, Linfoma de Células do Centro Folicular II

LCCF-III, Linfoma de Células do Centro Folicular III
LZM- Linfoma de Zona Marginal
LEC- Linfoma Epitliotrópico Cutâneo
LLA-T-Leucemia Linfoide Aguda T
LL-T- Leucemia Linfoide T
LLC-T- Leucemia Linfóide Crônica
LLP-T- Linfoma Linfocítico de pequenas células
LLC- Leucemia Linfocítica Crônica
IGM- Imunoglobulina M
IgA- Imunoglobulina A
IgG- Imunoglobulina G
IgE- Imunoglobulina E
IgD- Imunoglobulina D
C3- Componente 3
C4- Componente 4
EDTA- Ethylene diamine tetra acetic acid
ATP- AdenosinaTrifosfato
ABC- ATP-binding cassette
DR- Drugs Resistance
Pg-P- Glicoproteína P
ABCB1- ATP binding cassette subfamily B member 1
ABCG2- ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)
MRP1-Sinonim of ATP binding cassette subfamily C member 1
BCRP-sinonim of ATP binding cassette subfamily G member 2
PFA- Proteína de Fase Aguda
TK-1- Thymidinekinase 1
PCR- Proteína C Reativa
FNT α - Fator de Necrose Tumoral
IL-1- Interleucina 1
IL-6- Interleucina 6
SDS-PAGE-dodecil sulfato de sódio
HDL- High Density Lipoproteins

LDL-Low Density Lipoproteins

VLDL- Very Low Density Lipoproteins

KD- Kilodáltons

AAT- Alfa-1- Antitripsina

AGP- Alfa-1-Glicoproteína Ácida

A:G- Relação Albumina: Globulina

VD- Vitamina D

VDR- Receptor Vitamina D

CDK2- Quinase dependente de Ciclina

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

RFA: Reação de Fase Aguda

LM: Linfoma Multicêntrico

AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E DOSAGEM DE VITAMINA D DE CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.

RESUMO

O linfoma é um tumor linfóide que se origina principalmente em órgãos linfohematopoiéticos sólidos, porém também pode se originar em órgãos não hematopoiéticos, sendo considerado o tumor de origem hematopoiética mais importante em caninos. Os biomarcadores mais pesquisados em linfoma multicêntrico são as Proteínas de Fase Aguda, (PFA), que participam da resposta inflamatória inicial e são mediadas pela interleucina-1 (IL- 1), fator de necrose tumoral α (FNT α) e interleucina-6 (IL-6). Neste trabalho, objetivou-se determinar a concentração sérica da Vitamina D, (25- Hidroxivitamina D) e das PFAs (Alfa-1 glicoproteína ácida, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina, albumina, IgA, IgG e Alfa-1 – Antitripsina) como fatores prognósticos em cães com linfoma multicêntrico e monitorar a remissão em cães com linfoma em tratamento quimioterápico antineoplásico através das dosagens destes marcadores, realizadas em três momentos do tratamento (T0,T5 e T10). Foi feito o diagnóstico e estadiamento de 13 pacientes com linfoma multicêntrico através de citologia e histopatologia do linfonodo periférico afetado, obtido por biópsia excisional. Foram coletadas também, amostras de soro dos pacientes nas semanas T0, T5 e T10 do tratamento com protocolo quimioterápico antineoplásico CHOP e de 10 cães saudáveis para o grupo controle. As análises do proteinograma sérico foram feitas por eletroforese e a dosagem de vitamina D por quimioluminescência. Os dados obtidos foram analisados através do software R e para a comparação entre os grupos foi usado o teste ANOVA. O valor prognóstico das variáveis foi determinado através da curva ROC e posteriormente esses resultados foram comparados através da curva de sobrevivência de Kaplan- Meier. Os resultados indicam que a vitamina D foi insuficiente em 86% de todos os pacientes, sendo deficiente em 23,07% no grupo GL na semana T0, logo não houve diferença significativa entre os grupos, e não apresentou valor prognóstico para o linfoma multicêntrico em cães. As diferenças entre as variáveis: IGA, haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida foram significativas entre os grupos, e entre os diferentes momentos da quimioterapia ($p < 0,05$), indicando que podem ser marcadores sensíveis para o linfoma em cães. A α 1-glicoproteína ácida demonstrou-se com valor prognóstico para o linfoma, com 63% de especificidade.

Palavras chave: Linfoma não-Hodgkin, Oncologia clínica, Prognóstico, Reação de fase aguda, Vitamina D

PROGNOSTIC EVALUATION OF ACUTE PHASE PROTEINS AND VITAMIN D DETERMINATION OF DOGS WITH MULTICENTRIC LYMPHOMA SUBMITTED TO CHEMOTHERAPY TREATMENT.

ABSTRACT

Lymphoma is a lymphoid tumor that originates mainly in solid lymphohematopoietic organs, but it can also originate in non-lymphohematopoietic organs and is considered the most important hematopoietic tumor in canines. The most researched biomarkers in multicentric lymphoma are Acute Phase Proteins (PFA), which participate in the initial inflammatory response and are mediated by interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor α (FNT α) and interleukin-6 (IL-6). In this work, the objective was to determine the serum concentration of Vitamin D, (25-Hydroxyvitamin D) and PFAs (Alpha-1 acid glycoprotein, haptoglobin, transferrin, ceruloplasmin, albumin, IgA, IgG and Alpha-1 - Antitrypsin) as factors prognosis in dogs with multicentric lymphoma and to monitor remission in dogs with lymphoma undergoing antineoplastic chemotherapeutic treatment through the dosages of these markers, performed at three moments of treatment (T0, T5 and T10). The diagnosis and staging of 13 patients with multicentric lymphoma was made through cytology and histopathology of the affected peripheral lymph node, obtained by excisional biopsy. Serum samples were also collected from patients at weeks T0, T5 and T10 of treatment with CHOP antineoplastic chemotherapy protocol and from 10 healthy dogs for the control group. Serum proteinogram analyzes were performed by electrophoresis and vitamin D dosage by chemiluminescence. The data obtained were analyzed using the R software and the ANOVA test was used to compare the groups. The prognostic value of the variables was determined using the ROC curve and later these results were compared using the Kaplan-Meier survival curve. The results indicate that vitamin D was insufficient in 86% of all patients, being deficient in 23.07% in the GL group at week T0, so there was no significant difference between the groups, and did not show a prognostic value for multicentric lymphoma in dogs. The statistical differences between the variables: IGA, haptoglobin and α 1-acid glycoprotein were significant between the groups, and between the different moments of chemotherapy ($p < 0.05$), indicating that they may be sensitive markers for lymphoma in dogs. A1-acid glycoprotein proved to be of prognostic value for lymphoma, with 63% specificity.

Keywords: Non-Hodgkin's lymphoma, Clinical oncology, Prognosis, Acute phase reaction, Vitamin D

CAPÍTULO 1- Considerações gerais sobre linfoma em cães, proteínas de fase aguda e vitamina D

Introdução

Os linfomas são um grupo diversificado de neoplasmas que tem em comum a origem em células linfocitárias. Eles se desenvolvem mais frequentemente em tecidos linfóides, como em linfonodos, baço e medula óssea, entretanto, também podem se desenvolver em tecidos não linfóides, como em rins, pulmão e cavidade nasal (Marconato et al., 2011).

É um das neoplasias mais comuns em cães com incidência anual estimada em 13 a 24 para cada 100000 cães (Merlo et al., 2008). No Brasil, a incidência anual é de 24 a 33 casos para cada 100000 cães (Pastor et al., 2009).

O linfoma Não-Hodgkin (LNH) em humanos é semelhante ao linfoma canino (LC) nos seguintes aspectos: morfológico, imunofenotípico, genotípico, clínico e prognóstico; o que reforça as idéias de estudos para avanço da medicina e patologia comparada entre as espécies, tendo o cão como um promissor modelo experimental para a doença (Thomas et al., 2011).

A etiologia do LC ainda não é totalmente esclarecida, por se tratar de uma afecção multifatorial. Entre os fatores apontados como etiológicos para o linfoma, merecem destaque: os fatores genéticos, moleculares, infecciosos, ambientais e imunológicos (Pinkerton e Young, 2013).

O linfoma pode ser classificado de acordo com a localização anatômica, na qual a forma mais comum é a multicêntrica. Baseado apenas em critérios citológicos e histopatológicos, a classificação mais utilizada seria o sistema Kiel, dentro desse sistema, a forma mais frequente de LC é o linfoma difuso de alto grau de grandes células. Entretanto, atualmente o sistema de classificação mais aceito e completo acerca do linfoma é o sistema WHO, que se baseia em critérios tanto histopatológicos como imunofenotípicos. De acordo com a literatura veterinária 60 a 80% dos LCs são de origem em células B (Aricó, 2014).

O tratamento para linfoma multicêntrico de alto grau geralmente corresponde à quimioterapia com múltiplas drogas, porém mesmo assim, a grande maioria dos

cães tratados vem a apresentar recidivas, bem como desenvolver resistência a quimioterapia (Marconato, 2019).

Neste contexto, a busca por elucidar os fatores predisponentes, prognósticos e estratégias para monitorar o tratamento desses pacientes têm se tornado constante na medicina veterinária, para que se possa intervir terapêuticamente antes que o paciente volte a apresentar os sinais clínicos, como por exemplo, a linfadenopatia (Aricó et al., 2014; Marconato et al., 2019).

Estudo de Mellanby et al. (2016), apontou a concentração sérica da Vit D e das proteínas de fase aguda como fatores prognósticos e preditivos de alta sensibilidade em diversas neoplasias, tanto na medicina humana como na veterinária, inclusive em linfomas (Mellanby et al., 2016). Malone et al. (2010), destacou a vitamina D como fator prognóstico e preditivo em cães com mastocitoma grau II, alto grau, e apontou a existência de um receptor para 25(OH)D₃, presente no núcleo das células neoplásicas, o receptor VDR, sugerindo um alvo terapêutico.

Echkersall, (2014), sugeriu que as proteínas de fase aguda são marcadores sensíveis para o linfoma multicêntrico em cães e que estas podem inclusive, em caso de recidiva, demonstrar alterações em suas concentrações precocemente, sendo considerado mais sensível que a citologia dos linfonodos periféricos.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar a concentração sérica da Vit D, (25- hidroxivitamina D) e das proteínas de fase aguda como fatores prognósticos em cães com linfoma multicêntrico e monitorar a condição de remissão em cães com linfoma em tratamento quimioterápico antineoplásico através destes marcadores, dosados em três semanas distintas do protocolo quimioterápico antineoplásico (T0, T5, T10).

1.1 Revisão de literatura

1.1.2 Linfoma Canino

O linfoma representa a neoplasia hematopoiética mais comum em cães com uma taxa de incidência anual mundial mínima estimada de 13-114 por 100.000 cães. Embora o LC possa afetar qualquer raça, as mais predispostas são as de tamanho médio à grande (Edwards, 2003; Villamil, 2009). Uma ocorrência de caráter hereditário foi relatada em algumas raças incluindo o Bullmastiff, Rottweiler, Scottish terrier e Golden Retriever (Lobetti, 2009).

A incidência de linfoma em cães tem aumentado significativamente nas últimas décadas, de forma semelhante ao que tem acontecido na espécie humana, com o chamado linfoma Não Hodgkin (Howlader et al., 2012). Existem várias semelhanças etiológicas, e comportamentais entre o Linfoma canino e o Linfoma Não Hodgkin, e o fato do genoma dos cães ter sido sequenciado e estudado há bastante tempo, torna os cães um modelo experimental promissor para estudar a doença em humanos.

Apesar de nenhuma causa definitiva para o LC tenha sido estabelecida, a vida em áreas industriais, com a exposição aos resíduos domésticos, ou aos incineradores (Takashima Uebelhoeret al., 2012), exposição à radiação, aos poluentes e aos campos magnéticos demonstraram aumentar o risco de desenvolvimento de LC (Marconato et al. 2009; Pastor et al. 2009).

Evidências adicionais apontam que toxinas ambientais podem desempenhar um papel na carcinogênese, e isso vem da observação de que genótipos defeituosos da enzima desintoxicante glutathione-S-transferase (GST), e GST teta 1 (GSTT1) em particular, que compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH), esta possui um papel central na defesa das células contra o estresse oxidativo a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico e estão super-representados em câncer humanos. Das 27 variantes GSTT1 identificadas no cão, um genótipo foi presente em 18% de todos os casos de LC (Ginn et al., 2014). Essa mutação pode afetar a decodificação de mRNA e, como resultado, causar alterações na expressão e atividade enzimática (Ginn et al., 2014).

A manifestação clínica do linfoma varia de acordo com o órgão que a neoplasia está afetando em determinado paciente. Ele pode ser classificado de acordo com a localização anatômica em multicêntrico, extranodal, mediastínico, cutâneo, gastrointestinal, hepático, ocular, sistema nervoso, pulmonar e atípico (Vail et al., 2019). Em geral, o linfoma pode cursar com edema em membro, em face, síndrome da veia cava cranial, vômito, diarreia, apatia, febre, ascite, icterícia linfadenomegalia, eventualmente pode ocorrer dispnéia por conta de infiltração pulmonar ou efusão pleural e ainda pode cursar com poliúria e polidipsia em decorrência da hipercalcemia (Vail et al., 2019).

O estadiamento varia em estádios de I a V. O estágio I corresponde ao comprometimento de apenas um linfonodo; o II corresponde ao comprometimento regional da cadeia linfática (linfonodos craniais ou caudais à linha média do paciente); o III ao comprometimento generalizado da cadeia linfática; o IV apresenta também o comprometimento do baço e do fígado com ou sem a presença do estágio III e o estágio V corresponde a qualquer das manifestações anteriores com o comprometimento de medula óssea, sangue periférico e/ ou de órgãos não-linfóides, como o pulmão, por exemplo. Há ainda os subestágios: ausência ou presença de sinais clínicos, respectivamente subestágios a ou b (Tabela 1), (Vail et al., 2019).

O diagnóstico envolve a citologia como exame de triagem e o estadiamento é feito por meio de exames de imagem, como ultrassonografia abdominal e radiografia de tórax. Faz parte do diagnóstico, a caracterização do tipo histológico de acordo com a classificação de Kiel e do imunofenótipo através da imunistoquímica, marcando a expressão de moléculas específicas para linfócitos B (CD79a, Pax5, CD20) e para linfócitos T (CD3, CD4), como reportado por Vail e Young (2019).

A imunofenotipagem do LC também pode ser determinada pela citometria de fluxo (Comazzi; Gelain, 2011) e pela PCR for Antigen Receptor Rearrangement (PARR), de acordo com Gentilini et al. (2009).

Ainda em relação às ferramentas diagnósticas para o linfoma, têm-se os biomarcadores como algo frequente na pesquisa e cada vez mais próximo da utilização na rotina clínica. Biomarcadores são proteínas séricas que podem ser usadas para diagnosticar e/ ou monitorar uma doença específica. Mensurações séricas de proteínas de fase aguda como a PCR (Proteína C Reativa) e

haptoglobina tem baixa especificidade e sensibilidade para diagnóstico de LC, entretanto quando combinadas a dosagem de TK1, uma enzima da síntese de precursores de DNA, ou quando correlacionado a todo o proteinograma do paciente e aos dados clínicos é útil como teste diagnóstico e de monitoramento da doença em cães (Comazzi; Gelain, 2011).

O tratamento do linfoma multicêntrico é baseado mais comumente em protocolos multiagentes, ou seja, utilizando três ou mais quimioterápicos diferentes de forma alternada ao longo das semanas. Como por exemplo, o protocolo CHOP (Vincristina, Ciclofosfamida, Doxorubicina e Prednisolona), ou CHOP (L. Asparginase). Atualmente existem terapias alternativas a quimioterapia para o linfoma, como a radioterapia e a imunoterapia (Vail et al., 2019).

A classificação do linfoma em cada caso clínico de acordo com a WHO, tem se demonstrado importante na escolha adequada do tratamento, bem como na elucidação dos comportamentos e prognósticos de cada doença de forma individualizada, avançando no diagnóstico e tratamento do linfoma tanto na espécie canina, quanto na humana (Howlader et al., 2012).

Tabela 1: Estadiamento clínico do linfoma proposto pela WHO

I Envolvimento de apenas 1 linfonodo
II Envolvimento dos linfonodos regionais
III Linfadenomegalia generalizada
IV Envolvimento de baço e/ou fígado com ou sem estágio III
V Envolvimento da Medula óssea com ou sem estágio I-IV ou de órgãos não linfóides
Sub-estágios a: Sem sintomatologia sistêmica
b: Com sintomatologia sistêmica

Adaptado de North e Banks, 2009

1.1.3 Linfoma Multicêntrico

O linfoma multicêntrico acomete os linfonodos tanto periféricos como cavitários, o baço, o fígado, as tonsilas, a medula óssea, sangue periférico e órgãos

extranodais, como o pulmão. Cerca de 80% dos casos de LC são do tipo multicêntrico (Couto, 2015; Vail e Young, 2019).

Os sinais clínicos mais comumente apresentados por cães com linfoma multicêntrico incluem linfadenopatia generalizada, edema dos membros por obstrução do fluxo linfático, anorexia, apatia, perda de peso, caquexia, esplenomegalia, hepatomegalia, desidratação, febre, ascite, palidez das mucosas e icterícia (Figuera et al., 2006). Geralmente nos estágios iniciais, a linfadenomegalia pode estar restrita aos linfonodos submandibulares e cervicais superficiais (Vail e Young, 2019).

1.1.4 Classificação de WHO

A classificação mais recente e completa sobre linfomas em cães é o sistema de classificação da WHO, que inclui informações sobre o imunofenótipo da doença (Valli et al., 2013).

O sistema da WHO é baseado em uma avaliação histológica e imunofenotípica extrapolada da classificação humana que foi aplicada ao cão. Verificou-se mais de 50 subtipos diferentes de linfoma, entretanto, a grande maioria dos casos de linfoma está compreendida em apenas cinco subtipos: linfoma difuso de grandes células B, que corresponde a 54% da frequência total de casos de linfoma em cães, linfoma células T periférico não especificado (16%), linfoma zona T nodal (14%), linfoma T linfoblástico (5%) e linfoma de zona marginal (células B) (4%), (Tabela 2) (Valli et al. 2011).

O estudo de Valli et al., (2013) apontou que o imunofenótipo T pode estar relacionado com o comportamento mais agressivo do linfoma multicêntrico, bem como com a falha do tratamento e surgimento de mecanismos de resistência aos diversos quimioterápicos como, por exemplo, à doxorrubicina e à ciclofosfamida.

Tabela 2 : Classificação da WHO para linfomas multicêntricos em cães.

Linfoma B	Precursor maduro	Leucemia Linfoblástica Aguda-B (LLA-B), Linfoma Linfoblástico-B (LL-B), Leucemia Linfocítica Crônica-B (LLC-B), Linfoma Linfocítico Pequeno-B (LLP-B), Linfoma Linfocítico Tipo Intermediário e Linfoma Linfoplasmocítico
	folicular	Linfoma de Células do Manto, Linfoma de Células do Centro Folicular-I (LCCF-I), LCCF-II, LCCF-III, Linfoma de Zona Marginal (LZM), LZM Esplênico e Linfoma de Tecido Linfóide Associado a Mucosa.
	Tumores plasmocíticos	TP Indolente, TP Anaplásico e Mieloma
	Linfoma de Grandes Células B	LGCB Clivado ou não Clivado, Linfoma Imunoblástico de Grandes Células, LGCB rico em Células T e LGCB Tímico
	Linfoma BurkittLike	
Linfoma T	Precursor	LLA-T e LL-T
	Maduro	LLC-T, LLP-T, Leucemia ou Linfoma Linfocítico de Grandes Grânulos e LLC de Células NK
	Cutâneo	Linfoma Epiteliotrópico Cutâneo (LEC) e Linfoma não Epiteliotrópico Cutâneo
	Linfoma de célula T periférico ou Extranodal	
	Linfoma Angiotrópico	Linfoma Angiocêntrico e Linfoma Angioinvasivo
	Linfoma de célula T intestinal	
	Linfoma de Grandes células anaplásico	
Fonte: Marconatto et al., 2009		

1.1.5 Resistência ao tratamento quimioterápico em LC

A eficácia da quimioterapia é limitada pelo aparecimento de mecanismos de resistência aos medicamentos, também conhecida como Drugs Resistance (DR), e devido às limitações em alternativas de opções de tratamento para LC, o desenvolvimento de DR tem um grave impacto no prognóstico (Lage, 2008).

A DR pode ter muitas causas, mas o aumento da expressão dos drug transporters of the ATP-Binding Cassette superfamily (Transportadores ABC), incluindo P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1), and BCRP (ABCG2) parecem ter um papel importante neste processo (Lage, 2008).

Os transportadores ABC são uma superfamília do sistema de transporte transmembranar que é uma das mais antigas famílias de genes. É representado em todos os filos existentes, de procariontes a humanos. Os transportadores ABC geralmente consistem em várias subunidades, das quais, uma ou duas são proteínas transmembranares, e uma ou duas são das ATPases associadas à membrana. As subunidades ATPase utilizam a energia de ligação e hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) para fornecer a energia necessária para a translocação de substratos através das membranas, para captação ou exportação do substrato (Ito et al. 2015).

A DR intrínseca é mais comum em Linfomas de células T do que em linfoma de células B. Nesse caso, a DR no linfoma de células T está associada ao aumento da expressão de ABCG2, já a DR adquirida nos linfomas de células B tendem a estar associados à superexpressão ABCB1 (Zandvliet et al. 2014).

Com base nesses achados, existem duas opções terapêuticas disponíveis: a reversão de DR usando o bloqueio da P-gp (Glicoproteína P) e inibidores do BCRP ou com o uso de drogas citotóxicas que não são substratos para a P-gp nem BCRP. Inibidores da Glicoproteína P que podem ser úteis no tratamento de DR em LC, incluem PSC833 (Valspodar) e o inibidor de tirosina-quinase, masitinibe (Zandvliet et al. 2014).

Embora o uso de Valspodar nos casos de resistência aos medicamentos do linfoma pareça promissor, a inclusão do PSC833 em uma primeira linha no protocolo baseado no CHOP não ofereceu benefício ao tratamento (Ito et al. 2015).

Porém, medicamentos que não são substratos típicos para os transportadores ABCB1 e ABCG2, principalmente os agentes alquilantes e L-asparaginase, são drogas úteis para serem usadas nos vários protocolos quimioterápicos de resgate para o linfoma multicêntrico (Ito et al. 2015).

1.1.6 Proteínas de Fase Aguda

A resposta de fase aguda é uma resposta mais rápida, que se estabelece antes da estimulação da resposta imune específica e em muitos casos antes do início dos sinais clínicos. Portanto, isso pode ser considerado como uma indicação

precoce para algum processo patológico ou doença. A resposta de fase aguda é não-específica, porque se desenvolve secundariamente a numerosas condições que podem produzir injúria tecidual (Kogica, 2003).

Em animais com distúrbios no equilíbrio fisiológico devido à infecção, inflamação, injúria tecidual, neoplasia ou desordem imunológica, há uma resposta de fase aguda inespecífica. Esta resposta compreende alterações na concentração de algumas proteínas séricas referidas como proteínas de fase aguda (PFA). As PFA são glicoproteínas produzidas e liberadas pelos hepatócitos a partir de estímulo específico de citocinas [interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF)]. Quando uma PFA apresenta sua concentração aumentada no soro ou plasma é considerada uma proteína de fase aguda positiva (alfa-1- antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida ceruloplasmina e haptoglobina), e quando sua concentração diminui com a injúria é considerada uma proteína de fase aguda negativa (pré-albumina, albumina e transferrina) (Eckersall, 2008).

A produção e resposta das PFA (Proteínas de Fase Aguda) dependem de cada espécie. No caso, em cães, uma resposta mais expressiva ocorre com a proteína C reativa e haptoglobina, entretanto, em gatos, um aumento significativo dessas proteínas não tem sido detectado na inflamação (Céron et al., 2005).

A análise das proporções das frações proteicas séricas tem grande valor na abordagem de desordens agudas e crônicas, paraproteinemias, hemoglobinopatias, deficiência imunológica e anormalidades genéticas, tem utilidade também, juntamente com outras investigações em doenças hepáticas e neoplasias como mieloma múltiplo, leucemias e linfomas. Dessa forma, o exame ajuda a entender a clínica das doenças e auxiliar no diagnóstico de afecções que possuem padrões eletroforéticos característicos (Ramprasad e Siddappa, 2015).

Estas proteínas permitem o diagnóstico de processos inflamatórios em animais com supressão ou depressão medular. Além disso, são úteis na monitoração da resolução tecidual de traumas ou inflamação, e também na avaliação da resposta orgânica ao tratamento (Céron, 2005).

A avaliação do proteinograma sérico determinado através da eletroforese tem sido utilizado para detectar e fornecer informações sobre o prognóstico de diversas

neoplasias, como por exemplo, os carcinomas mamários, leucemias, linfomas e mielomas (Battisti et al., 2013).

Em relação especificamente aos LCs, o estudo de Calazans et al., 2009 concluiu que os resultados obtidos pela SDS-PAGE sugerem que concentrações séricas mais elevadas de ceruloplasmina e haptoglobina e menores de albumina podem estar associadas a presença do linfoma em cães, bem como ao seu prognóstico. Além disso, pode ser uma ferramenta útil para indicar a doença residual mínima em pacientes que receberam alta do tratamento antineoplásico (Battisti et al., 2013).

A Doença Residual Mínima (DRM) é definida como a presença de células neoplásicas detectáveis por métodos mais sensíveis de procura, como biologia molecular ou imunofenotipagem. Ou seja, quando não se pode detectar doença por métodos morfológicos, como citologia ou exames de imagem, mas é possível detectar por métodos mais sensíveis, como PCR, imunistoquímica e biomarcadores sorológicos (Contin et al., 2015). Frequentemente, os cães que alcançam a remissão completa poderão ter recidiva após o tratamento. Isso ocorre por conta da multiplicação dos clones das células tumorais que não foram afetadas pelo protocolo de quimioterapia adotada inicialmente, essas células são chamadas de MDR clones, e elas tendem a ser mais resistentes às drogas que as células do tumor original, por terem maior expressão do gene MDR1 e conseqüentemente da glicoproteína P. Por essa razão é imprescindível o desenvolvimento de ferramentas capazes de monitorar o tratamento e pós-tratamento dos pacientes com linfoma multicêntrico, de forma a prever a falha da terapia antes mesmo da linfadenopatia e dos sinais clínicos. Nesse contexto, os estudos das proteínas de fase aguda parecem ser promissores no alcance desse objetivo (Contin et al., 2015).

A mensuração das concentrações das proteínas de fase aguda pode auxiliar, muitas vezes, no monitoramento de protocolos terapêuticos em cães com determinadas neoplasias (Céron et al., 2005). Segundo Eckersall, (2004), estas proteínas, além de úteis no auxílio diagnóstico de linfomas em pacientes humanos, leucemia e mieloma múltiplo, são indicadoras de prognóstico e permitem detectar precocemente enfermidades graves, por exemplo, a sepse.

1.1.7 Concentração de proteínas de fase aguda e prognóstico de neoplasias

As concentrações séricas de PFAs também sofrem alterações em processos neoplásicos (Calazans et al., 2009; Mylonakis et al., 2011). Estudos demonstraram variações nas PFA em cães portadores de tumores mamários, pancreáticos, carcinoma de células escamosas e linfoma (Calazans et al., 2009; Galezowski et al., 2010; Mukorera et al., 2011), e em seres humanos no câncer de próstata e mama (Starket al., 2009). Nas neoplasias mamárias em cães, as variações das concentrações séricas das PFA podem ocorrer em função da inflamação tecidual crônica, do tamanho do tumor primário e da presença de metástases (Crossley et al., 2010).

Em estudo de Crossley (2010), foram avaliadas 45 cadelas, de idades e raças variadas, diagnosticadas com neoplasia mamária, nas quais foi realizado o teste de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para identificar as PFAs (albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, α -1 antitripsina e α -1 glicoproteína ácida) e o teste ultrasensível para proteína C reativa (PCR), mediante a esse teste foi concluído que a PCR e a haptoglobina são proteínas inespecíficas, porém, altamente sensíveis, podendo ser usadas como ferramentas auxiliares no diagnóstico e prognóstico de neoplasia mamária em cadelas. A avaliação combinada da PCR e Haptoglobina é melhor do que a individual, e pode sugerir malignidade (Crossley et al., 2010).

Há poucos estudos em cães que avaliaram a resposta inflamatória inicial em linfomas multicêntricos, principalmente diferenciando histopatologicamente e imunofenotipicamente a doença. Entretanto, segundo Eckersall (2014), pesquisas recentes em humanos têm evidenciado que a qualificação e a quantificação de proteínas séricas podem subsidiar o diagnóstico e fornecer valiosas informações prognósticas e de monitoramento de doenças linfoproliferativas.

Pacientes caninos diagnosticados com linfoma multicêntrico que possuíam maiores concentrações de alfa-1- glicoproteína ácida no momento do diagnóstico já foram associados a uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico, e

consequentemente maior sobrevida em cães. Já os níveis altos de haptoglobina ao longo da quimioterapia foram associados com pior prognóstico para cães com linfoma (Eckersall, 2014).

1.1.8 Haptoglobina

É uma glicoproteína (alfa-2-globulina) composta por duas subunidades alfa e beta, com cerca de 63 KD, que se estabilizam ao se ligarem especificamente à hemoglobina plasmática livre, dando origem a um complexo proteico que será conduzido da circulação para o sistema mononuclear fagocitário, no qual ocorrerá o reaproveitamento do íon ferro durante a etapa da hemocaterese e na defesa contra patógenos (Levy et al., 2010).

É considerada uma das mais importantes PFA (Proteínas de Fase Aguda) em todas as espécies, por ser uma das mais sensíveis, especialmente em bovinos e caninos. A elevação de seus valores em cães é ocasionada por processos inflamatórios, corticoterapia, tripanossomíases, leishmaniose, trauma, síndrome de Cushing e neoplasias (Cerón et al., 2005). Sendo assim se faz necessária a análise correlacionada com a clínica do paciente, com outros parâmetros, como o proteínograma e as demais proteínas de fase aguda em conjunto. A correlação da alteração na concentração sérica desta proteína com o câncer em cães já foi relatado em tumores mamários, linfomas e leucemias (Silva, 2008). Em LC, a concentração de haptoglobina normalmente é bastante aumentada, cerca de quatro a cinco vezes maior que em cães saudáveis, demonstrando ser um marcador sensível para esta afecção (Tabela 3) (Calazans et al., 2009).

Tabela 3. Médias e desvios-padrão das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) verificadas no proteinograma obtido em gel de poliacrilamida de cães sadios e cães com linfoma.

Proteína	Peso molecular (d)	Cães sadios mg/dL	Cães com linfoma mg/dL
Imunoglobulina A	145.000	25,91±10,06	19,11±16,99
Imunoglobulina G cadeia leve	36.000	603±596,50	814±666,91
Haptoglobina	42.000	94,54±59,50a	554±449,51b
Albumina	65.000		
Ceruloplasmina	125.000	3,42±7,44a	43,95±18,19b
Imunoglobulina G cadeia pesada	57.000	1.002±499,11	998±907,23

Fonte: Calazans et al., 2009.

1.1.9 Albumina

Em cães saudáveis, a albumina corresponde a 60% da concentração total de proteínas, sendo a mais abundante no plasma. A albumina é sintetizada pelos ribossomos dos hepatócitos, transferida para o retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso e complexo de golgi, atravessando a membrana dos sinusóides (Silva et al.; 2008).

A quantidade de albumina sintetizada é controlada pelas variações na pressão coloidosmótica, detectada através de receptores nos sinusóides, embora também sofram influência dos hormônios, como a insulina, tiroxina e cortisol (Evans, 2002). Somente cerca de 30 a 40% da albumina está presente no sangue, o restante encontra no interstício. Os músculos, fígado e rins são os órgãos onde ocorre o catabolismo da albumina, sendo responsáveis pela metabolização de 40 a 60% da albumina total (Santarén et al., 2008)

Além de manter a pressão coloidosmótica, a albumina possui função de transporte de substâncias. Diversos metabólitos no sangue são transportados pela albumina, e isso auxilia o deslocamento de substâncias que são solúveis em água e

evita a eliminação excessiva, através do rim, de moléculas pequenas. Dessa forma, ácidos graxos, colesterol, bilirrubina, óxido nítrico e íons são carregados pela albumina (Evans, 2002; Kaneko et al., 2008).

A hipoalbuminemia está presente em pacientes com diversos neoplasmas, sendo um achado comum nessas afecções. Entretanto, de acordo com Prince (1991) a presença de hipoalbuminemia em cães com linfoma está associada a um pior prognóstico, por ser indicativa de inflamação aguda, hepatopatia ou sepse nestes pacientes e, portanto, indica uma pior resposta à quimioterapia (Eckersall, 2008).

1.1.10 Alfa-1-antitripsina (AAT)

A alfa-1-antitripsina (AAT) compõe o grupo dos “inibidores de proteases”, que possuem a função de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante um processo inflamatório agudo. É chamada de antitripsina por sua capacidade de inativar a tripsina, uma enzima digestiva pancreática, porém é mais eficiente inativando outras enzimas digestivas, como a elastase produzida por neutrófilos. Assim, sua nomenclatura mais precisa é Inibidor de Proteinase alfa 1 ($IP\alpha 1$) (Naoum et al., 1999).

Desta forma, sua síntese é estimulada durante a resposta inflamatória aguda, ou seja, é uma PFA positiva. O aumento da AAT é típico das hepatopatias, exceto na cirrose, nesse caso ela tende a diminuir sua concentração, também aumenta na doença pulmonar crônica (Naoum et al., 1999).

As enzimas proteolíticas que são inativadas pela AAT possuem a capacidade de degradar a membrana basal e a matriz extracelular, permitindo o contato das células neoplásicas com o estroma e consequente penetração e infiltração celular, ocasionando metástases e crescimento tumoral (Gomes et al., 2009). Portanto a AAT tem sido apontada como fator protetivo contra diversas neoplasias, com potentes propriedades antiinflamatórias e pode aumentar principalmente em linfomas de estágio IV (Kaneko et al., 2008).

1.1.11 Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP)

A alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) é uma alfa-1-globulina, sua concentração sérica altera-se significativamente após um processo inflamatório. A AGP apresenta propriedades imunomoduladoras, de reparo e de cicatrização; se liga a maioria dos fármacos e agentes inespecíficos, apresenta sua concentração elevada na babesiose, erliquiose, parvovirose e neoplasias como linfoma, sarcoma e carcinoma (CERÓN et al., 2005). A AGP é uma das principais proteínas glicosiladas no soro, com peso molecular por volta de 43 KD (Eckersall, 2008).

A AGP se liga aos metabólitos endógenos, tais como a heparina, histamina, serotonina, esteróides e catecolaminas (Israili e Dayton, 2001). Há ainda relatos sobre a habilidade da alfa-1-glicoproteína ácida se ligar a fármacos. Isso pode ter implicações terapêuticas, como afetar a concentração de fármacos livres, diminuindo a fração ativa dessas drogas na corrente sanguínea, o que influencia diretamente na farmacocinética do medicamento e na eficácia do tratamento (Eckersall, 2008).

A habilidade da AGP em se ligar a substâncias de baixo peso molecular pode exercer uma função de proteção geral, como a ligação a lecitinas e endotoxinas. A AGP também tem várias funções na defesa inata contra infecção e modulação da resposta imune (Kogika et al., 2003). Além disso, a fagocitose, a ativação de neutrófilos e agregação plaquetária são inibidas pela alfa-1-glicoproteína ácida e ela parece ter participação na maturação de linfócitos B e T (Israili e Dayton, 2001).

Na maioria das espécies, a AGP é uma proteína de fase aguda moderada, ou seja, aumenta aos poucos, porém permanece elevada por mais tempo do que a proteína de fase aguda principal, como a proteína C-reativa de caninos e haptoglobina. Nesse caso, isso pode ser promissor no diagnóstico de diversas enfermidades (Israili e Dayton, 2001).

Em estudo de Vieira et al. (2010), ao avaliar o proteinograma sérico de cães diagnosticados com linfoma cutâneo no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento, foi observado que no momento do diagnóstico, os cães apresentaram concentrações elevadas de AGP e transferrina, quando comparados com cães saudáveis.

1.1.12 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina é uma proteína responsável pelo transporte do cobre, na produção de células vermelhas e na proteção celular de compostos gerados pela fagocitose de microrganismos e debrís celulares, sendo um importante antioxidante (Gruys et al., 2005). Constitui-se de uma proteína de fase aguda positiva, que se desloca para fração alfa-2-globulina (Bush, 2004). Seu aumento ocorre nos processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários, enquanto a diminuição é observada principalmente ao nascimento, em casos de desnutrição, nefrose e doenças hepáticas associadas à intoxicação por cobre. Sua meia vida é de aproximadamente quatro dias, mais curta em relação à a1-glicoproteína ácida (Bush, 2004).

A inflamação aguda, a lesão tecidual e a febre produzem um aumento nas alfa-globulinas, como a haptoglobina e ceruloplasmina, às vezes acompanhadas por um aumento nas betaglobulinas, como o fibrinogênio. A inflamação subaguda produz um aumento nas alfa e betaglobulinas. Já na inflamação crônica, há um aumento das gamaglobulinas (Bush, 2004).

Calazans et al. (2009) compararam o perfil das PFA em soro de cães saudáveis e com linfoma multicêntrico, detectando uma elevação da ceruloplasmina e haptoglobina, assim como uma diminuição na albumina, nos cães com linfoma.

1.1.13 Transferrina

A transferrina é uma betaglobulina produzida pelos hepatócitos, cuja função é o transporte do ferro plasmático, sendo o seu aumento um sinal de carência de ferro (Pires et al., 2011). A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, cujos teores séricos tendem a decrescer na presença de condição inflamatória (Tizard, 2008).

A concentração da transferrina também pode estar aumentada na anemia ferropriva e na gestação. Essa proteína plasmática possui meia vida de oito a dez dias, possuindo também uma atividade antibacteriana e anti-viral. Reduções de transferrina são observadas em doenças hepáticas, infecções agudas e crônicas,

leucemia (Pires et al., 2011) e nas anemias hemolíticas, onde os níveis de ferro sérico estão elevados (Tizard, 2008).

O metabolismo do ferro está associado com as proteínas ligadoras de ferro, tais como a transferrina, a lactoferrina, a haptoglobina e a ferritina. Em condições inflamatórias ou de infecção, como por exemplo, após a invasão bacteriana, é parada a absorção de ferro intestinal, no intuito de dificultar a sobrevivência do patógeno no organismo hospedeiro (Pires et al., 2011).

Em estudo de Hernandez et al. (2017), nos cães com linfoma foi encontrada associação positiva entre o tempo de sobrevida e as concentrações baixas das proteínas albumina e transferrina, ou seja, os cães com linfoma apresentaram uma redução significativa nas concentrações de albumina e transferrina em relação aos cães saudáveis.

1.1.14 IgA

A IgA existe primariamente em duas formas, como um monômero (160 KD) no sangue e na forma secretória como um dímero (390 KD). Menos comumente, a IgA pode ocorrer na forma de polímero. Em animais domésticos, a IgA é importante como anticorpo secretório dentro do trato intestinal e dos pulmões. Ela é responsável por neutralizar vírus e não permitir a aderências de patógenos bacterianos aos tecidos alvo (Kaneko, 1997).

A IgA encontra-se em maior concentração nas doenças infecciosas, hepáticas, doenças do tecido conjuntivo, mielomas e outros tumores do sistema retículo endotelial. A IgA apresenta-se em menor concentração nos fetos, nos animais recém-nascidos antes da ingestão do colostro, nas deficiências imunológicas e na gamaglobulinemia (Kaneko, 1997). A IgA está presente nas secreções externas (lágrima, saliva, secreções respiratórias, gastrintestinais e genitourinárias) em muitas espécies animais, sendo importante para defesa local e proteção de várias superfícies do corpo contra invasão bacteriana e viral (Jain, 1993).

1.1.15 IgG

As IgGs são as principais imunoglobulinas encontradas no sangue e são responsáveis pela imunidade humoral do organismo, elas apresentam várias funções biológicas, incluindo opsonização, aglutinação e fixação de complemento (Jain, 1993). A IgG apresenta elevações e diminuições na sua concentração sérica semelhantes a IgA mediante processos neoplásicos (Kaneko, 1997).

No soro, a IgG é a classe de anticorpos com maior concentração, aproximadamente 1 a 2g/100mL, o que pode variar entre as espécies (Tizard, 2008). A estrutura da IgG corresponde a uma cadeia de quatro polipeptídeos com um peso molecular total de 180 KD. As cadeias gama são as mais pesadas de IgG e são exclusivas dessa imunoglobulina. A IgG pode estar no sistema vascular e distribuir-se por toda parte do fluido extravascular tecidual, onde ela possui muitas funções de proteção, e suas subclasses estão discriminadas na maioria das espécies (Gershwin, 2008).

A elevação significativa nas concentrações de IgG dos cães com linfoma cutâneo foi detectada em estudo de Hernandez et al. (2017), condizente com pesquisas que avaliaram a resposta humoral em pacientes humanos acometidos por linfoma cutâneo e que encontraram hipergamaglobulinemia (Talpur et al., 2002). Isso pode ser justificado pela ativação das células B normais, pela produção de uma substância denominada “fator solúvel” nesses pacientes que estimula a produção de IgG por estas células (Talpur et al., 2002).

1.1.16 Globulinemia em linfoma

Nos tumores de células linfóides pode haver o aumento de alfa-2 e betaglobulinas, apesar de nos linfomas e carcinomas hepáticos seja comum ocorrer um aumento de beta e gamaglobulinas (Bush, 2004). Em 20% dos cães com linfoma há hipergamaglobulinemia que causa a hiperglobulinemia de forma geral (Cardoso et al., 2004).

No linfoma, pode haver gamopatia monoclonal ou policlonal, que são doenças decorrentes de alterações na síntese de imunoglobulinas, ou seja, principalmente

ocorre quando há uma proliferação de células do tipo B que resulta em síntese excessiva de uma imunoglobulina monoclonal (Kaneko et al., 2008). Dessa forma, esta gamopatia está ligada a doenças linfoproliferativas, especialmente aos linfomas difusos de células grandes B (Giraudel et al., 2002).

Além disso, a alfa-1-glicoproteína ácida parece exercer algum papel na maturação de linfócitos B e T, podendo ter sua concentração alterada em casos de linfomas e ter uma influência na gamaglobulinemia (Israili e Dayton, 2001).

1.2 Dosagem sérica de Vitamina D e o câncer

A vitamina D (VD) é um hormônio esteroide, que está relacionado com a proliferação celular. A 1,25(OH)₂D₃ (Calcitriol) é a forma ativa da VD e pode ser obtida através de alimentos como, peixe, e derivados do leite, ovos e possui absorção no duodeno e jejuno dos animais. A absorção intestinal da VD requer a presença dos sais biliares, porque esta é lipossolúvel (Cunningham et al., 2014; Melanby, 2016).

A VD é produzida de maneira endógena na maioria dos mamíferos, a partir de um precursor produzido pela pele, o 7-deidrocoleciferol, que é ativado com a ação dos raios ultravioletas da luz solar e se transforma em pré-vitamina D₃. Entretanto, no caso dos cães, eles possuem uma capacidade reduzida de síntese do coleciferol na pele quando comparados às outras espécies devido à baixa disponibilidade desse precursor na pele que é rapidamente convertido em colesterol, tendo que adquirir a VD, principalmente através da dieta (Cunningham et al., 2014; Melanby, 2016).

Após a ingestão ou síntese através da pele, a VD é encaminhada ao fígado onde sofre hidroxilação e se torna a forma 25-hidroxicolecalciferol, que é a forma mais abundante da VD na circulação. Depois disso, a forma 25-hidroxicolecalciferol sofre uma segunda hidroxilação nos rins, assumindo então a sua forma ativa no organismo, o calcitriol (Figura 1).

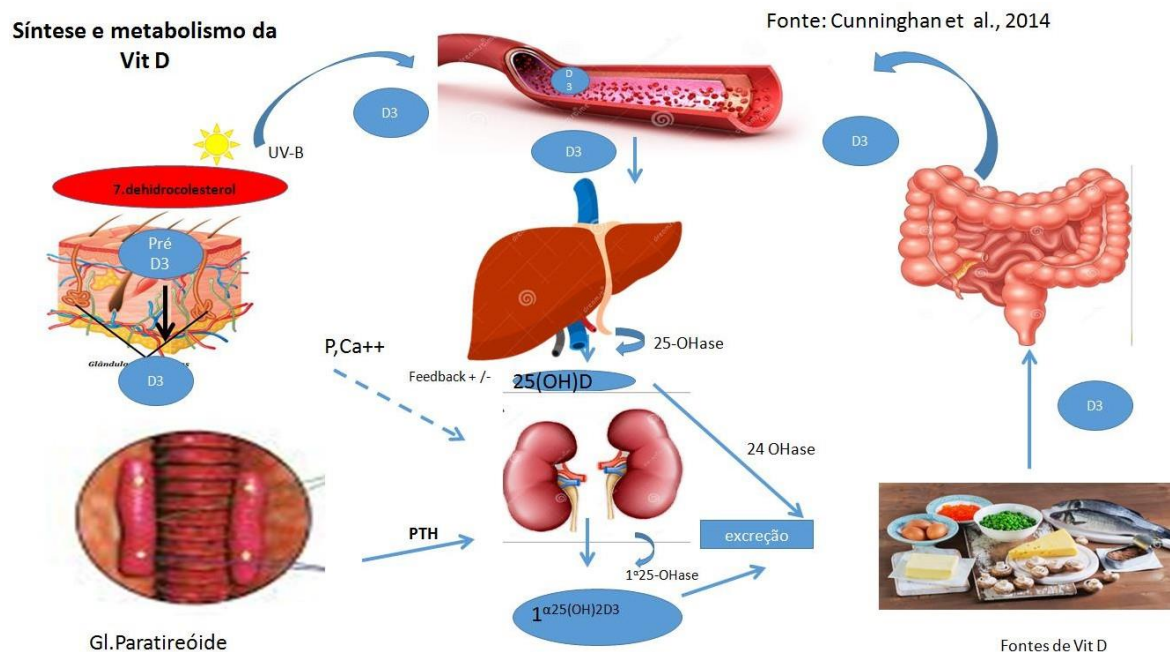


Figura 1- Síntese e metabolismo da vit D. Fonte: Adaptado e elaborado pela própria autora a partir de Tratato de fisiologia em medicina veterinária, Cunningham, 2014.

A VD regula o metabolismo ósseo, pois participa da regulação do cálcio com sua ação em ossos, rins, sistema digestório e a paratireoide. A VD é a responsável pelo controle da absorção intestinal de cálcio, bem como participa da regulação da reabsorção óssea. A forma ativa da VD, o calcitriol, [1,25(OH)2D3], promove um aumento da concentração de cálcio sérico ocasionado pela maior absorção intestinal de cálcio e fósforo, mobilizando o cálcio dos ossos e aumentando a sua reabsorção nos rins (Couto et al., 2015, Mellanby, 2016).

Em seres humanos, dados epidemiológicos têm associado baixos níveis de vitamina D com muitas doenças, incluindo uma variedade de tumores. Além disso, tem sido demonstrado nesta espécie, que baixos níveis de vitamina D estão ligados a um mau prognóstico em pacientes com câncer (Weidner e Verbrugghe, 2016).

Estudos demonstraram que o baixo nível de vitamina D está associado a um risco aumentado de tumores de vários tipos (Malone et al., 2010). Os outros estudos encontraram a mesma associação de baixa concentração sérica de vitamina D com doenças como insuficiência renal, insuficiência cardíaca congestiva e doença inflamatória intestinal (Gross et al., 2000).

Ao contrário dos seres humanos, cães e gatos não produzem VD a partir da exposição da pele à luz solar. Sua única fonte de VD provém da dieta (Hazewinkel et al, 2002; Couto et al.,2015). A Associação de Controle Alimentar Oficial Americana recomenda o acréscimo de 500 UI de calcitriol em cada Kg de ração produzida para caninos, de forma que o animal receba cerca de 10 UI de VD por Kg de peso corpóreo, por dia (Gross, et al. 2000).

Trabalhos recentes demonstraram que os níveis de VD no sangue na maioria dos cães e gatos são insuficientes, justificando a suplementação. Além disso, a absorção intestinal varia significativamente entre os cães (Gross et al., 2000).

Um estudo clínico realizado em 10 cães com mastocitoma submetidos à aplicação de uma formulação concentrada de calcitriol por via oral demonstrou benefícios clínicos no tratamento dessa neoplasia, ocasionando a remissão tumoral em quatro desses pacientes (Malone, 2010). Neste mesmo estudo, ficou comprovada a maior expressão de VDR, (Receptor de Vitamina D) no mastocitoma, a presença do receptor sugeriu um novo alvo para intervenção terapêutica com VD.

A VD exerce seus efeitos antitumorais via mecanismo genômico, pelo receptor de vitamina D (VDR). O VDR é uma fosfoproteína membro da superfamília de receptores nucleares. O VDR forma um heterodímero com o receptor de ácido retinóico (RXR), agindo como um fator transcricional. Para isso, o VDR, liga-se a elementos de resposta à VD, isto é, duas sequências de seis nucleotídeos repetidas, mas separadas por três nucleotídeos aleatórios, sequências estas contidas em regiões promotoras de genes responsivos a VD, entre eles, a osteocalcina, P21, TGF β , 24 Hidroxilase (Milani et al., 2010).

Estima-se que alguns tumores apresentem expressão de receptores VDR em suas células, dessa forma a ação do calcitriol se dá de forma direta nesses neoplasmas, o que pode indicar que a administração de análogos da VD podem causar a redução da lesão (Russel et al., 2010).

A 1,25(OH) $_2$ D $_3$ é uma reguladora de crescimento negativa para células de câncer de mama in vivo e in vitro. A modulação regulatória dessas células pelo calcitriol parece suprimir a gênese de tumores nas células normais mamárias e pode ajudar a inibir o crescimento do câncer de mama já existente, caracterizando assim, um fator protetivo contra os tumores de mama.

Nas linhagens de células de câncer de mama humano MCF-7, o calcitriol induziu, de maneira molecular, a apoptose por inibir a expressão do gene Bcl-2 que é anti-apoptótico (Simboa-Campbell et al., 1996).

O calcitriol exerce seu efeito antiproliferativo inibindo a progressão celular para a fase S através da modulação de moléculas do ciclo celular, induzindo assim a parada no ciclo celular em G1/G0 através do aumento da expressão de inibidores de quinase dependente de ciclina, diminuindo a atividade quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), e através da hiperfosforilação da proteína retinoblastoma. Em algumas células, a 1,25(OH)₂D₃ induz a apoptose pela *down-regulation* de gene anti-apoptóticos como Bcl-2 (James et al., 1996).

Em uma pesquisa em humanos, que correlacionou a deficiência e suplementação de VD em pacientes com linfoma de células B agressivo tratados com imunoterapia, foi demonstrado que os pacientes associados aos níveis mais baixos de 25(OH)D₃ apresentavam características de baixo desempenho, excesso de peso, sintomas, sub-estadiamento b, LDH elevado, níveis mais baixos de albumina e hemoglobina. Além disso, após a suplementação, pacientes com níveis normalizados de 25(OH)D₃ mostraram sobrevida melhor do que pacientes com persistência de níveis insuficientes / deficientes de 25(OH)D. Esse estudo fornece a primeira evidência de que alcançar níveis normais de 25(OH)D após a suplementação de vitamina D₃ esteve associado à melhora nos pacientes com linfoma de células B alto grau ao receber tratamento com rituximabe (anticorpo anti- CD20) (Hohaus, et al., 2017).

Há outro estudo com humanos que mediu os níveis de vitamina D no pré-tratamento, em pacientes com linfoma Hodgkin tratados prospectivamente e correlacionou esses níveis com os resultados clínicos. Obteve como resultados que cinquenta por cento dos pacientes eram deficientes em vitamina D (30 nmol / L) antes da quimioterapia planejada. A deficiência de vitamina D no pré-tratamento foi muito comum em pacientes que recidivaram ou que eram refratários em comparação a controles livres de recidiva. Demonstrou-se que o status da vitamina D é um preditor independente do resultado da quimioterapia e levantou-se a hipótese de que o status da vitamina D pode ser importante para a quimiossensibilidade do linfoma Hodgkin. Além disso, foram realizados experimentos suplementando doses

fisiológicas de vitamina D (calcitriol) em linhas de células HL (Linfoma Hodgkin) cultivadas e foram demonstrados efeitos antiproliferativos aumentados em combinação com quimioterapia (Borchmann, et al. 2019).

Entretanto, faltam estudos na medicina veterinária que correlacionem a Vitamina D com o linfoma multicêntrico em cães, e quais seriam as implicações clínicas e prognósticas da concentração desse hormônio esteróide nos pacientes.

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DO PROTEINOGRAMA E DOSAGEM DE VITAMINA D SÉRICOS DE CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO.

2.1 Introdução

O prognóstico de cães com linfoma é altamente variável e depende de fatores que são documentados ou que se supõe que afete a resposta à terapia. Os fatores prognósticos mais consolidados, identificados para linfoma multicêntrico são: imunofenótipo, subestágio e a classificação histológica segundo a WHO. Muitos estudos têm confirmado que cães com linfomas de células T intermediárias e grandes, não indolentes, apresentam remissões significativamente mais curtas e menores durações de sobrevida do que cães com grau intermediário ou alto da doença de células B (Lane, 2018; Marconato et al. 2019).

Ainda em relação aos fatores prognósticos e preditivos para o linfoma multicêntrico em cães, as abordagens sobre a importância do papel da vitamina D na saúde sistêmica têm sido uma tendência recorrente na pesquisa nos últimos anos (Pérez Hernández et al., 2016; AL Sawah et al., 2016; Limketkai et al., 2016), despertando o interesse da comunidade científica, com um aumento exponencial de estudos em humanos (Merchan et al., 2017). Porém, no que se refere à medicina veterinária, esse conhecimento ainda é incipiente e faltam estudos consistentes.

A insuficiência de 25 (OH) D foi associada a tempo livre de doença e sobrevida inferiores em LDGCB (Linfoma Difuso de Grandes Células B) em pacientes humanos com linfoma Não-Hodgkin. Nestes estudos a normalização dos níveis de vitamina D nesses pacientes através da suplementação, melhorou os resultados do tratamento, como resposta a terapia antineoplásica e tempo livre de doença, porém ainda se fazem necessários testes em ensaios clínicos futuros (Drake et al., 2010; Hohaus et al., 2017; Borchmann et al. 2019).

Além da vitamina D, trabalhos apontam as proteínas de fase aguda como marcadores sensíveis e extremamente precoces no diagnóstico de diversas

doenças, sendo que muitas vezes essa resposta inflamatória representa um importante fator prognóstico para o paciente com câncer.

A resposta de fase aguda (RFA) é muito rápida e antecede ao estímulo do sistema imune e, em muitos casos, o surgimento dos sinais clínicos (Cerón et al., 2005). O aumento das PFAs ocorre precocemente quando comparado com a leucocitose, aumento da taxa de hemossedimentação e febre (Jain, 1993). Entretanto, é considerada uma resposta extremamente inespecífica, pois se desenvolve secundariamente em várias condições que produzem lesão tecidual (Cerón et al., 2005). Esta é uma reação muito complexa que envolve efeitos locais e sistêmicos. Um desses efeitos é a alteração na concentração de algumas proteínas plasmáticas, as PFAs, sintetizadas principalmente pelos hepatócitos. Sua indução é desencadeada pelas citocinas (IL-1, IL-6 e TNF), que atuam como mensageiras entre o local da lesão e a estimulação dos hepatócitos para a sua produção. As citocinas têm múltiplas origens, vários alvos e desempenham diversas funções e sua presença já foi confirmada em diversas espécies de animais (Jain et al., 2011). Dentre as proteínas de fase aguda que se destacam na resposta inflamatória canina, as principais são: Alfa-1-antitripsina, albumina, ceruloplasmina, transferrina, IgA, IgG, Haptoglobina e Alfa-1-glicoproteína ácida, devido a sua maior expressividade, (Eckersall, 2008).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivos gerais

Avaliar a concentração sérica da Vitamina D, (25- Hidroxivitamina D) e das proteínas séricas (Haptoglobina, albumina, transferrina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, IgA e IgG) como fator prognóstico em cães com linfoma multicêntrico e monitorar a condição de remissão do linfoma em cães em tratamento quimioterápico antineoplásico, através da eletroforese de proteínas séricas realizada em três momentos da quimioterapia antineoplásica.

2.2.3 Objetivos específicos

- Realizar um estudo clínico da população dos pacientes incluídos no experimento.
- Comparar a concentração da Vitamina D, 25(OH)D, e das proteínas séricas (Haptoglobina, ceruloplasmina, IGA, IGG, transferrina, Alfa-1-glicoproteína ácida, albumina e Alfa-1-antitripsina), entre o grupo controle (pacientes saudáveis) e o grupo linfoma.
- Comparar os pacientes com alta e baixa concentração da Vitamina D, 25(OH)D e das proteínas séricas (Haptoglobina, ceruloplasmina, IGA, IGG, transferrina, Alfa-1-glicoproteína ácida, albumina e Alfa-1-antitripsina) em relação ao tempo livre de doença nesses grupos, para determinar assim o valor prognóstico da vit D e destas proteínas em linfoma multicêntrico em cães.
- Comparar a concentração da Vitamina D, 25(OH)D e das proteínas de fase aguda (IgA, IgG, Haptoglobina, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa -1-antitripsina, ceruloplasmina, transferrina e albumina), em três diferentes momentos do tratamento quimioterápico, buscando correlacionar a concentração da vitamina e destas proteínas com a resposta terapêutica.

2.3. Material e métodos

2.3.1 Seleções dos animais

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/FCAV), Jaboticabal/SP, nº 08948/18.

Os proprietários que concordaram com a participação dos seus animais neste projeto de pesquisa receberam orientações e um termo de consentimento informativo.

Foram selecionados animais da espécie canina (*Canis familiaris*), independente de raça, sexo ou idade, com diagnóstico de linfoma multicêntrico,

mediante exames clínicos, citológicos e histopatológicos, oriundos do atendimento do Serviço de Oncologia (SOV), do Hospital Veterinário da UNESP/FCAV Jaboticabal/SP e do Hospital Veterinário da Universidade Brasil- Descalvado, durante o período de outubro de 2019 a outubro de 2020.

Os critérios de seleção foram: os animais não poderiam ter histórico de doenças infecciosas recentes (dentro de 1 mês), entretanto, não foram realizados testes sorológicos que confirmassem que os pacientes não foram expostos aos agentes infecciosos endêmicos na região do estudo. Foram excluídos da pesquisa, os pacientes com obesidade, os pacientes previamente tratados, mesmo aqueles que foram tratados apenas com corticóides, por fim, foram excluídos do experimento, os pacientes que vieram a óbito antes da décima semana do protocolo quimioterápico, pois o período selecionado para as coletas dos soros foi nas semanas (T0, T5 e T10) do tratamento, já que neste período já é esperada a remissão tumoral.

O estadiamento clínico dos pacientes foi realizado de acordo com o sistema de estadiamento da OMS (Marconato et al., 2019).

Para o grupo controle, foram selecionados 10 caninos jovens, saudáveis, pacientes que foram submetidos à cirurgia de ovariectomia ou orquiectomia, de campanhas de castração realizadas no setor de obstetrícia do HV Unesp- Jaboticabal, dos quais foram obtidos o soro para realização do grupo controle da pesquisa. Os animais foram selecionados mediante avaliação clínica minuciosa e exames hematológicos para certificar que de fato estavam saudáveis.

2.3.2 Estadiamento clínico

O processo de estadiamento incluiu anamnese, exame físico, hemograma e perfil bioquímico sérico (ALT [alanina aminotransferase], FA [fosfatase alcalina], creatinina e ureia). A aspiração dos linfonodos regionais por agulha fina e exame citológico foram realizados dos linfonodos periféricos palpáveis. Também foram realizadas radiografias torácicas (projeções lateral esquerda, lateral direita e ventrodorsal) e exame ultrassonográfico do abdômen para descartar enfermidades coexistentes e/ou detectar neoplasia intracavitária.

O mielograma foi realizado através de uma biópsia aspirativa do canal medular do úmero de 5 dos 13 pacientes com linfoma selecionados para este experimento, pois devido ao estado clínico grave que se encontravam os pacientes não foi possível submetê-los a um procedimento cirúrgico mais prolongado. Os procedimentos foram realizados quando possível no mesmo tempo cirúrgico da biópsia excisional dos linfonodos, seguindo, portanto as técnicas de antissepsia cirúrgica da região de coleta. A punção foi realizada com o auxílio de um punch ósseo para perfuração da cabeça do úmero e 2 ml do material foi coletado com uma seringa estéril de 10 ml com 2 gotas de EDTA à 10%. As amostras foram depositadas em placas de Petri para que fossem captadas todas as espículas da mesma. Juntamente com a amostra de medula óssea dos pacientes, foram encaminhadas amostras de sangue dos mesmos para análise do hemograma concomitantemente ao mielograma (Manual Tecsa, 2012).

2.3.3 Coletas das amostras sorológicas e biópsia excisional

Amostras de soro foram coletadas prospectivamente de cães com linfoma. Estas foram coletadas no dia da realização da biópsia, antes de receber qualquer tipo de tratamento antineoplásico, no HV-UNESP/Jaboticabal, e no Hospital Veterinário da Universidade Brasil de Descalvado. Tendo em vista monitorar a evolução do paciente durante o tratamento quimioterápico, as coletas de sangue total foram efetuadas no tempo $T=0$, ou seja, antes de iniciar o tratamento, no tempo $T5= 5$ semanas, e uma última amostra no $T10= 10$ semanas, as amostras foram centrifugadas e o soro foi coletado e armazenado.

Os pacientes foram diagnosticados por meio da citologia e histopatologia com o linfoma multicêntrico e foram selecionados 10 animais saudáveis para o controle, dos quais também foi coletado amostras de soro. As amostras de soro dos pacientes foram utilizadas para realização dos testes de proteinograma por eletroforese, para proteínas de fase aguda: haptoglobina, ceruloplasmina, albumina, globulinas, transferrina, alfa-1-antitripsina e alfa-1- glicoproteína ácida. A eletroforese foi

realizada em parceria com o Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP.

Foi realizada a dosagem da Vit D, [25(OH)D3], sérica do Grupo Linfoma (GL), da mesma forma nos três momentos do tratamento quimioterápico e também do Grupo Controle (GC), através do método de quimioluminescência e essa etapa foi realizada em parceria com o laboratório de análises clínicas e diagnóstico em medicina veterinária, Vetpat, em Campinas / São Paulo.

As biopsias excisionais foram realizadas através de uma pequena incisão com o bisturi, nº24, acima do linfonodo periférico identificado com linfadenopatia no início do tratamento dos pacientes, procedeu-se com a remoção completa do linfonodo, após a ligadura dos vasos linfáticos aferente e eferente, adequada hemostasia com bisturi bipolar e posterior síntese da pele e tecidos adjacentes.

Para realização das coletas, os animais foram submetidos ao protocolo anestésico constituído de Medicação Pré-anestésica (MPA) (Acepromazina+Cetamina+Midazolam), indução com propofol e manutenção com isoflurano. Foram coletados, um fragmento para congelamento a temperatura de – 196°C e outro para conservação em formol tamponado à 10%, em seguida esses fragmentos foram enviados para análise histopatológica e estudos imunoistoquímicos.

Após a realização das coletas, os pacientes foram liberados para recuperação em casa, e foi prescrito dipirona, 25 mg/kg/BID/ 3 dias e meloxicam, 0,1 mg/Kg/SID/ 3 dias.

2.3.4 Histopatológico e Imunoistoquímica

Os exames histopatológicos foram realizados pelo setor de patologia veterinária da Unesp-Jaboticabal. As amostras coletadas cirurgicamente foram conservadas inicialmente em formol a 10%, e em seguida, num período de 24 h, foi feita a transferência para o álcool a 70% e encaminhadas para emblocamento em parafina, coloração HE e posterior análise no laboratório de Patologia Veterinária da mesma universidade.

A avaliação imunoistoquímica foi realizada no laboratório de análises clínicas veterinárias de Campinas (VETPAT), para tal, foram feitos cortes de tecido com 3 µm, montados em lâminas silanizadas que foram desparafinizadas e reidratadas, posteriormente foi realizada a recuperação antigênica utilizando solução de citrato pH 6, em câmara de pressão Pascal (DakoCytomation). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de bloqueio pronta para uso (Spring Biosciences) seguindo indicações do fabricante. Após essa etapa, procedeu-se o bloqueio de reações inespecíficas com proteinblock (Novocastra) e os cortes foram incubados com os anticorpos primários durante períodos demonstrados na tabela 4a temperatura ambiente de 27° C.

Em seguida, foram realizadas as reações imunoistoquímicas com sistema de detecção de polímero Novolink (Leica) conforme preconizado pelo fabricante (Tabela 4).

Por fim, a revelação da reação foi obtida pelo substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) (Novolink). A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra de LC sabidamente positivo para CD3, uma amostra de LC positiva para PAX5. Os controles negativos foram feitos substituindo-se os anticorpos primários por diluentes de anticorpo. Para cada reação foi acompanhada lâminas de controles positivos e negativos.

Na reação de imunoistoquímica foi utilizada para a imunofenotipagem de linfomas, os marcadores para linfoma T: (CD3), Linfoma B: (Pax5) e além disso foi realizado o marcador de proliferação celular: (Ki67), conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Anticorpos usados para imuno-histoquímica de linfonodos de cães para imunofenotipagem do linfoma e KI67(marcador de proliferação celular).

Marcador	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação	Sistema de detecção	Controle positivo
PAX 5	Monoclonal 24/PAX-5	1:1000	Solução Pascal Citrato, pH 6 a 95°, banho maria por 45 min.	2 horas	sistema de detecção de polímero Novolink (Leica)	Amostra de linfonodo canino sabidamente positiva para Linfoma B
CD3	Policlonal	1:500	Solução Pascal Citrato, pH 6 a 95°, banho maria por 20 min.	2 horas	sistema de detecção de polímero Novolink (Leica)	Amostra de linfonodo canino sabidamente positiva para linfoma T
KI67	Monoclonal MIB-1	1:100	Solução Pascal Citrato, pH 6 a 95°, banho maria por 20 min.	2 horas	sistema de detecção de polímero Novolink (Leica)	Amostra de linfonodo canino

Fonte: Laboratório de análises clínicas veterinárias Vetpat, Campinas, 2019.

As amostras foram avaliadas por microscopia de luz, utilizando gráticula ocular de diâmetro de 26 mm (Microscópio Leica DMLB, HC PLAN 10x/20, 4"x5"). As imunoexpressões dos anticorpos CD3 e PAX-5 foram estabelecidas por porcentagem de células marcadas, considerando-se o número de células positivas e o número total de células dentro da gráticula, avaliadas em cinco campos aleatórios de maior aumento (x40). A análise da expressão dos marcadores Ki-67 foi feita em objetiva de 40X, contando-se as células positivas e todas as células presentes em cinco campos aleatórios, sendo estes resultados transformados em percentual de células positivas, sendo considerada a amostra positiva quando pelos menos 10% das células exibiu marcação imunoistoquímica, de acordo com Sueiro et al. (2004). As lâminas foram avaliadas com auxílio de um analisador de imagens automático ZEISS com programa de morfometria KS300-3.0 (Moraes, 2009).

2.3.5 Ensaios de Proteínas de fase Aguda e Fracionamento eletroforético

Nos ensaios de proteínas de fase aguda experimental, todas as amostras de soro foram separadas e armazenadas a temperatura de -20°C em freezers destinados para experimentos do setor de oncologia da UNESP-Jaboticabal.

As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP.

O proteinograma sérico foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado segundo técnica descrita por Laemmli (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICALELEKTROPHORESIS CELLS® - BIO-RAD).

A polimerização do gel foi possível pela adição de 15,0 L de tetrametiletilenodiamina (TEMED)³ e 0,3 L de persulfato de amônia a 10%. A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução.

A parte superior da placa que continha o gel entrou em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada estéril. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10 μL de soro sanguíneo diluídos em 30 μL de tampão-fosfato (PBS) e 20 μL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 μL das referidas amostras foi depositada no fosso do gel.

A placa era colocada em suporte apropriado, em contato com solução tampão com pH 8,5 e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel era corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uniformizar a coloração e, em seguida,

retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentassem visíveis e nítidas.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-9301) através do escaneamento das amostras. Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores (SIGMA MARKER™, wide range, 6,5 a 200 KD) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KD, além das proteínas purificadas albumina, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, alfa-1- glicoproteína ácida, IgA, e IgG. Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

2.3.6 Tratamento quimioterápico

Os pacientes selecionados para participar deste estudo estiveram em tratamento quimioterápico, de duração de 19 semanas, com o protocolo CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona); conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Protocolo CHOP para tratamento de linfoma canino realizado no Setor de Oncologia Veterinária (SOV), HV- UNESPJaboticabal e na Universidade Brasil- Descalvado, 2019.

Protocolo CHOP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Vincristina 0,7 mg/m ² EV	X		X			X	X				X		X			X		X	
Ciclofosfamida 250 mg/m ² VO		X					X					X					X		
Doxorrubicina 30 mg/m ² EV				X					X				X						X
Prednisona VO	2mg/kg	1,5mg/kg	1mg/kg	0,5 mg/kg															

Fonte: Vail & Young, 2007

Em caso de recidiva durante o tratamento de primeira linha, os pacientes foram submetidos a uma terapia resgate com lomustina 70mg/m², VO, a cada 21 dias e esses animais não foram retirados do grupo experimental.

2.3.7 Dosagem de Vit D (Quimioluminescência)

Para a dosagem da vitamina D foi utilizado o método de ensaio laboratorial (Liaison 25 OH VitaminD Total®), que usa a tecnologia de imunoensaio quimioluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa de 25(OH)D e outros metabólitos hidroxilados da vitamina D no soro. Este é um imunoensaio quimioluminescente competitivo (CLIA) direto, que determina a quantidade de 25(OH)D total no soro ou plasma.

Durante a primeira incubação, a 25(OH)D é dissociada da sua proteína de ligação e liga-se ao anticorpo específico na fase sólida. Ao fim de 10 minutos é adicionado o marcador vitamina D ligado a um derivado de isoluminol (Alves et al., 2013). Após uma segunda incubação de 10 minutos, o material não-ligado é removido com um ciclo de lavagem. Subsequentemente, os reagentes iniciadores são então adicionados e inicia-se uma reação quimioluminescente rápida. O sinal de luz é medido por um fotomultiplicador como unidades de luz relativas (RLU), sendo inversamente proporcional à concentração de 25(OH)D nos calibradores, nos controles ou nas amostras (Figura 2) (Fonseca, 2017).

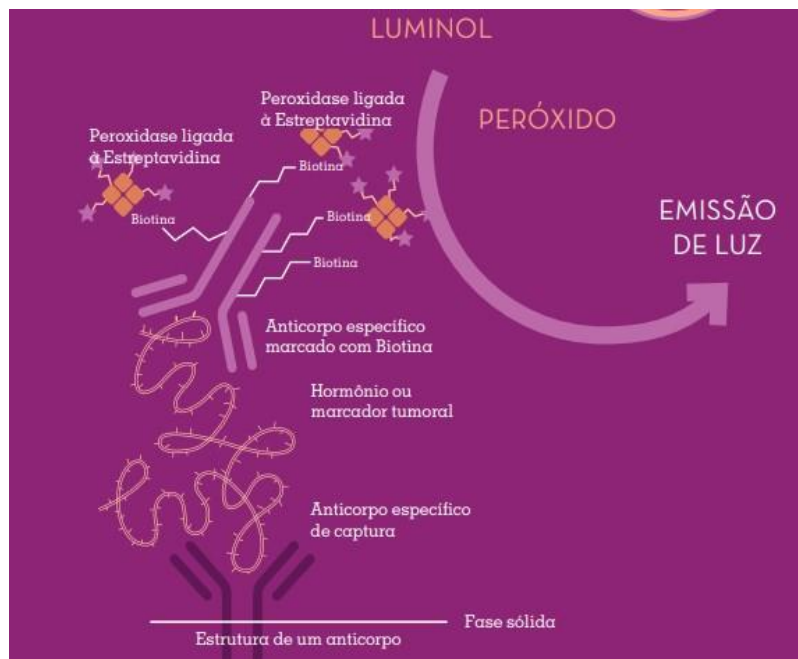


Figura 2: Esquema da reação de eletroquimioluminescência. Fonte: Bender e von Mühlen, Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica, 2016.

2.3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Áustria). Inicialmente foi testada a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro) e homocedasticidade das variâncias (teste de variância) de todas as variáveis estudadas. Os valores reais ou transformados das variáveis estudadas foram comparados entre os grupos e momentos pelo teste de ANOVA com medidas repetidas no tempo e posteriormente as diferenças encontradas foram identificadas pelo teste de Tukey. Os valores reais ou transformados das variáveis foram estudados nos pacientes com linfoma através do teste T student, caso alguma variável resultasse em análises significativas, em seguida seriam submetidos a determinação das curvas ROC (Registered Operative Curve), que avalia a capacidade discriminatória diagnóstica. Esse mesmo teste ROC calcula o ponto de coorte, a especificidade, sensibilidade e a área sob a curva do teste. Para posteriormente, os pacientes serem separados em alta e baixa concentração de cada proteína avaliada. Na presente pesquisa, foi determinado um valor de coorte através do método curvas de ROC para a concentração da AGP, IgA, transferrina e haptoglobina, que foram as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,1$ no teste T-

student; ou seja apresentaram diferenças significativas nas análises estatísticas. Por fim, esses resultados foram comparados através da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, a qual define o percentual de pacientes que recidivaram ao longo do tempo, ou seja, comparou o tempo livre de doença entre esses pacientes. Os resultados apresentam-se como a média \pm D e a significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$). Foi realizada também, para avaliação dos resultados, a análise de correspondência múltipla, para identificar a existência de associação entre as variáveis analisadas neste estudo, as dosagens das PFAs e os achados clínicos e patológicos dos pacientes, para tal, foi usado o software Statistic 7.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Dados da População

Foram coletados amostras de 13 animais diagnosticados com linfoma multicêntrico através de citologia e histopatologia. Os cães acometidos eram predominantemente sem raça definida (SRD), ($n=4$) ou (30,76%). Os demais cães pertenciam às raças: Golden retriever, Chowchow, Lhasa apso, Cocker spaniel, Boxer e Red heeller. A média de idade de apresentação foi de 6,8 anos; (intervalo de 3-14 anos), sendo 8 fêmeas (61,5%), destas, 3 eram castradas e 5 não-castradas e 5 machos (38,46%), destes, 3 eram castrados e 2 não-castrados (tabela 6). Cerca de 90% dos pacientes eram oriundos da zona urbana, da região metropolitana de Ribeirão Preto.

Outros estudos também observaram um acometimento maior de cães SRD, principalmente por LDGCB (Linfoma Difuso de Grandes Células B), que é o tipo histológico de linfoma multicêntrico mais comum em cães (Marconato et al., 2015; Aricó et al., 2014). Porém, outra pesquisa apontou o boxer e o Rotweiller como as raças mais acometidas no LC (Morrison, 2004). A média de idade de apresentação obtida no presente estudo foi próxima à relatada na literatura, cujos dados revelam que o LDGCB é mais frequente em cães com 7,5 a 8 anos (Ferrareso et al., 2014).

Em relação ao estadiamento, 9 animais apresentaram Estadio 4, perfazendo um total de 76,9%, e também se observou que a grande maioria dos animais

apresentava-se com sinais clínicos, classificados como subestadio “b”, (n=11) ou 84,6% e apenas 2 foram classificados como subestadio “a”, (Tabela 6). De forma semelhante ao encontrado em nosso estudo, pesquisas prévias também tiveram como resultado que um número significativo de pacientes, aproximadamente 80% dos cães com linfoma estudados apresentava o estadio IV (Marconato et al., 2015). Entretanto, Mutz et al. (2015), em seu estudo envolvendo 77 cães com linfoma multicêntrico, verificou um número significativo de pacientes em estadio V, cerca de 60% dos pacientes.

Tabela 6: Dados clínicos dos pacientes do GL (Grupo Linfoma).Hospital Veterinário Unesp-Jaboticabal, 2019

VARIAVEL		N	%
SEXO	Fêmea	8	61,54
	Macho	5	38,46
IDADE	Média (7,53)		
PESO (Kg)	Média (19,56)		
RAÇA	SRD	4	30,7
	Golden Retriever	2	15,38
	Rotweiller	1	7,7
	Pug	1	7,7
	Chowchow	1	7,7
	Lhasaapso	1	7,7
	Cocker spaniel	1	7,7
	Redhillier	1	7,7
	Boxer	1	7,7
	ESTADIAMENTO	I	0
II		0	0
III		1	7,7
IV		10	76,9
V		2	15,4
SUBSTADIAMENTO	a	2	15,4
	b	11	84,6

As alterações clínicas observadas nos pacientes do presente estudo foram: o edema de membros (figura 4), efusão pleural, inapetência, vômito, diarreia, dispnéia, apatia, anorexia e perda de peso. Quanto à linfadenopatia, essa alteração foi observada em 100% dos pacientes (Figura 3), 46,15% apresentaram lesões em baço de aspecto rendilhado, 23,07% esplenomegalia e 15,4% lesões nodulares em baço, 15,4% linfadenopatia em linfonodo mediastínico (Figura 6) e apenas 7,7%

apresentou lesões infiltrativas em pulmões (Figura 5). Furtado et al. (2013), obtiveram resultados semelhantes em seu estudo, os pacientes caninos com linfoma multicêntrico também apresentaram sinais clínicos conforme descrito na literatura, destacando-se a linfadenopatia e o edema em membros. Entretanto sinais clínicos incomuns podem acontecer na manifestação clínica da doença, como convulsões, dispnéia, oligúria e polidipsia (Valli et.al., 2013)



Figura 3: Imagem fotográfica de Linfadenomegalia em linfonodo axilar em caninocom linfoma multicêntrico (seta). Fonte: Hospital Veterinário Unesp-Jaboticabal, 2019.



Figura 4: Imagem fotográfica de edema em membro posterior em canino com linfoma multicêntrico. Fonte: Hospital Veterinário, Unesp –Jaboticabal, 2019.

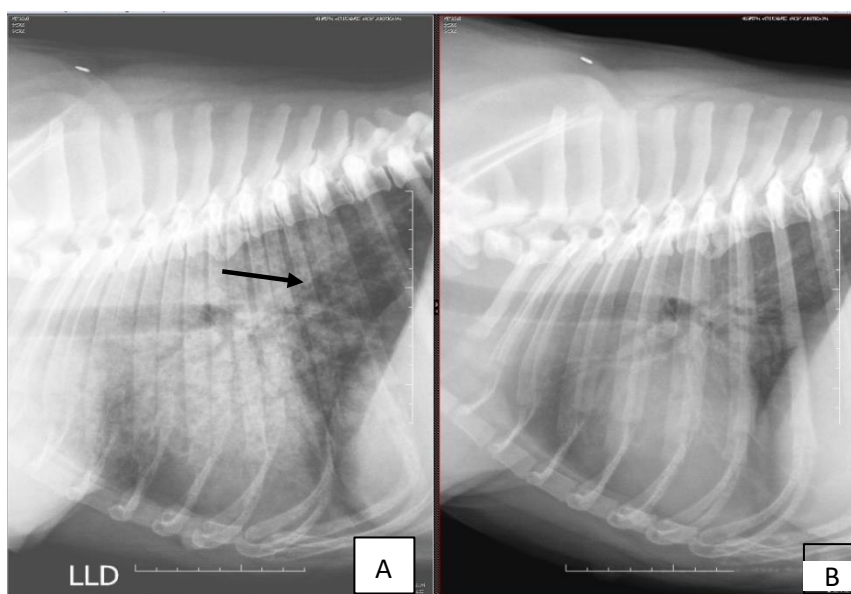


Figura 5: Imagem radiográfica de tórax de paciente com suspeita de infiltração neoplásica em pulmão (seta) de linfoma multicêntrico de estadiamento 5, subestadiamento B. A) Exame pré-quimioterapia antineoplásica. B). Exame pós primeiro ciclo do CHOP. Fonte: Hospital Veterinário Unesp-Jaboticabal, 2019.

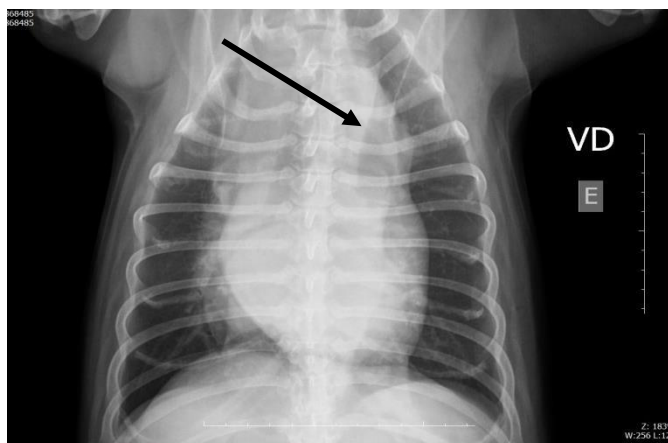


Figura 6: Imagem radiográfica de tórax de paciente com linfadenomegalia em linfonodo mediastínico (seta), em paciente canino com linfoma multicêntrico. Fonte: Hospital veterinário, Unesp-Jaboticabal, 2019.

Foram observados nos mielogramas realizados dos pacientes com linfoma, alterações como: hipoplasia eritróide e mielóide que se correlacionavam com a anemia e neutropenia no sangue periférico destes pacientes (Figura 7A). Entretanto, nos pacientes analisados não foram observadas alterações linfoproliferativas, bem como acometimento neoplásico da medula óssea (Figura 7B). Siva (2011) correlacionou alterações em mielograma com as alterações hematológicas apresentadas por cães com linfoma multicêntrico, em seu estudo também foi observada hipoplalasia mielóide e eritroide na medula óssea que se correlacionavam com anemia e leucocitose no sangue periférico; entretanto, neste mesmo estudo, foi observada, em dois animais, a presença de infiltração neoplásica na medula óssea, diferentemente do que foi detectado em nosso estudo.

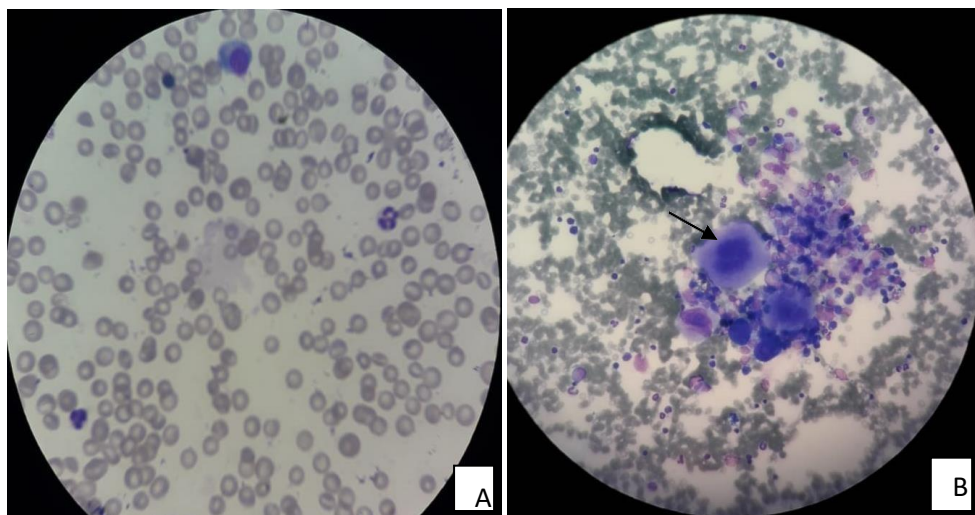


Figura 7 A: Fotomicrografia de mielograma de paciente com linfoma, demonstrando hipoplasia medular, especialmente das séries eritróide e mielóide. B: Mielograma de paciente com linfoma, não demonstrando infiltração neoplásica, seta indicando megacariócito. Aumento de 40 x. Coloração tipo Romanowsky. Fonte: Laboratório de patologia clínica, UNESP-Jaboticabal, 2019.

Em relação as alterações hematológicas observadas, sete dos treze pacientes com linfoma apresentaram anemia no momento do diagnóstico (53,8%), e 5 pacientes (38,46%) apresentavam hipercalcemia antes de iniciar a quimioterapia. Dois pacientes apresentaram FA aumentada no momento do diagnóstico (15,38%) e também dois pacientes apresentaram hipoalbuminemia (15,38%) (Tabela 8 Leme et al. (2011), observaram uma alta ocorrência de alterações hematológicas e bioquímicas como: a anemia, hipercalcemia e hipergamaglobulinemia, devido a síndrome paraneoplásica ocasionada pelo LC. De acordo com Cápua et al. (2011), em seu estudo retrospectivo das alterações hematológicas de cães com linfoma, foram demonstradas alterações expressivas nesses animais, além das alterações mencionadas anteriormente, a trombocitopenia também foi significativa nos pacientes deste estudo, além disso, afirmou-se também que a anemia e trombocitopenia apresentam influência negativa no prognóstico desses pacientes.

Avaliando a resposta ao tratamento, observou-se que todos os pacientes apresentaram remissão completa dos sinais clínicos após o primeiro ciclo de quimioterapia antineoplásica (CHOP), ou seja, na quinta semana do protocolo. Entretanto, cerca de 46% dos pacientes recidivaram com média de tempo livre da

doença de 186,9 dias; intervalo (28-461 dias) e tempo médio de sobrevida de 208,9 dias; intervalo (73-480 dias), (Tabela 7). Dado similar ao obtido nos estudos de Valli et al. (2013) que obteve média de sobrevida de 221 dias em cães com linfoma multicêntrico alto grau. Porém outros estudos diferiram destes resultados ao obter sobrevida próxima a um ano em pacientes com linfoma alto grau tratados com o protocolo CHOP de quimioterapia (Jark et al., 2016).

O tempo de sobrevida em LC pode ser influenciado por fatores inerentes ao paciente e ao tumor em si. Em relação às variações individuais, são fatores prognósticos negativos: obesidade, idade avançada, anemia e desnutrição. Já em relação à doença, o prognóstico negativo está associado ao tipo histológico de alto grau, alto índice mitótico, imunofenótipo T, estádios IV e V e subestádio b (Marconato et al., 2011).

No presente estudo, quatro cães, (30,7%) de diferentes raças vieram a óbito antes de finalizar o tratamento. Os dois pacientes com maior tempo de sobrevida, obtiveram 461 e 353 dias de sobrevida.

Tabela 7: Avaliação da resposta ao tratamento e desfecho dos pacientes do GL(Grupo Linfoma). Hospital Veterinário Unesp-Jaboticabal, 2019

Paciente	Resposta ao tratamento	Recidiva	Desfecho	TLD	TSV
A1	RC	SIM	óbito	249 dias	288 dias
A2	RC	SIM	óbito	121 dias	125 dias
A3	RC	SIM	óbito	28 dias	73 dias
A4	RP	SIM	óbito	77 dias	87 dias
A5	RC	SIM	óbito	137 dias	158 dias
A6	RC	SIM	óbito	65 dias	147 dias
A7	RC	SIM	óbito	353 dias	360 dias
A8	RC	SIM	óbito	461 dias	480 dias
A9	RC	Não	Finalizou protocolo	o	
A10	RC	NÃO	Finalizou protocolo	o	
A11	RC	NÃO	Em tratamento		
A12	RC	SIM	óbito	84 dias	92 dias
A13	RC	SIM	Finalizou protocolo	294 dias	304 dias

Legenda: Em negrito, pacientes que recidivaram antes dos 200 dias do diagnóstico.

RC: Remissão Completa

De acordo com Leme et al. (2011), também são fatores prognósticos para o linfoma multicêntrico em cães: a presença ou não de anemia, hipercalcemia e comprometimento da função hepática que pode ser evidenciado pela hipoalbuminemia e aumento da FA.

Tabela 8: Informações hematológicas e dosagens bioquímicas dos pacientes do grupo GL, no momento do diagnóstico (T0). Hospital Veterinário Unesp-Jaboticabal, 2019

Variável		N de pacientes	% de pacientes
ANEMIA	S	7	53,85
	N	6	46,15
Ca Corrigido no T0 em mg/dL	A	5	38,46
	B	8	61,54
FA no T0 em mg/dL	A	2	15,38
	B	11	84,61
Albumina no T0 em mg/dL	A	2	15,38
	B	11	84,61

Intervalos de referência: Ca corrigido (11,3 mg/dL), albumina (2,6 à 3,4 mg/dL), FA (20—156 mg/dL) S: sim , N: não; A: Alto, B : Baixo.

2.4.2 Grau histológico das amostras de linfonodos dos pacientes com linfoma multicêntrico

Quanto ao grau histológico das amostras de linfonodos dos pacientes com linfoma multicêntrico, observou-se uma prevalência de Linfoma Difuso de Grandes Células B, correspondendo a 53,85% dos pacientes do GL (Grupo Linfoma), com uma média de 16,3 figuras de mitose em 10 CGA (tabela 9). Por meio das análises imunohistoquímicas realizadas nos pacientes do Grupo Linfoma, foi obtido um total de 8 pacientes (66,6%) de imunofenótipo B (figura 9), e 4 pacientes (33,3%) de imunofenótipo T (figura 8), 1 paciente teve a amostra de linfonodo danificada nas análises. Em relação ao índice de proliferação celular, Ki67, foi obtido um valor médio de 61,25% e uma moda de 70% (tabela 9).

Os resultados de imunohistoquímica corroboram ao que foi encontrado no estudo de Valli et al. 2011, no qual é descrito que existem mais de 30 subtipos de

linfoma, e muitos são semelhantes aos subtipos do linfoma não-hodgkin humano, mas nem todos estão bem estabelecidos no diagnóstico da medicina veterinária (Valli et al., 2011). Todavia, existem 5 principais subtipos, sendo eles: o linfoma difuso de grandes células B, o linfoma de zona marginal, linfoma T periférico, o linfoma de zona T e o linfoma linfoblástico, estes representam mais de 80% dos diagnósticos na medicina veterinária (Comazzi et al., 2014).

A proporção entre os imunofenótipos T e B foi condizente com o que é apontado na literatura, ou seja, uma proporção de aproximadamente 70% dos casos de linfoma multicêntrico em cães tem como imunofenótipo o B e 30% o T (Marconato et al. 2015). Entretanto, Aricó et al. (2014) apontou em seu estudo um percentual de 80% do imunofenótipo B em 77 cães com linfoma multicêntrico.

O Ki67 foi positivo em todas as amostras, com um valor percentual médio alto de 61,25%, o que demonstra um alto índice celular proliferativo, caracterizando os linfomas multicêntrico de alto grau. O Ki67 é uma proteína conservada no núcleo celular que mantém a estrutura do DNA durante a mitose e é expressa nas fases G1, S, G2 e M (Hall, 1992).

Poggi et al. (2016) quantificaram o Ki67, por citometria de fluxo, e observaram tempos de sobrevivência mais curtos em cães com linfoma cujo Ki67 foi superior a 70%, o que demonstra que o Ki67 é um fator prognóstico no LC.

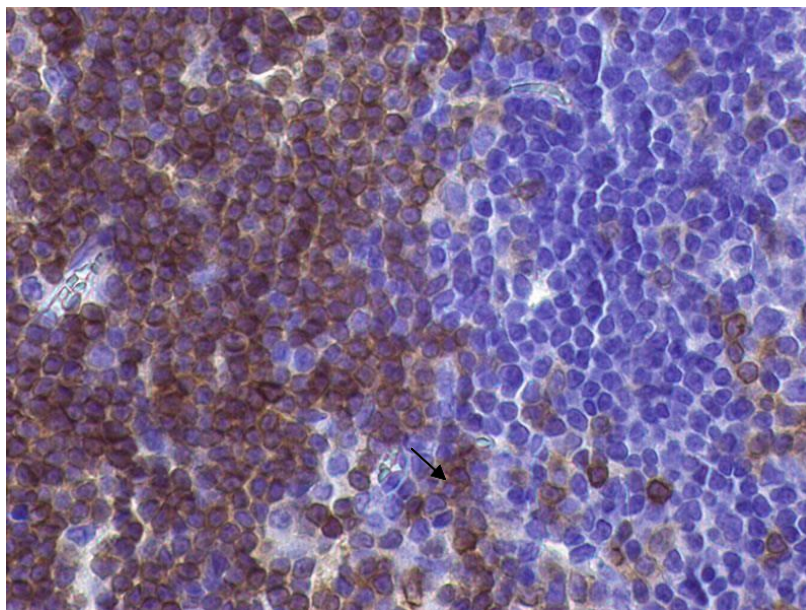


Figura 8: Fotomicrografia de Imunomarcção de linfonodo canino. Linfoma de células T, imunomarcção em membrana celular (seta). Aumento de 40 X. Imunomarcção: anticorpo CD3. Fonte: Laboratório de análises Clínicas Vetpat,2019.

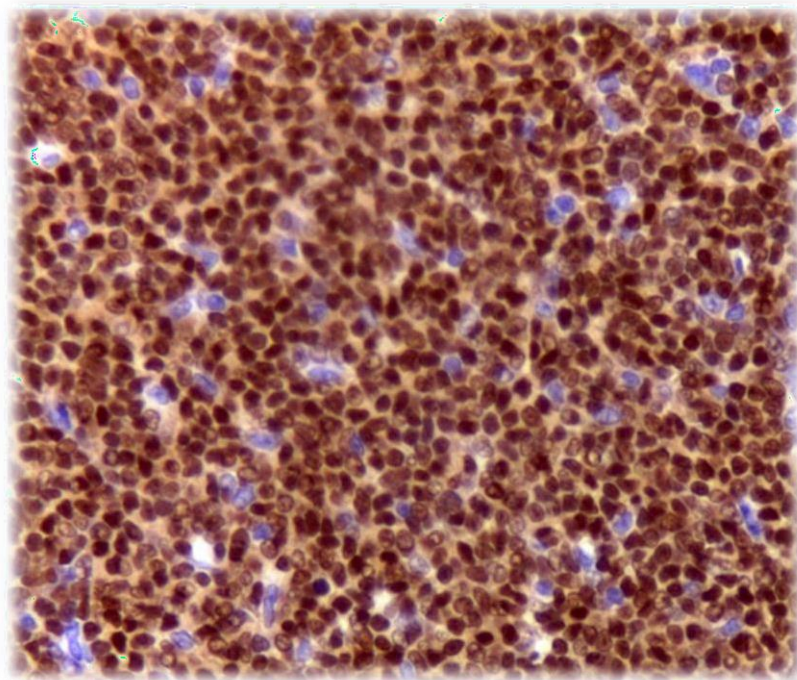


Figura 9: Fotomicrografia de Imunomarcaçãode células B, em linfonodo canino, demonstrando a imunomarcaçãocitoplasmática. Aumento: 40X. Imunomarcaçã: anticorpo PAX5. Fonte: Laboratório de análises Clínicas Vetpat, 2019.

Tabela 9: Avaliação histopatológica das amostras de linfonodos dos pacientes do grupo GL .

Paciente	Grau Histológico	Índice Mitótico figuras de mitose em 10 CGA	Imunofenótipo	Ki67
A1	Linfoma alto grau células grandes	6	B	40%
A2	Linfoma difuso de grandes células de grau intermediário	9	B	70%
A3	Linfoma difuso de pequenas células de baixo grau	20	T	70%
A4	Linfoma linfoplasmocítico	18	T	20%
A5	Linfoma difuso grandes células	20	B	65%
A6	Linfoma difuso de grandes células alto grau	82	B	45%
A7	Linfoma difuso de grandes células	20	B	90%
A8	Linfoma Difuso de grandes células	11	B	85%
A9	Linfoma difuso de pequenas células de baixo grau	5	T	15%
A10	Linfoma difuso de células intermediárias alto grau	13	T	85%
A11	Linfoma difuso de células intermediárias	10	X	X
A12	Linfoma linfoblastico B	20	B	80%
A13	Linfoma difuso de grandes células	16	B	70%

2.4.3 Dosagem sérica de Vit D

A partir dos dados apresentados na tabela 10 e 11, foi observado que os cães avaliados, tanto no GC (Grupo Controle), quanto no GL (Grupo Linfoma) eram insuficientes ou deficientes em vitamina D3. Embora existam poucos estudos em cães, essa associação entre baixas concentrações séricas de vitamina D e risco de

desenvolvimento de neoplasias foi descrito em cães com linfoma e mastocitoma (Wakshlag et al., 2011; Gerber; Hauser&Reusch, 2004).

São considerados deficientes em vitamina D, os pacientes com níveis séricos abaixo de 24,99 ng/mL e a insuficiência em vitamina D é caracterizada por níveis séricos entre 25-99 ng/mL (Selting et al., 2014). O intervalo da concentração de 25(OH)D obtido na população do GL, no T0, foi de (11,2- 62,1 ng/mL) e o valor médio foi de 32,77 ng/mL. No GC, 80% dos animais foram insuficientes, apenas 10% foi deficiente, com intervalo de concentração de (25,3- 115,2 ng/mL) e valor médio de 45,93 ng/mL. Já no GL, em relação às diferentes semanas da quimioterapia, 23,07% dos pacientes apresentaram deficiência em Vit D3 na primeira semana pré-tratamento (T0), na semana T5, 6 pacientes foram deficientes (46,15%), se observou 5 pacientes deficientes em vitamina D na semana T10 (38,46%) (Tabela 10).

Esses dados foram semelhantes ao estudo de Fonseca (2017), que avaliou a dosagem sérica de 25(OH)D em cães com neoplasias mamárias e obteve uma média da concentração na população de 36,7 ng/mL, sendo que todos os pacientes deste estudo também apresentaram insuficiência ou deficiência em vitamina D3.

Porém, os resultados do presente estudo apontam que concentrações séricas de 25(OH)D não foram significativamente menores ($P>0,05$) em cães com linfoma em comparação ao GC, o que sugere que níveis séricos de vitamina D mais baixos não são um fator de risco para o desenvolvimento de linfoma multicêntrico em cães, apesar da média da concentração ser diferente entre os grupos.

Tabela 10: Dosagem sérica por quimioluminescência da 25(OH)D3 em ng/mL nos pacientes do grupo GL, realizadas em três momentos durante o tratamento quimioterápico CHOP. Hospital Veterinário Unesp-Jaboticabal, 2019, análises do Laboratório de análises clínicas VETPAT- Campinas-2020.

Número de pacientes classificados de acordo com a dosagem de Vitamina D	T0	T5	T10
Insuficiente	10	7	8
Deficiente	3	6	5
[] Média em ng/mL	32,77	29,79	30,49

LEGENDA: Deficiência - Até 24,9 ng/mL; Insuficiência - 25 - 99,9 ng/mL; Suficiência: 100 - 120 ng/mL; Elevado: > 150 ng/mL. Amostra : Sangue. Método : QUIMIOLUMIESCÊNCIA. []: concentração.

Tabela 11: Dosagem sérica por quimioluminescência da 25(OH)D3 em ng/dL, dos pacientes do grupo GC (Grupo Controle). Hospital Veterinário Unesp-Jaboticabal, 2019, análises do Laboratório de análises clínicas VETPAT- Campinas /2020.

Classificação de acordo com a dosagem de Vitamina D	Número de animais	Percentual de animais %
Insuficiente	8	80
Deficiente	1	10
Suficiente	1	10
Média	45,93 ng/mL	

LEGENDA: Deficiência - Até 24,9 ng/mL; Insuficiência - 25 - 99,9 ng/mL; Suficiência: 100 - 120 ng/mL; Elevado: > 150 ng/mL. Amostra : Sangue. Método : QUIMIOLUMIESCÊNCIA

Nas tabelas 12 e 13, são apresentados os valores médios da concentração sérica média da vit D, [25(OH)D3], do grupo controle e do grupo linfoma nos diferentes momentos do tratamento quimioterápico, demonstrando que não foram significativas as diferenças entre estes valores médios calculados em cada grupo e nem entre os momentos da quimioterapia antineoplásica ($P > 0,05$). A concentração de Vit D não se alterou significativamente com a presença da doença ou com a evolução do tratamento.

Resultados semelhantes foram observados em estudos de Crestoni et al. (2013), no qual se comparou a concentração sérica de 25(OH)D3 entre cadelas portadoras de tumores mamários e cães não portadores (machos e fêmeas) e não foi encontrada diferenças significativas que indicassem a relação da concentração de 25(OH)D3 e a carcinogênese mamária. Entretanto, em estudos de Wakshlag (2011), em que se avaliou a concentração da vitamina D3 em 87 cães da raça Labrador retriever, obteve-se como resultado, que os cães portadores de mastocitoma apresentavam concentrações séricas desta vitamina inferiores ao grupo controle.

Estudos semelhantes apontaram essa associação entre baixas concentrações séricas de vitamina D e risco da ocorrência de neoplasias, em cães com linfoma (Gerber; Hauser & Reusch, 2004) e em cães com hemangiossarcoma esplênico (Selting et al. 2014).

Tabela 12: Comparação entre os valores médios de concentração da vitamina D3 entre os momentos da terapia antineoplásica.

VARIÁVEL	Grupo	Momento	Média	Dp	Valor de p	
D3	Linfoma	T0	32,77	13,74	0,1133	a
		T5	29,79	14,69		a
		T10	30,49	12,77		a

Legenda: Letras iguais, valores não diferem entre si.

Tabela 13: Comparação entre os valores médios de concentração da vitamina D3 entre os grupos no momento pré-tratamento.

VARIÁVEL	Grupo	Momento	Média	Dp	Valor de p	
D3	Controle	T0	45,93	26,39	0,1133	a
	Linfoma	T0	32,77	13,74		a

Legenda: Letras iguais, valores não diferem entre si.

2.4.4 Proteinograma obtido por eletroforese

O proteinograma sérico foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Na Figura 10 é apresentada a separação em SDS-PAGE das proteínas séricas nos cães, as quais foram analisadas pelo densitômetro de acordo com o peso molecular já conhecido de cada proteína sérica identificada (Tabela14). Neste estudo, foram encontradas de 18 a 31 frações protéicas nos cães sadios e com linfoma, porém somente 11 frações apresentaram evidência no traçado eletroforético. As proteínas séricas totais incluem albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas. As subfrações de alfa globulinas encontradas neste ensaio incluíram alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), alfa-2ceruloplasmina e alfa-2-haptoglobina. A transferrina foi a beta globulina encontrada. A IgA e IgG também foram identificadas, resultados semelhantes a estudo de Bush et al. (2004).

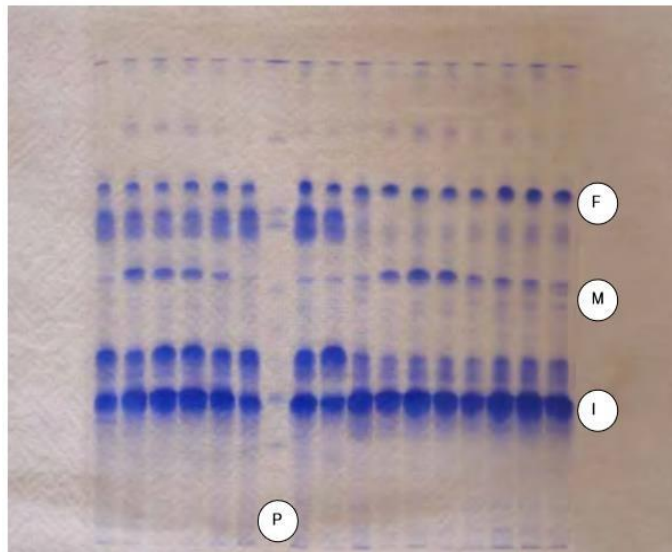


Figura 10: Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliacrilamida mostrando a separação das frações protéicas em cães. As proteínas com maior peso molecular localizam-se no início (I) da corrida eletroforética, estando entre elas as proteínas IgA (170 KD), ceruloplasmina (125 KD), transferrina (85 KD), albumina (65 KD), alfa-1- antitripsina (60 KD) e IgG (cadeia pesada) (52 KD). No meio (M) do gel estão as proteínas haptoglobina (39 KD) e alfa-1-glicoproteína ácida (37 KD). Ao final (F) do gel estão as proteínas nº 9 (33 KD), IgG (cadeia leve) (25 KD) e proteína nº 11 (23 KD). Fonte: Laboratório de Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP, 2020.

Tabela 14: Proteínas séricas avaliadas por eletroforese e respectivos pesos moleculares. Laboratório de Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP, 2020.

Proteína Sérica	Peso Molecular (KD)
IGA	170
Ceruloplasmina	125
Transferrina	85
Albumina	65
α1- Antitripsina	60
IGG-Total	77 (IGG cadeia pesada-52), (IGG cadeia leve-25)
Haptoglobina	39
α1- Glicoproteína Ácida	37

Legenda: peso molecular das proteínas avaliadas no projeto através da eletroforese através do densitômetro após a segregação dessas proteínas no gel de poliacrilamida.

As análises estatísticas realizadas através do teste ANOVA demonstraram diferenças significativas com a presença da doença e com a evolução da terapia antineoplásica entre as médias das variáveis: IGA (Gráfico 3) e α 1- Glicoproteína Ácida, os valores diferiram entre si, ($p < 0,05$). A concentração de haptoglobina apresentou diferença expressiva com a presença da doença, ou seja, ao comparar o grupo controle e o GL na semana T0, porém não apresentou oscilação significativa ao longo do tratamento quimioterápico (Gráfico 2). Em estudos de Vieira (2009), também se verificou que de forma geral as médias das concentrações séricas das proteínas nos soros dos pacientes foram maiores no grupo dos cães com linfoma em relação ao grupo controle, corroborando com outros autores que afirmam que há uma maior produção de globulinas e PFAs em cães com doenças inflamatórias e neoplásicas (Calazans, 2006; Semolin, 2008).

Entretanto, conforme demonstrado na tabela 15, não houve diferença significativa entre as variáveis IGG, Transferrina, Albumina, ceruloplasmina e Alfa-1-

antitripsina entre os grupos experimentais, nem entre as semanas avaliadas durante o tratamento, (tabela 16) ($p > 0,05$).

Ainda de acordo com estudo de Vieira (2009), também foi relatado um aumento significativo com a presença do linfoma nas concentrações séricas de alfa- 1-glicoproteína ácida ($p < 0,05$), porém neste mesmo estudo, foi identificado um aumento significativo na concentração de transferrina e IgG nos cães do GL, diferentemente do nosso estudo, em que se identificou um aumento da haptoglobina sérica e IgA.

Também não houve diferenças estatísticas significativas entre os momentos da quimioterapia em relação às concentrações das proteínas séricas analisadas. Porém, pode-se observar uma redução na concentração de IgA, IgG e alfa-1- antitripsina na décima semana do tratamento (tabela 16). A explicação provável paratal resultado pode ser o fato de que o antineoplásico, a doxorrubicina, causa lesões dos parênquimas hepático e renal, levando a hipoproteinemia, hipoalbuminemia e proteinúria (Nakage, 2000).

Em estudo de Eckersall (2008), a redução da concentração de IgG pode ser esclarecida pela deficiência imunológica causada tanto pela doença em si, quanto pela imunossupressão causada pela quimioterapia, porém neste mesmo estudo é apontada uma redução nos teores de haptoglobina, albumina e ceruloplasmina com a evolução da terapia. A redução simultânea da concentração de haptoglobina e albumina podem indicar a presença de lesões hepáticas, uma vez que estas proteínas são sintetizadas pelo fígado. No presente estudo não foi detectada a hipoalbuminemia associada à baixa concentração de haptoglobina, possivelmente devido ao controle e tratamento suporte das lesões hepáticas e renais causadas pelos quimioterápicos utilizados.

Tabela 15: Comparação entre os valores médios de concentração das proteínas séricas analisadas, em mg/dL, entre os grupos no momento pré-quimioterapia. Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP, 2020.

Variável	Grupo	Momento	Média	DP	Valor de P	Letra
IgA	Controle	T0	16,33	4,971	0,0118	a
	Linfoma	T0	37,58	21,38		b
CERULOPLASMINA	Controle	T0	26,3	15,91	0,166	a
	Linfoma	T0	35,95	17,66		a
TRANSFERRINA	Controle	T0	249,7	63,3	0,3575	a
	Linfoma	T0	307,4	109,5		a
ALBUMINA	Controle	T0	3926	260,8	0,4418	a
	Linfoma	T0	4372	1356		a
A1ANTITRIPSINA	Controle	T0	185,6	37,11	0,0645	a
	Linfoma	T0	270,9	128		a
IgG TOTAL	Controle	T0	1320	193,9	0,1909	a
	Linfoma	T0	1542	737,4		a
HAPTOGLOBINA	Controle	T0	108,7	56,15	0,0003	a
	Linfoma	T0	418,9	275,4		b
A1GLICOPROTACIDA	Controle	T0	11,14	3,066	0,0247	a
	Linfoma	T0	52,03	35,67		b

Legenda: letras iguais os valores não diferem entre si.

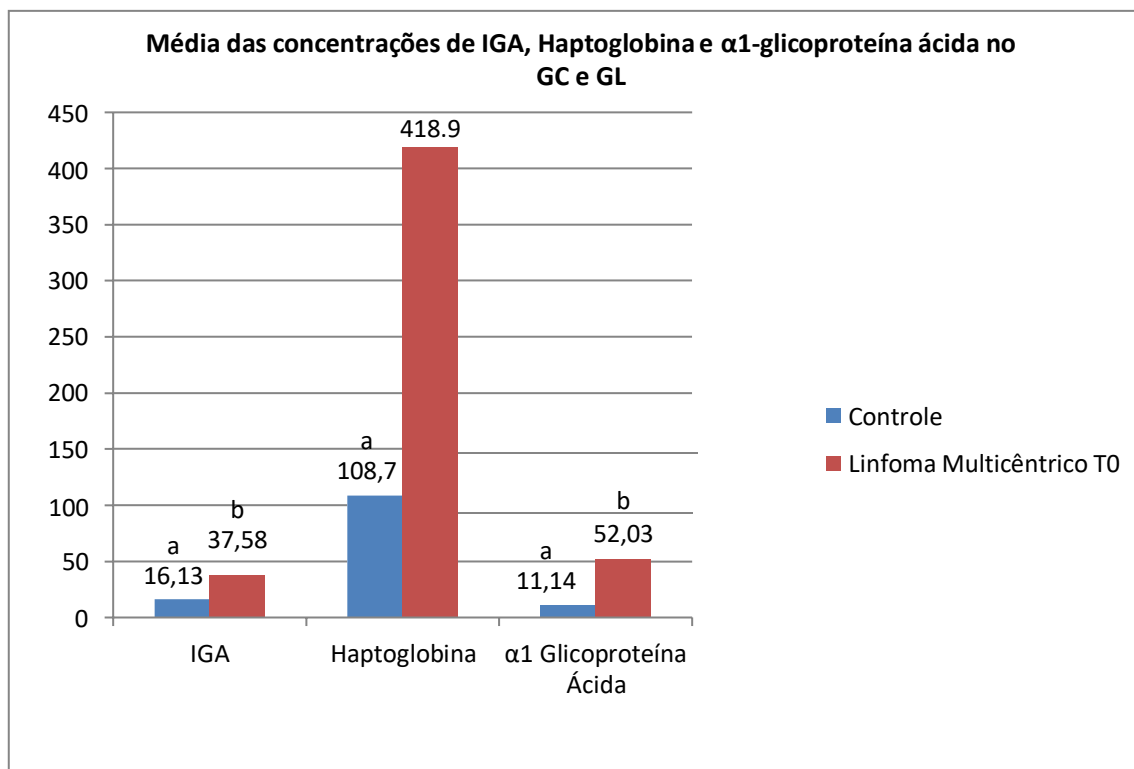
Tabela 16: Comparação entre os valores médios de concentração das proteínas séricas analisadas, entre os momentos da terapia antineoplásica. Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP, 2020.

Variável	Grupo	Momento	Média	DP	Valor de P	Letra
IgA	Linfoma	T0	37,58	21,38		b
		T5	29,67	14,72		ab
		T10	26,58	10,24		ab
CERULOPLASMINA	Linfoma	T0	35,95	17,66		a
		T5	38,64	21,1		a
		T10	45,49	23,54		a
TRANSFERRINA	Linfoma	T0	307,4	109,5		a
		T5	333,6	150,2		a
		T10	330	133,4		a
ALBUMINA	Linfoma	T0	4372	1356		a
		T5	4136	889,4		a
		T10	4644	1380		a
A1ANTITRIPSINA	Linfoma	T0	270,9	128		a
		T5	303,3	109,8		a
		T10	260,2	98,76		a
IgG TOTAL	Linfoma	T0	1542	737,4		a
		T5	1121	531,8		a
		T10	1154	489,8		a
HAPTOGLOBINA	Linfoma	T0	418,9	275,4		b
		T5	608,5	353,3		b
		T10	644,6	349,7		b
A1GLICOPROTACIDA	Linfoma	T0	52,03	35,67		b
		T5	43,03	38,39		ab
		T10	43,97	32,73		ab

Legenda: letras iguais, valores não se diferem entre si. Os resultados apresentam-se como a média \pm D e a significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$).

O gráfico 1 ilustra que houve diferenças significativas entre as concentrações médias de IgA, Haptoglobina e Alfa-1- glicoproteína ácida entre o GC e o GL.

Gráfico 1 : Comparação entre os valores médios da concentração das proteínas de fase aguda em mg/ dL entre o GL no T0 e o GC.



Não houve diferenças significativas entre os valores médios da proteína total entre os grupos experimentais e nem entre os momentos avaliados do tratamento quimioterápico. Este resultado concorda com resultados de Silva (2005), que também não obteve diferenças significativas nas médias das concentrações de proteínas totais entre os soros dos pacientes com linfoma e o grupo controle, mas resultados diferentes podem ser identificados em Nakage (2000), que observou um decréscimo na proteína sérica total dos cães com linfoma, o que pôde ser explicado pelo estado nutricional ruim desses pacientes, lesão renal e hepática após a administração de doxorrubicina na quarta semana do protocolo de quimioterapia antineoplásica.

As médias das concentrações das proteínas séricas de fase aguda, Haptoglobina (Gráfico 2) , α1-glicoproteína ácida e IGA (Gráfico 3) demonstraram diferenças significativas entre os grupos experimentais, ou seja, houve diferença

relevante na concentração média destas proteínas entre cães saudáveis e com linfoma, antes da 1ª sessão de quimioterapia, ($p < 0,05$) conforme demonstrado nos Gráficos. O gráfico 2 demonstra que os cães com linfoma apresentavam maior a dispersão dos valores individuais das dosagens de haptoglobina em relação à média quando comparado ao GC, indicando forte correlação entre a doença e as alterações na concentração da variável em questão. O gráfico 3 demonstra, da mesma forma, a dispersão dos valores de IgA do GL foi maior que no GC, valores diferiram entre si.

Gráfico 2: Dispersão entre os valores da concentração da haptoglobina em mg/dL dos pacientes com Linfoma ao longo do tratamento quimioterápico e do GC.

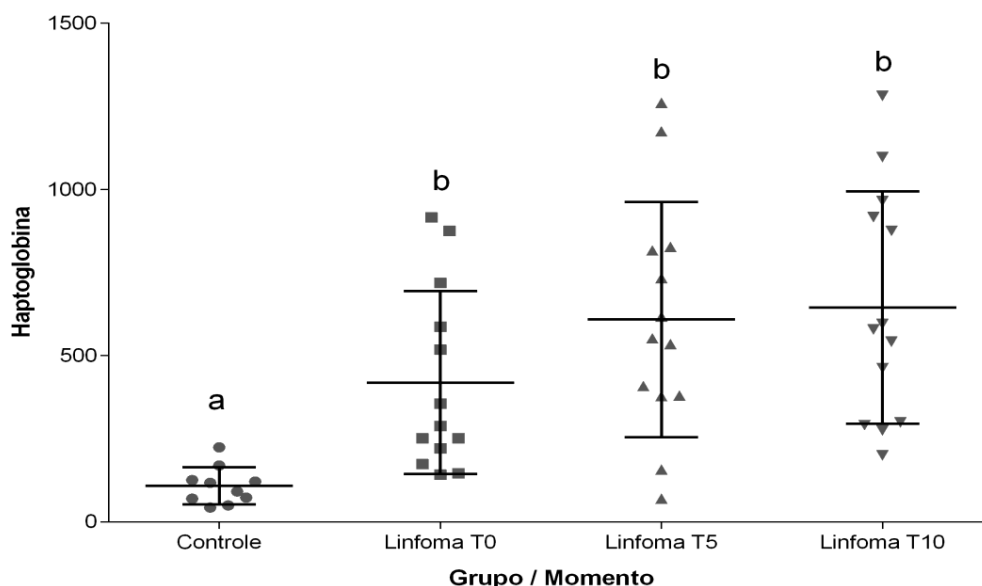
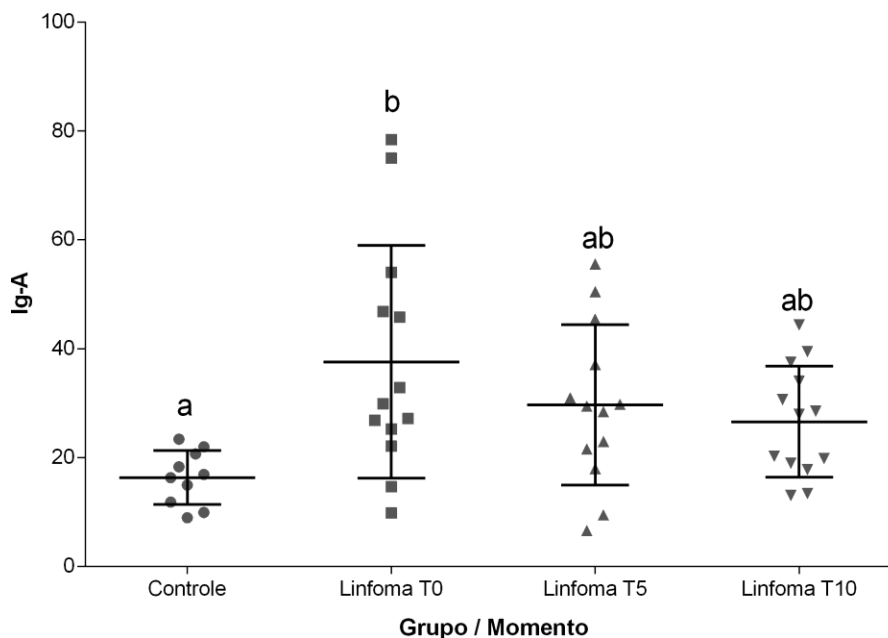


Gráfico 3: Dispersão entre os valores da concentração da IGA em mg/dL dos pacientes com Linfoma ao longo do tratamento quimioterápico e do GC.



A sensibilidade e especificidade para a α -1 –glicoproteína ácida (AGP) em linfoma multicêntrico de cães foram de respectivamente: 61% e 62%. O valor da recidiva em pacientes com coorte foi de 35%, enquanto que o valor da recidiva em pacientes sem coorte foi de 58%, com P-Recidiva de 0,139 e com valor de P igual a 0,0232 (Tabela 17) .O que pode sugerir um fator protetivo da AGP para linfoma multicêntrico em cães, ou seja, cães com maior teor sérico no momento do diagnóstico de AGP tem menor probabilidade de apresentar recidiva, ou demoram mais para apresentar recidiva da doença em relação aos cães com menores concentrações desta proteína.

As alfa-1-globulinas (antitripsina e glicoproteína ácida) são induzidas principalmente pela citocina, Interleucina 1 (IL-1) (Céron et al., 2005). A AGP é uma proteína de fase aguda positiva nos cães, apresentou-se significativamente elevada ($p < 0,05$) em cães com linfoma, no momento zero, corroborando achados de literatura, reportados por alguns autores (Calazans, 2006; Eckersall, 2008). Estes autores relataram que a determinação das concentrações de AGP pode ser útil em estimar a carga tumoral, comparando cães com linfoma tratados ou não com doxorubicina (Calazans, 2006; Eckersall, 2008).

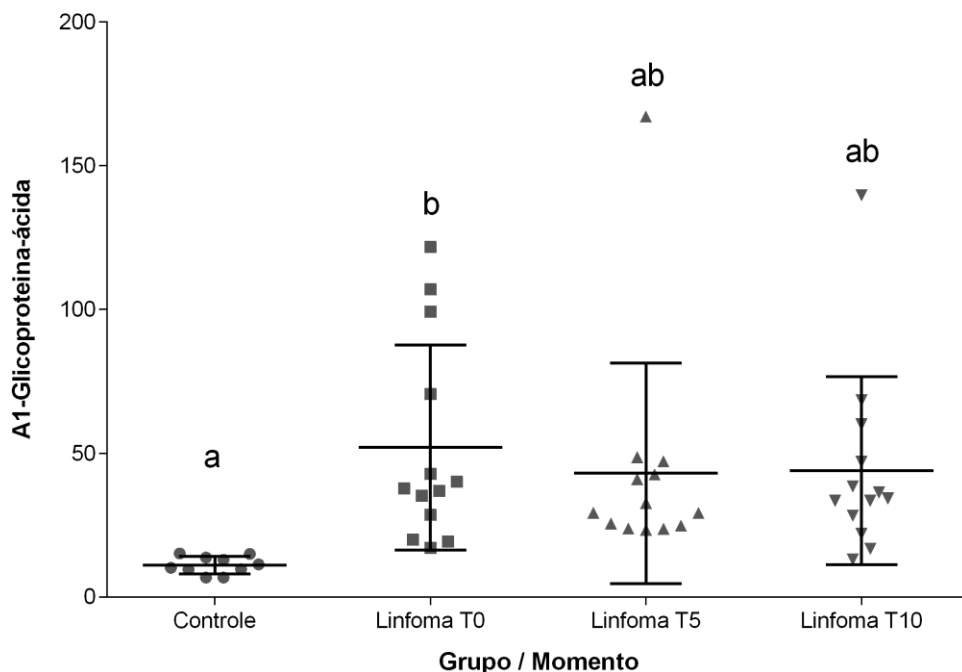
Elevações na concentração sérica dessa proteína têm sido descritas em cães com linfoma, carcinomas (exceto carcinoma mamário) e sarcomas. Em pesquisas que apontaram especificidade e sensibilidade semelhante para linfoma canino ao presente estudo, foi concluído que a AGP é um marcador promissor para detecção precoce do linfoma multicêntrico (Céron et al., 2005).

Os linfócitos são capazes de produzir a AGP, o que explica o seu nível sérico alto em cães e gatos com linfoma. Ademais, em humanos a AGP pode ser sintetizada pela glândula prostática e aparecer no líquido seminal (Céron et al., 2005).

A AGP é comprovadamente um agente antiinflamatório natural, que inibe a ativação dos neutrófilos e aumenta a secreção do receptor antagonista de interleucina-1 através dos macrófagos, inibindo, portanto, a proliferação de linfócitos, principalmente neoplásicos em casos de linfoma (Fournier et al., 2000).

O gráfico 4 demonstra que a dispersão dos valores da variável AGP em relação à média foi bem maior no GL em relação ao GC. E que os valores médios da concentração desta proteína não se alteraram ao longo do tratamento quimioterápico, tendendo a se aproximar da dispersão observada no grupo controle, os valores diferiram entre si, ($p < 0,05$).

Gráfico 4: Comparação entre as concentrações da α 1-Glicoproteína ácida ao longo do tratamento quimioterápico e entre os Grupos experimentais (GC: Grupo Controle e GL: Grupo Linfoma).



Segundo Daleck et al. (2008), as concentrações séricas de AGP são capazes de estimar a carga tumoral e suas alterações permitiram prever a recidiva do linfoma semanas antes de sua manifestação clínica em cães com linfoma multicêntrico tratados com doxorrubicina. Neste estudo, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações séricas de AGP, entre cães com linfoma, após a primeira administração de doxorrubicina, porém houve diferença entre cães saudáveis e com a presença da doença.

2.4.4 Avaliação de valor prognóstico das variáveis avaliadas

As respostas ao tratamento dos pacientes neste estudo foram avaliadas na quinta semana de tratamento, de acordo com estudos de Vieira (2013), a resposta tumoral ao tratamento foi determinada na quinta semana do protocolo CHOP, devido à maior probabilidade dos cães com linfoma multicêntrico apresentarem remissão completa após a primeira administração de doxorrubicina do protocolo, porém para

Hernandez et al. (2017) foi estipulado a décima semana para as observações, pois neste período se pode ter melhor parâmetro da ação da doxorrubicina nos pacientes.

O ponto de corte selecionado para as observações foi de 200 dias, pois de acordo com Vail e Young (2007), além do paciente já haver finalizado o protocolo CHOP de 19 semanas, entre 200 a 240 dias pode haver recidiva dos casos de linfoma alto grau.

Na presente pesquisa, para cada variável estudada, os pacientes foram divididos em alta e baixa concentração sérica, o ponto de corte foi determinado através de análises de curvas ROC, esses grupos foram comparados através do teste de curva de sobrevivência de Kaplan Meier e então foram determinados os pacientes que recidivaram e que não recidivaram em cada grupo, avaliando o tempo livre de doença (TLD) dos pacientes. Ao longo do experimento, notou-se que 6 dos 13 pacientes (46,15%) que compunham o GL apresentaram recidiva anterior ao período de corte estipulado para as observações, ou seja, 200 dias.

Conforme demonstrado na Tabela 17, os pacientes com alto e baixo teor das proteínas estudadas foram comparados, e foi determinado que apenas a AGP teve valor prognóstico positivo para o linfoma, ou seja, os pacientes que apresentavam maiores concentrações de AGP ao longo do tratamento quimioterápico tiveram maior tempo em remissão da doença, neste caso, maiores tempos livres de doença. (Tabela 17).

Esses resultados diferiram dos resultados observados em Hernandez et al. (2017), em que não foi observado uma correlação entre concentrações mais altas de alfa-1-glicoproteína ácida e um melhor prognóstico do linfoma multicêntrico em cães, nesta pesquisa foi obtido que apenas concentrações mais baixas de transferrina e albumina estavam associadas a um menor TLD e menor tempo de sobrevida dos pacientes (Hernandez et al., 2017).

Entretanto, especialmente em felinos, a AGP-1 é uma das principais PFA que, em processos malignos como a leucemia, ou em processos inflamatórios agudos/crônicos, pode elevar sua concentração sérica cerca de 1000 vezes aos níveis basais. A utilização deste parâmetro deve ser incluída no monitoramento de

cães e gatos, como marcador diferencial para avaliação de neoplasias ou processos inflamatórios agudo(Céron et al., 2005).

Estudo de Vieira et al. (2010) também observou um aumento substancial da concentração da AGP nos pacientes caninos com linfoma multicêntrico em relação ao grupo controle, sugerindo que esses pacientes apresentavam uma reação de fase aguda (RFA) exacerbada nos momentos das coletas sorológicas, entretanto não foi avaliado o valor prognóstico dessa proteína neste estudo.

Tabela 17: Comparação entre os pacientes com linfoma multicêntrico que recidivaram e que não recidivaram dentro do intervalo de tempo de corte para as observações.

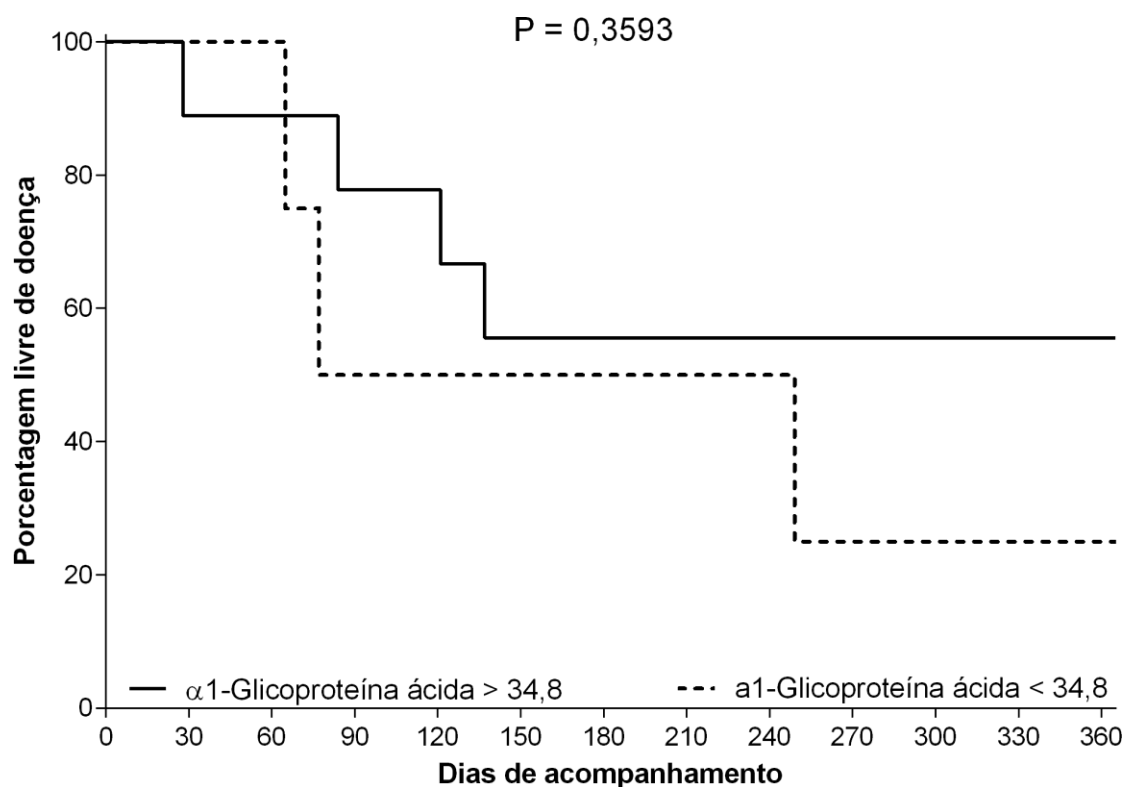
Recidiva	6/13 casos	46,15%	186,9 dias em média			
Variável	Recidiva	Média	DP	Valor de P	P-Prognóstico	Valor Coorte
IGA	N	30,84	15,84	0,0866	0,9999	
	S	31,78	17,41			
CERULOPLASMINA	N	43,99	17,69	0,2014	0,1213	
	S	35,4	23,5			
TRANSFERRINA	N	291,3	119,3	0,0906	0,09103	
	S	361,5	133			
ALBUMINA	N	4629	1180	0,1764	0,2258	
	S	4098	1225			
A1ANTITRIPSINA	N	276,1	101,1	0,9034	0,8658	
	S	280,5	125,3			
IGGTOTAL	N	1217	711,8	0,5476	0,2599	
	S	1337	482,2			
HAPTOGLOBINA	N	592,7	315,9	0,0484	0,3981	
	S	516,1	360,1			
A1GLICOPROTACIDA	N	55,94	42,03	0,0232	0,0304	<34,8
	S	35,15	20,18			
VITAMINA D3	N	29,87	15,07	0,5722	0,5447	

Foi determinado um valor de coorte através do método curvas de ROC para a concentração da AGP, IgA, transferrina e haptoglobina, que foram as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,1$; ou seja apresentaram diferenças significativas nas

análises estatísticas. Essas variáveis foram mensuradas no momento do diagnóstico, a partir dessas mensurações foi observada uma distinção na perspectiva de sobrevida e tempo livre de doença desses pacientes. Esses pacientes foram divididos em 2 grupos, alta e baixa concentração da proteína avaliada, a partir do ponto de corte e foram comparados então através da curva de sobrevivência de Kaplan Meier, através da qual se demonstrou o percentual de pacientes que recidivaram ao longo do tempo.

Pacientes com concentração sérica de alfa-1- glicoproteína ácida superior a 34,8 mg/dL no momento do diagnóstico demoraram mais tempo para apresentar recidiva em relação aos pacientes com concentração sérica inferior a esse valor no momento T0 do tratamento quimioterápico, conforme pode ser observado no gráfico 5, obtido a partir das análises pelo método da curva de Kaplan-Meier. Entretanto não houve diferença significativa pelas curvas de Kaplan Meier que comprove que o valor de corte que se obteve pelas curvas ROC é prognóstico para o linfoma multicêntrico em cães.

Gráfico 5 :Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de α 1-Glicoproteína ácida maior e menor que 34,8 mg/dL

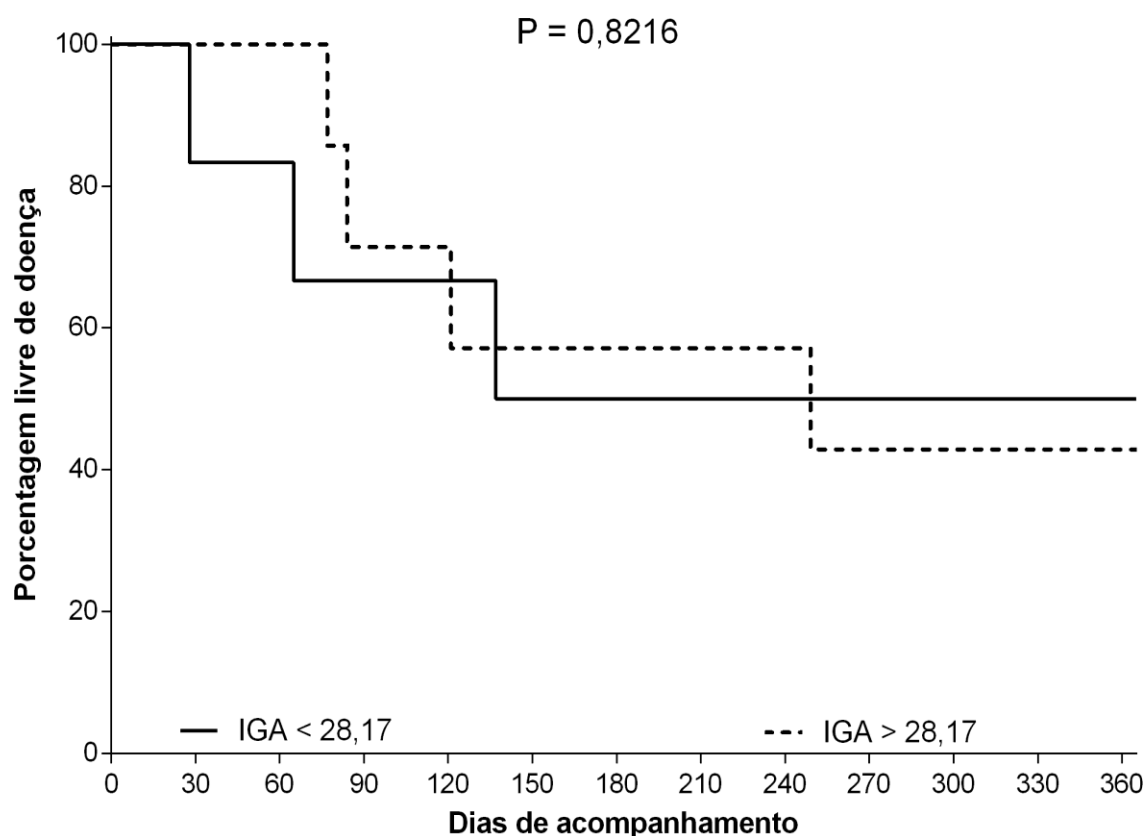


Pacientes com concentração sérica de IgA superior a 28,17 mg/dL no momento do diagnóstico apresentaram recidiva mais rapidamente em relação aos pacientes com concentração sérica inferior a esse valor no momento T0 do tratamento quimioterápico, conforme pode ser observado no gráfico 6. Entretanto não houve diferença significativa pelas curvas de Kaplan Meier que comprove que o valor de corte que se obteve pelas curvas Roc é prognóstico para o linfoma multicêntrico em cães, apesar da variável demonstrar influência no tempo livre de doença desses pacientes.

Nos resultados encontrados no ensaio atual, verificou-se que as concentrações séricas médias de IgA apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no teste ANOVA, na comparação entre cães saudáveis e com linfoma ,

concordando com Madewell et al. (1979). Porém, assim como em estudos de Eckersall (2008), essa proteína também estava aumentada no momento do diagnóstico de cães com linfoma multicêntrico, Provavelmente, devido a uma maior produção de globulinas em doenças inflamatórias e neoplásicas, conferindo um pior prognóstico, mas este é um achado pouco comum em linfomas multicêntricos, uma vez que a IgA é uma globulina presente principalmente em secreções externas e não no soro dos pacientes.

Gráfico 6 :Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de IgA maior e menor que 28,17 mg/dL



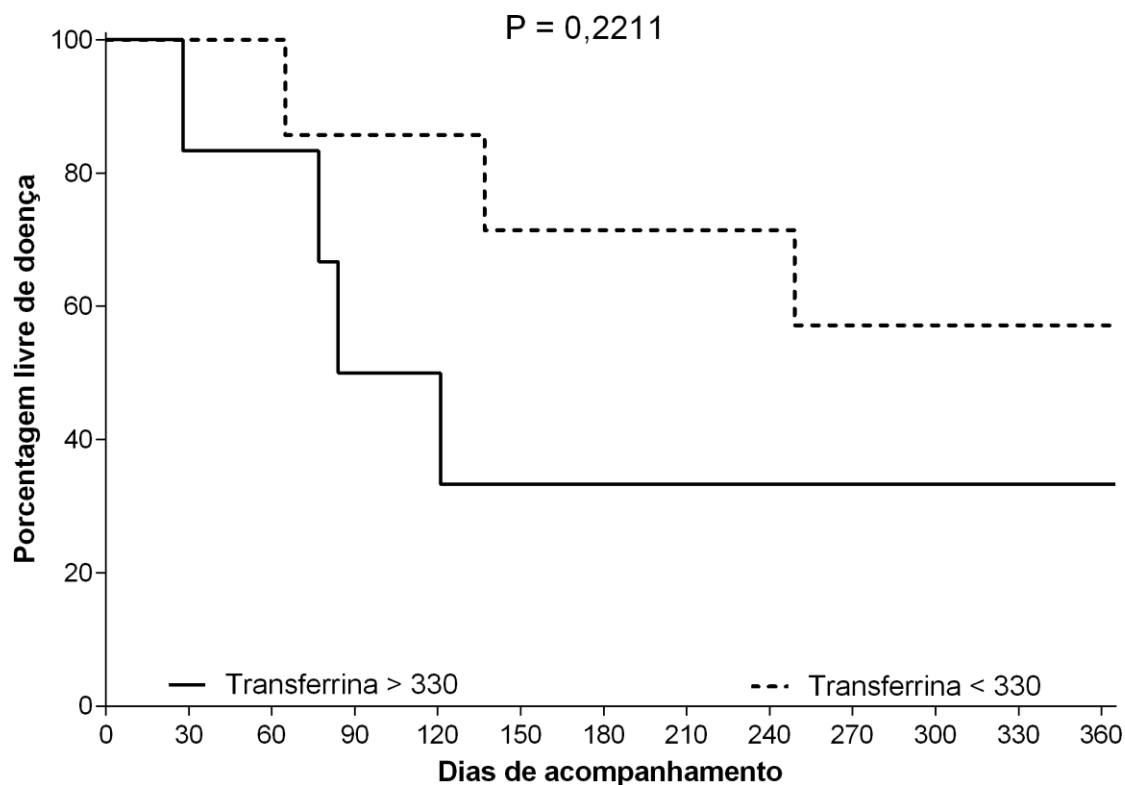
Pacientes com concentração sérica de transferrina superior a 330 mg/dL no momento do diagnóstico demoraram menos tempo para apresentar recidiva em relação aos pacientes com concentração sérica inferior a esse valor no momento T0 do tratamento quimioterápico, conforme pode ser observado no gráfico 7, obtido a

partir das análises pelo método da curva de Kaplan-Meier. Entretanto, o valor de coorte que se obteve pelas curvas Roc, não foi confirmado como fator prognóstico para o linfoma multicêntrico em cães , pela curva de sobrevivência ($P>0,1$).

Esse dado se contrapõe ao que normalmente é relatado na literatura, em que a transferrina é considerada uma PFA negativa, ou seja, sua concentração diminui com a presença da inflamação ou neoplasia (Eckersall, 2008). Entretanto, de forma semelhante ao estudo de Vieira et al. (2010) e Munhoz (2012), a transferrina se comportou como uma proteína de fase aguda positiva nos pacientes deste estudo, aumentando sua concentração sérica na presença da doença. A explicação provável para este fato pode ser a que a concentração do receptor circulante, a transferrina, está relacionada com o nível de eritropoiese, aumentando também na deficiência de ferro, alterações estas que podem estar presentes em casos de linfoma multicêntrico, pois a série eritróide tende a estar reduzida (Worwood, 1996)

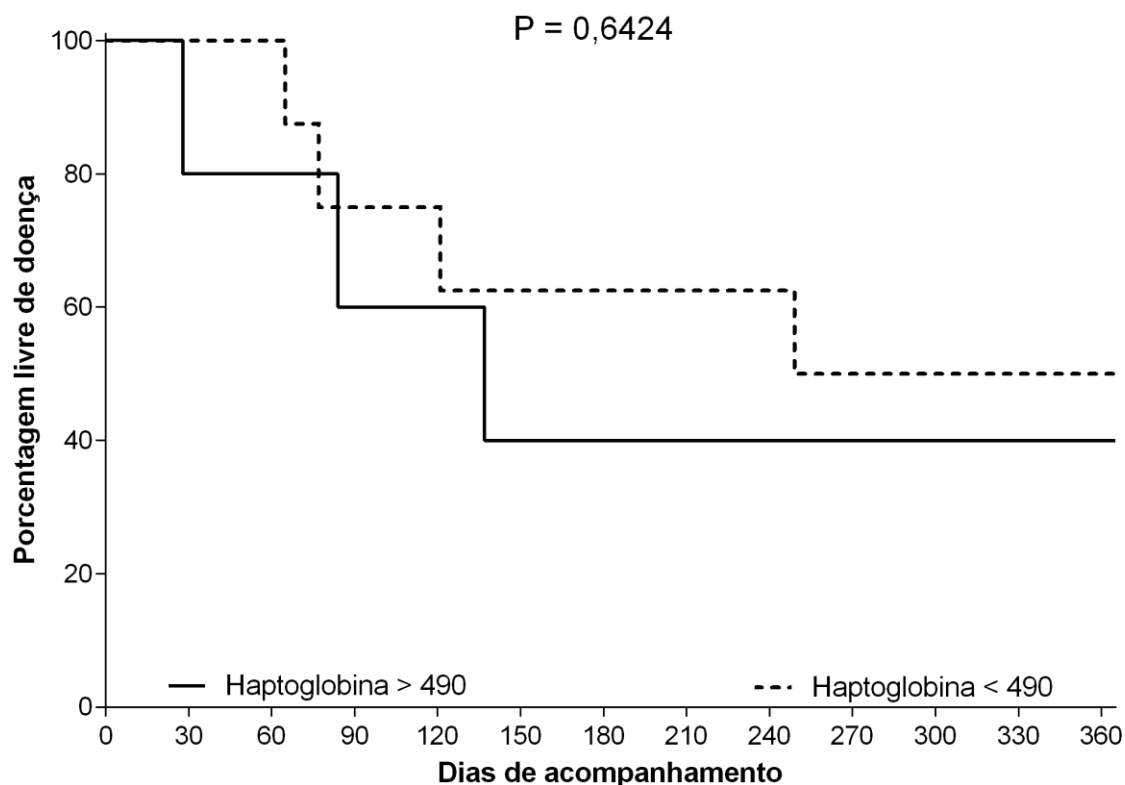
Os dados encontrados foram contrários aos resultados de Hernandez et al. (2017) em que valores mais altos da transferrina foram associados a um melhor prognóstico em LC, no presente estudo ocorreu que os pacientes com níveis séricos acima de 330 mg/dL de transferrina obtiveram maior probabilidade de recidiva em menos tempo (Gráfico 7).

Gráfico 7: Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de transferrina maior e menor que 330mg/d



Pacientes com concentração sérica de haptoglobina superior a 490 mg/dL no momento do diagnóstico apresentaram recidiva mais rapidamente em relação aos pacientes com concentração sérica inferior a esse valor no momento T0 do tratamento quimioterápico, conforme pode ser observado no gráfico 8. Achados semelhantes foram encontrados em estudos de Daleck et al. (2008) e Vieira et al. (2013) e foi associado a um pior prognóstico em cães, pois indica uma Reação de Fase Aguda (RFA) exacerbada em cães com linfoma, principalmente quando esse aumento é detectado no momento do diagnóstico, apesar disso, este aumento pode estar associado ao uso de corticóides e também à cães com comprometimento hepático inicial pela neoplasia, que portanto estaria associado ao estágio IV do linfoma, o que por sua vez, foi prevalente entre os pacientes do presente estudo.

Gráfico 8: Curvas do percentual livre de doença ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de haptoglobina maior e menor que 490 mg/dl



2.4.5 Análise de correspondência múltipla

Com o valor de $P < 0,05$, houve associação positiva entre as altas concentrações de alfa-1-antitripsina e os pacientes que apresentavam a doença com baixo grau histológico na décima semana de tratamento (T10). Este resultado diferiu do que foi descrito em estudos de Vieira et al. (2013), que não encontrou associação entre o tipo histológico e as diferenças nas concentrações proteicas, apenas relatou que as alterações nas concentrações das PFAs estavam relacionadas com o imunofenótipo e o sub-estádio da doença, muito embora, subtende-se que as alterações ao estarem correlacionadas com a presença de sinais clínicos, estariam também associadas aos linfomas de alto grau, pois estes apresentam um desenvolvimento mais agressivo, com um acometimento maior do paciente. Neste mesmo estudo o aumento da alfa-1-antitripsina e da haptoglobina

estavam correlacionadas com linfomas Ts, sugerindo maior chance de ocorrência de metástases nestes pacientes (Vieira et al., 2013).

Sabe-se que a AAT é o componente mais importante dentre os “inibidores de proteases”, que é um grupo de proteínas com a função de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante um processo inflamatório agudo (Eckersall, 2008). Desta maneira, o aumento das concentrações séricas da AAT em todos os momentos estudados para os cães do grupo GLT, sugere uma maior concentração de enzimas proteolíticas em cães com linfoma T, e conseqüentemente, maior risco de metástase.

Em estudos de Priest et al. (2010), que teve como objetivo avaliar a concentração das proteínas em cães com linfoma de alto e baixo grau, concluiu-se que a expressão do receptor de transferrina no linfoma canino, e concluíram que tal expressão depende do grau e do fenótipo do tumor. Além disso, relataram que a expressão do receptor de transferrina foi significativamente menor nos tumores de células T de baixo grau comparativamente aos de alto grau, bem como aos linfomas B de baixo ou alto grau.

2.4.6 Considerações finais

O presente estudo apresentou algumas limitações durante a sua execução , sendo sugerido novos estudos a fim de complementar os dados obtidos até o momento. Dentre as limitações encontradas pode-se destacar o número reduzido de pacientes de ambos os grupos podem ter apresentado interferências nas análises estatísticas. Ademais, não foi possível nessa pesquisa realizar testes sorológicos prévios das principais doenças endêmicas da região tanto do grupo controle como do tratamento, com o intuito de descartar quaisquer outras afecções pré-existentes que pudessem interferir na pesquisa, bem como na realização da quimioterapia.

Conclusões

Conclui-se com esse estudo que a dosagem de vitamina D3 mensurada nos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico não se apresentou como um marcador prognóstico eficaz em paciente com linfoma multicêntrico e também não apresentou diferença estatística com a presença da doença nem nas semanas avaliadas ao longo do tratamento quimioterápico. Ademais, as proteínas séricas a IgA e a alfa-1-glicoproteína ácida e haptoglobina demonstraram alterações entre os grupos e ao longo das semanas avaliadas durante o protocolo de quimioterapia, sendo consideradas como potenciais marcadores sensíveis para indicar a presença do linfoma multicêntrico em cães. A alfa-1-glicoproteína ácida, haptoglobina, IgA e transferrina demonstraram valor prognóstico em linfoma multicêntrico em cães, sendo que a alfa-1- glicoproteína ácida foi um fator protetivo para a doença, já que os pacientes com maior teor dessa proteína apresentaram maior tempo livre de doença e menor probabilidade de recidivar em menos tempo. De acordo com a estatística multivariada, o aumento da concentração de alfa-1-antitripsina está associada ao linfoma com tipo histológico de baixo grau. Por fim, em relação aos aspectos clínicos da população de cães com linfoma deste estudo, houve uma prevalência de fêmeas, SRD, com tipo histológico tumoral LDGBC e tempo livre de doença médio de 186,9 dias.

Referências

Al sawah S. et al. 25-Hydroxyvitamin D and glycemic control: A cross-sectional study of children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 115, p. 54-59, 2016.

Alves M, Angerami RN, Rocha EM. Dry eye disease caused by viral infection: review. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 76, n. 2, p. 129-132, 2013.

Aricò A, Ferrareso S, Bresolin S, Marconato L, Comazzi S, TeKronnie G, Aresu L. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals chromosomal copy number aberrations associated with clinical outcome in canine diffuse large B-cell lymphoma. **PLoS One**. 2014;9(11):e111817.

Atherton MJ, Braceland M, Fontaine S, Waterston MM, Burchmore RJ, Eadie S, Eckersall PD. & Morris JS. (2013). Changes in the serum proteome of canine lymphoma identified by electrophoresis and mass spectrometry. **The Veterinary Journal**, 196(3), 320-324. Acedidoem Set. 11, 2017.

Battisti, M.K.; Silva, D.M.; Reusingi, M.S. et al., Proteínas de fase aguda em cadelas com neoplasia mamária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.5, p.902-907, mai, 2013.

BorchmannS, Cirillo M, Goergen H, Math D, MederL,Sasse S, Kreissl S, Jan Bröckelmann P, Tresckow B, FuchsM, TillmannR, Engert, APretreatment Vitamin D Deficiency Is Associated With Impaired Progression-Free and Overall Survival in Hodgkin Lymphoma. **J Clin Oncol** 37, p. 1- 11, 2019.

Bush, BM. Bioquímica Plasmática. In:_____ **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004, cap. 5, p. 169-223.

Calazans, SG. **Hemograma e constituintes bioquímicos do sangue de cães com linfoma submetidos ou não à poliquimioterapia (ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona)**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - área Cirurgia

Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Campbell MJ, Kolffer HP. Troward therapeutic intervention of cancer by vitamin D compounds. **J. Natl. Cancer Inst.** 1997, 89: 182-185.

Cardoso MJL, Machado LHA, Moutinho FQ, Padovani CR. Linfoma canino: achados clínico-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 25-29, 2004.

Cápuá, M.L.B. et al. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2011nahead/a4011cr3979.pdf>>.. Acesso em: 16 jun. 2019

CerónJJ, Eckersall PD, Martínez-subiela S. Acute phase protein in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

Comazzi S; Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. **The Veterinary Journal**, v.188, n.2, p.149-155, 2011.

Contin CM, Coelho SB, Oliveira JE, Olivio MB, Vieira MR, Bagliotti CMF, Crivellenti LZ, Crivellenti SB, Santana AE. Proteínas de fase aguda: revisão de literatura. **Investigação**, 14(2): 73-76, 2015.

Couto CG. Linfoma no cão e no gato. In: Nelson, R.W.; Couto, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 882–889.

Couto CG. Linfoma. In: Nelson, RW, Couto, CG. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 77, p. 1160-1174. 2015

Crossley R et al. Determinación de proteína C-reactiva em hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.42, p.101105, 2010.

Cunninghan NS, Lee BS, Henry HL. The renal mitochondrial metabolism of 25 hydroxyvitamin D3: a possible role for fospholipids. **BiochimicaeiBiophysica acta** 2014, 881(3): 480-8.

Daleck, C. R.; Calazans, S. G.; DE Nardi, A. B. Linfomas. In: Daleck, C. R.; DE Nardi, A. B.; Rodaski, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008, p. 482-499.

Drake MT, Mauer MJ, Habermann TM, et al. Vit D insufficiency and prognosis in Non hodgkin's Lymphoma. 2010. **Jornal of Clinical Oncology**. 28(27): p. 4191-4199.

Eckersall P D. The time is right for acute phase protein assays. **The Veterinary Journal**, Ithaca, v. 168, n. 1, p. 3-5, 2010.

Eckersall, P. D. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey J. W, Bruss ML. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155.

Eckersall, P. D. & Bell, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, London, v.185, p. 2327, 2014.

Edwards DS, Henley WE, Harding EF, Dobson JM, Wood JL. 2003. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. **Vet.Comp.Oncol**. 1:20. 02-06.

Evans, T. W. Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 6-11, 2002

Ferraresso, S.; Bresolin, S.; Aricò, A.; Comazzi, S.; Gelain, M. E.; Riondato, F.; Bargelloni, L.; Marconato, L.; Kroonie, G.; Aresu, L. Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large B-Cell lymphoma. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014. E 92707.

Figuera RA, Souza TM, Barros CSL. Linfossarcoma em cães. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.895-899. 2002.

Fonseca FM. **Concentração sérica de 25-hidroxivitamina D em cães saudáveis e como fator preditivo e prognóstico em cadelas com neoplasia mamária**. 2017. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2017.

Galezowski AM. et al. C-Reactive Protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, p.395-401, 2010.

Gentilini F. et al. GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.127, n.1-2, p.47-56, 2009.

Gerber, B.; Hauser, B.; Reusch, C. E. Serum levels of 25hydroxycholecalciferol and 1, 25-dihydroxycholecalciferol in dogs with hypercalcaemia. **Veterinary research communications**, v. 28, n. 8, p. 669-680, 2004.

Gershwin L J. Clinical Veterinary Immunology. In: Kaneko J J, Harvey J W, Bruss M L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008, p. 157-172.

Ginn J, Sacco J, Wong YY, Motsinger-Reif A, Chun R, Trepanier LA. 2014. Positive association between a glutathione-S-transferase polymorphism and lymphoma in dogs. **Vet Comp Oncol**. 12:227-236.

Giraudel JM, Pages JP, Guelfi JF. Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. **Journal of American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 38, n. 2, p. 135-147, 2002.

Gomes, E. G. A.; Jucá, M. J.; Menezes, H. L.; Nunes, B. L. B. B. P.; Costa, H.; Lima, F. O.; Matos, D. Correlation between the immunohistochemical expressions of MP-1, MMP-7 and VEGF and prognostic factors in colorectal adenocarcinoma. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 24, n.4, p. 303-310, 2009.

Gordon AH. **Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels**. New York: Elsevier, 1995. 213 p.

Gorman N T. e Halliwell R E W. The immunoglobulins: structure, genetics and function. In: Halliwell R E W, Gorman N T. (Eds.). **Veterinary clinical immunology**. London: Saunders, 1989. p. 19-54.

Gross KL, Wedeking KJ, Cowell CS, Schoenherr WD, Jewell DE, Zicker SC, Debraekeller J, Frey RA. Nutrients In: Hand MS, Thatcher CD, Remmildard RL, Roudedush P. **Small animal clinical nutrition**. 4^a ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2000, p. 84-86.

Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., Koopmans, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ Sci B**, Hangzhou, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

Hazewinkel H A W, Tryfonidou M A. Vitamin D3 metabolism in dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 23–33, 2002.

Hernandez, G.V. Linfomas cutâneos em cães: estudo epidemiológico, morfológico, imunofenotípico e seroproteico. 87f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

Hohaus S, Tisi MC, Bellesi S, Maiolo E, Alma E, Tartaglia G, Corrente F, Cuccaro A, D'Alo F, Basile U, Larocca LM, Stefano VD. Vitamin D deficiency and supplementation in patients with aggressive B- cell lymphomas treated with immunochemotherapy. **Cancer Medicine**. V. 123 (1): p.1-12. 2017.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, et al. (eds). 2012. SEER cancer statistics review, 1975-2009 (vintage 2009 populations). Bethesda, **MD: National Cancer Institute.**

Israili Z H, Dayton P G. Human alpha-1-glicoprotein and its interactions with drugs. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 33, n. 2, p. 161-235, 2001.

Ito D, Childress M, Mason N, Winter A, Leary J, Henson M, Borgatti A, Lewellen M, Krick E, Stewart J, et al. 2015b. A double blinded, placebo-controlled pilot study to examine reduction of CD34C/CD117C/CD133C lymphoma progenitor cells and duration of remission induced by neoadjuvant valsopodar in dogs with large B-cell lymphoma. **F1000 Research**. 4:42.

Jain N C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea &Febiger, 1993. p. 417

Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, New Delhi, v. 3, p.118-127, 2011.

James SY, Mackay AG, Colston KW. Effects of 1,5 dihydroxyvitamin D3 and analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem Biol.* 1996, 58: 395-401.

Kaneko JJ. Serumproteins and dysproteinemias. In: Kaneko J J, Harvey J W, Bruss M L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.117- 138.

Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed., Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155, 157-172.

Kimura KC. **Linfoma canino: papel do meio ambiente**. 2012. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo.

Kogika M M, et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e alfa- 1 glicoproteína ácida em cães com gastroenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 35-42, 2003.

Lage H. 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cell Mol Life Sci.** 65:31453167.

Lane J, Price J, Moore A, et al.: Low-grade gastrointestinal lymphoma in dogs: 20 cases (2010 to 2016), **J Small Anim Pract** 59:147–153, 2018.

Levy A P, Asleh R, Blum S, Levy N S, Miller-Iotan R, Kaletlitman S, Anbinder Y, Lache O, Nakhoul F M, Asaf R, Farbstein D, Pollak M, Soloveichik Y Z, Strauss M. Alshiek, J, Livshits A, Schwartz A, Awad H, Jad K, Goldenstein H. Haptoglobin: basic and clinical aspects. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 12, p. 293–304, 2010.

Limketkai BN, Bechtold ML, Nguyen DL. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Current Gastroenterology Reports**, v. 18, n. 10, p. 52, 2016.

Malone EK. et al. Calcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in vitro and has single agent

activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 8, n. 3, p. 209-220, 2010

Marconato L, Aresu L, Stefanello D, Comazzi S, Martini V, Ferrari R, Riondato F, Rouquet N, Frayssinet P, Sabattini S. Opportunities and challenges of active immunotherapy in dogs with B-cell lymphoma: a 5-year experience in two veterinary oncology centers. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer** (2019) 7:146.

Marconato L, Leo C, Girelli R, Salvi S, Abramo F, Bettini G, Comazzi S, Nardi P, Albanese F, Zini E. 2009b. Association between waste management and cancer in companion animals. **J Vet Intern Med.** 23:564-569.

Marconato, L.; Martini, V.; Stefanello, D.; Moretti, P.; Ferrari, R.; Comazzi, S.; Laganga, P.; Riondato, F.; Aresu, L. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio as a useful prognostic factor in dogs with diffuse large B cell lymphoma receiving chemo immunotherapy. **The Veterinary Journal, Newmarket**, v. 206, n. 2, p. 226-30, 2015.

Marconato L, Stefanello D, Valenti P, Bonfanti U, Comazzi S, Roccabianca P, Caniatti M, Romanelli G, Massari F, Zini E. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. **J Am Vet Med Assoc.** 2011; 238(4):480–5.

Mellanby R J. Beyond the skeleton: the role of vitamin D in companion animal health . **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 4, p. 175-180, 2016.

Merchan BB. et al. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 2017 v.12, n 8, p.344.

Milani C, Welsh J, Katayama ML, Lyra EC, Maciel MS, Brentani MM, Folgueira MA. Human breast tumor slices: A model for identification of vitamin D regulated genes in the tumor microenvironment. **J Steroid Biochem. Mol.Biol.** 2010,(1-2):151-5.

Mukorera V. et al. Serum C-reactive protein concentration in benign and malignant canine spirocercosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.963-966, 2011.

Munhoz, T.D.; Faria, J. L. M.; Vargas-hernandez, G. et al., Experimental Ehrlichia canis infection changes acute-phase proteins. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso), v. 21, p. 206-212, 2012.

Mutz, M.; Boudreaux, B.; Kearney, M.; Stroda, K.; Gaunt, S.; Shiomitsu, K. Prognostic value of baseline absolute lymphocyte concentration and neutrophil/lymphocyte ratio in dogs with newly diagnosed multi-centric lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, Roslin, v. 13, n. 4, p. 337–347, 2015.

Mylonakis ME, Ceron JJ, Siarkou VI, Martinez S, Tvarijonaviciute A, Koutinas AF, Harrus S. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine, Lawrence**, v. 25, p. 811-817, 2011.

Nakage, A. P. M. Estudo do quadro hematológico e das alterações bioquímicas, eletroforéticas e histopatológicas hepática e renal de cães submetidos ao tratamento com o agente antineoplásico doxorubicina (adriplastina®). 2000. 99 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Naoum PC, Ceron CR, Domingos CRB. Conhecimentos Básicos de Eletroforese. In: Naoum P C. **Eletroforese – técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, 1999. p. 1-38.

Pastor M, Chalvet Monfray K, Marchal T et al. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year, **J Vet Intern Med** 23:301-310, 2009.

Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, Ponce F. 2009. Genetic and environmental risk indicators in canine non-hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. **J Vet Intern Med**. 23:301-310.

Pérez-hernández N. et al. Vitamin D and its effects on cardiovascular diseases: a comprehensive review. **The Korean journal of internal medicine**, 2016.

Pires LSA, Dittrichii RL, Souza AC, BertolMAF, Patricio LFL. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 272- 277, 2011.

Poggl, A.; Miniscalco, B.; Morello, E.; Gattino, F.; Delaude, A.; Ferrero Poschetto, L.; Aresu, L.; Gelain, M. E.; martini, V.; COMAZZI, S.; Riondato, F. Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, Roslin, 2016. [Epub ahead of print]. Disponível em . Acesso em: 5 jan. 2021.

Price, G. S.; Page, R. L.; Fischer, B. M.; Levine, J. F.; Gerig, T. M. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 5, p. 259-262, 1991.

Ramprasad, Kowsalya; Siddappa, Sujatha. A review of electrophoretic patterns from a tertiary care nephrourology referral centre. **Journal Of Cancer Research&Therapy**. . 3 (6) p. 72-73. 31 jun. 2015.

Rocha AA, Suzano SMC, Rodrigues RL. Classificação Histológica e Imunoistoquímica em Três Casos de Linfoma Canino. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v.9, n.9, p.32-47, 2010.

Russell D S. et al. An immunohistochemical study of vitamin D receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 143, n. 2, p. 223-226, 2010.

Santarém VA, José MD, Laposy CB. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 845-852, 2008.

Selting, K. A. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs– correlation with health and cancer risk. **Veterinary and comparative oncology**, 2014.

Silva, M. C. V. Efeitos hematológicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos de dois diferentes protocolos antineoplásicos à base de lomustina, vincristina e prednisona em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). 2005. 105 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

Silva ROP, Lopes AF, Faria RMD. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais** 2011; 18(2): 116-122.

Stark JR. et al. Circulating prediagnostic interleukin-6 and C-reactive protein and prostate cancer incidence and mortality. **International Journal of Cancer**, v.124, p.2683-2689, 2009.

Suzano SMC. et al. Classificação citológica dos linfomas caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.47, n.1, p.47-54, 2010.

Takashima-Uebelhoer BB, Barber LG, Zagarins SE, Procter Gray E, Gollenberg AL, Moore AS, Bertone-Johnson ER. 2012. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human nonHodgkin's lymphoma. **Environ Res.** 112:171- 176

Talpur, R.; Lifshitz, O.; Breuer-mcham, J. et al. Increased serum immunoglobulin levels are common in mycosis fungoides and Sézary syndrome. **Jour. Am Acad Dermatol.** Nov; 47(5):685-91, 2002.

Teilgaard-mönch K. et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. **Blood**, v.108, p.353-361, 2006.

Thomas JS. Overview of plasma proteins. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed.: Lippincott Williams Wilkins, 2000, p. 891-898.

Thomas R, Seiser EL, Motsinger-Reif A, et al: Refining tumor associated aneuploid through “genomic recording” of recurrent DNA copy number aberrations in 150 canine Non-Hodgkin’s lymphomas. **LeukLymphoma** 52:1321-1335, 2011.

.

Tizard IR. **Veterinary Immunology: An Introduction**. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. P. 147.

Vail DM, Pinkerton ME, Young KM. Hematopoietic tumors. In: Withrow SJ, Vail DM. **Small animal clinical oncology**. 5. ed., Missouri: Saunders, 2013. p. 621-692.

Vail DM, Young KM. Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen’s small animal clinical oncology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap. 31, p. 699-733, 2019.

Valli VE, Kass PH, SanMyint M, Scott F. Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. **Veterinary Pathology** 50(5) 738-748, 2013.

Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, et al. 2011. Classification of canine malignant lymphomas according to the world health organization criteria. **Vet Pathol**. 48:198211

Vieira, M.; Coleta, F.; Godoy, A. et al., Acute Phase Proteins in Canine Lymphoma During Antineoplastic Chemotherapy. **Braz J VetPathol**; 3(2), 86-92, 2010.

Vieira, M.; Coleta, F.; Godoy, A. et al., Perfil de proteínas séricas em cães com linfoma multicêntrico de imunofenótipo b ou t: correlação com fatores prognósticos. **Braz J VetPathol**; 3(2), 82-94, 2013.

Villamil JA, Henry CJ, Hahn AW, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. 2009. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. **J Cancer Epidemiol**; 4 (1). 112-123

Weidner N, Verbrugghe A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. just-accepted, 2016.

Weidner N, Verbrugghe A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. just-accepted, 2016

Yang F M, Haile D J, Berger F G, Herbert D C, Van Beveren E, Ghio A J. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. **American Journal of Physiology- Lung Cell Molecular Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 2, L402-L409, 2003.

Young, K. M. Hemolymphatic system: Introduction. In: Morgan, R.V. **Handbook of small animal practice**. 3 th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p. 653-655.

Zandvliet M, Teske E, Schrickx JA. 2014. Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma. **Toxicol In Vitro**. 28:14, 981-506.