UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

# PROSTAGLANDINA E2 EM CÃES PORTADORES DE LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN ASSOCIADO OU NÃO A UM INIBIDOR DE COX-2

**Mariana Rodrigues Miotto**
**Médica Veterinária**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# PROSTAGLANDINA E2 EM CÃES PORTADORES DE LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN ASSOCIADO OU NÃO A UM INIBIDOR DE COX-2

**Mariana Rodrigues Miotto**

**Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária

**2014**

Miotto, Mariana Rodrigues
M669p Prostaglandina E2 em cães portadores de linfoma multicêntrico submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin associado ou não a um inibidor de cox-2./ **Mariana Rodrigues Miotto. – – Jaboticabal, 2014**
ix, 61p.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Aureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Flávia Eiras dela Coleta, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Maria Angélica Dias, Maria Luísa Buffo de Cápua
Bibliografia

1. Linfoma. 2. Medicina Veterinária. 3. Oncologia. 4. PGE2. 5. Quimioterapia I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** PROSTAGLANDINA E2 EM CÃES PORTADORES DE LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN ASSOCIADO OU NÃO A UM INIBIDOR DE COX-2

**AUTORA: MARIANA RODRIGUES MIOTTO**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MARIA ANGÉLICA DIAS
Centro Universitário Moura Lacerda / Ribeirão Preto/SP

Profa. Dra. MARIA LUÍSA BUFFO DE CAPUA
Instituto Bioethicus / Botucatu/SP

Profa. Dra. MARCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA
Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP

Profa. Dra. FLAVIA EIRAS DELA COLETA
Médica Veterinária / Clínica Veterinária É o Bicho / Araraquara/SP

Data da realização: 06 de agosto de 2014.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mariana Rodrigues Miotto – nascida em Jaboticabal aos doze dias do mês de março de 1982. Filha de José Apparecido Miotto e Maria Trindade Gavioli Rodrigues Miotto. Graduou-se em Medicina Veterinária no ano de 2005, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal. Durante a graduação participou de diversos cursos e estagiou em diferentes áreas, inclusive no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP Jaboticabal, onde participou ativamente da rotina e desenvolveu seu Trabalho de Graduação. Concluiu o mestrado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Clínica Médica) da FCAV-UNESP em 2009. Iniciou o curso de doutorado no mesmo Programa e Instituição em 2010. Desde 2013, é Médica Veterinária concursada na Prefeitura Municipal de Jaboticabal, atuando na Vigilância de Vetores e Zoonoses como Responsável Técnica do Canil Municipal, e no Conselho Municipal de Proteção e Defesa Animal (COMDEA).

Somos o resultado das viagens que fazemos,
dos livros que lemos
e das pessoas que amamos
(Airton Ortiz)

Dedico esta tese à pessoa que me fez nascer novamente, e desta vez como Mãe.
Que me fez conhecer o significado mais puro do amor.
Alice.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à minha família, pela compreensão nas ausências físicas e de pensamento.

Aos animais e proprietários, que mesmo diante da doença, contribuíram para a condução do tratamento quimioterápico, sabidamente longo e cansativo.

Aos colegas de profissão que muito me auxiliam e ensinam, e especialmente aos colegas e funcionários do Serviço de Oncologia Veterinária e do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital "Governador Laudo Natel", sem os quais não conseguiria conduzir meus estudos e pesquisas.

Aos docentes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, em especial ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, meu Pai Científico, que me acompanha em minha aventura científica desde a graduação.

Aos professores Gervásio Bechara, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Maria Angélica Dias e Mirela T. Costa pela composição da banca de qualificação e pela contribuição com suas considerações.

À pós-graduação da FCAVJ por ter me concedido a oportunidade de realizar este doutorado e à CAPES pela bolsa concedida.

# SUMÁRIO

Página

Certificado da Comissão de ética no uso de animais..... iii
Resumo ..... iv
Palavras-chave ..... iv
“Abstract” ..... v
“Keywords” ..... v
Lista de abreviaturas ..... vi
Lista de tabelas ..... viii
Lista de figuras ..... x
1.INTRODUÇÃO..... 01
2. REVISÃO DE LITERATURA
2.1 Linfoma ..... 02
2.2 Neoplasias x PGE2 ..... 11
2.3 O uso de inibidores de COX-2 na terapia antitumoral ..... 14
2.4 Restrições ao uso de inibidores de COX-2 ..... 16
3. MATERIAL E MÉTODOS
3.1 Animais ..... 18
3.2 Classificação histológica e imunoistoquímica do linfoma ..... 18
3.3 Protocolos quimioterápicos ..... 21
3.4 Dosagem de PGE2 ..... 21
3.5 Análise estatística ..... 22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO
4.1 Gênero..... 22
4.2 Raça ..... 23
4.3 Idade ..... 24
4.4 Peso ..... 25
4.5 Estadiamento e subestadiamento clínico ..... 26
4.6 Imunofenótipo ..... 28
4.7 Classificação histopatológica ..... 29
4.8 Sobrevida ..... 30

4.9 Remissão após o primeiro ciclo de quimioterapia ..... 31
4.10 Leucograma ..... 32
4.11 ELISA ..... 36
5. CONCLUSÕES ..... 38
6. REFERÊNCIAS ..... 38
7. APÊNDICES ..... 50

# CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 01418/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Determinação da concentração de PGE2 em cães portadores de linfoma multicêntrico submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-wisconsin associado ou não a um inibidor de cox-2: correlação com prognóstico, taxa de recidiva e sobrevida"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de fevereiro de 2014.

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2014.

**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**
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 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

# PROSTAGLANDINA E2 EM CÃES PORTADORES DE LINFOMA MULTICÊNTRICO SUBMETIDOS AO PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN ASSOCIADO OU NÃO A UM INIBIDOR DE COX-2

**RESUMO -** Considerando a relevância do linfoma canino na rotina veterinária e o curto período de sobrevida alcançado com os protocolos quimioterápicos empregados, novas alternativas de tratamento estão sendo estudadas. Nas últimas décadas, diversos estudos foram realizados correlacionando o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de neoplasias com a superprodução de prostaglandinas nas células tumorais e inflamatórias locais, em consequência à maior produção de COX-2, que leva à proliferação celular, à supressão da apoptose, à indução da angiogênese e da metástase, ações estas que contam para sua função oncogênica. Uma das estratégias para a redução das concentrações de PGE2 é a utilização de inibidores de COX-2 no tratamento antineoplásico. No presente estudo foram avaliados 20 cães com diagnóstico de linfoma multicêntrico, divididos em dois grupos. Os animais do grupo 1 foram tratados com o protocolo quimioterápico de Madson-Wisconsin convencional, e os do grupo 2, com o protocolo modificado pela substituição da prednisona por um inibidor seletivo de COX-2. Antes da primeira (T1) e da quinta (T2) sessão de quimioterapia, foram realizados hemograma e dosagem de PGE2 plasmática por ELISA. Observou-se um maior número de animais fêmeas, das raças Rottweiler e sem raça definida, de meia idade, que apresentaram com maior freqüência, o linfoma multicêntrico em estádio IVa, de origem celular B, e difuso de grandes células. No leucograma, notou-se em alguns animais, no momento do diagnóstico, a presença de leucocitose por neutrofilia ou por linfocitose, e após o primeiro ciclo de quimioterapia, sete casos de linfopenia. Os cães com remissão dos sinais clínicos após o primeiro ciclo de quimioterapia, apresentam menores concentrações de PGE2 plasmática quando comparados com aqueles sem remissão. A associação do tratamento quimioterápico com um inibidor de COX-2 foi capaz de reduzir as concentrações de PGE2 em 50% dos pacientes, enquanto apenas 10% daqueles do grupo 1 apresentaram redução. Entretanto não foi confirmado o papel da PGE2 como marcador de prognóstico e tempo de sobrevida para cães com linfoma.

**PALAVRAS-CHAVE:** linfoma, medicina veterinária, oncologia, PGE2, quimioterapia

# E2 PROSTAGLANDIN IN DOGS SUFFERING FROM MULTICENTRIC LYMPHOMA TREATED WITH A STANDARD OR COX-2 INHIBITOR MODIFIED MADISON-WISCONSIN CHEMOTHERAPY PROTOCOL

**ABSTRACT –** Considering the relevance of canine lymphoma in veterinary medicine and the short survival achieved with chemotherapy protocols employed, new treatment options are being studied. In the last decades, various studies have been conducted to correlate the development and progression of certain types of cancer with the overproduction of prostaglandins in tumor sites and inflammatory cells, due to increased production of COX-2, leading to cell proliferation, the suppression of apoptosis , the induction of angiogenesis and metastasis, these actions that count toward their oncogenic function. One strategy for reducing the levels of PGE2 is the use of COX-2 in anticancer treatment. In this study 20 dogs with diagnosis of multicentric lymphoma, divided in two groups were evaluated. Animals in group 1 were treated with the standard Madison-Wisconsin chemotherapy protocol, and group 2, with this protocol modified by the replacement of prednisone for a selective inhibitor of COX-2. Before the first (T1) and fifth (T2) chemo, blood samples and measurement of plasma PGE2 by ELISA were performed. We observed a higher number of female animals, Rottweiler breeds and mixed breed, middle age animals, who presented with greater frequency, multicentric lymphoma in stage IVa, B cell origin, and diffuse large cell. Leukocytosis with neutrophilia or lymphocytosis was observed for some animals at the moment of diagnosis, and after the first cycle of chemotherapy, seven cases of lymphopenia. Dogs with clinical signs of remission after the first cycle of chemotherapy show lower plasma PGE2 when compared with those without remission. The association of chemotherapy treatment with a COX-2 was able to reduce concentrations of PGE2 in 50% of patients, while only 10% of those in group 1 decreased. However, it was not possible to confirme the role of PGE2 as a marker of prognosis and survival time for dogs with lymphoma.

**KEYWORDS:** chemotherapy, lymphoma, oncology, PGE2, veterinary medicine

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucléico

ARN Ácido ribonucléico

CD "Cluster of differentiation"

CECP Carcinoma de cabeça e pescoço

CHCM Concentração de hemoglobina corpuscular média

COP Cliclofosfamida, vincristina (Oncovin®) e prednisona

COX-1 Ciclooxigenase 1

COX-2 Ciclooxigenase 2

COX-3 Ciclooxigenase 3

DO Densidade óptica

ELISA "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ensaio imunoenzimático)

EP Receptor cognato

EP1 Receptor de prostaglandina E2 tipo 1

EP2 Receptor de prostaglandina E2 tipo 2

EP3 Receptor de prostaglandina E2 tipo 3

EP4 Receptor de prostaglandina E2 tipo 4

FCAV Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária

HV Hospital Veterinário

IM Intramuscular

IV Intravenoso

Kg Quilogramas

mg Miligramas

MW Madison-Wisconsin

OMS Organização Mundial da Saúde

PGD2 Prostaglandina D2

PGE2 Prostaglandina E2

PGES Prostaglandina E - sintase

PGF2α Prostaglandina F2 alfa

PGI2 Prostaglandina I2

EROS Espécies reativas de oxigênio

TNF-α "Tumor necrosis factor alpha" (Fator de necrose tumoral alfa)

TXA2 Tromboxano A2

UNESP Universidade Estadual Paulista

VCM Volume corpuscular médio

VO Via oral

15PGDH 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase

µg Microgramas

µL microlitros

## LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Classificação Clínica do Linfoma segundo a Organização Mundial e Saúde – OMS ..... 06

Tabela 2: Protocolo quimioterápico de MW de 19 semanas adotado para os animais do grupo 1..... 20

Tabela 3: Protocolo quimioterápico de MW de 19 semanas modificado adotado para os animais do grupo 2 ..... 21

Tabela 4: Valores individuais, médias e desvios-padrão do tempo de sobrevida de cães com linfoma multicêntrico tratados com o Protocolo de MW do grupo 1 (n=10)..... 30

Tabela 5: Valores individuais, médias e desvios-padrão do tempo de sobrevida de cães com linfoma multicêntrico tratados com o Protocolo de MW modificado por um inibidor seletivo de COX-2 do grupo 2 (n=10)..... 31

Tabela 6: Contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em dez cães hígidos do grupo controle (GC)..... 32

Tabela 7: Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 1 (n=10), no momento do diagnóstico (T1)..... 33

Tabela 8: Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 2 (n=10), no momento do diagnóstico do linfoma (T1)..... 33

Tabela 9: Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 1 (n=10), após o primeiro ciclo de quimioterapia do protocolo de MW (T2)..... 35

Tabela10:Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 2 (n=10), após o primeiro ciclo de quimioterapia do Protocolo de MW modificado (T2).... 35

Tabela 11: Valores da densidade óptica (DO), em duplicata, para amostras-padrão de kit comercial de dosagem de PGE2 pelo método ELISA..... 36

Tabela 12: Valores da densidade óptica (DO) em amostras de plasma sanguíneo de cães hígidos (n=10) do grupo controle..... 37

Tabela 13: Valores da densidade óptica (DO) em amostras de plasma sanguíneo de cães com linfoma (n=20) no momento do diagnóstico (T1) e após o primeiro ciclo de quimioterapia (T2), sobrevida, imunofenótipo e estadio/subestadio do linfoma. Jaboticabal, 2014..... 38

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Frequência racial de vinte cães com linfoma..... 24

Figura 2: Porcentagem das faixas etárias de vinte cães com linfoma..... 25

Figura 3: Distribuição conforme faixas de peso corpóreo de vinte cães com linfoma ..... 26

Figura 4: Porcentagem dos estadios clínicos em vinte casos de linfoma canino ..... 27

Figura 5: Porcentagem dos sub-estadios clínicos em vinte casos de linfoma canino ..... 27

Figura 6: Porcentagem de imunnofenótipos em vinte casos de linfoma canino ..... 29

Figura 7: Porcentagem de tipos histológicos em vinte casos de linfoma canino ..... 30

# 1. **INTRODUÇÃO**

O Linfoma é uma neoplasia caracterizada por proliferação clonal de linfócitos malignos e se origina da medula óssea, timo, baço, fígado ou linfonodos. Entretanto, pode desenvolver-se em praticamente qualquer órgão, pela contínua migração dos linfócitos pelos diferentes tecidos do organismo. Trata-se de uma das neoplasias malignas mais comuns em cães, representando de 8,5 a 9% de todos os tumores caninos e tem como principal tratamento a poliquimioterapia, capaz de induzir remissão completa em 60 a 90% dos animais, dependendo do protocolo utilizado, com tempo médio de sobrevida de seis a 12 meses, período considerado bastante reduzido. Novas alternativas de tratamento devem ser exploradas.

Nas últimas décadas, diversos estudos na Medicina têm sido realizados correlacionando o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de neoplasias com a presença da ciclooxigenase-2 (COX-2) e, consequentemente, superprodução de prostaglandinas nas células tumorais, o que tem encorajado pesquisas semelhantes na Medicina Veterinária. O aumento da prostaglandina $E_2$ ($PGE_2$) promove o desenvolvimento neoplásico devido ao aumento da proliferação celular, da angiogênese e da invasão tumoral, inibição da apoptose e supressão da resposta imune. Inibidores seletivos da COX-2 reduzem a produção de prostaglandinas e outros eicosanóides e, portanto, revertem sua influência no ambiente tumoral. Deste modo, o tratamento com inibidores de COX-2 apresenta-se como mais uma estratégia para a terapia antitumoral.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Linfoma

O termo linfoma refere-se a um grupo heterogêneo de desordens caracterizadas pela proliferação de células originárias do tecido linfóide como linfócitos, histiócitos e seus precursores e derivados (CONTRAN et al., 1994; ITO et al., 2014). Afetam primariamente os linfonodos ou outros órgãos viscerais sólidos como fígado e baço (VAIL; OGILVIE, 1998). Em alguns casos, pode ocorrer expansão do componente linfomatoso com conseqüente envolvimento do sangue periférico (RUBIN, 1994).

É uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas no cão (MACEWEN; YOUNG, 1996; OGILVIE; MOORE, 1995; VAIL; OGILVIE, 1998), sendo superada apenas por tumores mamários e cutâneos (DE MOURA et al., 2003). Representa 7 a 9% das neoplasias malignas na espécie canina (MORRISON, 1998; RALLIS et al., 1992) e aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hemolinfático na referida espécie (OGILVIE; MOORE, 1995; ROSENTHAL; MACEWEN, 1990).

Segundo Coleta (2009), em estudo conduzido no Brasil, 80% dos cães acometidos pelo linfoma são de meia-idade ou idosos. O mesmo percentual foi verificado por Greenlee et al. (1990) e Moulton e Harvey (1990). O linfoma também pode ocorrer em animais muito jovens (MOULTON; HARVEY, 1990; SEQUEIRA et al., 1999; VALLI, 1993).

Quanto ao sexo, alguns autores relatam predominância em machos, sendo estes acometidos por 68% dos casos de linfoma (DOBSON; GORMAN, 1994; RALLIS et al., 1992; SEQUEIRA et al., 1999). Van Pelt e Connor (1968) observaram maior ocorrência em fêmeas. Coleta (2009), Fráguas (2008), Moulton e Harvey (1990), Vail e Ogilvie (1998) afirmam não haver predileção sexual.

De acordo com Sequeira et al. (1999) os animais portadores de linfoma são predominantemente aqueles das raças de grande ou médio porte, como Boxer, Basset hound, Rottweiler, Cocker Spaniel, São Bernardo e Golden Retriever. Alguns autores afirmam que os animais da raça Boxer representam a maior parcela de cães

acometidos por linfoma, sugerindo uma predisposição genética desta raça (FORNEUL-FLEURY et al., 1997; SÖZMEN et al., 2005). Coleta (2009) em estudo envolvendo 28 cães com linfoma, relatou que aproximadamente 30% deles eram da raça Rottweiler. Porém, a predisposição racial neste tipo de neoplasia ainda é controversa (MOULTON; HARVEY, 1990).

A etiologia do linfoma canino é multifatorial. Fatores ambientais como exposição crônica a substâncias químicas tais como o herbicida 2,4-ácido fenoxiacético são referidos como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma em cães. Por outro lado, em cães de raças puras, a predisposição genética para este tipo de neoplasia pode existir (GREENLE et al., 1990; JONES et al., 1997; MORRISON, 2005; VALLI, 1993). Em outras espécies animais tais como felinos, bovinos, roedores e aves, assim como em alguns primatas, a etiologia viral acha-se bem estabelecida (GREENLE et al., 1990; JONES et al., 1997; VALLI, 1993).

As classificações histológicas e citológicas do linfoma canino baseiam-se no princípio de que as células linfomatosas representam o equivalente maligno dos diferentes tipos de linfócitos normais (FOURNEL-FLEURY et al*.,* 1994). De acordo com VALLI et al. (2002), as primeiras classificações de referência dos linfomas foram realizadas por RAPPAPORT (1966) e depois por LENNERT (1967) - classificação de Kiel. Novas classificações foram propostas por vários hematopatologistas com divergências na identificação dos tipos celulares o que conduziu a controvérsias. Em 1982, a proposta de uma classificação de uso clínico permitiu encontrar correspondência entre seis classificações mais utilizadas em bases exclusivamente morfológicas. Esta classificação, nominada de Working Formulation (WF) foi reconhecida em escala internacional, sobretudo nos Estados Unidos, já que os europeus utilizavam a classificação de Kiel atualizada, que se baseia em critérios tanto morfológicos quanto imunológicos. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos conseguiu adaptar as classificações Working Formulation e a de Kiel atualizada para tumores caninos com grande sucesso.

Os progressos consideráveis da imunologia, da citogenética e a introdução da biologia molecular permitiram um melhor conhecimento de formas já definidas, culminando em 1994 com a proposta de classificação denominada Classificação Euro-Americana Revisada das Neoplasias Linfóides (REAL - Revised European-

American Classification of Lymphoid Neoplasms).

Em Medicina Veterinária, a classificação histológica das neoplasias linfóides esteve por muito tempo baseada em classificações utilizadas para seres humanos. Em 1974, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou o primeiro livro que classificou os tumores hematopoéticos e linfóides dos animais domésticos. O texto foi atualizado em 2002, e incluiu a realização da imunofenotipagem dos linfócitos para classificação dos linfomas caninos (CORREIA, 2006). Este sistema passou a acompanhar a classificação humana com o objetivo de facilitar o intercâmbio de conhecimentos e a realização de estudos comparativos entre medicina e medicina veterinária, pois incorpora tanto os critérios morfológicos quanto os imunológicos (VALLI et al., 2011).

As principais particularidades do linfoma canino com relação ao humano incluem a raridade de linfomas foliculares, a grande quantidade de linfomas centroblásticos e a elevada proporção de linfomas de alto grau no cão (FOURNEL-FLEURY et al., 1994). Os linfomas caninos apresentam características semelhantes aos linfomas não-Hodgkin humanos

A classificação do linfoma também é estabelecida de acordo com a sua localização anatômica: multicêntricos (80 a 85%), digestivos (7%), cutâneos (6%), mediastinais (3%) e extranodais (raros). Os sinais clínicos do linfoma variam de acordo com a sua apresentação anatômica e histológica (NELSON; COUTO, 2006).

Cães com linfoma multicêntrico têm idade média avançada e a maioria apresenta linfadenopatia generalizada e, 10 a 20%, apresentam sinais clínicos inespecíficos, tais como, inapetência, anorexia, perda de peso e letargia. Os sinais clínicos de cães com linfoma digestivo incluem acentuada perda de peso ou massa abdominal palpável, alças intestinais espessadas e irregularidades na mucosa retal. No linfoma mediastinal, os achados clínicos são traduzidos por dispnéia, taquipnéia e sons cardíacos abafados secundários à efusão pleural. Os achados ao exame físico nos casos de linfoma extranodal podem ser uveíte anterior, hemorragia de retina e hifema (linfoma ocular); placas elevadas (linfoma cutâneo); demência, convulsões e paralisia (linfoma neural); insuficiência renal (linfoma renal) e arritmias (linfoma cardíaco) (COUTO; HAMMER, 1997).

Quanto à classificação citomorfológica os linfomas podem ser de alto, médio ou de baixo grau. De acordo com o esquema de classificação histológica (Kiel ou “National Cancer Institute”), 80% dos linfomas caninos são similares aos linfomas não-Hodgin humanos de médio e alto grau. E, quanto à imunofenotipagem, podem ser classificados em linfomas T, linfomas B e linfomas não T/ não B, bem como mistos (B/ T) (DE MOURA et al., 1999; JONES et al., 1997; MOULTON; HARVEY, 1990; SEQUEIRA et al., 1999; TESKE, 1994; VAIL, 2000). Segundo Vail et al. (2000), 70 a 80% dos linfomas caninos têm derivação imunofenotípica de célula B, dado semelhante ao encontrado por Sueiro et al. (2004) no Brasil. Ademais, o linfoma em cães pode ser classificado em diferentes estadios clínicos, que correspondem à extensão da doença a outros órgãos, manifestações de síndromes paraneoplásicas e sinais clínicos (DAY, 1995; DE MOURA; SEQUEIRA, 1999). Tal estadiamento permite estabelecer diagnóstico mais preciso do linfoma, bem como prognóstico clínico possibilitando tratamento mais adequado e uma melhora na taxa de sobrevida de pacientes linfomatosos (MORENO; BRACARENSE, 2007). Portanto, de acordo com a OMS, no estadio I há envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide de um único órgão (exceto medula óssea), no estadio II há envolvimento de vários linfonodos regionais com ou sem envolvimento das amígdalas, no estadio III há envolvimento generalizado dos linfonodos, no estadio IV há envolvimento de fígado e/ ou baço, com ou sem envolvimento generalizado dos linfonodos e no estadio V há envolvimento do sangue, medula óssea e/ ou outros órgãos. A maioria dos animais apresenta-se no estadio III ou IV da doença quando da avaliação clínica (DAY, 1995; DE MOURA et al., 1999). Os sub-estadios são “a”, sem sinais clínicos da doença, e “b”, com sinais clínicos de linfoma (Tabela 1).

**Tabela 1**. Classificação Clínica do Linfoma segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS.

| | |
|---|---|
| Estágio I | Envolvimento de um único linfonodo |
| Estágio II | Envolvimento de vários linfonodos em uma área regional |
| Estágio III | Envolvimento generalizado dos linfonodos |
| Estágio IV | Envolvimento do fígado e/ou baço com ou sem estádio III da doença |
| Estágio V | Envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros sistemas, com ou sem estádio I a IV |
| a | sem sinais sistêmicos da doença |
| b | com sinais sistêmicos da doença |

Embora o diagnóstico do linfoma esteja fundamentado no exame físico e nas avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e exames radiológicos e ultrassonográficos do paciente, o seu diagnóstico definitivo só pode ser firmado pela avaliação citológica ou histológica do órgão afetado (FAN; KITCHELL, 2002; NELSON; COUTO, 2006). Na Medicina Veterinária, há tempos a citologia tem sido aceita como técnica confiável para o diagnóstico de linfoma canino (CARTER; VALLI, 1988; FRÁGUAS, 2008), principalmente quando aliado à imunofenotipagem pela citometria de fluxo (SÖZMEN et al., 2005) ou por imunocoloração de cortes de tecidos ou de preparações citológicas obtidas por aspiração com agulha fina (RASKIN, 2003).

Diferentes classificações histológicas para o linfoma humano têm sido adaptadas para o linfoma canino (TESKE, 1994; MILNER et al., 1996). Dois sistemas de classificação do linfoma humano, a *Working Formulation (National Cancer Institute)* e o sistema *Kiel* foram os mais facilmente adaptados e considerados os mais completos (TESKE et. al., 1994; MILNER, et al. 1996; KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999). A classificação histológica da OMS abrange os seguintes subtipos: pouco diferenciado; linfoblástico; linfocítico e prolinfocítico; e histiocítico, histioblástico e histiolinfocítico. Entretanto, esta classificação é pouco utilizada por apresentar baixo valor prognóstico (RALLIS et. al., 1992).

A *Working Formulation* classifica o tumor com base no padrão tecidual (difuso ou folicular) e no tipo celular (pequena e clivada; grande; e imunoblástica). Já o

sistema *Kiel* modificado avalia a morfologia celular (centroblástico, centrocítico e imunoblástico) e a imunofenotipagem (células B ou T). Ambos os sistemas classificam se o tumor é de baixa ou alta malignidade, sendo que a *Working Formulation* acrescenta um grau intermediário de malignidade (MACEWEN; YOUNG, 1996). Os sistemas de classificação auxiliam na determinação do prognóstico dos linfomas. A classificação da *Working Formulation* tem maior correlação na determinação do tempo de sobrevida do animal (KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999). O padrão de arquitetura folicular em cães não está correlacionado com prognóstico, sendo encontrado na minoria dos casos. Em seres humanos, ao contrário, aproximadamente 30% dos linfomas não- Hodgkins são foliculares determinando um prognóstico favorável (TESKE, 1994). Na maioria dos estudos, demonstrou-se que linfomas de alto grau de malignidade apresentam, com maior freqüência, remissão completa em resposta à quimioterapia, quando comparados aos de baixa malignidade. No entanto, cães com linfoma de baixo grau de malignidade têm maior tempo de vida sem quimioterapia (MACEWEN & YOUNG, 1996). O sistema *Kiel* modificado auxilia na determinação do tempo de reincidência nos animais tratados, acreditando-se que também tenha utilização na estimativa do tempo de sobrevida (KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999).

Os achados dos exames complementares em cães linfomatosos estão diretamente relacionados com a localização anatômica do tumor e a gravidade dos sinais sistêmicos. Exames como o hemograma devem ser realizados para estadiamento e avaliação do estado geral do animal. Neste caso, os achados comuns são leucocitose (DOBSON; GORMAN, 1993; FURIE, 1993; LATIMER, 1997), anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia (CÁPUA et al., 2011), esta última em decorrência da infiltração da medula óssea por células neoplásicas (RALLIS et al., 1992). Cápua et al. (2011) relataram ainda linfocitose em 22% dos cães com linfoma. A observação de esfregaços de medula óssea é de grande importância para o estadiamento do linfoma e tem indicação sempre que há anemia e linfocitose (MACEWEN; YOUNG, 1996; MADEWEKLL; FELDMAN, 1980).

O prognóstico clínico para cães com linfoma está relacionado ao imunofenótipo e sub-estadio estabelecido pela OMS. Os tumores imunorreativos

CD3 (derivados de células T) têm remissão mais curta e os animais com sinais clínicos de linfoma (sub-estadio “b”) têm prognóstico reservado (VAIL, 2000).

Na ausência de tratamento, o linfoma leva muitos cães a óbito em quatro a seis semanas (MACEWEN; YOUNG, 1996). No entanto, é a neoplasia que melhor responde à quimioterapia (OGILVIE; MOORE, 1995; ROSENTHAL; MACEWEN, 1990), e aquela que, adequadamente tratada e monitorada, proporciona consideráveis avanços na duração e qualidade de vida do paciente (OGILVIE; MOORE, 1995). Cápua et al. (2009), relatam com tratamento quimioterápico de MW, uma taxa de sobrevida de 33%, seis meses após da terapia antitumoral para o linfoma.

A toxicidade hematológica é o efeito colateral mais comum nos pacientes sob regime de quimioterapia, pois as células sangüíneas constituem sistema celular de renovação rápida (KISSEBERTH; MACEWEN, 1996). Neutropenia e trombocitopenia são os primeiros sinais, enquanto a anemia desenvolve-se mais tardiamente em razão da vida média mais longa das hemácias (OGILVIE; MOORE, 1995). Dessa forma, a hematotoxicidade é considerada um fator limitante da quimioterapia, tanto pelo risco potencial de morte do animal em decorrência da hipoplasia da série granulocitária (neutropenia séptica), quanto por impor diminuição de maneira transitória ou definitiva da dose do quimioterápico, o que pode prejudicar a eficácia do tratamento. A maioria dos fármacos quimioterápicos é mielotóxica, sendo que a ciclofosfamida possui mielotoxicidade elevada e a vincristina, na dose de 0,75 $mg/m^2$, possui mielotoxicidade moderada (LANORE; DELPRAT, 2004). O nadir de neutrófilos, momento no qual o número de granulócitos é o mais baixo após uma sessão de quimioterapia, é geralmente constatado uma semana após o início do tratamento. A neutropenia, fase mais perigosa do ciclo, persiste por três a cinco dias. Em pouco menos de duas semanas, a medula passa por uma fase de recuperação (LANORE; DELPRAT, 2004).

As etapas da quimioterapia do linfoma canino incluem indução da remissão, manutenção da remissão e reindução da remissão ou terapia de resgate (MACEWEN; YOUNG, 1996). A resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos é o maior obstáculo para o tratamento efetivo do linfoma. No momento do diagnóstico é provável que a população de células linfomatosas

contenha diversas linhagens que sejam resistentes a um ou mais agentes antineoplásicos (HOSKINS, 2001). Esse é um dos motivos pelos quais a poliquimioterapia é considerada mais eficaz do que a quimioterapia de agente único no tratamento referida doença (HOSKINS, 2001; MORRISON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007).

Desde sua descrição na literatura há 20 anos, o protocolo quimioterápico COP, combinação de ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona, tem sido a base para muitos protocolos quimioterápicos, no tratamento de linfoma canino, sendo considerado como padrão (MYERS et al., 1997). Porém, apresenta vários efeitos adversos tais como infertilidade, alopecia e pigmentação da pele (FRAZIER; HAHN, 1995), além de mielossupressão e distúrbios gastrintestinais (KITCHELL; DHALIWAL, 2000; KOCHEVAR; MEALEY, 1997).

Outro protocolo que se tornou popular no tratamento do linfoma canino é o de Madison-Wisconsin (MW) - uma combinação dos fármacos L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorrubicina, as cinco drogas consideradas mais efetivas para cães portadores de linfoma (HOSOYA et al., 2007). Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e tempo de sobrevivência para cães com linfoma (MORRISON, 2005), sendo um dos protocolos mais empregados no tratamento de linfoma em cães (CHUN et al., 2000; MORRISON, 2005). Tal protocolo passou por modificações, principalmente com relação à sua duração, desde que foi publicado por Keller et al. (1993). No início a duração era de três anos, com sobrevida de um ano para metade dos pacientes. Em 2002, Garrett et al., utilizou o protocolo de Madison- Wisconsin modificado para 25 semanas, e não houve diferença significativa com relação à resposta ao tratamento (remissão completa) e sobrevida dos animais em relação ao protocolo inicial. Mais recentemente, em 2007, outra versão do protocolo de MW, com 19 semanas de duração, foi publicada por Hosoya et al., e a remissão completa foi atingida em 77% dos casos e 45% atingiram sobrevida de um ano.

A vincristina, um alcalóide vegetal derivado da vinca, atua interrompendo a metáfase, ligando-se às proteínas dos microtúbulos necessárias à formação dos fusos mitóticos e mitose celular (KOCHEVAR; MEALEY, 1997; RODASKI; DE NARDI, 2008). Este fármaco pode provocar, como efeitos colaterais

hematológicos, a mielossupressão, caracterizada por discreta leucopenia, às vezes acompanhada de anemia e trombocitopenia. Esta toxicidade pode ser maior quando associada à L-asparaginase, uma enzima obtida de organismos como a *Escherichia coli* e a *Erwinia carotovora* capaz de destruir as reservas exógenas do aminoácido asparagina, vital ao processo de síntese protéica das células neoplásicas, que são incapazes de produzir a asparagina endógena. Essa enzima raramente provoca depressão medular, mas inibe a função dos linfócitos T e B, além de promover hepatotoxicidade com aumento nas atividades séricas das enzimas alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase, e das concentrações de bilirrubina, como também diminuição da albumina sérica (RODASKI; DE NARDI, 2008).

A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada classificada como agente alquilante que atua inibindo a síntese do DNA e, conseqüentemente, o ciclo celular, de forma não fase-específica. Um de seus efeitos tóxicos é a mielossupressão, principalmente com neutropenia, trombocitopenia e, com menor freqüência, anemia não regenerativa nos casos de pacientes submetidos à terapia prolongada (BARGER; GRINDEM, 2000; RODASKI; DE NARDI, 2008).

A doxorrubicina, que integra o referido protocolo, é um antibiótico antitumoral (antraciclina) derivado de culturas de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius*, sendo um quimioterápico inibidor da transcriptase reversa e da RNA polimerase, impedindo a síntese do DNA e RNA como agente ciclo celular não específico. Pode causar leucopenia, anemia e trombocitopenia, além de cardiotoxicidade (RODASKI; DE NARDI, 2008).

A prednisona, um corticosteróide utilizado nas primeiras quatro semanas do protocolo de MW, induz os linfócitos normais à apoptose, exercendo efeitos citolíticos em neoplasias linfóides (FAN; LORIMIER, 2005; KOCHEVAR; MEALEY, 1997; LANORE; DELPRAT, 2004). É um hormônio que atua em um receptor linfocitário específico, causando cisão do DNA, prevenindo a divisão celular (RODASKI; DE NARDI, 2008). Como alterações hematológicas clássicas secundárias à utilização dos esteróides incluem-se neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose (BARGER; GRINDEM, 2000; DILLON; SPANO; POWERS, 1980; STOCKHAM; KEETON; SZLADOVITS, 2003). O tratamento

prolongado pode causar aumento das atividades séricas das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina (DILLON; SPANO; POWERS, 1980).

Em busca de novas estratégias de tratamento, as pesquisas voltam-se, não somente para o desenvolvimento de fármacos antitumorais, mas também exploram os mecanismos envolvidos na carcinogênese. Nas últimas décadas diversos estudos foram realizados correlacionando o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de neoplasias com a superprodução de prostaglandinas nas células tumorais e inflamatórias locais, em consequência à maior produção de COX-2.

## 2.2 Neoplasias X PGE2

Quando as células são alvo de estímulos fisiológicos e/ou patológicos, o ácido aracdônico, presente na porção fosfolipídica da membrana celular, é clivado pela ação das fosfolipases, principalmente a A2, e convertido em prostanóides, pela ação das ciclooxigenases e/ou em leucotrienos (GREENHOUGH et al., 2009; MATSUOKA; NARUMIYA, 2007). Prostanóides são ácidos graxos de 20 carbonos, e incluem as prostaglandinas e os tromboxanos (MATSUOKA; NARUMIYA, 2007). A ação das ciclooxigenases, também conhecidas como prostaglandina H sintase, leva à conversão do ácido aracdônico em PGH2, altamente instável, que rapidamente é metabolizado pelas prostaglandinas sintases e convertida em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina F2α (PGF2α), prostaglandina I2 (prostaciclina) ou tromboxano A2 (TXA2) (GREENHOUGH et al., 2009).

De acordo com o estímulo, a ação da ciclooxigenase é realizada por uma de suas isoformas, a ciclooxigenase 1 (COX-1) ou a ciclooxigenase 2 (COX-2) (GREENHOUGH et al., 2009; YU et al., 2008). No início dos anos 2000, foi descoberta a cicloxigenase 3 (COX-3), envolvida em processos anti- inflamatórios (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

A COX -1, também chamada de constitutiva, é encontrada na maioria dos tecidos e relaciona-se com a produção de prostaglandinas com efeitos fisiológicos, como proteção da mucosa gástrica, melhora da perfusão renal e agregação plaquetária. Foi identificada como alvo dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) por Vane em 1971, e clonada em 1988 por Dewitt e Smith. A COX-2, descoberta no

inicio da década de noventa (SIMMONS et al., 2004), é uma enzima induzida e sintetizada em processos inflamatórios e neoplásicos, em resposta a citocinas inflamatórias (YU et al., 2008). Ambas catalizam a mesma reação (ZHA et al., 2004), e, apesar do seu padrão de expressão ser muito diferente (DUBOIS et al., 1998; WILLIAMS et al.,1999), possuem sequências com grande homologia (domínio de ancoragem e centro catalítico), exceto no que diz respeito à isoleucina 590 do canal do substrato da COX-1, que na COX-2 é substituída por uma valina (KURUMBAIL et al., 1996). Devido a esta diferença, a isoforma COX-2 pode metabolizar outros substratos como, por exemplo, o ácido linoleico. É também esta diferença que permitiu o desenvolvimento de inibidores seletivos para a COX-2 (ZHA et al., 2004).

São vários os fatores que podem promover um aumento da expressão da COX-2. Esta indução de expressão é de curta duração, regressando aos valores basais, caso o estímulo desapareça, em 24-48 horas (STACK & DUBOIS, 2001). Moléculas anti-inflamatórias biológicas como os corticoesteróides, a IL-13, a IL-10 e a IL-4 impedem a expressão da COX-2 (NIIRO et al., 1998), assim como os estrógenos (OSPINA et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2006), os anti-oxidantes e a proteína p53. Pensa-se que a PGE2 seja a principal prostaglandina envolvida na carcinogênese (WANG & DUBOIS, 2006; CHEN & SMYTH, 2011) e que, além desta, apenas o tromboxano A2 (TXA2) esteja implicado na promoção da angiogênese tumoral (PRADONO et al., 2002). Os níveis de PGE2 dependem da atividade da COX-2 e da PGE-sintetase (PGES) que são responsáveis pela sua produção, e da 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH) responsável pela sua degradação (WANG & DUBOIS, 2006).

Estudos demonstraram que a COX-2 pode ser induzida por oncogenes, hipóxia tecidual, raios ultravioletas, interleucinas, andrógenos, fator de crescimento epidermal, fator de necrose tumoral (TNF-α) e benzopirenos, lipopolissacarídeos bacterianos e radicais de oxigênio (EROS). Níveis elevados de COX-2 levam à proliferação celular, à supressão da apoptose, à indução da angiogênese e da metástase, ações estas que contam para sua função oncogênica (KUNDU; SURH, 2008). É primariamente expressa em monócitos ativados e macrófagos, embora sua expressão também seja induzida em células T ativadas (SIMMON et al., 2004).

As prostaglandinas possuem forte atividade imunomoduladora e podem

exercer efeitos autócrino e parácrino. A função pró-inflamatória da PGE2 nas células ocorre através de receptores específicos de membrana, ligados à proteína G (GPCRs - proteínas transmembrânicas envolvidas na transdução de sinais celulares) denominados EP1, EP2, EP3 e EP4 (DORSAM; GUTKIND, 2007; FORTIER et al., 2008; FULTON et al., 2006; GREENHOUGH et al., 2009; KUNDU; SURH, 2008) e efetivamente suprimem a resposta imune das células T (NATARAJ et al., 2001; VANG et al., 2003). Os receptores de PGE2 ativam diferentes tipos de proteínas G podendo ligar-se a mais de um tipo delas e também a outras vias de sinalização (CASTELLONE et al., 2005; HATAE et al., 2002; SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007).

A superexpressão da COX-2, leva à produção, pelas células tumorais e estromais, de PGE2. Esta, por interação com os receptores EP2 e EP4, reduz a expressão das citoquinas associadas à resposta imune Th1 (TNF-A, INF-γ, IL-2) e aumenta a expressão de citoquinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-6) (HARRIS et al., 2002), leva à supressão da produção de linfócitos B e T, diminuição na produção de linfocinas, diminuição na formação e atividade antineoplásica de células Natural Killers e monócitos, resultando na síntese de células T não responsivas. Promove portanto, o desenvolvimento neoplásico, o aumento da proliferação celular, acentuando a angiogênese, inibindo a apoptose, estimulando a invasão tumoral e suprimindo a resposta imune (WANG; DUBOIS, 2006), contribuindo para o processo de mestástase (CAMACHO et al., 2008; KUNDU; SURH, 2008). A PGE2 pode ainda potenciar a evasão de células neoplásicas por modular o sistema imunitário (WANG; DUBOIS, 2006). Em situações normais, o organismo seria capaz de destruir clones de células transformadas ou combater células tumorais já formadas (KANAOKA et al., 2007).

Muitas das mais prevalentes neoplasias humanas, incluindo o câncer de mama, o carcinoma de pulmão e o carcinoma de cabeça e pescoço (CECP) (DORSAM; GUTKIND, 2007), apresentam níveis elevados de PGE2 (CAMACHO et al., 2008; KUNDU; SURH, 2008). Em 2002, Gallo et al. mostraram haver maiores níveis de PGE2 em pacientes com CECP com metástases quando comparados com pacientes sem metástases.

Kundu e Surh (2008) demonstraram que a PGE2 é capaz de promover a carcinogênese na pele e no cólon em camundongos. A administração intraperitoneal

de PGE2 em ratos leva à formação de adenocarcinomas no cólon, aumentando a proliferação celular e suprimindo a apoptose. Em camundongos transgênicos com superexpressão no gene APC (adenomatous *Polyposis coli)*, sabidamente envolvido no câncer de cólon, mostram aumento no número de adenomas intestinais. Além disso, nos mesmos ratos, a administração de PGE2 bloqueou os efeitos da regressão dos adenomas promovida por anti-inflamatórios não esteroidais. A inativação funcional ou a perda da PDGH, enzima que degrada PGE2, é correlacionada ao aumento da tumorigênese em diversos órgãos, incluindo o cólon, os pulmões e a bexiga.

### 2.3 O uso de inibidores da COX-2 na terapia antitumoral

O tratamento com antiinflamtórios não esteroidais (NSAIDs), que inibem a COX-1 e/ou a COX-2, pode reduzir o risco e a incidência de algumas neoplasias. Inibidores seletivos da COX-2 reduzem a produção de prostaglandinas e outros eicosanóides, aumentam a apoptose, reduzem a angiogênese, a metástase e inibem o crescimento celular e a proliferação (MOHAN; EPSTEIN, 2003) ao ligar-se diretamente ao seu sítio ativo (LEV-ARI et al., 2007). Uma das estratégias para a redução das concentrações de PGE2 é a utilização de inibidores de COX-2.

Um estudo realizado por Lee et al. (2009) mostrou que os níveis de PGE2 aumentados em camundongos com carcinoma pulmonar de Lewis diminuiram no grupo tratado com inibidor de COX-2 (celecoxib), além do número de metástases.

Segundo Dorsam e Gutkind (2007), a inibição da COX-2 reduz o número e o tamanho de adenomas em pacientes humanos com maior propensão ao desenvolvimento de câncer de cólon por mutação no gene supressor tumoral APC. Mohan e Epstein (2003) mostraram que o celecoxib mostrou ser capaz de reduzir significativamente o número de pólipos intestinais em pacientes humanos com adenopolipose familiar e de reduzir a incidência, o número e o tamanho de adenocarcinomas em ratos.

Em 2009, Hoshikawa et al. demonstraram que tanto os inibidores de COX-2 quanto uma droga antagonista do receptor EP3 inibem o crescimento celular de forma dose-dependente, mas essa inibição é menos eficaz para o antagonista do EP3, e somente o inibidor de COX-2 reduziu significativamente os níveis de PGE2

secretada pelas células de CECP.

Camundongos geneticamente modificados que superexpressam a COX-2 nas glândulas mamárias, na pele e no estômago são mais propensos a desenvolver neoplasias malignas nos referidos órgãos, enquanto camundongos "knockout" para COX-2 são menos suscetíveis ao desenvolvimento de neoplasias malignas no intestino, de papilomas na pele e de neoplasias malignas na mama. Tanto o uso de inibidores seletivos da COX-2, como o reforcoxib, e a inativação funcional da COX-2 em camundongos "knockout" para o gene APC*,* um modelo animal para a polipose adenomatosa humana, reduziram o número e o tamanho dos pólipos intestinais, corroborando a associação entre a superexpressão de COX-2 e a carcinogênese. O mesmo também foi observado em modelos de carcinogênese de pele induzida por luz ultravioleta. Além disso, a inibição da COX-2 por celecoxib retarda, em ratos, a progressão da inflamação esofágica para a metaplasia esofágica e adenocarcinoma. A participação da COX-2 nos estágios iniciais da carcinogênese esofágica é bem evidente, pois a expressão da COX-2 é elevada durante os estágios de displasia e carcinoma *in situ,* e no carcinoma epidermóide invasivo. A supressão da expressão da COX-2, tanto por meios farmacológicos quanto por RNA de interferência, leva à redução da produção de PGE2 e redução da tumorigênese em camundongos *nude2* (KUNDU; SURH, 2008).

Segundo Zhang et al. (2012), o celecoxibe foi responsável pela prevenção de carcinoma de esôfago em ratos com refluxo de suco duodenal e ácido causados cirurgicamente.

Estudos em diversas neoplasias, como no carcinoma espinocelular oral (SCHMIDT et al., 2001; BORIA et al., 2004), no melanoma oral maligno (BORIA et al., 2004) e no carcinoma prostático em seres humanos (SORENMO et al., 2004), com tratamento com piroxicam em combinação ou não com a quimioterapia apresentava vantagens em termos de sobrevivência. Contrariamente, a administração conjunta do piroxicam com doxorrubicina em cães com linfoma, não mostrou qualquer vantagem comparativamente aos animais tratados apenas com doxorrubicina (MUTSAERS et al., 2002).

Um estudo realizado em 12 cadelas com carcinoma mamário inflamatório tratadas com piroxicam ou quimiotrapia demonstrou tempo de sobrevivência médio

de 171 dias para o grupo tratado com piroxicam, em oposição aos 14 dias observados nos três animais apenas tratados com quimioterapia. Adicionalmente, registaram-se melhorias clínicas nos animais tratados com o AINE (SOUZA et al., 2009).

**2.4 Restrições ao uso dos inibidores de COX**

Na década de 70, descobriu-se que os AINEs atuam inibindo a COX (VANE, 1971), percebendo-se mais tarde que os efeitos benéficos destes fármacos estão associados à inibição da COX-2, enquanto que a sua toxicidade está associada aos efeitos inibitórios sobre a COX-1 (HAYES, 2007). Comparativamente aos seres humanos, as espécies felina e canina apresentam maior sensibilidade à toxicidade provocada pelos AINEs (HAYES, 2007), devido à deficiente glucuronidação nos felinos e à re-circulação entero- hepática nos cães (JONES & BUDSBERG, 2000). Ainda que existam AINEs que inibem preferencialmente a COX-2, como o carprofeno e o meloxicam, foram criados os Coxibs, que inibem especificamente a COX-2, não possuindo efeito inibitório sobre a COX-1 (HAYES, 2007), entretanto ainda mostram efeitos secundários associados, que serão discutidos mais adiante. É ainda importante salientar que não é desejável inibir a atividade da COX-2 por completo, visto que esta é expressa fisiologicamente em órgãos vitais, como os rins e o cérebro (JONES & BUDSBERG, 2000).

Um estudo desenvolvido para avaliar os efeitos dos Coxibs no sistema digestivo acabou por detectar um aumento da incidência de infarto do miocárdio, em seres humanos medicados com rofecoxib (BOMBARDIER et al., 2000). O estudo em questão possuía dois grupos, um a que foi administrado o rofecoxib e outro a que se administrou naproxeno. Inicialmente, os autores associaram os efeitos cardio-vasculares no grupo que foi tratado com o rofecoxib a uma falta de proteção conferida pelo naproxeno (BOMBARDIER et al., 2000). Estudos posteriores vieram comprovar a associação causa-efeito verificada entre os Coxibs e os efeitos colaterais cardio-vasculares (BRESALIER et al., 2005, BERTAGNOLLI et al., 2006).

O argumento apontado pela maioria dos autores baseia-se num desequilíbrio de concentrações entre a prostaciclina (PGI2) e o tromboxano A2 (TxA2) induzido pelos Coxibs (CHA & DUBOIS, 2006). Enquanto a PGI2 inibe a agregação plaquetária e induz a vasodilatação (MURATA et al., 1997), o TxA2 tem o efeito

contrário (CHA & DUBOIS, 2006); assim, a inibição da PGI2 induz um estado pró-trombótico que poderá resultar num infarto do miocárdio (MUKHERJEE et al., 2001; FITZGERALD, 2004). Adicionalmente, a PGI2 parece desencadear um efeito protetor nas células cardíacas face a stress oxidative (ADDERLEY & FITZGERALD, 1999). Cha e DuBois (2006) salientam ainda o fato de, enquanto os efeitos secundários dos Coxibs só ocorrerem alguns meses após o início do tratamento, o desequilíbrio nas concentrações de PGI2 e TxA2 acontece poucas horas após a administração dos inibidores. Estes autores apontam para que os Coxibs possam, eventualmente, levar a outro tipo de alterações cardiovasculares como a hipertensão e a retenção de fluidos.

Outra hipótese que poderá explicar os efeitos cardiovasculares secundários dos Coxibs é o fato destes reduzirem a expressão do VEGF, fator implicado na homeostase cardiovascular (WANG & DUBOIS, 2006). Tal fenômeno deve-se à subexpressão da PGE2 induzida pelos fármacos que conduz à subexpressão do VEGF (WANG & DUBOIS, 2007).

Devido aos efeitos secundários dos Coxibs, alguns autores afirmam que o próximo passo será o desenvolvimento de outros fármacos que regulem a concentração de PGE2 ou que inibam as diferentes vias ativadas por esta proteína (WANG & DUBOIS, 2006; CHA & DUBOIS, 2007). Possíveis alvos para a diminuição da concentração celular de PGE2 serão as PGES, a 15-PGDH e os recetores EP 1-4 (WANG & DUBOIS, 2006). Em modelos murinos foi demonstrado que a deleção da mPGES-1 não provoca alterações cardiovasculares, ao contrário da inibição da COX-2 (CHENG et al., 2006), indicando que a inibição das PGES possa ser uma estratégia viável. Sabe-se que a perda de função da 15-PGDH ocorre em diversas neoplasias como o carcinoma do pulmão (DING et al., 2005), os tumores do cólon (BACKLUND et al., 2005; MYUNG et al., 2006) e os tumores das células de transição da bexiga (GEE et al., 2003) e que o restabelecimento dos níveis desta enzima é capaz de inibir o crescimento das lesões tumorais (YAN et al., 2004). Em algumas neoplasias a administração de AINEs aumenta a expressão da 15- PGDH (BACKLUND et al., 2005; QUIDVILLE et al., 2004).

Wang & DuBois (2006) referem também que estes novos fármacos seriam uma grande valia por poderem ser utilizados em neoplasias que apresentem

sobrexpressão de qualquer uma das isoformas da COX.

Nos domínios da Medicina Veterinária, principalmente envolvendo cães portadores de linfoma multicêntrico, existem poucos estudos focados na produção de PGE2 e, tampouco, estabelecendo comparações da resposta à quimioterapia de Madison-Wisconsin com a taxa de recidiva, prognóstico e tempo de sobrevida do paciente.

Desta forma, justifica-se plenamente o estudo da PGE2 em cães com linfoma, submetidos à quimioterapia de Madison-Wisconsin, associado ou não a um inibidor da COX-2. Certamente, os resultados encontrados, devidamente analisados e interpretados, poderão subsidiar uma nova estratégia terapêutica para pacientes com linfoma.

O objetivo desse estudo foi avaliar, por intermédio do ELISA, a PGE2 em cães com linfoma multicêntrico, submetidos ao protocolo quimioterápico de MW, modificado ou não com um inibidor de COX-2, bem como o seu possível papel como fator prognóstico em pacientes linfomatosos. Objetivou-se também avaliar a utilização do inibidor da COX-2 com relação ao aumento da taxa de remissão e sobrevida dos pacientes.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

As parcelas experimentais constituíram-se de 30 cães adultos, machos ou fêmeas, atendidos junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e distribuídos em três grupos experimentais.

Compuseram este estudo, como controle, dez cães, machos e fêmeas, com peso médio de 11,45±2,54 Kg, idade média de 7±3,20 anos, considerados hígidos com base no exame clínico, hemograma, perfil hepático, renal e exame coproparasitológico.

Os grupos tratados, denominados 1 e 2, foram compostos, cada um, por 10 cães acometidos por linfoma multicêntrico atendidos pelo Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP, e tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin de 19 semanas

sendo este alterado por um inibidor de COX -2, em substituição à prednisona, para os animais do grupo 2.

O diagnóstico de linfoma foi firmado com base nos achados clínicos, citológicos e histológicos, com bases nos critérios de classificação morfológica descritos por Fournel-Fleury et al. (2002). A classificação anatômica e estadiamento clínico da neoplasia, de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde, foram feitas com base no exame clínico, ultrassonográfico, radiográfico, hematológico central e periférico, em estadios (I a V) e subestadios (a ou b) de acordo com a Tabela 1.

Os cães foram avaliados clinicamente a cada sessão de quimioterapia e, enquadrados, conforme sua resposta ao tratamento em animais com remissão completa (desaparecimento da doença clínica), remissão parcial (diminuição maior ou igual a 50% do tamanho do tumor sem novos focos), doença estável (diminuição ou aumento menor que 50% do tamanho do tumor) e doença progressiva (aumento em pelo menos 50% do tamanho do tumor, ou o aparecimento de novos focos) (DHALIWAL et al., 2003). O tempo de sobrevida foi considerado como o tempo decorrido entre o diagnóstico do linfoma e o óbito do animal.

### 3.2 Classificação histológica e imunohistoquímica do linfoma

Casos suspeitos de linfoma foram submetidos ao exame citológico, obtidos através da punção aspirativa por agulha fina. Após confirmação do diagnóstico, foi realizada biópsia excisional de linfonodo, posteriormente fixado em solução de formol a 10% tamponado (pH 7,6). As amostras, após processamento histológico de rotina, foram novamente avaliadas pelo patologista segundo critérios da Organização Mundial de Saúde (2002) para classificação do linfoma e, também realizada imunohistoquímica no Laboratório de Patologia Veterinária VetPat, Campinas – SP, para imunofenotipagem.

### 3.3 Protocolos quimioterápicos

Os animais portadores de linfoma multicêntrico foram distribuídos em 2 grupos. No grupo 1, os animais foram submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin de 19 semanas (HOSOYA et al., 2007; CHUN et al., 2009)

(Tabela 2) e aqueles do grupo 2, submetidos ao protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin de 19 semanas modificado (Tabela 3).

Antes de cada sessão de quimioterapia, os animais com linfoma foram avaliados clinicamente, quando também foi realizado o estadiamento do tumor, obedecendo às regras estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde. Adicionalmente, amostras de sangue dos animais foram colhidas por venopunção jugular para realização de hemograma e dosagem de alaninoaminotransferase, creatinina, proteína e albumina séricas, como parte dos procedimentos adotados pelo serviço de Oncologia Veterinária do referido Hospital.

**Tabela 2 -** Protocolo quimioterápico de MW de 19 semanas adotado para os animais do grupo 1.

| | Semanas | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MW-19 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| L-asparaginase (400 mg/kg, IM) | ● | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vincristina (0,75 mg/m$^2$, IV) | ● | | ● | | | ● | | ● | | | ● | | ● | | | ● | | ● | |
| Ciclofosfamida (200mg/m$^2$, VO) | | ● | | | | | ● | | | | | ● | | | | | ● | | |
| Doxorrubicina (30 mg/m$^2$, IV) | | | | ● | | | | | ● | | | | | ● | | | | | ● |
| Prednisona* | ● | ● | ● | ● | | | | | | | | | | | | | | | |

* 2 mg/kg, via oral, a cada 24 horas durante 7 dias

1,5 mg/kg, via oral, a cada 24 horas durante 7 dias

1 mg/kg, via oral, a cada 24 horas durante 7 dias

0,5 mg/kg, via oral, a cada 24 horas durante 7 dias.

**Tabela 3** – Protocolo quimioterápico de MW de 19 semannas modificado adotado para os animais do grupo 2.

| | Semanas | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MW-19 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| L-asparaginase (400 mg/kg, IM) | ● | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vincristina (0,75 mg/m$^2$, IV) | ● | | ● | | | ● | | ● | | | ● | | ● | | | ● | | ● | |
| Ciclofosfamida (200mg/m$^2$, VO) | | ● | | | | | ● | | | | | ● | | | | | ● | | |
| Doxorrubicina (30 mg/m$^2$, IV) | | | | ● | | | | | ● | | | | | ● | | | | | ● |
| Firocoxibe* | ● | ● | ● | ● | | | | | | | | | | | | | | | |

*5 mg/Kg, via oral, a cada 24 horas durante 28 dias.

### 3.4 Amostras de sangue para realização de hemograma

As amostras de sangue dos pacientes obtidas no momento do diagnóstico (T1) e após o primeiro ciclo de quimioterapia (T2) por venopunção jugular em tubos a vácuo com anticoagulante EDTA, foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” para realização de hemograma e, posteriormente submetidas à centrifugação para separação do plasma, que foi congelado a -20 graus Celsius. Os animais do grupo controle foram submetidos à avaliação em um único momento.

### 3.5 Dosagem de PGE2

Para quantificação da PGE2 plasmática foi utilizado o “kit” de ELISA comercial DetectX Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal (Arbor Assays, Ann Harbor, MI, USA), que utiliza placa de 96 poços revestida com anticorpo de captura (Mouse polyclonal mouse IgG). As amostras de plasma foram diluídas na proporção 1:10 na solução fornecida no kit.

Foram feitas diluições seriadas da solução estoque de PGE2 em solução

própria fornecida no kit, obtendo-se seis diferentes concentrações: 1000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62,5pg/mL e 31,3pg/mL. Para a realização do experimento foram utilizados, além dos padrões, dois poços sem amostra (NSB), dois poços representando atividade mínima de PGE2 (B0 ou 0 pg/mL). Os poços NSB foram preenchidos com solução tampão e o Conjugado. Os poços das diluições padrão e das amostras foram preenchidos com PGE2 padrão ou amostra e demais reagentes. A placa foi recoberta e incubada por duas horas em temperatura ambiente sob agitação constante. Após quatro lavagens com solução tampão de lavagem fornecida pelo kit, foi adicionado o substrato TMB para revelação, e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. A revelação baseia-se em reações que produzem substâncias de coloração amarela. Quanto mais amarelo o poço, menor a quantidade de prostaglandina presente na amostra. Posteriormente, foi adicionada a solução *STOP* e feita a leitura da densidade óptica em leitor de Elisa (VICTOR3 V 1420 multilabel plate counter - Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) usando filtro de 450nm. Os valores da leitura foram subtraídos do valor NSB, a fim de se obter um valor corrigido.

### 3.5 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros gênero, raça, idade, peso, estadiamento e subestadiamento clínico, imunofenótipo, classificação histopatológica e sobrevida foram analisados pela estatística descritiva básica.

Foram utilizados dois testes para realização da análise estatística dos demais dados. Primeiramente, para os resultados de ELISA para os diferentes grupos e momentos foi conduzido o teste de medidas repetidas no tempo. Para analisar a remissão entre os grupos, foi realizado o teste fatorial. Para compação das médias, foi utilizado teste T.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Gênero

Dos 20 animais com linfoma, oito eram machos (44,5%) e dez eram fêmeas (55,5%). Desta forma, observa-se prevalência da doença em fêmas. Segundo a

maioria dos autores (MACEWEWN et al., 1987; DOBSON & GORMAN, 1993; STARRAK et al., 1997), os cães aparentemente não apresentam predisposição de gênero para o linfoma, entretanto Cápua (2009), Cardoso et. al. (2003), Moreno et al. (2007), Coleta (2009), Dobson & Gorman (1994) e Neuwald et al. (2014) encontraram uma maior incidência de machos em seus estudos.

**4.2 Raça**

Para os 20 cães com linfoma, a distribuição racial deu-se da seguinte forma: cinco Rottweilers (25%) e cinco sem raça definida - SRD (25%). Das raças Basset Hound, Boxer, Bull Terrier, Daschound, Dogue Alemão, Fox paulistinha, Labrador, Lhasa Apso, Pit Bull e Poodle houve apenas um representante (Figura 1).

Embora a predisposição racial neste tipo de neoplasia seja ainda um assunto controverso (MOULTON & HARVEY, 1990), observou-se neste estudo, a predominância de Rottweilers e cães sem raça definida. Jagielski et al. (2002) e Moreno & Bracarense (2007) descreveram também uma maior ocorrência da doença em Rottweilers, e Vail et al. (2001) descrevem a predisposição genética para o linfoma em uma família desta raça nos Estados Unidos. No Brasil, grande parte dos Rottweilers descendem de famílias de cães importados o que, juntamente com a falta de critérios para o acasalamento, podem explicar a difusão desta predisposição genética encontrada nesta família de cães americanos (MORENO et al., 2007).

Quanto aos cães sem raça definida, é sabido que no Brasil representam grande parte da população, consequentemente, do número de animais atendidos no Hospital “Governador Laudo Natel”. Cardoso et al. (2003) e Moreno et al. (2007) relatam também maior prevalência de tais cãe em estudos conduzidos, respectivamente, nos estados de São Paulo e Paraná. Embora alguns autores afirmem que os animais da raça Boxer representam a maior parcela de cães acometidos por linfoma, sugerindo uma predisposição genética desta raça para o linfoma (SÖZMEN et al., 2005; FORNEUL-FLEURY et al., 1997; PRIESTER & MCKAY, 1980), neste estudo apenas um paciente era de tal raça.

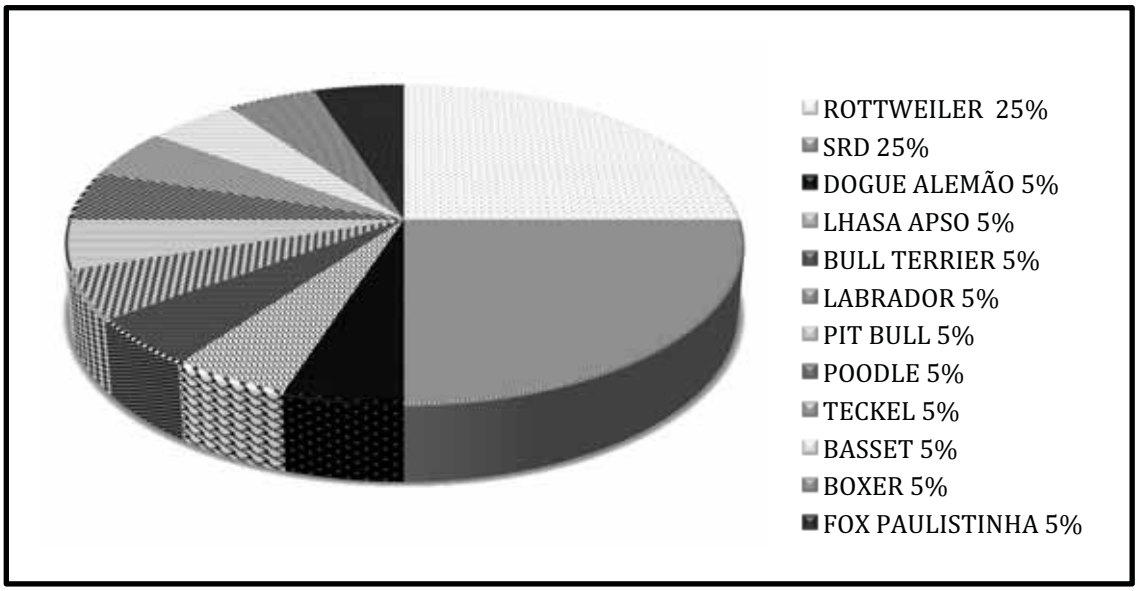


**Figura 1**: Frequência racial de vinte cães com linfoma. Jaboticabal, 2014.

### 4.3 Idade

Quanto à faixa etária, observou-se uma variação de quatro a 13 anos resultando na média de 8,1 ± 2,8 anos. A maioria dos cães, 11 animais (55%), encontrava-se na faixa de seis a dez anos, considerados de meia-idade. Quatro cães (20%) estavam na faixa de um a cinco anos, e cinco pacientes tinham entre 11 e 15 anos (25%) (Figura 2). Os achados de maior número de cães de meia idade acometidos por linfoma, corroboram com a maioria dos autores (COUTO, 1986; MACEWEN et al., 1987; MACEWEN & YOUNG, 1996; NEUWALD et al., 2014; STARRAK et al., 1997; CARDOSO et al., 2003; MORENO et al., 2007). Apesar do linfoma ser mais frequente nos cães de meia idade a idosos, esta neoplasia pode ser observada em pacientes de todas as idades.

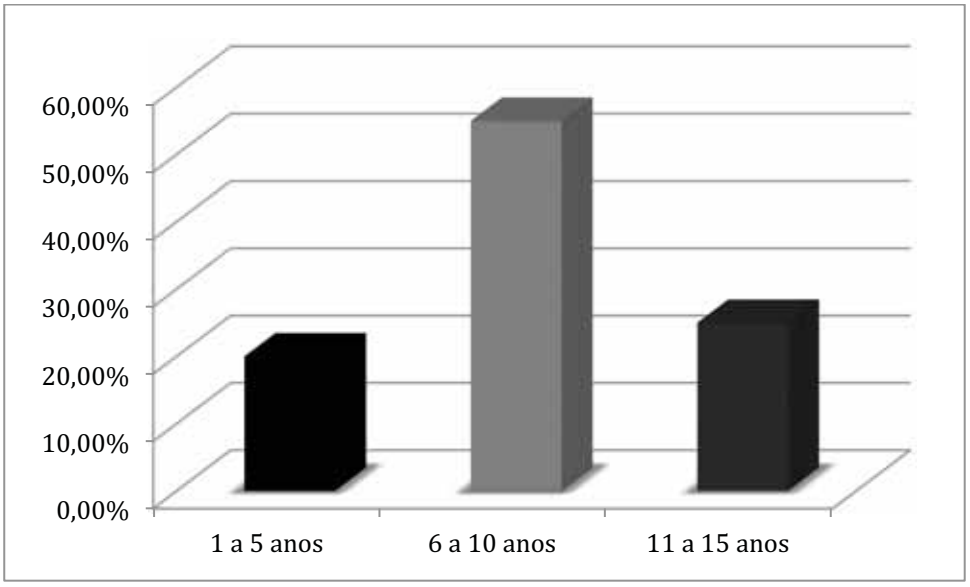


**Figura 2**: Porcentagem das faixas etárias de vinte cães com linfoma. Jaboticabal, 2014.

### 4.4 Peso

Quanto ao peso, a variação ficou entre 7,0 e 54kg (26,5 ± 14,3), o que demonstra a grande variação do porte dos animais incluídos neste estudo. Dezoito pacientes foram classificados nas faixas de 1 a 15 Kg, 16 a 30 Kg e 31 a 45 Kg igualmente, ou seja, seis animais (30%) em cada uma. Os cães de maior porte, com peso variando de 46 e 60Kg representaram 10% dos animais (Figura 3). Assim, nota-se cães de pequeno, médio e grande porte acometidos por linfoma. Entretanto, Coleta (2009) e Moreno et al. (2007) observaram uma prevalência de animais de grande porte.

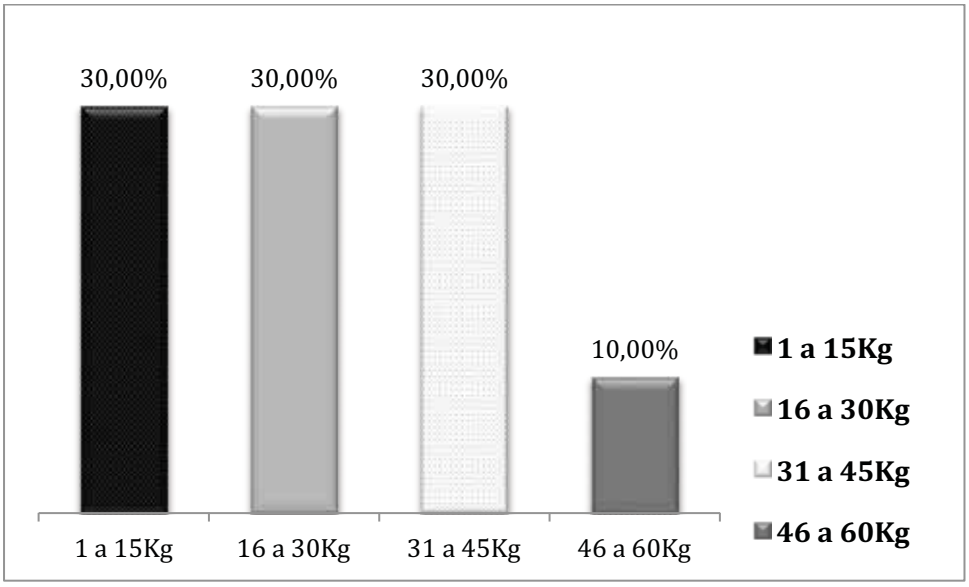


**Figura 3**: Distribuição conforme faixas de peso corpóreo de vinte cães com linfoma. Jaboticabal, 2014.

### 4.5 Estadiamento e sub-estadiamento clínico

Com relação ao estadiamento e sub-estadiamento clínico, descrito pela Organização Mundial da Saúde, baseados respectivamente na infiltração da doença nos órgãos, e na presença ou ausência de sinais clínicos, no presente trabalho apenas um caso enquadrou-se no estadio I (5%) e outro no II (5%), seguidos dos estádios III e V com quatro casos (20%) cada. Dez casos de pacientes (50%), no momento do diagnóstico, foram classificados no estadio IV (Figura 4).

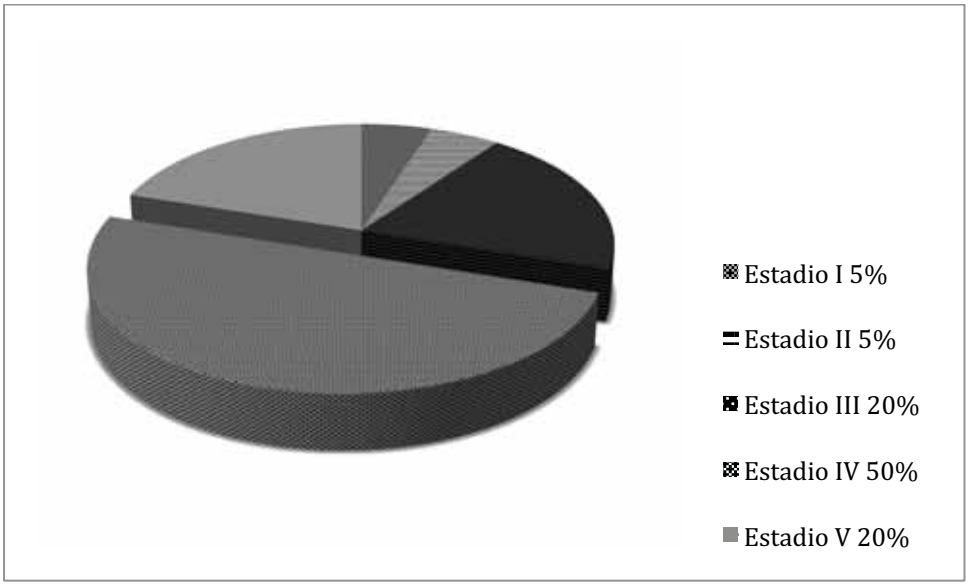


**Figura 4:** Porcentagem dos estadios clínicos em vinte casos de linfoma canino. Jaboticabal, 2014.

A maioria dos animais, 80% (16 animais), apresentavam a doença em sub-estadio a, e apenas quatro pacientes (20%), no momento do diagnóstico, apresentavam sinais clínicos decorrentes do linfoma, ou seja, subestadiamento (Figura 5).

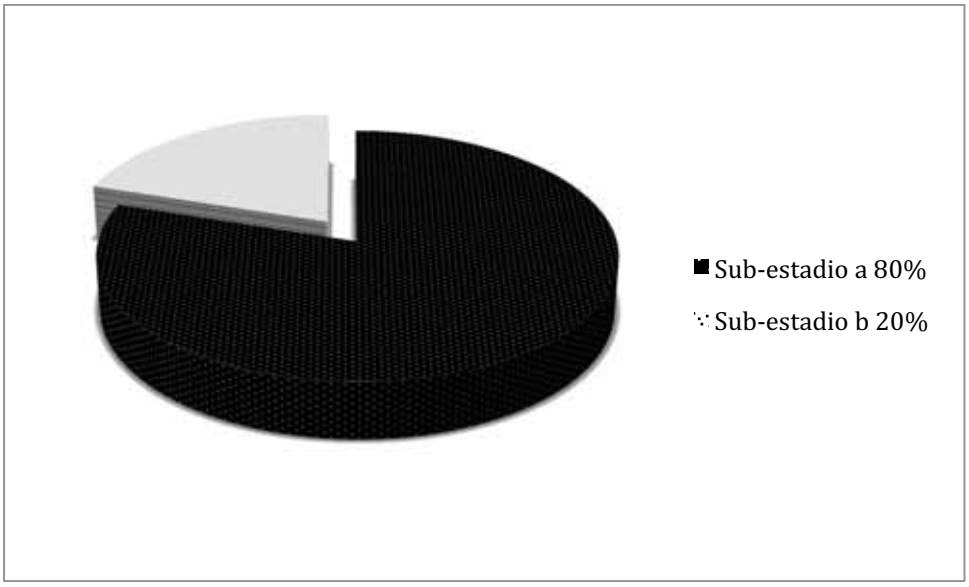


**Figura 5:** Porcentagem dos sub-estadios clínicos em vinte casos de linfoma canino. Jaboticabal, 2014.

Noventa por cento dos casos de linfoma deste estudo foram classificados nos

estadios III, IV ou V, assim como os resultados obtidos por Cardoso et al. (2003). O reduzido número de casos de linfoma em estádio I ou II encontrado neste estudo corrobora com diversos autores (COLETA, 2009; GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994; STARRAK et al., 1997), e pode ser explicado pelo fato de ser muito difícil observar as alterações físicas nos estágios iniciais da doença, e assim, os proprietários procuram tardiamente o tratamento. Entretanto, a maioria dos pacientes incluídos neste estudo não apresentavam sinais clínicos decorrentes do linfoma no momento do diagnóstico, corroborando com os achados de VAIL & YOUNG, 2007 e de HOSOYA et al., 2007), que em um estudo conduzido com 101 cães com linfoma multicêntrico observou que 72,3% deles apresentavam sub-estadio a. Coleta (2009), em um estudo conduzido no interior do estado de São Paulo, constatou que 66,6% dos casos de linfoma eram classificados em sub-estadio b. Uma porcentagem ainda maior de cães (83%) apresentavam sinais clínicos decorrentes do linfoma no momento do diagnóstico em estudo conduzido por Neuwald et al. (2014), no Rio Grande do Sul.

**4.6 Imunofenótipo**

Dentre os vinte casos de linfoma incluídos no presente estudo, 17 (85%) expressaram fenótipo B e, apenas três (15%), fenótipo T (Figura 6). Os achados do presente estudo são similares aos encontrados por Coleta (2009) no Brasil, Ponce et al. (2010) na França, e Arespacochaga et al. (2007) na Áustria. No Brasil, dois estudos mostraram maior ocorrência do imunofenótipo T, com prevalência de 53,5 a 60,2%
(MOURA, 2000; MORENO; BRACARENSE, 2007).

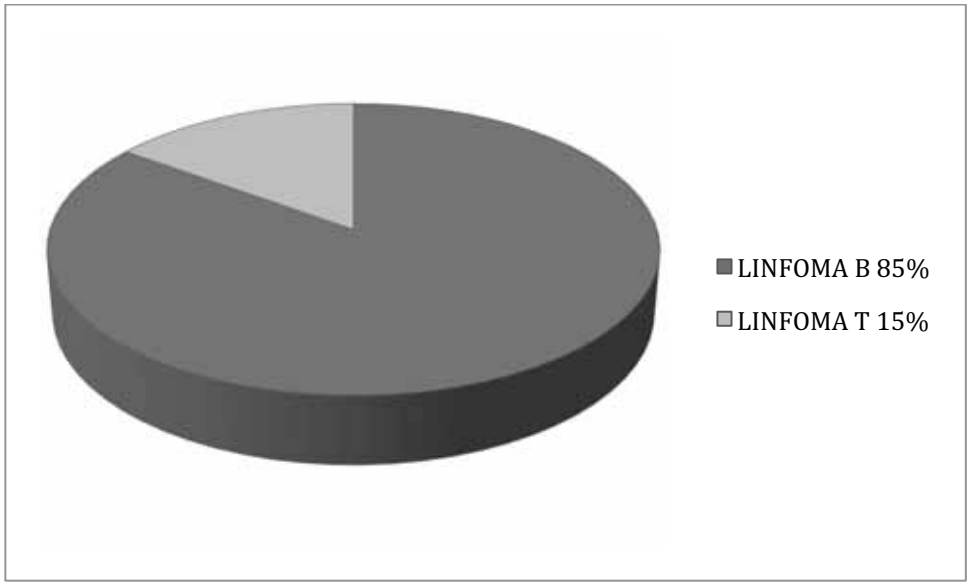


**Figura 6:** Porcentagem de imunofenótipos em vinte casos de linfoma canino. Jaboticabal, 2014.

### 4.7 Classificação histopatológica

Dos vinte casos de linfoma canino incluídos no presente estudo, três foram classificados como linfomas linfoplasmocíticos (16,7%), dois linfoblásticos (11,1%) e um (5,5%) imunoblástico de grandes células (Figura 7).

A maioria dos casos de linfoma do presente estudo (66,7%) foi classificada pelo exame histopatológico como difuso de grandes células. Em um estudo com 40 cães com linfoma, Sueiro (2004) observou porcentagem ainda maior deste tipo histológico, 77,5%.

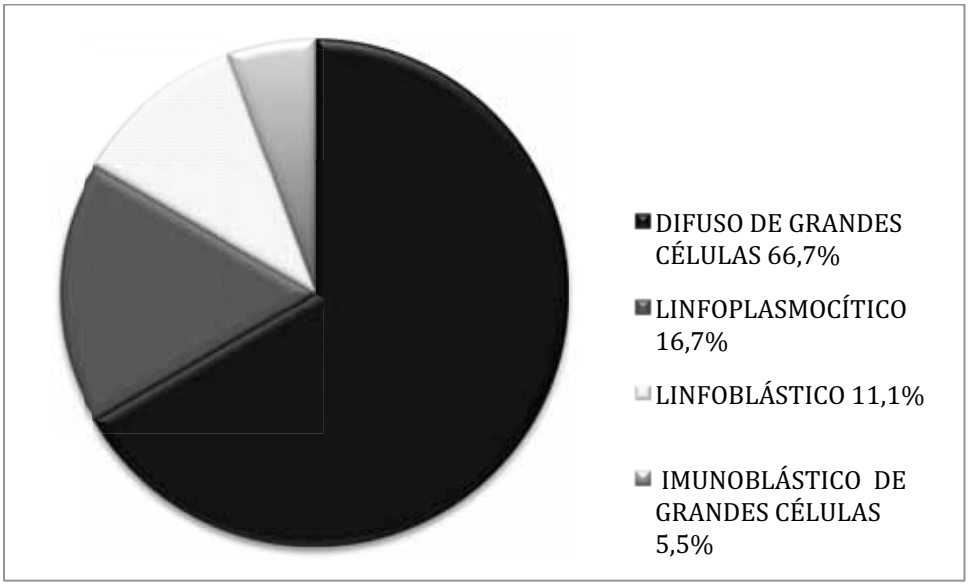


**Figura 7:** Porcentagem de tipos histológicos em vinte casos de linfoma canino. Jaboticabal, 2014.

### 4.8 Sobrevida

O tempo de sobrevida dos cães com linfoma dos grupos 1 e 2, bem como as médias e desvios-padrão, estão dispostos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

**Tabela 4:** Valores individuais, médias e desvios-padrão do tempo de sobrevida de cães com linfoma multicêntrico tratados com o Protocolo de MW do grupo 1 (n=10). Jaboticabal, 2014.

| PARCELA | SOBREVIDA |
|---|---|
| A1 | 27 semanas |
| A2 | 60 semanas |
| A3 | 20 semanas |
| A4 | 06 semanas |
| A5 | 39 semanas |
| A6 | 20 semanas |
| A7 | 91 semanas |
| A8 | 56 semanas |
| A9 | 10 semanas |
| A10 | 46 semanas |
| **MÉDIA** | **37,5 semanas** |
| **DP** | 26,37 |

**Tabela 5:** Valores individuais, médias e desvios-padrão do tempo de sobrevida de cães com linfoma multicêntrico tratados com o Protocolo de MW modificado por um inibidor seletivo de COX-2 do grupo 2 (n=10). Jaboticabal, 2014.

| PARCELA | SOBREVIDA |
|---|---|
| A11 | 1 semana |
| A12 | 78 semanas |
| A13 | 71 semanaa |
| A14 | 11 semanas |
| A15 | 04 semanas |
| A16 | 19 semanas |
| A17 | 35 semanas |
| A18 | 75 semanas |
| A 19 | 21 semanas |
| A 20 | 24 semanas |
| **MÉDIA** | **33,9** |
| **DP** | **29,81** |

Não houve diferença estatística significativa entre o tempo de sobrevida dos pacientes e a taxa de remissão dos sinais após o primeiro ciclo de quimioterapia (T2).

Os animais tratados com o protocolo quimioterápico de MW convencional viveram, em média, por um período mais longo após o diagnóstico de linfoma, do que aqueles tratados com tal protocolo de quimioterapia associado a um inibidor seletivo de COX-2. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos.

### 4.9. Remissão após o primeiro ciclo de quimioterapia

Na quinta semana do protocolo de MW, ou seja, ao final do primeiro ciclo, apenas cinco pacientes (A1, A2, A4, A11 E A15) não apresentavam remissão parcial ou completa dos sinais do linfoma. Não houve diferença estatística significativa na sobrevida dos pacientes com remissão. O paciente A2, apesar de não ter alcançado a remissão dos sinais clínicos em T2, e do imunofenótipo T do linfoma, que tem um prognóstico mais reservado e expectativa de vida mais curta, como relatado por Vail (2000), apresentou sobrevida de mais de um ano, possivelmente decorrente do diagnóstico precoce, com estadiamento na primeira semana de tratamento Ia, não

havendo ainda manifestação clínica da doença. Outro paciente, o A4, com linfoma T, também não apresentou remissão após o primeiro ciclo de quimioterapia, mas já apresentava estadio da doença mais avançado e teve sobrevida bastante curta. Os animais A11 e A15 não chegaram ao final do primeiro ciclo de quimioterapia.

### 4.10 Leucograma

Os valores da contagem global e diferencial de leucócitos, bem como médias e desvio padrão, em animais do grupo controle (Tabela 6) ficaram dentro do intervalo de normalidade para a espécie, baseados nos valores de referência do "Laboratório de Patologia Clínica Veterinária" do "Hospital Veterinário Governador Laudo Natel" (Apêndice 1).

**Tabela 6.** Contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em dez cães hígidos do grupo controle (GC). Jaboticabal, 2014.

| | **Leu** ($x10^3$/uL) | **Bas** (céls/uL) | **Eos** (céls/uL) | **NB** (céls/ uL) | **NS** (céls/ uL) | **Linf** (céls/uL) | **Mon** (céls/uL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **C1** | 16,9 | 0 | 0 | 338 | 9464 | 5577 | 1521 |
| **C2** | 10,6 | 0 | 212 | 530 | 7420 | 1908 | 530 |
| **C3** | 7,2 | 72 | 720 | 144 | 4608 | 1368 | 288 |
| **C4** | 12,9 | 0 | 1806 | 0 | 8901 | 1935 | 258 |
| **C5** | 8,8 | 0 | 176 | 88 | 6248 | 1936 | 652 |
| **C6** | 10,5 | 0 | 105 | 0 | 8190 | 1995 | 210 |
| **C7** | 9,8 | 0 | 98 | 196 | 6860 | 2156 | 490 |
| **C8** | 15,5 | 310 | 1705 | 0 | 9765 | 3565 | 155 |
| **C9** | 9,7 | 0 | 194 | 97 | 7372 | 1843 | 194 |
| **C10** | 8,8 | 0 | 792 | 88 | 5632 | 2024 | 264 |
| **MÉDIA** | 11,07 | 38,2 | 580,8 | 148,1 | 7446 | 2430,7 | 456,2 |
| **DP** | 3,1 | 98,14 | 672,91 | 169,92 | 1674,99 | 1240,74 | 408,7 |

Os valores globais e diferenciais absolutos de leucócitos no momento do diagnóstico (T1) para os cães dos grupos 1 e 2 estão dispostos nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7:** Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 1 (n=10), no momento do diagnóstico (T1). Jaboticabal, 2014.

| | **Leu** ($x10^3$/ uL) | **Bas** (céls/uL) | **Eos** (céls/uL) | **NB** (céls/uL) | **NS** (céls/uL) | **Linf** (céls/uL) | **Mon** (céls/uL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A1** | 25,6** | 0 | 768 | 5120** | 16640** | 2560 | 512 |
| **A2** | 12,2 | 0 | 732 | 610** | 9272 | 1098 | 488 |
| **A3** | 7,9 | 0 | 316 | 158 | 5846 | 1422 | 158<< |
| **A4** | 71,6** | 0 | 716 | 1432** | 10024 | 58712** | 716 |
| **A5** | 35,6** | 0 | 356 | 1424** | 28480** | 4628 | 712 |
| **A6** | 9,6 | 0 | 96<< | 0 | 6912 | 2496 | 96<< |
| **A7** | 9,1 | 0 | 273 | 273 | 7553 | 728 | 273 |
| **A8** | 15 | 0 | 1500 | 150 | 10200 | 2550 | 600 |
| **A9** | 7,1 | 0 | 213 | 71 | 5893 | 568* | 355 |
| **A10** | 9,4 | 0 | 0<< | 376 | 6486 | 2068 | 470 |
| **MÉDIA** | 20,31 | 0 | 497,00 | 961,40 | 10730,60 | 7683,00 | 438,00 |
| **DP** | 20,21 | 0 | 443,96 | 1552,43 | 7014,49 | 17968,72 | 215,27 |

**<< Valor abaixo do limite inferior de refência para a espécie canina**

**** Valor acima do limite superior de referência para a espécie canina**

**Tabela 8:** Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 2 (n=10), no momento do diagnóstico do linfoma (T1). Jaboticabal, 2014.

| | **Leu** ($x10^3$/uL) | **Bas** (céls/uL) | **Eos** (céls/uL) | **NB** (céls/uL) | **NS** (céls/uL) | **Linf** (céls/uL) | **Mon** (céls/uL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A11** | 8,7 | 0 | 174 | 0 | 6960 | 1305 | 261 |
| **A12** | 22,1** | 0 | 0<< | 0 | 19227** | 2210 | 663 |
| **A13** | 7,6 | 0 | 76<< | 0 | 5092 | 2356 | 76<< |
| **A14** | 13 | 0 | 520 | 0 | 9880 | 2080 | 520 |
| **A15** | 88** | 0 | 0<< | 3520** | 74800** | 5280 | 4400** |
| **A16** | 6,7 | 0 | 0<< | 0 | 5896 | 536<< | 268 |
| **A17** | 7,8 | 0 | 156 | 0 | 6006 | 1326 | 312 |
| **A18** | 9,2 | 0 | 552 | 92 | 7544 | 920 | 92<< |
| **A19** | 8,5 | 0 | 0<< | 0 | 7310 | 1105 | 85<< |
| **A20** | 12,9 | 258 | 1290 | 0 | 7353 | 2451 | 1548 |
| **MÉDIA** | 18,45 | 25,8 | 276,80 | 361,20 | 15006,80 | 1956,90 | 822,50 |
| **DP** | 24,85 | 81,58 | 412,77 | 1110,27 | 21395,51 | 1340,34 | 1331,66 |

**<< Valor abaixo do limite inferior de refência para a espécie canina**

**** Valor acima do limite superior de referência para a espécie canina**

As alterações encontradas no leucograma dos pacientes no momento do diagnóstico foram variadas, assim como descrito por Morrison (2005). Cinco animais (25%), apresentaram leucocitose, sendo em quatro casos, consequente à neutrofilia, e em um, por linfocitose. Neuwald et a. (20014) observaram leucocitose em 40% dos casos de linfoma canino no momento do diagnóstico. A leucocitose neutrofílica verificada no presente estudo, e manifestada com ou sem desvio à esquerda regenerativo, provavelmente reflete uma condição inflamatória decorrente do tumor (SCHULTZE, 2000). A neutrofilia pode ocorrer em 25 a 40% dos cães com linfoma (VAIL & YOUNG, 2007) e possui pouco significado clínico (BERGMAN, 2007). O paciente A4 apresentou intensa leucocitose, 71,6x$10^3$/µL, com marcante linfocitose.

Não foi constatada leucopenia no momento do diagnóstico em nenhum dos pacientes. Entretanto, os animais A9 e A16 que apresentaram as mais baixas contagens absolutas de leucócitos em T1, respectivamente 7,1x$10^3$/µL e 6,7 x$10^3$/µL, e, ainda que dentro dos intervalos de normalidade, foram os únicos com linfopenia. Após o primeiro ciclo de quimioterapia (T2), apenas um paciente do grupo 1 (A4), apresentou leucocitose (22,5x$10^3$/µL), como já havia ocorrido no momento de seu diagnóstico (71,6x$10^3$/µL). Entretanto o aumento na contagem absoluta de leucócitos deveu-se, em T2, à neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo (Tabela 9), e não mais à linfocitose. Já no grupo 2, para dois pacientes, A14 e A20, foi constatada leucocitose neutrofílica em T2 (Tabela 10).

Sete paciente, em T2, estavam linfopênicos, sendo três dos grupo 1 e quatro do grupo 2, fato que atesta a acentuada toxicidade dos quimioterápicos no tecido linfóide, tal qual asseverado por Gauthier et al. (2005). Vale ressaltar entretanto, que cães com linfoma antes do tratamento já podem apresentar linfopenia (CARDOSO et al., 2004b; MORRISON, 2005. A literatura é escassa no que diz respeito às causas dessa alteração. Um aspecto que pode estar relacionado a este fato é a diminuição da população linfocitária recirculante, devido ao bloqueio do fluxo linfático secundário à neoplasia (LATIMER, 1997).

**Tabela 9:** Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 1 (n=10), após o primeiro ciclo de quimioterapia do protocolo de MW (T2). Jaboticabal, 2014.

| | **Leu** ($x10^3$/uL) | **Bas** (céls/uL) | **Eos** (céls/uL) | **NB** (céls/uL) | **NS** (céls/uL) | **Linf** (céls/uL) | **Mon** (céls/uL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A1** | 13,4 | 0 | 670 | 670 | 8040 | 3350 | 670 |
| **A2** | 6,2 | 0 | 248 | 62 | 5332 | 310* | 248 |
| **A3** | 17,6 | 0 | 352 | 352 | 11968 | 4048 | 880 |
| **A4** | 22,5** | 0 | 225 | 1125** | 15300** | 4950 | 900 |
| **A5** | 9,6 | 0 | 1344 | 288 | 7296 | 384* | 288 |
| **A6** | 8 | 0 | 80* | 0 | 5360 | 2320 | 240 |
| **A7** | 7,9 | 0 | 316 | 0 | 6715 | 474* | 395 |
| **A8** | 10,5 | 0 | 525 | 0 | 7455 | 2205 | 315 |
| **A9** | 7,4 | 0 | 0* | 0 | 6882 | 370 | 148* |
| **A10** | 9,5 | 0 | 855 | 190 | 7695 | 760 | 0* |
| **MÉDIA** | 11,26 | 0 | 461,50 | 268,70 | 8204,30 | 1917,10 | 408,40 |
| **DP** | 5,16 | 0 | 404,74 | 371,08 | 3100,07 | 1725,16 | 306,34 |

*** Valor abaixo do limite inferior de refência para a espécie canina**

**** Valor acima do limite superior de referência para a espécie canina**

**Tabela 10:** Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos, no sangue periférico em cães com linfoma multicêntrico do grupo 2 (n=10), após o primeiro ciclo de quimioterapia do Protocolo de MW modificado (T2). Jaboticabal, 2014.

| | **Leu** ($x10^3$/uL) | **Bas** (céls/uL) | **Eos** (céls/uL) | **NB** (céls/uL) | **NS** (céls/uL) | **Linf** (céls/uL) | **Mon** (céls/uL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A11** | - | - | - | - | - | - | - |
| **A12** | 16,9 | 0 | 676 | 338 | 13858 | 1521 | 507 |
| **A13** | 5,1 | 0 | 51* | 0 | 4284 | 510* | 255 |
| **A14** | 23,1** | 0 | 462 | 0 | 19866** | 1848 | 924 |
| **A15** | - | 0 | - | - | - | - | - |
| **A16** | 8,9 | 0 | 623 | 267 | 7031 | 712* | 267 |
| **A17** | 10,1 | 0 | 202 | 0 | 9090 | 303* | 505 |
| **A18** | 14,3 | 0 | 429 | 143 | 9438 | 4147 | 143* |
| **A19** | 5,5 | 0 | 55* | 85 | 4675 | 605* | 165* |
| **A20** | 19,3** | 0 | 386 | 0 | 15247** | 3281 | 386 |
| **MÉDIA** | 12,90 | 0 | 360,50 | 104,13 | 10436,13 | 1615,88 | 394,00 |
| **DP** | 6,57 | 0 | 238,55 | 134,41 | 5467,03 | 1415,61 | 255,50 |

*** Valor abaixo do limite inferior de refência para a espécie canina**

**** Valor acima do limite superior de referência para a espécie canina**

Não houve diferença estatística, ao nível de 5%, para a contagem global de leucócitos entre os grupos, e nem para os dois momentos do protocolo experiemental.

Quando avaliou-se a contagem absoluta de leucócitos para os animais que apresentaram remissão dos sinais do linfoma após o primeiro ciclo de quimioterapia, houve redução significativa ($p<0,05$) do número de células em comparação com aqueles que não atingiram a remissão.

### 4.11 ELISA

As concentrações de PGE2 nas amostras-padrão do “kit” comercial de ELISA são, após feitas as diluições indicadas pelo fabricantes, conhecidas e gradativamente decrescentes: o padrão 1 possui 1000 pg/mL, enquanto o padrão 6, apenas 31,3 pg/mL (Tabela 11). Após a realização do teste e da leitura das placas, o resultado da DO para as amostras-padrão é crescente no mesmo sentido, ou seja, quanto mais concentrada a amostra (Padrão 1), menor a coloração resultante das reações na placa, e consequentemente, menor o valor da DO.

**Tabela 11:** Valores da densidade óptica (DO), em duplicata, para amostras-padrão de kit comercial de dosagem de PGE2 pelo método ELISA. Jaboticabal, 2014.

| PADRÃO | CONCENTRAÇÃO DE PGE2 | DO |
|---|---|---|
| 1 | 1000pg/mL | 0,089 |
| 1 | 1000pg/mL | 0,092 |
| 2 | 500 pg/mL | 0,166 |
| 2 | 500 pg/mL | 0,119 |
| 3 | 250 pg/mL | 0,235 |
| 3 | 250pg/mL | 0,233 |
| 4 | 125 pg/mL | 0,356 |
| 4 | 125pg/mL | 0,338 |
| 5 | 62,5 pg/mL | 0,459 |
| 5 | 62,5 pg/mL | 0,422 |
| 6 | 31,3 pg/mL | 0,513 |
| 6 | 31,3 pg/mL | 0,505 |

Os valores da DO resultantes da análise de amostras de plasma sanguíneo de 10 cães hígidos do grupo controleo e de 20 cães com linfoma incluídos neste ensaio estão demonstrados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

**Tabela 12:** Valores da densidade óptica (DO) em amostras de plasma sanguíneo de cães hígidos (n=10) do grupo controle. Jaboticabal, 2014.

| ANIMAL | DO |
|---|---|
| C1 | 0,022 |
| C2 | 0,026 |
| C3 | 0,041 |
| C4 | 0,009 |
| C5 | 0,031 |
| C6 | 0,033 |
| C7 | 0,011 |
| C8 | 0,026 |
| C9 | 0,054 |
| C10 | 0,068 |
| MÉDIA | 0,0321 |
| DP | 0,0182 |

As amostras de plasma sanguíneo de nove pacientes do grupo 1, apresentaram menor DO após o primeiro ciclo de quimioterapia quando comparada com T1. Assim, as concentrações de PGE2 plasmáticas, aumentaram. Para cinco cães do grupo 2 (A13, A17, A18, A19, A20), ou seja, tratados com inibor seletivo de COX-2, as dosagens plasmáticas de PGE2 diminuíram entre os dois momentos.

Houve diferença significativa para valores da DO entre o grupo 2 e o 1, e entre o grupo 2 e o grupo controle ($p<0,05$), entretanto não houve diferença entre o grupo 1 e o grupo controle. Nos diferentes momentos, ou seja, diagnóstico (T1) e após o primeiro ciclo de quimioterapia (T2), não houve diferença significativa dentro dos grupos, mas sim entre os dois grupos tratados.

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) da DO para os cães com e sem remissão dos sinais em T2. Para aqueles com remissão dos sinais, a média da DO foi maior (0,229350) do que a médias para os pacientes sem remissão dos sinais (0,142968) o que implica em concentração de PGE2 menor para o grupo com remissão.

A escassez de dados na literatura com relação à avaliação de PGE2 plasmática por ELISA em cães com linfoma, e o número reduzido de animais incluídos no presente estudo dificultam a interpretaçãoo e discussão dos achados.

**Tabela 13:** Valores da densidade óptica (DO) em amostras de plasma sanguíneo de cães com linfoma (n=20) no momento do diagnóstico (T1) e após o primeiro ciclo de quimioterapia (T2), sobrevida, imunofenótipo e estadio/subestadio do linfoma. Jaboticabal, 2014.

| ANIMAL | DO EM T1 | DO EM T2 | IMUNOFENÓTIPO | ESTADIO/SUBESTADIO | SOBREVIDA (semanas) |
|---|---|---|---|---|---|
| **GT1** | | | | | |
| A1 | 0,132 | 0,038 | B | IIIb | 27 |
| A2 | 0,074 | 0,031 | T | Ia | 60 |
| A3 | 0,043 | 0,035 | B | Va | 20 |
| A4 | 0,035 | 0,009 | T | Va | 6 |
| A5 | 0,04 | 0,032 | B | IVa | 39 |
| A6 | 0,055 | 0,025 | B | Va | 20 |
| A7 | 0,032 | 0,02 | B | IVa | 91 |
| A8 | 0,083 | 0,047 | B | Va | 56 |
| A9 | 0,01 | 0,014 | B | IIIa | 10 |
| A10 | 0,018 | 0,072 | B | IVa | 46 |
| **MÉDIA GT1** | **0,0522** | **0,0323** | **-** | **-** | **37,5** |
| **GT2** | | | | | |
| A11 | 0,137 | - | B | IIIb | 1 |
| A12 | 0,094 | 0,085 | B | IIIa | 78 |
| A13 | 0,238 | 0,246 | B | IVa | 71 |
| A14 | 0,493 | 0,034 | T | IIb | 11 |
| A15 | 0,714 | - | B | IVb | 4 |
| A16 | 0,337 | 0,34 | B | IVa | 19 |
| A17 | 0,461 | 0,556 | B | IVa | 35 |
| A18 | 0,051 | 0,37 | B | IVa | 75 |
| A19 | 0,24 | 0,389 | B | IVa | 21 |
| A20 | 0,39 | 0,422 | B | IVa | 24 |
| **MÉDIA GT2** | **0,3155** | **0,30525** | **-** | **-** | **33,9** |

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este ensaio, cujos grupos de cães com linfoma multicêntrico foram estabelecidos a partir da casuística de um hospital-escola, e que, portanto, foram mantidos durante toda a experimentação em seus domicílios e, considerando as variações com relação à classificação do linfoma, estadios e sub- estadios clínicos, resposta individual ao tratamento, e ainda com base nos resultados obtidos, analisados e devidamente interpretados, conclui-se que:

- cães com linfoma multicêntrico com remissão dos sinais clínicos após o primeiro ciclo de quimioterapia, apresentam menores concentrações de PGE2 plasmática quando comparados com aqueles sem remissão.

- 80% dos cães submetidos ao tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin convencional apresentaram, após o primeiro ciclo de tratamenento, aumento da concentração plasmática de PGE2.

- 50% dos cães tratados com o protocolo de Madison-Wisconsin modificado – substituição da prednisona por um inibidor seletivo de COX-2 - apresentaram, após o primeiro ciclo de tratamenento, redução da PGE2 plasmática.

- ainda são incertos os benefícios terapêuticos dos inibidores seletivos de COX-2 em cães com linfoma

- não foi confirmado o papel da PGE2 plasmática como marcador de prognóstico e de tempo de sobrevida para cães com linfoma multicêntrico, entretanto, os pequenos avanços alcançados, no que tange o uso de inibidores de COX-2, abrem portas para novas investigações no tratamento antitumoral em Medicina Veterinária. Estudos *in vitro* e *in vivo* ainda são necessários para determinar o quanto a inibição da COX-2 pode auxiliar no tratamento de neoplasias de cães e gatos, e a possbilidade destes medicamentos inibirem e prevenirem as neoplasias destas espécies

- técnicas mais específicas são necessárias para comprovar se há superexpressão de COX-2, e consequentemente, aumento da PGE2 no linfoma canino, tendo em vista as dificuldades de padronização, por tratar-se de uma neoplasia que se manisfesta sob diferentes formas clínicas e tecidos, o que dificulta o emprego de técnicas consagradas como a imunoistoquímica.

## 6. REFERÊNCIAS

BARGER, A. M.; GRINDEM, C. B. Hematologic abnormalities associated with cancer therapy. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Canada: Lippincott Williams ε Wilkins, 2000, p.676-681.

CAMACHO, M.; LEON, X.; FERNANDEZ-FIGUERAS, M, T.; QUER, M.; VILA, L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, n. 30, v. 9, p. 1175-1181, 2008.

CÁPUA, M. L. B.; **Tratamento do linfoma canino com poliquimioterapia seguida ou não de transplante autólogo de medula óssea"** 2009. 111 f. Tese (Dotoutorado em Medicina Veterinária – Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

CÁPUA, M. L. B.; COLETA, F. E.; CANESIN, A. P. M. N.; GODOY, A.V.; CALAZANS, S. G.; MIOTTO, M. R.; DALECK, C. R.; SANTANA, A. E. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.7, 2011.

CARDOSO, M. J. L.; MACHADO, L. H. A; ROCHA, N. S.; MOUTINHO, F. Q.; CIAMPOLINI, P. A. Linfoma canino: revisão de cinqüenta e quatro casos. **Bioscience Journal**, v.19, n.13, p131-142, 2003.

CARTER, R. F.; VALLI, V. E. Advances in the cytologic diagnosis of canine lymphoma. **Seminars in Veterinary Medicine Surgery (Small Animal)**, v.3, n.2, p.167-175, 1988.

CASTELLONE, M. D.; TERAMOTO, H.; WILLIAMS, B. O.; DRUEY, K. M.; GUTKIND, J. S. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. **Science**, v.2, n. 310, p.1504-1510, 2005.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. COX-3, a cyclooxygensase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Academic Science**, v. 99, p.13926-13931, 2002.

CHEN, E. P.; SMYTH, E. M. COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 96, p. 14-20, 2011.

CHUN, J. K.; FAN, T. M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p.285-294, 2000.

CHUN. R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 157-162, 2009.

COLETA, F. E. **Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma**. 2009. 131 f. Tese (Dotoutorado em Medicina Veterinária – Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

CORREIA, J. J. **Contribuição para o estudo do linfoma maligno no cão**. 325 f. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2006

COUTO, C. G.; HAMMER, A. S. Afecções dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária.** São Paulo: Manole, 1997. cap.144, p.2667-2689.

COUTO, C. G. Oncologia: princípios de tratamento do câncer. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 78, p. 864-869.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 561-569, 1994.

DAY, M. J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. **Journal Comparative Pathology**, v.112, p.79-96, 1995.

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

DILLON, A. B.; SPANO, J. S.; POWERS, H. D. Prednisolone induced hematologic, biochemical, and histologic changes in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.16, p.831-837, 1980.

DOBSON, J. M., GORMAN, N. T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response to two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 1993.

DORSAM, R. T.; GUTKIND, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. National Rev Cancer, n. 7, v. 2, p. 79-94, 2007.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB Journal.** v. 12, p. 1063-1073, 1998.

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

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

FRÁGUAS, M. S. **Estudo de casos de linfoma canino, ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006, junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV-UNESP-Jaboticabal.** 2008. 64 f. Monografia (Trabalho de Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.

FRAZIER, D. L.; HAHN, K. A. Commonly used drugs. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer Chemotherapy - A Veterinary Handbook**. Malvern: Williams & Wilkins, 1995. p. 79-149.

FULTON, A. M.; MA, X.; KUNDU, N. Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. **Cancer Research**. v.15, n.66(20), p. 9794-9797, 2006.

GALLO, O.; MASINI, E.; BIANCHI, B.; BRUSCHINI, L.; PAGLIERANI, M.; FRANCHI, A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Human Pathology**. v. 33, n. 7, p. 708-714, 2002.

GREENHOUGH, A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 377-386, 2009.

GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A. K.; CALVANO, S. E.; MATUS, R. E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A. L.; LIEBERMAN, P. H. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, Philadephia, v.66, p.480-490, 1990.

HOSHIKAWA, H.; GOTO, R.; MORI. T.; MITANI, T.; MORI, N. Expression of prostaglandin E2 receptors in oral squamous cell carcinomas and growth inhibitory effects of an EP3 selective antagonist, ONO-AE3-240. **Internal Journal Oncology**, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2009.

HOSOYA, K.; KISSEBERTH, W. C.; LORD, L. K.; ALVAREZ, F. J.; LARA-GARCIA, A.; KOSAREK, C. E.; LONDON, C. A.; COUTO, C. G. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 1355-63, 2007.

ITO, D.; FRANTZ, A. M.; MODIANO, J. F. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.159, n.3-4, p. 192-201, 2014.

JONES, C. J.; BUDSBERG, S. C. Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 217, n. 5, p. 721-729, 2000.

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

KANAOKA, S.; TAKAI, T.; YOSHIDA, K. Cyclooxygenase-2 and tumor biology. **Advances in Clinical Chemistry**, Farmington, v. 43, p. 59-78, 2007.

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

KISSEBERTH, W.C.; MACEWEN, E.G. Complications of cancer and its treatment. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**, 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996, cap. 13, p.129-146.

KOCHEVAR D. T.; MEALEY K. Principles of cancer chemotherapy. **Veterinary Medicine**, p. 339-349, April. 1997.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutat Research**. v. 659, supl. 1-2, p.15-30, 2008.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Rocca, 2004. cap. 4, p. 53-78.

LEE, S. Y. et al. The Immune Tolerance of Cancer in Mediated by IDO That is Inhibited by COX-2 Inhibitors Through Regulatory T Cells. **J. Immunither**, v. 32, n. 1, p. 22-28, 2009.

LEV-ARI, S.; KAZANOV, D.; LEBERMAN, E.; BEN-YOSEF, R.; ARBER, N. Down-regulation of PGE2 by phusiologic levels of celecoxibe is not sufficient to induce apopstosis or inhibit cell proliferation in human colon carcinoma cell lines. Dig Dis Science, n. 52, v.4, p. 1128-1133, 2007

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology,** 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. cap. 28 B, p. 451-479, 1996.

MADEWELL, B. R.; FELDMAN, B. F. Characterization of anemias with neoplasia in small animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.176, n.5, p.419-425, 1980.

MATSUOKA, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **Scientific World Journal**. 7:1329-47, 2007.

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

MOHAN, S.; EPSTEIN, J. B. Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibiton in upper aerodigestive tract cancer. **Oral cancer**, n. 39, v. 6, p. 537-546, 2003.

MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v.44, p. 46-42, 2007.

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

MORRISON, W. B. Lymphoma in dogs and cats. Texas: Teton New Media, 2005. MOULTON, J. E. & HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press. p. 231, 1990.

MUTSAERS, A. J.; GLICKMAN, N. W.; DENICOLA, D. B.; WIDMER, W. R.; BONNEY, P. L.; HAHN, K. A.; KNAPP, D. W. Evaluation of treatment with doxorubicin and piroxicam or doxorubicin alone for multicentric lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.108, n. 12, p. 1813-1817, 2002.

MYERS, N.C.; MOORE, A.S.; RAND, W.M.; GLIATTO, J.; COTTER, S.M. Evaluation of multidrug protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n.6, p. 333-339, November/December, 1997.

NATARAJ, C.; THOMAS, D. W.; TILLEY, S. L.; NGUYEN, M. T.; MANNON, R.; KOLLER, B. H.; COFFMAN, T. M. Receptors for prostaglandin $E_2$ that regulate cellular immune responses in the mouse. **Journal of Clinical Investigation,** v. 108, p. 1229-1235, 2001.

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

NEUWALD, E. B.; TEIXIERA, L. V.; CONRADO, F. O.; SILVA, M.O.D.; HLAVAC, N. R. C.; GONZÁLEZ, F. H. D. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, p. 349-354, 2014.

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

RALLIS, T., KOUTINAS, A., LEKKAS, S. et al. Lymphoma in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, p.590-596, 1992.

RAPPAPORT, H. Tumours hematopoietic system. In: Atlas of tumour pathology. Washington: Saunders, 1966, p. 97-98.

RASKIN, R. E. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**, trad. FAGLIARI, J.J. Sao Paulo: Rocca, p.79-112, 2003.

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

RODASK, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia Antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008.

ROSENTHAL, C. R.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, United States, v. 196, n. 5, p. 774-781, 1990.

RUBIN, E. The blood and the lymphoid organs. In: RUBIN, E. & FARBER, J.L. **Pathology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1994. cap. 20.

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

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition, **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 387-437, 2004.

STOCKHAM, S.L.; KEETON, K.S.; SZLADOVITS, B. Clinical assessment of leukocitosis: distinguishing leukocytoses caused by inflammatory, glucocorticoide, physiologic, and leukemic disorders or conductions. **The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, v.33, p.1335-1357, 2003.

SUEIRO, F. A. R. **Linfomas caninos: estudo morfológico e imunoistoquímico de 55 casos e correlação da imunoexpressão da proteina P53.** 2004. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SUEIRO, F. A.; ALESSI, A. C.; VASSALLO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.131, p. 207-213, 2004.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkins lymphoma. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v. 6, p. 59-71, 1994.

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

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

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

VANE, J. R. Purity and stability oh synthetic peptides such as angiotensis and kinins. **Nature**, v. 9, p. 230.

VANG, T. Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein Kinase A inhibits T cell receptor signaling. **Journal of Biological Chemestry**. v. 278, p. 17597-17600, 2003.

VAN PELT, R.W., CONNOR, G.H. Clinicopathologic survey of malignant lymphoma in the dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.152, p.976-989, 1968.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. **GUT**, v. 55, p.115-122, 2006.

YU L.; WU, W. K. K.; LI, Z. J.; WONG, H. P. S.; TAI, E. K. K.; LI, H. T.; WU, Y. C.; CHO, C. H. E series of prostaglandin receptor 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1 signaling is required for the mitogenic action of prostaglandin E2 in esophageal squamous-cell carcinoma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therap**eutics, v. 327, n.1, p. 258- 267, 2008.

# APÊNDICES

**Apêndice 1 -** Valores de referência para leucométricos de cães, utilizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinária "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal.

| **PARÂMETRO** ($x10^3$/uL) | **VALOR** |
|---|---|
| **Leucócitos** | **6 - 18** |
| **Basófilos** | **0** |
| **Eosinófilos** | **0,12 – 1,8** |
| **Neutrófilos Bastonetes** | **0 – 0,5** |
| **Neutrófilos Segmentados** | **3,6- 13,8** |
| **Linfócitos** | **0,72 – 5,4** |
| **Monócitos** | **0,18 - 1,8** |

**Apêndice 2 –** Dados dos animais dos grupos 1 e 2.

| PARCELA | IDADE (ANOS) | RAÇA | SEXO | PESO (Kg) | HISTOPATOLÓGICO | IMUNO HISTOQUÍMICA | ESTADIO/SUBE STADIO | SOBREVIDA (semanas) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **GT1** | | | | | | | | |
| A1 | 5 | ROTTWEILER | MACHO | 42 | GRANDES CÉLULAS IMUNOBÁSTICO | B | IIIb | 27 |
| A2 | 8 | DOGUE ALEMÃO | FÊMEA | 40,8 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | T | Ia | 60 |
| A3 | 5 | ROTTWELER | FÊMEA | 51 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | Va | 20 |
| A4 | 8 | LHASA APSO | MACHO | 7,3 | LINFOPLASMOCÍTICO | T | Va | 06 |
| A5 | 6 | ROTTWEILER | MACHO | 37 | LINFOBLÁSTICO | B | IVa | 39 |
| A6 | 8 | BULL TERRIER | FÊMEA | 32,8 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | Va | 20 |
| A7 | 7 | SRD | MACHO | 13,8 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IVa | 91 |
| A8 | 4 | ROTTWEILER | FÊMEA | 40 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | Va | 56 |
| A9 | 4 | LABRADOR | MACHO | 30 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IIIa | 10 |
| A10 | 9 | SRD | FÊMEA | 33,5 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IVa | 46 |
| MÉDIA GT1 | 6,4 | - | - | 32,82 | - | - | | 37,5 |
| **GT2** | | | | | | | | |
| A11 | 6 | SRD | MACHO | 9,8 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IIIb | 01 |
| A12 | 13 | SRD | FÊMEA | 7 | DIFUSO LINFOPLASMOCÍTICO | B | IIIa | 78 |
| A13 | 11 | PIT BULL | FÊMEA | 24 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IVa | 71 |
| A14 | 11 | POODLE | FÊMEA | 12,3 | LINFOBLASTICO X DE ZONA T | T | IIb | 11 |
| A15 | 13 | TECKEL | MACHO | 9,5 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IVb | 04 |
| A16 | 6 | BASSET | FÊMEA | 27,7 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IVa | 19 |
| A17 | 9 | SRD | MACHO | 22,2 | LINFOPLASMOCÍTICO DIFUSO | B | IVa | 35 |
| A18 | 8 | ROTTWEILER | FÊMEA | 54 | DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS | B | IVa | 75 |
| A19 | 10 | BOXER | FÊMEA | 23 | LINFOPLASMOCÍTICO | B | IVa | 21 |
| A20 | 11 | FOX PAULISTINHA | MACHO | 12 | LINFOBLÁSTICO DE GRANDES CÉLULAS | B | IVa | 24 |
| MÉDIA GT2 | 9,8 | - | - | 20,15 | - | - | - | 33,9 |