TATIANA LILIANE ROSSI PAVAN

**Concentrações séricas das citocinas Interleucina-2 (IL-2),
Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose
Tumoral Alfa (TNF- α) e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1
em cães com linfoma multicêntrico**

São Paulo
2016

TATIANA LILIANE ROSSI PAVAN

Concentrações séricas das citocinas Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1) em cães com linfoma multicêntrico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3298
FMVZ

Pavan, Tatiana Liliane Rossi

Concentrações séricas das citocinas Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1) em cães com linfoma multicêntrico. / Tatiana Liliane Rossi Pavan. -- 2016.
89 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas.

1. Linfoma multicêntrico. 2. Citocinas. 3. Interleucina. 4. Inflamação. 5. Cão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Concentrações séricas das citocinas Interleucina-2, Interleucina-6, Interleucina-10, Fator de Necrose Tumoral- α e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 em cães com linfoma multicêntrico", protocolado sob o nº 2755/2012, utilizando 40 (quarenta) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research "Serum concentrations of Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-alpha and Monocyte chemotactic Protein-1 in dogs with multicentric lymphoma", protocol number 2755/2012, utilizing 40 (forty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

São Paulo, 20 de setembro de 2012.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PAVAN, Tatiana Liliane Rossi Pavan

Título: Concentrações séricas das citocinas Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1) em cães com linfoma multicêntrico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, que estiveram incondicionalmente ao meu lado nos momentos mais difíceis dos últimos anos, me deram a mão, me seguraram - literalmente - e mostraram o significado e valor do amor familiar.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora prof. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas, por ter me orientado não uma, mas três vezes. Pelos votos de confiança, paciência, pelos ensinamentos, pelo cuidado, carinho e preocupação com que tratou os assuntos da pós-graduação, possibilitando meu retorno e finalmente, a conclusão desse trabalho;

Ao Valter de Medeiros Winkel, por quem tenho eterna gratidão, por ter sido meu colega de pós-graduação e hoje, ter se tornado um grande amigo. Pela fundamental e imprescindível colaboração no estudo, pelo constante auxílio no acompanhamento dos casos, por ter dado continuidade às coletas na minha ausência, pela oportunidade da convivência, sem o qual esse trabalho não teria sido concluído. Pelo carinho com que faz as coisas pelo próximo, pela forma como sempre me ajudou e esteve ao meu lado. Por ter sido um amigo leal, parceiro e fiel escudeiro.

À professora Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, profissional por quem tenho profunda admiração, por ser sempre tão colaborativa, solícita e tão generosa;

Ao Lucas Campos de Sá Rodrigues, colega de pós-graduação e grande amigo, pelos momentos de companheirismo e amizade e, principalmente, pelos ensinamentos, paciência e disposição constante em prestar auxílio nos momentos críticos;

À Eliana Pereira Stagliorio pela grande amizade, lealdade, por ter ficado ao meu lado no momento mais delicado e por ter tratado minha família com tanto carinho e paciência;

Às amigas Renata Farinelli, Juliana Junqueira e Rebeca Weigel por me fazerem descobrir verdadeiras amizades nos momentos mais tempestuosos. Obrigada pela ajuda com a dissertação, por se fazerem tão presentes;

À tão querida e grande amiga, conselheira de todas as horas, Ludmila Moroz Rodrigues, alguém muito especial, quem a pós-graduação trouxe para a minha vida e que só viria a somar. De uma luz, bondade e gentileza que sorte de quem tem o privilégio de tê-la por perto. Minha eterna gratidão por ter sido tão disponível no auxílio para a execução desse trabalho, por ter estado tão presente nos períodos mais difíceis e por ter a presença marcante que mesmo na sua ausência, deixa em todo lugar um pouco da beleza com que você vê a vida. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pelas noites mal dormidas para me ajudar e obrigada por se fazer tão presente mesmo a tantos quilômetros de distância. Obrigada pelos muitos risos, pelos 'bom dia' efusivos e por ser tão colorida;

À Luciana Sartori e Ricardo Cabral pela profunda amizade, companheirismo, respeito, obrigada por aceitarem nossas diferenças, pelos muitos momentos de descontração e de tanta alegria, mas obrigada principalmente, pela leal amizade e disponibilidade de estarem sempre ao meu lado em quaisquer momentos. Vocês representam o círculo de amigos que quero ter pra vida;

Ao meu irmão Marcel, em quem confio apoio incondicional e com tantas diferenças, compartilhamos uma vida de experiências;

À minha irmã Karim, por ter me proporcionado conhecer um pouquinho do amor materno com o nascimento do Murilo e Thomás, por quem tenho um amor, que de tão forte, só pode ser como o de mãe;

À minha avó Maria Contesini Rossi (*in memorian*), por ter deixado a lição ambivalente da força e delicadeza, que ela exercia com tanta suavidade e inteligência, com quem muito aprendemos, de quem nunca deixaremos se sentir saudade;

Aos meus pais, José Roberto e Mary, a quem me faltam palavras de agradecimento por todos esses anos de compreensão. Fica aqui meu muitíssimo obrigado por serem meu alicerce, pelo apoio nos momentos mais difíceis, por terem se posicionado sempre de forma a respeitar minhas decisões, por terem me

proporcionado a vida que tive e por mostrarem que para ser uma família feliz, não é necessário ser perfeita. Basta ser unida.

À técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP, Sueli Akemi Taniwaki, pela importante contribuição na fase de padronização da técnica de PCR, pela paciência, ensinamentos e disposição em ajudar. À técnica Sheila Oliveira de Souza Silva, pelo auxílio e convívio no laboratório;

À Samantha Ive Miyashiro, pela amizade, paciência, ensinamentos e colaboração na execução das provas laboratoriais deste projeto;

À Jéssica Soares Garcia e à Ana Luiza Nairismagi Alves, pelo auxílio no atendimento dos casos;

Aos professores Archivaldo Reche Jr, Carlos Eduardo Larsson, Márcia Mery Kogika, Denise Saretta Schwartz, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Maria Helena Matiko Akao Laarson, Wilson Roberto Fernandes, Maria Cláudia Araripe Sucupira e Fernando José Benesi, pelos ensinamentos e exemplos como profissionais;

À Evadne Azeredo Will, minha profunda gratidão pela correção técnica desta dissertação e imprescindível colaboração da normalização, pela frequente disponibilidade, compreensão, cuidado, tranquilidade e carinho com que me auxiliou;

Às funcionárias do serviço de hematologia Maria Luisa Franchini e Maria Helena da Silva Pelissari, pela amizade, companheirismo, conversas e por terem agilizado todos os resultados de exames que precisávamos;

Às funcionárias do setor de Laboratório Clínico, Marly Elisabete Ferreira de Castro, Cláudia, Clara Satsuki Mori e Creide Donizete da Costa, pela disposição em agilizar a rotina;

À médica veterinária e grande amiga Luciane Maria Kanayama, por ajudar nos encaixes dos ultrassons, pelo companheirismo, confiança e profunda amizade e carinho;

À médica veterinária Silvana Unruh pelos encaixes dos exames radiográficos;

Aos enfermeiros Antônio Carlos Malaquias, Gilberto Pereira da Cruz , Carlito dos Santos Belau e Milton Gregório dos Santos, pelas coletas dos exames e auxílio na aplicação dos quimioterápicos;

Às médicas veterinárias do HOVET, Bruna Maria Pereira Coelho, Khadine Kazue Kanayama, Paula Romy Gonçalves Monteiro, Vera Assunta Batisttini Fortunato Wirthl e Denise Maria Nunes Simões, pelo constante auxílio na triagem dos casos e assistência ao tratamento dos pacientes; Obrigada pelo carinho, amizade e tantos ensinamentos;

Às secretárias da graduação e pós-graduação Carolina, Aparecida Freitas, Silvana Rossi Guedes e Adelaide Borges;

Aos animais que fizeram parte deste experimento, de quem me lembro um a um, de suas características e peculiaridades. Aos seus tutores, pela confiança, por depositar em nosso trabalho a esperança da cura ou o alívio da dor;

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram na conclusão desta dissertação.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

PAVAN, T. L. R. **Concentrações séricas das citocinas Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1) em cães com linfoma multicêntrico.** [Serum concentrations of Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-alpha and Monocyte chemotactic Protein-1 in dogs with multicentric lymphoma]. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Linfomas representam um grupo de neoplasias que tem em comum a origem em células linforreticulares, manifestando-se geralmente em tecidos linfóides. Em sua evolução há uma reação generalizada contra as alterações sistêmicas que comprometem a homeostase, conhecida como resposta de fase aguda. Citocinas são proteínas relacionadas à imunidade inata e adquirida que medeiam diversas funções e estão envolvidas na resposta inflamatória e são produzidas em resposta a vários estímulos. Foram objetivos desse estudo, verificar se existem diferenças no perfil das citocinas interleucina-2, interleucina-6, interleucina-10, MCP-1 e TNF-alfa nos animais com linfoma multicêntrico ao diagnóstico, quando comparados a um grupo controle e verificar se existe diferença entre os níveis apresentados no momento do diagnóstico e na 6ª semana, momento em que se avalia a remissão. Os grupos do estudo foram constituídos por 20 cães com linfoma (experimental) e 19 cães clinicamente normais (controle) sendo excluídos do estudo cães que apresentavam tratamento prévio e/ou doença concomitante. A quantificação das variáveis estudadas foi realizada utilizando-se kit comercial CCYTOMAG 90K (Milliplex®), sendo as mesmas determinadas no grupo controle uma única vez e no grupo experimental, quando do diagnóstico e na 6ª semana de tratamento. A análise estatística foi realizada através de teste não paramétrico de Mann-Whitney não pareado para o grupo controle e diagnóstico, bem como o diagnóstico e a 6ª semana de tratamento, enquanto que a análise de variância simples (ANOVA) não paramétrico Kruskal-Wallis foi aplicada na comparação dos três grupos (controle, ato do diagnóstico e 6ª semana de tratamento) para todas as citocinas. Foi observada diferença significativa nos níveis de IL-10 entre o grupo controle e o experimental ao diagnóstico ($p= 0,0033$). Os valores do grupo linfoma ao diagnóstico foram elevados em relação ao controle, sem diferença significativa entre os momentos do diagnóstico e 6ª semana. As IL-2 e IL-6 mostraram diferenças significantes entre o

grupo controle e o grupo linfoma ao diagnóstico ($p= 0,0037$ e $p=0,0017$, respectivamente), mas os valores do controle apresentaram-se elevados em relação ao momento do diagnóstico e não houve diferença entre o diagnóstico e 6ª semana. As citocinas TNF- α e MCP-1 não apresentaram diferença significativa. Concluiu-se que os animais com linfoma no diagnóstico apresentaram níveis séricos mais elevados de IL-10, quando comparados ao diagnóstico e ao grupo controle e seus níveis mantiveram-se elevados na 6ª semana de tratamento. As concentrações de IL-2 e IL-6 estiveram mais elevadas no grupo controle quando comparadas aos animais do grupo experimental e as concentrações de TNF- α e de MCP-1 não apresentaram diferença significativa.

Palavras-chave: Linfoma multicêntrico. Citocinas. Interleucina. Inflamação. Cão.

ABSTRACT

PAVAN, T. L. R. **Serum concentrations of Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-alpha and Monocyte chemotactic Protein-1 in dogs with multicentric lymphoma.** [Concentrações séricas das citocinas Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1) em cães com linfoma multicêntrico]. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Lymphomas belongs to a group of malignancies that have in common the origin in lymphoreticular cells, and is generally manifested in lymphoid tissues. In its evolution there is a generalized reaction against the systemic changes that compromise the homeostasis, known as acute phase response. Cytokines are proteins related to innate and acquired immunity which mediate several functions and are involved in inflammatory response and produced in response to several stimulant. This study was designed to verify if there are differences in the profile of cytokines interleukin-2, interleukin-6, interleukin-10, MCP-1 and TNF-alpha in dogs with multicentric lymphoma when compared to a control group and see if there is difference between the levels at the time of diagnosis and at the 6th week, when remission is achieve. The study group consisted of 20 dogs with lymphoma (experimental) and 19 clinically healthy dogs (control). We excluded patients who had previous treatments and/ or concomitant disease. For measurements of cytokines we use a commercial kits CCYTOMAG 90K (Milliplex®), the same being determined in the control group only once and in the experimental group at diagnosis and at 6 week of treatment. Statistical analysis was performed using nonparametric Mann-Whitney unpaired test for the control group and diagnosis, and the diagnosis and 6 week of treatment, while the simple analysis of variance (ANOVA) nonparametric Kruskal-Wallis test was applied when comparing the three groups (control, diagnosis and act 6th week of treatment) for all cytokines. There was a significant difference in IL-10 levels between the control group and the experimental diagnosis ($p = 0.0033$). The values of the lymphoma group at diagnosis were higher than the control, without significant difference between the time of diagnosis and 6th week. IL-2 and IL-6 showed significant differences between the control and lymphoma groups at diagnosis ($p = 0.0037$ and $p = 0.0017$, respectively), but the control had higher levels than the

lymphoma group and there was no difference between diagnosis and 6th week. The TNF- α and MCP-1 cytokines showed no significant difference. It was concluded that animals with lymphoma had higher serum levels of IL-10 when compared to control and their levels remained high at 6 weeks of treatment. IL-2 and IL-6 concentrations were higher in the control group compared to lymphoma group and the concentrations of TNF- α and MCP-1 were not significantly different.

Keywords: Multicentric Lymphoma. Cytokines. Interleukin. Inflammation. Dog.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	CITOCINAS	23
1.1.1	Propriedades gerais das citocinas.....	24
1.1.2	Categorias funcionais das citocinas.....	25
1.1.3	Interleucina-2 (IL-2).....	27
1.1.4	Interleucina-6 (IL-6).....	28
1.1.5	Interleucina-10 (IL-10).....	30
1.1.6	Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)	31
1.1.7	MCP-1	33
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	GRUPOS DE ESTUDO	36
3.1.1	Grupo Controle	36
3.1.2	Grupo Experimental	36
3.3	FREQUENCIA DE COLETAS ESPECÍFICAS E DESENHO DO ESTUDO.....	37
3.3	DIAGNÓSTICO DO LINFOMA MULTICÊNTRICO	38
3.4	ESTADIAMENTO	39
3.5	TRATAMENTO E SEGUIMENTO.....	40
3.6	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO	42
3.7	EXAMES COMPLEMENTARES.....	43
3.7.1	Hemograma	43
3.7.2	Provas Bioquímicas	43
3.8	TESTES PARA QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS	44

3.8.1	Metodologia de ensaio	45
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS	47
5.1	GRUPO CONTROLE.....	47
5.2	GRUPO EXPERIMENTAL	49
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	70
7.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

Linfomas, também conhecidos pelos sinônimos Linfossarcoma ou Linfoma maligno, representam um grupo de neoplasias que tem em comum a origem em células linforreticulares, manifestando-se geralmente em tecidos linfóides, a exemplo dos linfonodos, baço, fígado e medula óssea, entretanto, podem ocorrer em quase todos os tecidos do organismo. Embora a incidência anual seja difícil de prever devido a ausência de registros nacionais de tumores caninos, a experiência no atendimento clínico deixa clara a alta ocorrência dos linfomas entre as neoplasias que acometem o cão. De acordo com a bibliografia norte-americana, os linfomas compreendem 7 a 24% dos tumores caninos e 83% dentre as neoplasias hematopoiéticas (VAIL et al., 2013).

A etiologia é multifatorial e o desenvolvimento da neoplasia ocorre a partir de expansões clonais de células linfóides com distintas características morfológicas e imunofenotípicas (SUZANO, 2010). Recentes avanços em citogenética molecular, incluindo técnicas de microarranjos, têm sido aplicadas para investigação de alterações cromossômicas em cães com linfoma. A hipótese de envolvimento das retrovírus na patogenia do linfoma canino, a exemplo do que ocorre em outras espécies, também tem sido investigada e, embora não tenham sido confirmados, fatores ambientais, como herbicidas, pesticidas e exposição a campos magnéticos também têm sido relacionados ao processo (VAIL et al., 2013). Já foi sugerido um componente hereditário em alguns casos na espécie canina. Segundo Fournel-Fleury et al. (1997), como companheiro próximo do homem, os caninos estão sujeitos às mesmas influências do meio ambiente e o linfoma humano pode ser um modelo útil para a busca da etiologia provável para essa enfermidade.

Ao longo dos anos, vários sistemas têm sido utilizados na classificação do linfoma não-Hodgkin em humanos e alguns são aplicáveis para o linfoma canino e também para outras espécies (SCHALM, 2000).

Em cães, a classificação é feita com base na localização anatômica, critérios histológicos e características imunofenotípicas. As formas anatômicas mais comuns, em ordem decrescente de prevalência são multicêntrico, gastrintestinal, mediastinal e formas extranodais, como a cutânea (DOBSON, 2001). A forma multicêntrica, representa cerca de 84% dos casos de cães com linfoma, sendo caracterizada

principalmente pela linfonodomegalia periférica. Já a forma gastrointestinal é menos comum, somando 5 a 7% de todos os casos de linfoma, podendo ocorrer localmente, ou afetar múltiplos segmentos, com espessamento da parede, estreitamento do lúmen e/ou ulceração da mucosa, sendo o fígado e linfonodos regionais comumente acometidos (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002). No que diz respeito à forma mediastinal da doença, esta ocorre em aproximadamente 5% dos casos e é caracterizada pelo aumento de volume dos linfonodos mediastinais craniais, timo ou ambos. As formas primárias extranodais, podem ocorrer em quaisquer órgãos, a exemplo dos olhos, da pele, do sistema nervoso central, medula óssea, bexiga, coração e cavidade nasal. A forma extranodal cutânea especificamente, pode apresentar-se como uma neoformação solitária ou múltiplas lesões, sendo classificada como epiteliotrópica ou não-epiteliotrópica (VAIL et al., 2013)

A imunofenotipagem é utilizada para determinar o tipo de células que compreendem o tumor, mas a técnica também pode ser auxiliar no diagnóstico inicial. Quando uma população heterogênea de linfócitos é esperado num determinado tecido, a presença de uma população homogênea de mesmo imunofenótipo, sustenta a hipótese de processo neoplásico (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; VAIL et al., 2013).

O imunofenótipo do linfócito é identificado por determinação da expressão de moléculas específicas para células B (CD79a, CD20) e células T (CD3). Embora as células neoplásicas tenham características morfológicas que representem o imunofenótipo, exceções podem ocorrer e a morfologia não ser suficiente na caracterização do imunofenótipo (TESKE, 1994; VAIL et al., 2013). Para uma determinação mais precisa, anticorpos contra marcadores de linfócitos são aplicados a amostras de tecidos (imunohistoquímica), citológicas (imunocitoquímica) ou células individuais num meio fluido (citometria de fluxo). A avaliação por citometria e fluxo de células obtidas por aspiração por agulha fina também é possível. Para células T, marcadores incluem CD3, CD4 (T helper), e CD8 (T citotóxico) e para células B, os marcadores são CD79a, CD 20 e CD21 (VAIL et al., 2013).

Quanto à classificação histopatológica, esta foi adaptada aos cães com base nos conhecimentos adquiridos em linfomas humanos e, por consequência, sofreram modificações ao longo dos anos. Quase simultaneamente, as classificações norte americana de Luke-Collins e a européia, de Kiel foram publicadas. Ambos os

sistemas basearam-se nos conceitos imunológicos e somente diferiram significativamente na posição dos centrócitos dentro da linha de maturação em cada classificação (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002). A classificação de Kiel foi facilmente adaptada para o linfoma canino, mas com o intuito de unificar as classificações européia e norte americana, o Instituto Nacional do Câncer norteamericano publicou um estudo de 1.400 casos de múltiplas instituições realizando uma adaptação de classificações com uma hipótese de trabalho orientada principalmente pela evolução clínica e menos por critérios celulares (VALLI, 2013). Os linfomas humanos foram então classificados em grupos com curvas de sobrevida semelhantes e as características morfológicas de cada grupo foram descritas. Essa hipótese de trabalho acabou sendo considerada uma nova classificação, conhecida como “Working formulation” e que passou a ser adotada extensivamente (VEZZALI, 2009; VALLI, 2013).

Avanços na imunologia e histoquímica indicaram a necessidade de atualizar todos os sistemas anteriores. Isto levou à formação do ‘International Lymphoma Study Group’ (ILSG), que propôs a Revisão Europeu-Americana de Linfoma (REAL) (VALLI et al., 2013).

Dessa forma, a WHO (World Health Organization) publicou o esquema de classificação utilizando a “REAL”, como um sistema de base para a definição das categorias histológicas para as neoplasias hematopoiéticas e linfóides dos animais domésticos. Esse sistema incorporou critérios anatômicos, histológicos e imunofenotípicos (células B e T), com o objetivo de possibilitar um diagnóstico preciso dos diferentes tipos de linfomas. Em suma, é importante classificar o grau de malignidade histológica do linfoma canino em baixo (linfoma linfocítico de pequenas células ou linfoma centrocítico) ou intermediário a alto (linfoma difuso de grandes células, centroblástico ou imunoblástico) e a arquitetura como difuso ou folicular. A determinação do imunofenótipo fornece informações úteis. A resposta à quimioterapia é, no geral, melhor em animais com tumores de baixo grau e intermediária em linfomas de alto grau. Cães com linfomas de baixo grau podem ter elevada taxa de sobrevida sem uma terapia agressiva (VAIL et al., 2013).

As manifestações clínicas variam e dependem da extensão da doença e da forma anatômica. A multicêntrica é, geralmente, associada a linfonodomegalia periférica (MORRISON; 2005; VAIL; YOUNG, 2007). Manifestações inespecíficas

como anorexia, caquexia, desidratação, palidez das mucosas e vômito podem ocorrer, e relacionam-se com o subestágio “b” da Organização Mundial da Saúde (OMS) ((WILCOCK; YAGER, 1989; ROSENTHAL, 1990).

O aumento dos linfonodos é evidente, indolor e de consistência firme. Hepatoesplenomegalia e envolvimento da medula óssea ocorrem frequentemente. A maioria dos cães com linfoma multicêntrico evolui com uma ampla variedade de manifestações inespecíficas como anorexia, perda de peso, êmese, diarreia, aumento de volume abdominal, dispneia, polidipsia, poliúria e/ou febre (WARD, 1996). Polidipsia e poliúria são particularmente evidentes em cães com hipercalcemia. Os cães podem ainda apresentar manifestações clínicas relacionadas às alterações sanguíneas secundárias à infiltração neoplásica na medula óssea como a anemia, trombocitopenia e/ou neutropenia. Infiltração pulmonar difusa intersticial pode ocorrer em 27-34% dos casos de cães com a forma multicêntrica, com alterações radiográficas detectáveis (VAIL et al., 2013). Cães com linfoma gastrointestinal comumente apresentam manifestações como êmese, diarreia e/ou perda de peso, podendo haver envolvimento de linfonodos mesentéricos, baço e/ou fígado. A forma mediastinal é caracterizada pelo aumento dos linfonodos mediastinais e/ ou timo e as manifestações clínicas estão associadas ao possível comprometimento respiratório, efusão pleural e/ou polidipsia e poliúria em decorrência da hipercalcemia, frequentemente associada a esta forma anatômica da doença (MOULTON, 1990). Também pode cursar com a síndrome da veia cava cranial, caracterizada por edema de face, pescoço e membros torácicos secundários à estase venosa ou compressão pelo aumento de volume dos linfonodos. Já as manifestações em cães com formas extranodais do linfoma dependem do órgão envolvido (MACEWEN; YOUNG, 1996; VAIL et al., 2013).

Os linfomas também têm sido associado a síndromes paraneoplásicas, sendo que, das diversas alterações que podem ocorrer, a anemia e a hipercalcemia as mais comumente relatadas. A anemia, caracterizada como anemia da doença crônica, é muito e se deve ao armazenamento e metabolismo desordenados de ferro e por diminuição da vida útil das hemácias e, ocasionalmente, por diminuição da resposta medular (LICHTENSTEIN, 2014). Anemia hemolítica imunomediada e mielofitose também podem ser observadas (VAIL et al., 2013).

A hipercalcemia é atribuída à liberação de fatores de reabsorção óssea, como o fator ativador de osteoclastos. Essas proteínas estimulam a reabsorção óssea e

renal do cálcio, processo se deve a um peptídeo paratormônio-símile (PTHrP), produzido pelas células neoplásicas (FIGHERA, 2000; VAIL et al., 2013). A hipercalcemia pode ser caracterizada clinicamente por anorexia, perda de peso, fraqueza muscular, letargia, poliúria, polidipsia e ocasionalmente, depressão do sistema nervoso central e coma (MOULTON, 1990).

Para o diagnóstico do linfoma são essenciais o histórico e detalhado exame físico, além de análise citológica ou histopatológica do linfonodo ou fragmento do tecido. Para estadiamento clínico e diagnóstico das possíveis síndromes paraneoplásicas, faz-se necessária a realização de hemograma e perfil bioquímico sérico, com determinação do cálcio ionizado. As alterações bioquímicas séricas frequentemente refletem o sítio anatômico envolvido (VAIL et al., 2013). Além disso, os exames de imagem complementam a avaliação clínica. O exame morfológico do tecido e células que constituem a neoplasia é essencial para o diagnóstico do linfoma e pode ser feito por meio da análise citológica de material obtido por aspiração com agulha fina. Células linfóides são frágeis e, portanto, o aspirado depositado na lâmina não deve sofrer pressão excessiva. Para avaliação histológica faz-se necessária a remoção do linfonodo, incluindo a cápsula, entretanto, se não houver linfonodos periféricos envolvidos é apropriado que seja realizada biópsia do tecido acometido (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002; VAIL et al., 2013).

Após o diagnóstico deve ser realizado o estadiamento clínico (quadro 1). O estadiamento é importante e pode influenciar a decisão do tratamento e o prognóstico, sendo que a maioria dos cães (>80%) apresenta-se em estágio avançado (III a IV) (NORTH, 2009; VAIL et al., 2013).

A abordagem terapêutica do paciente é determinada pelo estágio da doença, presença ou ausência de síndrome paraneoplásicas, o estado geral do paciente, condição financeira, comprometimento dos responsáveis e seu nível de conforto em relação à probabilidade de sucesso relacionada com o tratamento e/ ou efeitos colaterais. Sem tratamento, a maioria dos cães com linfoma, tem uma sobrevida que varia de 4 a 6 semanas após o diagnóstico. A maioria dos cães que não recebem tratamento, morre em um período de 4-6 semanas após o diagnóstico (POSTORINO et al., 1992; COUTO, 2003).

O tratamento indicado é quimioterapia antineoplásica, considerando serem os linfomas doenças sistêmicas e com os objetivos de alcançar a remissão e aumentar a sobrevida. A poliquimioterapia é a terapia de escolha, uma vez que protocolos que

combinam múltiplas drogas apresentam eficácia superior quando comparados com protocolos de agentes únicos (MACEWEN; YOUNG, 1996). O linfoma canino responde bem ao tratamento clínico (HAHN et al., 1992). Muitos protocolos quimioterápicos para cães com linfoma foram desenvolvidos nos últimos vinte anos e para padronizar a avaliação da resposta ao tratamento e resultados de ensaios, o *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG) publicou critérios de avaliação dessa resposta (VAIL et al., 2013)

Apesar do grande número de protocolos disponíveis, a maioria é representada por adaptações do protocolo CHOP, em desenvolvido para uso humano. O CHOP representa uma combinação de ciclofosfamida (C), doxorubicina (H, hidroxidaunorubicina), vincristina (O, Oncovin) e prednisona (P), sendo o protocolo mais utilizado em cães, aquele proposto pela Universidade de Madison-Wisconsin. A quimioterapia baseada nesse protocolo induz remissão da neoplasia em aproximadamente 80% - 95% dos cães, com tempo médio de sobrevida de 10 a 12 meses, porém a taxa e a duração da resposta variam de acordo com a presença ou ausência de comorbidades e/ou da evolução e extensão da doença (MORRISON, 2005; VAIL et al., 2013).

Os cães respondem bem à quimioterapia e frequentemente atingem completa remissão, geralmente livre de manifestações clínicas associadas ao linfoma, apresentando melhora da qualidade de vida (HAHN et al., 1992; VAIL et al., 2013).

Na evolução do linfoma assim como ocorre com outros processos neoplásicos, infecciosos, traumáticos, imunomediados ou inflamatórios, há uma reação generalizada do organismo de forma não específica e aguda contra lesões locais e/ou sistêmicas que comprometem a homeostase. Esta reação é conhecida como resposta de fase aguda e compõe o sistema de defesa inato do organismo (GRUYS et al., 1994; CERÓN et al., 2005). Citocinas pró-inflamatórias são liberadas e o sistema vascular e células inflamatórias são ativados, levando à produção de mais citocinas e de outros mediadores inflamatórios e fator de necrose tumoral (WANG; TRACEY, 1999; ECKERSALL, 2004; TECLES et al., 2005).

Citocinas e quimiocinas demonstraram ter valor prognóstico em muitas neoplasias humanas incluindo o linfoma (PERRY et al., 2011).

1.1 CITOCINAS

Citocinas são pequenos polipeptídeos secretados por células do sistema imune tanto relacionadas à imunidade inata quanto adquirida, que medeiam diversas funções dessas células. São produzidas em resposta a vários estímulos, dentre eles a lesão tecidual, microrganismos e outros antígenos. Diferentes citocinas estimulam várias células envolvidas na resposta inflamatória (CUNNEEN, 2004; TRINCHIERI, 2011). Atuam por meio dos receptores de antígeno localizados nos linfócitos T ou B ou complexos antígeno-anticorpo. São estruturalmente diferentes, mas compartilham diversas propriedades (TIZZARD, 2008). Na fase de ativação das respostas adaptativas do sistema imune, as citocinas estimulam o crescimento e diferenciação dos linfócitos e nas fases efetoras do sistema imune tanto na resposta inata quanto adquirida, há ativação de diferentes células efetoras para eliminar microrganismos e outros antígenos. As citocinas também estimulam o desenvolvimento de células hematopoiéticas (ABBAS et al., 2010).

A nomenclatura das citocinas, em princípio, era baseada na origem celular e foram numeradas sequencialmente na ordem em que foram descobertas. As que são produzidas por fagócitos mononucleares são originalmente chamadas de monocinas e as produzidas por linfócitos, de linfocinas. Com o desenvolvimento dos anticorpos anticitocinas e provas moleculares, ficou claro que a mesma proteína pode ser sintetizada por linfócitos, monócitos e uma variedade de células tissulares, como epiteliais e endoteliais (HACK et al., 1997). Dessa forma, a nomenclatura genérica "citocinas" passou a ser utilizada para esta classe de mediadores. Muitas citocinas são sintetizadas por leucócitos (macrófagos ou células T) e agem em outros leucócitos e são, portanto, denominadas interleucinas, mas por razões históricas, uma vez que muitas citocinas chamadas linterleucinas são sintetizadas ou agem em outras células que não os leucócitos (ABBAS et al., 2010).

As citocinas atuam intensamente em todas as fases da inflamação (CALL et al., 2001) e podem ser divididas em pró (estimulam) ou anti (inibem) inflamatórias (GIANNOUDIS et al., 2004). As interleucinas têm ação preponderante no local da inflamação, porém, em algumas situações podem passar à corrente sanguínea e ter ação sistêmica. Exemplo disso são as alterações clínicas (apatia, anorexia) e de

temperatura (hiper ou hipotermia), que podem sinalizar ações das interleucinas no sistema nervoso central (MOLDAWER; COPELAND, 1997).

1.1.1 Propriedades gerais das citocinas

Uma vez estimuladas, as células não apenas produzem a citocina, mas também promovem sua liberação, possibilitando que a mesma possa agir na própria célula, células próximas ou distantes (GRAVES; COCHRAN, 2003).

A secreção das citocinas é um evento breve e auto-limitante, ou seja, não são armazenadas como moléculas pré-formadas e sua síntese é iniciada por meio de nova transcrição gênica como resultado de ativação celular. A ativação transcricional é transiente e como a codificação do RNA mensageiro é instável, a síntese de citocinas também é transitória. Têm ação sobre variados alvos celulares e podem se ligar a receptores na célula que as produzem e assim, exercer um efeito autócrino, ou podem se ligar apenas a receptores localizados nas células próximas, exercendo um efeito parácrino (ABBAS et al., 2010; GRAVES; COCHRAN, 2003). Algumas citocinas podem se difundir pelo organismo, afetando células-alvo em locais distantes e exercer assim, efeitos endócrinos. Quando ligadas a receptores celulares, as citocinas afetam o comportamento celular e podem induzir a célula-alvo a se dividir, diferenciar ou produzir novas proteínas. Podem ainda, inibir todos esses efeitos. A maioria das citocinas atua sobre muitos tipos celulares diferentes, induzindo respostas diferentes em cada um deles, característica chamada de pleiotropia. Essa propriedade permite que a citocina medie diversos efeitos biológicos, mas seu uso terapêutico passa a ser muito limitado, pois a administração da citocina para que se atinja um efeito clínico desejado, pode levar a numerosos efeitos colaterais (ABBAS, 2010).

Muitas citocinas diferentes podem atuar sobre um único alvo, característica conhecida como redundância. Algumas citocinas são mais eficazes quando atuam pareadas a outra, num processo denominado sinergia. Essa propriedade também pode ocorrer em sequência, ou seja, uma citocina induz a célula-alvo a expressar o receptor para outra citocina. E outras citocinas podem apresentar efeitos opostos, antagonizando as ações de outras (TIZARD, 2008).

1.1.2 Categorias funcionais das citocinas

Podem ser classificadas didaticamente em três categorias principais de acordo com sua função biológica.

- Mediadoras e reguladoras do sistema imune inato são produzidas principalmente por fagócitos mononucleares em resposta a agentes infecciosos. Padrões moleculares associados a patógenos, assim como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e RNA viral, ligados a receptores Toll-like (TLRs) na superfície ou em endossomos de macrófagos, estimula a síntese e secreção de algumas das mais importantes citocinas da imunidade inata. As mesmas citocinas podem ser secretadas por macrófagos que são ativados por células T estimuladas por antígeno (como parte da resposta celular adaptativa).
- Mediadoras e reguladoras da imunidade adaptativa, produzidas principalmente por linfócitos T em resposta ao reconhecimento específico a antígenos. Algumas das funções das citocinas de células T incluem regular o crescimento e diferenciação de várias populações de linfócitos e assim, desempenhar importantes papéis na fase de ativação de respostas imunes dependentes das células T. Demais citocinas secretadas pelos linfócitos T, recrutam, ativam e regulam células efetoras especializadas, como fagócitos mononucleares, neutrófilos e eosinófilos para eliminar o antígeno na fase efetora da resposta imune adaptativa.
- Mediadoras reguladoras de hematopoiese são produzidas pelas células estromais da medula óssea, leucócitos e outras células e estimulam o crescimento e diferenciação de leucócitos imaturos.

No geral, as citocinas da imunidade inata e adaptativa são produzidas por diferentes populações celulares e agem em diferentes alvos. Entretanto, essa distinção não é absoluta porque uma mesma citocina pode ser produzida tanto durante reações da resposta inata quanto a adaptativa e diferentes citocinas produzidas durante essas reações podem ter ações sobrepostas (ABBAS, 2010).

Em humanos, mecanismos imunológicos estão envolvidos na patogênese do linfoma de Hodgkin clássico (LHC), com uma clara disfunção no padrão de citocinas. Nos últimos anos, vários estudos têm sugerido que o LHC é uma neoplasia que se apresenta com alterações na produção de citocinas (MITELMAN et al., 2009). Esses estudos demonstram que o padrão anormal das citocinas, no linfonodo acometido contribui para o característico infiltrado hiper-reativo que compõe o tecido e com a proliferação das células malignas Reed Sternberg (H-RS), que é a população celular que constitui essa forma da doença (POPPEMA, 1996; VISENTAINER, 2009).

A imunidade adaptativa apresenta dois tipos de resposta: (1) resposta imune humoral, pela estimulação dos linfócitos B a produzirem anticorpos; e (2) resposta imune celular, onde os linfócitos T CD8+ com ação citotóxica e os macrófagos são ativados. Os linfócitos CD4+ participam de ambas as respostas pelo reconhecimento do antígeno e subsequente diferenciação em suas subpopulações efectoras Th1 ou Th2. As células Th1 facilitam a resposta imune celular ou citotóxica pela produção das citocinas IL-2 e TNF, enquanto as células Th2 secretam, dentre outras, principalmente, IL-10, que auxilia os linfócitos B a produzirem anticorpos, facilitando a resposta imune humoral (MITELMAN et al., 2009). Como os linfócitos B participam da resposta imune adaptativa, produzem anticorpos específicos contra antígenos tumorais, facilitando seu reconhecimento e destruição pelas células NK, fagocitose por macrófagos, ou ainda ativando a via do complemento, levando a lise tumoral.

Esses mecanismos possibilitam o reconhecimento e destruição das células neoplásicas, mas deve-se considerar que os tumores são formados por populações dinâmicas. Se de um lado o sistema imune representa uma pressão seletiva negativa, a instabilidade genética das células tumorais, propicia o escape de subpopulações progressivamente resistentes aos efetores do sistema imune. Apesar da origem monoclonal de cerca de 95% dos tumores, ao momento do diagnóstico, os tumores são formados por grupos heterogêneos de células oriundas da célula inicialmente mutada, assim, o tumor é constantemente “editado” pelos mecanismos efetores do sistema imune (CHAMMAS et al., 2009). Uma extensa infiltração de leucócitos em tumores sólidos é controlada, em parte, pela produção local de quimiocinas por células tumorais e essas quimiocinas, em conjunto com as citocinas e os fatores de crescimento influenciam na sobrevivência das células tumorais e na neoangiogênese (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2006). Dessa forma, se faz necessária a investigação e avaliação das citocinas em pacientes com linfoma ao

diagnóstico e tratamento, visando melhor entendimento da disfunção da resposta imune, sua correlação com as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes e se há uma possível relação com prognóstico.

1.1.3 Interleucina-2 (IL-2)

Células T proliferam em resposta a uma série de receptores de superfície/ligante, incluindo a de IL-2 com os receptores de IL-2 específicos (IL-2R), que são expressos em células T ativadas, mas não em repouso (WAGNER, 1987). A IL-2 parece ser produzida exclusivamente por linfócitos T e tanto as células CD4+ quanto as CD8+ podem secretar esta interleucina, contudo, células T CD4+ produzem em menor quantidade em relação às células CD8+. É ativada pelos linfócitos T e atua como um fator de crescimento autócrino (ABBAS, 2010; NAOUM, 2009).

Subpopulações de células T helper Th1 e Th2 podem produzir IL-2, entretanto, há evidências de que células Th1 produzem níveis mais elevados que a população Th2, mas isso ainda não foi esclarecido (ABBAS, 2010).

O efeito mais significativo da IL-2 é exercido sobre os leucócitos, entretanto, há relatos de ação menos pronunciada em outros tipos celulares. Como muitas das citocinas, a IL-2 estimula células que podem secretar outras citocinas ou demais substâncias que podem mediar efeitos secundários (THORPE, 1998).

Originalmente descrita como Fator de Crescimento da Célula T (TCGF), a IL-2 age ainda sobre os linfócitos B como estímulo para formação de anticorpos, estimula a proliferação de linfócitos B ativados e promove a indução de secreção de imunoglobulinas (MIRE-SLUIS, 1998; VARELLA, 2001; NAOUM, 2009). Pode ainda, atuar de modo a potencializar os efeitos imunomediados por células B ativadas. O efeito mais significativo da IL-2 é exercido sobre os leucócitos, porém outros menos marcantes em demais tipos celulares já foram descritos. Tal como acontece com muitas citocinas, as células estimuladas pela IL-2, podem secretar outras citocinas ou outras substâncias biologicamente ativas que podem mediar outros efeitos (THORPE, 1998).

No caso dos linfomas, pode haver aumento nas concentrações séricas (STASI, 2008) e os níveis séricos do receptor de interleucina-2 (IL-2R) parecem refletir a atividade e massa tumoral em pacientes humanos com linfoma não-Hodgkin. A atividade imunológica e o volume tumoral nesses pacientes têm sido relacionados aos níveis séricos de IL-2R (CD25) e o aumento dessa expressão é relatada em pacientes com uma variedade de malignidades hematológicas, a exemplo do linfoma e leucemia de células T no adulto (WAGNER, 1987; TANGE, 1990; TOJI, et al., 2015). Existe uma relação entre a expressão anormal de IL-2R e o desenvolvimento da doença e essa expressão está associada com crescimento maligno em caso de enfermidades hematopoiéticas (HELFAND, 1995).

1.1.4 Interleucina-6 (IL-6)

É uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imunes a antígenos específicos e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. É multifuncional e desempenha um importante papel em muitos processos fisiológicos, incluindo hematopoiese, proliferação de células B, diferenciação de plasmócitos e crescimento de hepatócitos (BISWAS et al, 1998; ZHANG et al., 2012).

Possui ações variadas. Na imunidade inata, estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, contribuindo para os efeitos sistêmicos da inflamação; adicionalmente, estimula a produção de neutrófilos por ação em progenitores da medula óssea. Por outro lado, na imunidade adaptativa a IL-6 estimula o crescimento de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos (VARELLA, 2001; GAIOLLA, 2009). Pode atuar como um fator acessório em sistemas que vão desde a proliferação de células T do timo e periféricos até o desenvolvimento de respostas de células-T citolíticas. Além do seu papel como um indutor de proteínas de fase aguda, a IL-6 contribui para defesa do organismo por meio de indução da febre e indução da liberação de hormônio adrenocorticotrófico. Neste contexto, é de interesse que os efeitos da IL-6 sobre a hepatócitos sejam melhor documentados em relação a presença de glicocorticóides, já que estes parecem aumentar a expressão do receptor de IL-6 (SNICK, 1990). Por outro lado,

os glicocorticóides, são considerados potentes inibidores da produção dessa citocina (MIRE-SLUIS, 1998).

É produzida predominantemente por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular e fibroblastos, além de algumas células T ativadas. Sua produção é estimulada por endotoxinas bacterianas, IL-1 e TNF- α (GAIOLLA, 2009; TIZARD, 2009). Atua no estímulo da unidade formadora de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) e nas células tronco. A produção de mutantes de IL-6 por células neoplásicas é um fator que contribui para o crescimento de linfócitos B leucêmicos e linfomas das células T (NAOUM, 2009).

A citocina não é frequentemente detectada no soro de indivíduos saudáveis; entretanto, os níveis séricos de IL-6 em pacientes com LH estão comumente aumentados ao diagnóstico, fenômeno que já foi associado à menor sobrevida e doença avançada (GAIOLLA, 2009). Seymour e colaboradores (1995) observaram correlação de níveis aumentados de IL-6 ao diagnóstico com variáveis prognósticas como velocidade de hemossedimentação (VHS), Beta-2-microglobulina, hipoalbuminemia e presença de sintomas sistêmicos, sugerindo papel da IL-6 no processo inflamatório sistêmico observado no LH. Em estudos conduzidos por Snick, 1990; Cozen e Reynolds, 2004, níveis séricos elevados de IL-6 foram associados a um pior prognóstico, menor taxa de remissão completa e baixa sobrevida.

Nas doenças hematopoiéticas, a IL-6 é produzida por linhagens de células linfoblásticas nos linfomas de grandes células anaplásicos, no linfoma de Hodgkin e também no mieloma múltiplo. A tumorigenicidade de células linfoblásticas esteve relacionada com a produção de IL-6 e anticorpos anti-IL-6 (EMILIE, 1992). Esse estudo demonstrou ainda, que a IL-6 tem suas concentrações elevadas em alguns, mas não em todos os tipos de linfoma. Duas situações diferentes foram identificadas: em linfomas de grandes células havia aumento das células produtoras de IL-6 e outra situação, em linfomas de pequenas células, onde essas células eram menos numerosas. Além disso, em humanos, os níveis séricos de IL-6 têm sido correlacionados com maior risco de linfoma em pacientes portadores de HIV (SEYMOUR, 1995). Esse mesmo estudo, conduzido por Seymour e colaboradores, demonstrou níveis séricos elevados de IL-6 em 78% dos pacientes com linfoma de grandes células no momento do diagnóstico e estudos anteriores relataram que apenas 15% dos pacientes com linfoma de baixo grau têm elevados níveis séricos de IL-6.

1.1.5 Interleucina-10 (IL-10)

Clones de células T têm sido subdivididos com base no padrão de linfocinas que são capazes de produzir. Clones Th 1 são capazes de produzir IL-2, interferon- γ (IFN- γ) e linfotóxina enquanto que clones Th 2 secretam IL-4, IL-5 e IL-6. Essa subdivisão é funcionalmente relevante, considerando que células Th1 medeiam respostas imunológicas celulares e Th2 promovem auxílio às células B na resposta humoral (ABBAS, 2010).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica produzida pelas células Th2, monócitos, macrófagos e linfócitos B normais e neoplásicos. A produção de IL-10 tem potente efeito imunossupressor via inibição por citocinas padrão Th1 incluindo INF- γ e IL-2. Nas células B, a IL-10 tem potente efeito estimulante, induzindo proliferação e diferenciação celular. Em pacientes humanos portadores de linfoma não-Hodgkin, os níveis séricos de IL-10 encontram-se significativamente elevados quando comparados com indivíduos normais ou pacientes com linfoma não-Hodgkin em remissão (CORTES, et al., 1997).

Alvos da IL-10 são as células Th1, as células B, os macrófagos, as células NK e os mastócitos (TIZARD, 2009), mas afeta também natural killer (NK), neutrófilos, células endoteliais e células periféricas mononucleares. A IL-10 inibe a função dos macrófagos e a síntese de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Tem potente atividade antiinflamatória *in vitro* e em modelos animais na inflamação aguda e crônica. É também co-estimulador no crescimento dos timócitos maduros, agindo como fator de diferenciação para as células T citotóxicas, sendo esta ação de menos intensidade (VARELLA, 2001). Inibe fortemente a apresentação de antígenos por monócitos e macrófagos, anulando as respostas proliferativas ou a produção de citocinas pelas células T.

Em um estudo de Blay, 1993, a IL-10 sérica foi detectada em metade dos pacientes com linfoma não-Hodgkin com doença ativa, e atingiu níveis praticamente indetectáveis em pacientes em remissão parcial ou total e em indivíduos saudáveis.

Nesse mesmo estudo, o autor concluiu que a IL-10 parece estar associada com a presença de doença ativa, entretanto, não reflete carga tumoral ou doença disseminada. El Far, 2004, identificou elevadas concentrações dos níveis séricos de IL-10 ao diagnóstico em pacientes com linfoma não-Hodgkin e, significativa diminuição em pacientes em remissão.

Cortes, 2007, sugeriu que essa citocina tem importante papel na patogênese e progressão dos linfomas e é concebível que a mensuração dos níveis séricos de IL-10 possa ter implicações prognósticas e a manipulação de seus níveis, potencial terapêutico. Tanto as propriedades imunossupressoras quanto as de proliferação e estimulação de células B, indicam que a IL-10 devem ser melhor estudadas nas neoplasias linfóides. Outro ponto é a pior sobrevida dos pacientes com linfoma de alto grau com níveis detectáveis de IL-10 no momento do diagnóstico, mas a significância biológica como fator prognóstico desfavorável permanece obscura (BLAY, 1993; CORTES, 2007).

Além disso, estudos experimentais mais recentes sugerem que a IL-10 desempenha um papel importante na regulação da tumorigênese e na indução de quimiorresistência em linfomas de células T (WANG, et al., 2015), o que demonstra que a complexa relação entre esta molécula e o câncer ainda não foi completamente elucidada.

1.1.6 Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

O nome dessa citocina deriva da identificação original como um fator sérico que causa necrose tumoral. É uma proteína produzida por macrófagos ativados, mastócitos, linfócitos T, células endoteliais, linfócitos B e fibroblastos.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta de fase aguda. Sua produção ocorre no início do processo inflamatório e é seguida por ondas de IL-1 e então, de IL-6 (EDLEFSE, 2014), capaz de influenciar a ativação e diferenciação dos linfócitos T (LEJEUNE, 1998).

Pode destruir algumas células tumorais e células infectadas por vírus, ativando caspases e induzindo a apoptose. São os receptores de TNF α que ativam o gatilho da apoptose. O papel desta citocina na resposta imune é complexo e inclui a

quimiotaxia e migração de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção. Em altas concentrações pode causar choque séptico (VITALE, 2007).

O TNF- α age no hipotálamo induzindo febre e por isso é chamado de pirógeno endógeno. Age também nos hepatócitos para aumentar a síntese de proteínas de fase aguda como a amilóide sérica A e fibrinogênio. A produção prolongada de TNF- α causa catabolismo protéico e adiposo, que é resultado da supressão do apetite e da redução da síntese de lipase, enzima necessária para liberar os ácidos graxos das lipoproteínas circulantes de modo que eles possam ser utilizados pelos tecidos (COSTA, 2005; VITALE, 2007; TIZARD, 2009).

Quando liberado em baixas concentrações, o TNF- α age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando-as a secretarem um grupo de citocinas (quimiocinas) que tem ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo, assim, um processo inflamatório local que possibilita o combate a quadros infecciosos (VITALE, 2007). Além de seu papel na infecção e inflamação, os membros da família do TNF- α estão envolvidos nos mecanismos de doenças imunomediadas. Podem atuar ligados à membrana celular, ou de forma autócrina, parácrina ou endócrina (HAHNE, 1998).

Além de seu papel nos processos inflamatórios, o TNF- α pode induzir tanto a apoptose, quanto a diferenciação ou proliferação celular e é expresso em tecidos tumorais, podendo, portanto, acelerar o crescimento de células transformadas, possivelmente desempenhando um papel na tumorigênese (HAHNE, 1998). Alterações nas concentrações de citocinas como a IL6, IL10, e TNF- α foram detectadas em pacientes com linfoma e associadas a um prognóstico desfavorável (ROTHMAN, 2005). Níveis elevados têm sido observados em pacientes com linfoma, principalmente não-Hodgkin, no entanto, a importância biológica e clínica da secreção de TNF- α em linfomas é ainda obscura (LISSONI, 1999; BALKWILL, 2006). Segundo Fowler et al., 2011, animais com linfoma tem menor capacidade de produção de TNF- α e essa capacidade pode não melhorar após a indução da remissão.

Estudos histológicos revelam que a maioria dos tumores são densamente inflamados, fenômeno atribuído à indução de uma cascata de citocinas (LEJEUNE, 1998).

1.1.7 MCP-1

As quimiocinas constituem uma família de citocinas quimiotáticas que são divididas em dois subgrupos, chamados CXC (ou α) e CC (ou β), dependendo se as duas cisteínas foram separadas por um aminoácido ou não (PROOST,1998). CCL2 é uma citocina pertencente à família de quimiocinas CC, que também é conhecida como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). Originalmente denominada "proteína quimiotática derivada de tumor", é secretada por várias linhagens de células tumorais e sabidamente uma proteína quimiotática potente para monócitos, neutrófilos, células T de memória e células NK (VALKOVIC, 2010; PERRY et al., 2011).

Tem a capacidade de atrair monócitos da circulação para se transformarem em macrófagos. A MPC-1 é produzida predominantemente por macrófagos e células endoteliais e desempenha importante papel no recrutamento e seletividade de monócitos, neutrófilos e linfócitos, na indução de quimiotaxia a sítios de lesão e infecção, pela ativação da proteína-G acoplada a receptores, bem como estimulante para a emigração de células mielóides da medula óssea (JOVEN, 2008; DESHMANE, 2009; Perry et al., 2011).

As quimiocinas e seus receptores têm sido encontrados na maioria dos tumores e estão envolvidos numa ampla gama de atividades de impacto que levam a crer que tenham efeitos importantes na patogênese do câncer. Por essa razão, suspeita-se que as quimiocinas tenham papel na promoção do crescimento, assim como na inibição do mesmo, dependendo da forma como são expressas (DESHMANE, 2009). Em um estudo conduzido por Luciani, 1998, identificou-se a expressão de MCP-1 em pacientes com linfoma de Hodgkin. O autor associou essa citocina como fator determinante no padrão inflamatório da doença de Hodgkin .

Como tem a capacidade de atrair e ativar linfócitos, podemos esperar que algumas quimiocinas estimulem uma resposta antitumoral. Além disso, possuem atividade angiogênica, que pode contribuir potencialmente para o crescimento e progressão tumoral (DESHMANE, 2009).

No caso dos linfomas especificamente, estudo realizado por Perry e colaboradores em 2009, não evidenciou diferença significativa no intervalo livre de doença ou sobrevivência global em cães com linfoma, associados aos níveis de

MCP-1, bem como não houve relação com a contagem de monócitos e neutrófilos. Ainda nesse trabalho, o que se observou foi que os animais com elevadas concentrações séricas antes do início do tratamento tiveram intervalo livre de doença significativamente mais curto (PERRY, et al., 2009).

2 OBJETIVOS

Considerando-se a importância dos linfomas na rotina de atendimento clínico de cães e a relevância das citocinas e sua atuação nessa neoplasia, foram objetivos deste estudo:

Geral:

Mensuração sérica das citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF alfa e MCP-1, em cães com linfoma multicêntrico ao diagnóstico e à 6^a. semana de tratamento.

Específicos:

Verificar se existem diferenças no perfil dessas citocinas nos animais com linfoma multicêntrico ao diagnóstico, quando comparados a um grupo controle.

Verificar se existe diferença entre os níveis apresentados no momento do diagnóstico e na 6^a semana, quando se avalia a remissão da neoplasia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS DE ESTUDO

O projeto em questão esteve de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA-VET), o qual foi protocolado sob o número 2755/2012.

Os animais utilizados neste estudo foram divididos em dois grupos distintos discriminados abaixo.

3.1.1 Grupo Controle

Foi constituído por 19 cães adultos, clinicamente saudáveis, submetidos à anamnese, exames físico e laboratoriais (hemograma, plaquetometria, uréia, creatinina, alanina-aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase, bilirrubinas, proteínas totais, albumina sérica e cálcio ionizado) que não apresentaram alterações, sendo a amostra de sangue desses animais coletada uma única vez.

3.1.2 Grupo Experimental

Para diminuir as variáveis frente às diversas apresentações clínicas dos casos de linfoma, optou-se por estudar apenas animais com a forma multicêntrica da doença. Dessa forma, foram atendidos inicialmente no Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 32 animais com linfoma multicêntrico, sendo que o grupo experimental foi constituído por 20 cães. Não houve restrições sexuais, etárias

ou raciais no grupo estudado, entretanto foi utilizado como critério de exclusão a utilização de qualquer tratamento prévio (quimioterapia antineoplásica, antibioticoterapia ou corticoideterapia) e a ocorrência de doenças concomitantes.

Os cães desenvolveram espontaneamente a doença formando, portanto, um grupo heterogêneo em relação ao porte, raça e idade.

Antes de iniciar os procedimentos, os responsáveis foram orientados sobre o estudo e consentiram na coleta de material e acompanhamento de seus animais. Também tiveram a opção de participar ou não do estudo, e aqueles que aceitaram, assinaram um termo de consentimento de acordo com o estabelecido pela CEUA-VET.

Para a confirmação do diagnóstico de linfoma e inclusão do paciente no grupo de estudo foram considerados dados de anamnese e exames físico e laboratoriais, bem como a análise de exame citológico de material proveniente de punção aspirativa de linfonodos. Com a confirmação citológica do diagnóstico, os animais foram submetidos a exames complementares para o estadiamento da doença e avaliação geral.

Foram coletados 8,0mL de sangue por punção venosa jugular ou cefálica, dos quais 2,0mL foram acondicionados em frasco contendo EDTA a 10% para confecção de hemograma e contagem de plaquetas e o restante mantido em frasco siliconizado, sem anti-coagulante, o qual foi centrifugado para obtenção do soro sanguíneo e aliqotado para a realização dos outros exames laboratoriais.

3.3 FREQUENCIA DE COLETAS ESPECÍFICAS E DESENHO DO ESTUDO

As amostras de soro sanguíneo para análise das citocinas foram colhidas quando do diagnóstico e após 6 semanas do início do protocolo quimioterápico. O soro foi armazenado a -80°C até o momento da realização das determinações específicas das citocinas. Animais que atingiram a 6ª semana de tratamento, tiveram a resposta ao tratamento avaliada, conforme recomendado pelo consenso do *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG), que tem como objetivo fornecer orientações mínimas para a descrição e comparação de tratamento e a aplicação na prática clínica, (VAIL, et. al., 2009).

Os animais em mau estado clínico geral ou que não completaram as 6 semanas de tratamento estipuladas para a avaliação da resposta foram excluídos do estudo. Consideraram-se inclusos, animais com resposta completa ou parcial, desde que atingissem as 6 semanas de tratamento.

3.3 DIAGNÓSTICO DO LINFOMA MULTICÊNTRICO

O diagnóstico de linfoma multicêntrico foi realizado por meio da avaliação citológica das células neoplásicas de linfonodos que se encontravam aumentados, evitando-se os linfonodos cervicais. Para tanto, a punção aspirativa dos linfonodos foi realizada com agulha 25 x 7 mm; o material coletado foi distendido em lâminas pela técnica de “squash” e, na sequência, o esfregaço foi corado pela técnica de Rosenfeld, de acordo com procedimento adotado pelo Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica-VCM/ HOVET da FMVZ-USP.

Utilizaram-se os critérios citológicos para diagnóstico dos linfomas, de acordo com a classificação de Kiel, que se baseia, principalmente, em características citomorfológicas bem definidas, sendo o tipo de classificação ideal para ser empregada nos exames citopatológicos (SUZANO, 2010). Quanto ao aspecto citológico, linfomas linfocíticos ou bem diferenciados possuem células redondas com cromatina nuclear condensada, nucléolo evidente, citoplasma escasso, baixo índice mitótico (menor que 5 células por campo) e baixa taxa de progressão. Linfoma mistos ou de diferenciação intermediária possuem uma mistura de células pequenas e grandes, com cromatina densa e citoplasma moderadamente escasso. Linfomas linfoblásticos ou pouco diferenciados possuem células atípicas, que são maiores que as células dos anteriores, de tamanhos semelhantes, com nucléolo redondo, evidente, cromatina condensada, citoplasma escasso e elevado índice mitótico (maior que 10 células por campo) (MOULTON, 1990; SCHALM, 2000).

3.4 ESTADIAMENTO

Para o estadiamento clínico utilizou-se o sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1980). Nesse sistema os cães com linfoma multicêntrico são classificados em cinco categorias (I a V) com base nos linfonodos e órgãos envolvidos e ainda subclassificados em estágios a e b, que se correlacionam com a presença de sintomas, conforme quadro 1.

Quadro 1 - Sistema de estadiamento clínico para linfoma segundo a Organização Mundial de Saúde

Estágio	Característica
Ia	Envolvimento limitado a um único linfonodo ou a apenas um órgão sem sintomatologia sistêmica
Ib	Envolvimento limitado a um único linfonodo ou a apenas um órgão com sintomatologia sistêmica
IIa	Envolvimento de vários linfonodos em uma determinada região sem sintomatologia sistêmica
IIb	Envolvimento de vários linfonodos em uma determinada região com sintomatologia sistêmica
IIIa	Envolvimento generalizados dos linfonodos sem sintomatologia sistêmica
IIIb	Envolvimento generalizados dos linfonodos com sintomatologia sistêmica
IVa	Envolvimento do fígado e/ou baço sem sintomatologia sistêmica
IVb	Envolvimento do fígado e/ou baço com sintomatologia sistêmica
Va	Manifestação no sangue periférico, envolvimento em medula óssea ou outro órgão não hematopoético sem sintomatologia sistêmica
Vb	Manifestação no sangue periférico, envolvimento em medula óssea ou outro órgão não hematopoético com sintomatologia sistêmica

Fonte: (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1980).

3.5 TRATAMENTO E SEGUIMENTO

O protocolo quimioterápico antineoplásico instituído foi o denominado Wisconsin-Madison curto, no qual associam-se quatro fármacos diferentes: sulfato de vincristina, ciclofosfamida, cloridrato de doxorrubicina e prednisona.

O tratamento foi dividido em duas fases, sendo a de indução a primeira delas, compreendendo quatro semanas. Na primeira e terceira semana de tratamento quimioterápico, os animais receberam uma dose de sulfato de vincristina por via intravenosa. Antes da aplicação os animais tiveram acessos venosos estabelecidos com cateteres 22G ou 20G, recebendo lentamente solução fisiológica 0,9%, não sendo utilizadas veias puncionadas anteriormente ou que apresentassem edema. Tricotomia e antissepsia com álcool 70% foram realizadas antes da venopunção. A dose do fármaco foi calculada, manipulada e aplicada em *bolus* diretamente no equipo, após a manutenção do acesso venoso ter sido conferido. Já a ciclofosfamida, utilizada na segunda semana, foi administrada por via oral. Os proprietários foram orientados quanto ao armazenamento e à administração da drágea, protegendo as mãos com luvas de látex. No primeiro dia de quimioterapia os proprietários receberam a prescrição de prednisona para ser administrada por via oral até o final do tratamento.

Na quarta semana foi aplicado o cloridrato de doxorrubicina, após reconstituição do liofilizado em solução fisiológica a 0,9%, resultando em diluição final de 2,0mg/mL. Essas primeiras 4 semanas de tratamento consistem no período de indução da remissão no qual, os animais também recebem o tratamento com prednisona com doses decrescentes conforme quadro 2.

Na fase de manutenção da remissão, os animais foram tratados com mais três ciclos similares ao anterior, exceto com a utilização da prednisona.

Quadro 2 - Esquema do protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin curto, utilizado para tratar cães com linfoma multicêntrico, atendidos na Oncologia Clínica, no Serviço de Clínica Médica.

Esquema do protocolo quimioterápico do grupo Short-Madison																		
Quimioterápico	Semanas																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>Sulfato de Vincristina</i>	X		X			X		X			X		X			X		X
<i>Ciclofosfamida</i>		X					X					X					X	
<i>Cloridrato de Doxorrubicina</i>				X					X					X				X
<i>Prednisona</i>	X	X	X	X														

Fonte: HOVET, FMVZ/USP. São Paulo, (2016)

Durante o tratamento, o protocolo de alguns animais foi modificado, de acordo com a resposta à quimioterapia ou aos efeitos colaterais observados.

Exames ultrassonográficos foram realizados em todos os animais como parte do estadiamento, para detectar envolvimento e alterações em órgãos abdominais tais como fígado, baço e linfonodos e foram repetidos após a fase de indução da remissão, para avaliação da resposta ao tratamento e, posteriormente repetidos, caso o animal apresentasse recidiva ou falha na resposta ao tratamento. Em alguns casos isolados, nos quais havia indicação, o exame foi repetido outras vezes durante o período de tratamento.

Da mesma forma, a avaliação radiográfica do tórax, nas posições latero-lateral e ventro-dorsal, foi realizada para avaliar aumento de volume em linfonodos torácicos e alterações sugestivas de infiltração neoplásica no parênquima pulmonar. As avaliações radiográficas foram realizadas logo após o diagnóstico, para o estadiamento do processo, e para alguns animais, repetidas após a fase de indução da remissão, para avaliar a resposta ao tratamento. Naqueles pacientes onde as alterações radiográficas persistiram mesmo após a fase de indução, outros exames de controle foram solicitados durante o acompanhamento clínico.

Os exames radiográficos e ultrassonográficos foram realizados pelo Serviço de Diagnóstico por imagem do Departamento de Cirurgia-VCI/HOVET da FMVZ-

USP conforme padronização adotada pelo mesmo e, no caso dos exames ultrassonográficos, utilizaram-se transdutores de 5,0 e 7,5 MHz, de acordo com o porte e peso do animal.

O exame de avaliação ecocardiográfica foi solicitado para todos os pacientes que receberam o tratamento com o cloridrato de doxorubicina. Esse antineoplásico, do grupo das antraciclinas, pode provocar alterações miocárdicas e possui efeito cardiotóxico dose-dependente e irreversível. Leva inicialmente à disfunção diastólica que pode progredir para disfunção sistólica, especialmente quando do uso de doses cumulativas mais elevadas e, portanto, antes de sua utilização, quer seja como componente do protocolo de primeira linha, ou no de resgate, os animais passaram por uma avaliação detalhada da sua condição cardiológica.

Os retornos para acompanhamento foram semanais, por 19 semanas, que compreendem o período de tratamento padronizado no protocolo utilizado (VAIL, et al., 2013)

3.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO

Ao final do período de indução da remissão, os animais foram criteriosamente avaliados e a resposta ao tratamento quimioterápico foi estabelecida por meio de exame físico completo, incluindo mensuração dos linfonodos, exames complementares como hemograma e bioquímica sérica, além de exames de imagem tais como ultrassom abdominal e radiografias de tórax.

A resposta ao tratamento foi avaliada seguindo critério adotado pelo *Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG)* (VAIL et al., 2009), considerando a mensuração dos linfonodos, os exames de imagem e o período recomendado para avaliação desta resposta (6 semanas). Os animais foram classificados em quatro grupos: remissão total, remissão parcial, doença progressiva e doença estável. Os animais com ausência total de evidências de doença, ou seja, com retorno ao tamanho normal dos linfonodos, baço e fígado sem evidências de novos sítios de doença foram classificados como em remissão total (RT). Os animais em remissão parcial (RP) tiveram uma redução de 30% da somatória dos diâmetros maiores de todos os linfonodos periféricos aumentados. Animais com doença progressiva (DP)

seriam considerados aqueles com aumento de 20% da somatória dos diâmetros maiores em relação à menor medida atingida. Por fim, os animais com doença estável (DE) não tiveram uma redução suficiente para caracterizar uma remissão parcial, assim como não tiveram um aumento que caracterizasse a doença como progressiva (VAIL et al., 2009).

Durante todo o tratamento quimioterápico, em cada sessão, os linfonodos dos pacientes foram mensurados com paquímetro para acompanhamento da resposta.

3.7 EXAMES COMPLEMENTARES

Para ambos os grupos foram realizados exames complementares com o objetivo de excluir animais com possíveis alterações no grupo controle e a presença de doenças concomitantes, bem como avaliar alterações relacionadas ao linfoma, no grupo experimental.

3.7.1 Hemograma

As contagens absolutas de hemácias, leucócitos e plaquetas foram determinadas em contador automático veterinário ABC Vet Horiba – SP, e a contagem diferencial de leucócitos, bem como as análises morfológicas das células foram realizadas ao microscópio, em lâminas coradas pelo corante Rosenfeld.

3.7.2 Provas Bioquímicas

Incluíram as determinações de uréia, creatinina, alanina-aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase, bilirrubinas, proteínas totais, albumina e cálcio ionizado, as quais foram determinadas em analisador automático Liasys® - Roche, de acordo com o Laboratório Clínico do Departamento de clínica Médica –

VCM/HOVET da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.8 TESTES PARA QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS

As amostras de sangue para determinação específica das citocinas foram coletadas em tubos com gel ativador e em seguida, centrifugadas a 1030 RCF durante 10 minutos. O soro foi armazenado em *ependorfs* e mantido em freezer a -80°C por um período máximo de 24 meses, conforme orientação do fabricante.

A quantificação das citocinas foi realizada utilizando-se kit comercial CCYTOMAG 90K (Milliplex®), seguindo o protocolo padrão descrito pelo fabricante, sendo as amostras analisadas em duplicata. As determinações foram realizadas pelo Laboratório Especializado em Análises Científicas (LEAC), na cidade de São Paulo e conforme recomendação do fabricante.

Os kits Milliplex® utilizam microesferas como base dos imunoensaios, envolvendo um processo que cora internamente microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos, utilizando uma proporção precisa desses fluorocromos. Desta forma, foram criados 100 conjuntos de esferas, sendo que cada uma com sua “assinatura” baseada em “código de cor”. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito específico. Estas microesferas são então combinadas em um único poço de reação e podem dosar até 100 analitos simultaneamente. As microesferas são lidas no equipamento Luminex® através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas à medida que elas fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal em cada microesfera.

3.8.1 Metodologia de ensaio

1. Preparo da amostra- soro;
2. Incubação das microesferas acopladas ao anticorpo juntamente com as amostras e padrões;
3. Lavagem e então, incubação com o anticorpo de detecção;
4. Leitura no sistema Luminex xMAP.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio de um programa estatístico computadorizado GraphPad Prism 6.

Para atender aos objetivos propostos, inicialmente, foram utilizadas estatísticas descritivas e análise da distribuição dos dados quanto à normalidade ou não.

Como os dados não obedeceram à curva gaussiana, aplicou-se testes estatísticos não paramétricos para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos controle e experimental.

A análise de variância simples (ANOVA) pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicada nos três grupos estudados (controle, ato do diagnóstico e 6ª semana de tratamento) para todas as citocinas. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados dos grupos controle e ato do diagnóstico, bem como do diagnóstico com a 6 semana de tratamento de todas as citocinas.

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar se houve correlação entre as variáveis estudadas.

Para todas as análises adotou-se um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi composto por 19 animais adultos, cuja mediana da idade foi de 7 anos, sendo 15 machos (78,94%) e 4 fêmeas (21,05%), predominantemente das raças labrador (31,57%) e pastor Alemão (21%). Desses animais, foi colhida uma única amostra de sangue.

A idade dos animais foi analisada estatisticamente em relação ao grupo experimental e não houve diferença significativa.

O resultado das determinações de citocinas nesse grupo pode ser observado na tabela a seguir.

Tabela 1 – Concentrações individuais, mediana e desvio padrão das citocinas IL-2, IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α (pg/mL) do grupo controle – São Paulo, 2016.

Animal	Idade (anos)	Sexo	IL-2	IL-6	IL-10	MCP-1	TNF-alfa
1	3	Macho	13	1073	9,26	583	374
2	7	Macho	23724	7774	6,54	1824	2145
3	3	macho	3818	3029	3021	722	703
4	6	Macho	11415	7291	5898	1221	1397
5	5	Macho	3205	2864	ND	1408	735
6	6	Macho	5538	4213	792	944	935
7	9	Macho	2750	2111	81,51	641	517
8	4	Macho	2058	1404	4,99	609	442
9	13	Fêmea	32,78	65,66	8,18	269	8,43
10	10	Fêmea	1544	1149	70,55	495	302
11	10	Macho	3056	2718	90,12	738	714
12	7	Macho	204	174	17,29	381	33,53
13	7	Macho	10,32	29,42	23,21	373	1,97
14	6	Macho	590	663	6,94	605	184
15	4	Macho	5127	3535	90,72	860	888
16	5	Fêmea	ND	1,59	ND	227	ND
17	8	Macho	5464	4047	548	911	870
18	10	Macho	383	371	ND	472	79,1
19	11	Fêmea	2148	1602	117	564	408
Mediana	7		2148	1602	85,815	609	442
Desvio padrão			4202,62	2231,76	1428,30	391,83	530,66

Legenda: ND – níveis não detectáveis

5.2 GRUPO EXPERIMENTAL

O grupo experimental foi composto por 20 cães com diagnóstico de linfoma multicêntrico. Na tabela 3 caracterizou-se os animais conforme a raça, sexo, idade, tipo citológico, estadiamento clínico e a remissão (parcial ou completa). Os quadros 4 e 5, que demonstram os valores relativos dos hemogramas e exames bioquímicos do grupo experimental no momento do diagnóstico, encontram-se nos anexos.

A idade mediana dos animais do grupo experimental foi de 9,3 anos, com predomínio de cães machos (60% - 12/20) e com raça definida (65% - 13/7).

Todos animais apresentavam a forma anatômica multicêntrica do linfoma, sendo o tipo citológico mais frequente o linfoblástico, representando 90% (18/20), seguido pelo linfocítico (10% - 2/20). Remissão completa foi observada em 80% (16/20) dos casos e remissão parcial em 20% (4/20). Ressalta-se que 85% (17/20) apresentava-se em estadiamento grau IV no momento do diagnóstico e 15% (3/20), grau III.

A idade mediana dos animais do grupo experimental foi de 9 anos, idade mínima de 4 anos e máxima de 14 anos, com predomínio de cães machos (60% - 12/20) e com raça definida (65% - 13/7).

Todos animais apresentavam a forma anatômica multicêntrica do linfoma, sendo o tipo citológico mais frequente o linfoblástico, representando 90% (18/20), seguido pelo linfocítico (10% - 2/20). Remissão completa foi observada em 80% (16/20) dos casos e remissão parcial em 20% (4/20). Ressalta-se qu, 85% (17/20) apresentava-se em estadiamento grau IV no momento do diagnóstico e 15% (3/20), grau III.

A mediana do tempo de sobrevida desses animais foi de 301,5 dias (mínima de 37 dias e máxima de 1,095 dias, que corresponde a 1 animal vivo até o momento da conclusão desse estudo).

Tabela 2 – Caracterização do grupo experimental segundo a raça, sexo, idade, tipo citológico, estadiamento clínico e remissão- São Paulo, 2016.

Animal	Raça	Sexo	Idade	Citologia	Estadiamento	Remissão	Sobrevivência (dias)
1	SRD	macho	Idade (anos)	Linfoblástico	IVb	Completa	306
2	pastor Alemão	fêmea	7	Linfoblástico	IVb	Completa	155
3	border collie	fêmea	4	Linfoblástico	IVb	Completa	Vivo (1.095)
4	SRD	fêmea	10	Linfoblástico	IVa	Completa	270
5	Maltês	fêmea	14	Linfoblástico	IVa	Completa	401
6	pastor Alemão	fêmea	10	Linfoblástico	IVb	Parcial	37
7	golden retriever	macho	10	Linfoblástico	IVa	Completa	186
8	lhasa apso	fêmea	10	Linfoblástico	IIIa	Completa	655
9	Dachshund	macho	11	Linfocítico	IVb	Parcial	423
10	bulldog francês	macho	9	Linfoblástico	IVb	Completa	279
11	Pastor Alemão	macho	4	Linfoblástico	IVa	Completa	155
12	labrador	macho	10	Linfoblástico	IVa	Completa	330
13	cocker spaniel	macho	7	Linfoblástico	IVa	Parcial	297
14	SRD	macho	9	Linfoblástico	IVa	Completa	356
15	SRD	macho	8	Linfoblástico	IVa	Parcial	515
16	SRD	macho	4	Linfoblástico	IVb	Completa	217
17	SRD	macho	8	Linfoblástico	IVa	Completa	162
18	cocker spaniel	macho	8	Linfocítico	IIIb	Completa	396
19	dachshund	Fêmea	9	Linfoblástico	IVa	Completa	155
20	SRD	Fêmea	10	Linfoblástico	IVa	Completa	520

Na sequência de tabelas, são descritos os resultados das citocinas no grupo controle e no momento do diagnóstico e da avaliação da resposta ao tratamento, nos cães com linfoma .

Tabela 3 – Concentrações individuais, mediana e desvio padrão da citocina IL-2 (pg/mL) nos grupos controle, grupo linfoma ao diagnóstico e 6ª semana de tratamento - São Paulo – 2016.

Animal	Grupo controle	Grupo linfoma	Grupo Linfoma 6ª semana
1	1926	4081	3375
2	2148	ND	ND
3	3818	2541	ND
4	11415	ND	ND
5	3205	ND	ND
6	5538	ND	ND
7	2750	ND	2707
8	2058	ND	ND
9	32,78	2544	2936
10	1544	177	242
11	3056	ND	ND
12	204	ND	ND
13	ND	2528	2046
14	590	ND	ND
15	5127	ND	ND
16	ND	349	ND
17	5464	43,38	ND
18	383	ND	ND
19	ND	2936	2316
20		ND	ND
Mediana	2103	ND	ND
Desvio padrão	2784,31	1288,37	1176,20

Legenda: ND - níveis não detectáveis

Figura 1. Representação gráfica das concentrações de IL-2 nos grupos controle e linfoma ao diagnóstico e 6ª semana.

Observou-se, com relação à IL-2, que 35% dos animais com linfoma apresentaram níveis indetectáveis ao diagnóstico. Dos 65% com concentrações mensuráveis, um animal apresentou o dobro do valor de mediana do controle ao diagnóstico e este nível manteve-se elevado na 6ª semana. Um animal apresentou concentrações superiores à mediana do controle ao diagnóstico e níveis não detectáveis na 6ª semana, enquanto outro animal apresentou níveis indetectáveis ao diagnóstico e valores superiores à mediana do grupo controle na 6ª semana. Doze animais (60%) não apresentaram concentrações de IL-2 detectáveis ao diagnóstico e na 6ª semana do tratamento.

A análise estatística mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo linfoma ao diagnóstico ($p = 0,0037$). Os valores do grupo controle apresentaram-se elevados em relação ao momento do diagnóstico no grupo linfoma. Não houve diferença entre os momentos diagnóstico e 6ª semana, que se mantiveram estáveis.

Tabela 4 – Concentrações individuais, mediana e desvio padrão da citocina IL-6 (pg/mL) nos grupos controle, grupo linfoma ao diagnóstico e 6ª semana de tratamento - São Paulo – 2016.

Animal	Grupo controle	Grupo linfoma	Grupo linfoma 6ª. semana
1	7774	ND	ND
2	3029	2071	ND
3	7291	56	46,15
4	2864	ND	ND
5	4213	72,89	ND
6	2111	ND	2137
7	1404	ND	ND
8	65,66	2071	2071
9	1149	202	245
10	2718	ND	ND
11	174	ND	ND
12	29,42	2196	1256
13	663	ND	15,52
14	3535	17,37	55,10
15	ND	342	39,47
16	4047	200	ND
17	371	ND	ND
18	1602	3125	2095
19	ND	15,52	ND
Mediana	1856,50	17,37	7,76
Desvio Padrão	2272,97	965,57	779,82

Legenda: ND – níveis não detectáveis

Figura 2 - Representação gráfica das concentrações de IL-6 nos grupos controle e linfoma ao diagnóstico e 6ª semana.

FONTE: (PAVAN, 2016)

Observou-se, com relação à IL-6, que 40% dos animais com linfoma não apresentaram níveis detectáveis de IL-6 ao diagnóstico. Dos 60% que apresentaram concentrações detectáveis, quatro apresentaram valores próximos ou levemente superiores à mediana dos controles, sendo que 3 mantiveram níveis similares na remissão, um manteve o mesmo valor, três tornaram-se indetectáveis, três mantiveram concentrações elevadas na 6ª semana quando comparados ao momento do diagnóstico e seis animais que tiveram valores indetectáveis ao diagnóstico, assim se mantiveram na 6ª semana.

A análise estatística mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo linfoma ao diagnóstico ($p = 0,0017$). Os valores do grupo controle apresentaram-se elevados em relação ao grupo linfoma no momento do diagnóstico. Não houve diferença nos animais com linfoma entre o momento do diagnóstico e a 6ª. semana.

Tabela 5 – Concentrações individuais, mediana e desvio padrão da citocina IL-10 (pg/mL) nos grupos controle, grupo linfoma ao diagnóstico e 6ª semana de tratamento - São Paulo – 2016.

Animal	Grupo controle	Grupo linfoma	Grupo linfoma 6ª semana
1	ND	246	594
2	ND	ND	16,43
3	3021	2152	117
4	ND	165	72,06
5	117	49,29	25,2
6	792	210	ND
7	81,51	373	185
8	ND	147	165
9	ND	3085	2141
10	70,55	327	409
11	90,12	ND	28,93
12	17,29	37,91	278
13	23,21	781	14,18
14	ND	922	72,06
15	90,72	373	18,99
16	ND	198	14,18
17	548	131	382
18	ND	210	270
19	...	3156	2501
20	...	49,29	ND
Mediana	20,25	210	94,53
Desvio padrão	698,7667	955,5198	673,6354

Legenda: ND – níveis não detectáveis

Figura 3. Representação gráfica das concentrações de IL-10 nos grupos controle e linfoma ao diagnóstico e 6ª semana.

FONTE: (PAVAN, 2016)

Observou-se, com relação à IL-10, que 10% (2/ 20) dos animais com linfoma apresentaram níveis não detectáveis da citocina ao diagnóstico e 90% (18/ 20) com valores detectáveis. No grupo controle, 47,36% (9/19) apresentaram níveis não detectáveis. No grupo linfoma, ao diagnóstico, 85% apresentaram valores superiores ao dobro da mediana do grupo controle. Três animais (15%) apresentaram valores ao diagnóstico superiores a 2.000pg/mL e apenas um animal apresentou uma diminuição significativa na 6ª semana do tratamento. Dois animais com níveis indetectáveis ao diagnóstico permaneceram com valores baixos (menor que a mediana do grupo controle) na remissão.

A análise estatística mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo linfoma ao diagnóstico ($p= 0,0033$). Os valores do grupo linfoma ao diagnóstico foram elevados em relação ao controle. Não houve diferença significativa entre os momentos do diagnóstico e 6ª semana.

Tabela 6 – Concentrações individuais, mediana desvio padrão da citocina MCP-1 (pg/mL) nos grupos controle, grupo linfoma ao diagnóstico e 6ª semana de tratamento - São Paulo – 2016.

Animal	Grupo controle	Grupo linfoma	Grupo linfoma 6ª semana
1	583	3421	3409
2	1824	393	360
3	722	742	653
4	1221	785	329
5	1408	784	431
6	944	452	526
7	641	738	1220
8	609	590	486
9	269	3413	2496
10	495	314	323
11	738	410	323
12	381	335	372
13	373	692	486
14	605	721	553
15	860	914	438
16	227	429	362
17	911	752	841
18	472	777	1478
19	564	3002	1437
		855	512
Mediana	609	740	499
Desvio padrão	391,83	965,47	794,48

Legenda: ND – níveis não detectáveis

FONTE: (PAVAN, 2016)

Figura 4. Representação gráfica das concentrações de MCP-1 nos grupos controle e linfoma ao diagnóstico e 6ª semana.

FONTE: (PAVAN, 2016)

No que diz respeito a MCP-1, 100% dos animais apresentaram níveis detectáveis ao diagnóstico, sendo que três apresentaram concentrações ao diagnóstico superiores à mediana do controle. Onze animais (52%) mantiveram os níveis de MCP apresentados ao diagnóstico, na fase de remissão. Sete animais (35%) apresentaram diminuição dos níveis em aproximadamente 50% na remissão. Apenas dois apresentaram aumento das concentrações na fase de remissão.

A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre o grupo controle e o grupo linfoma ao diagnóstico ($p=0,5362$), nem entre os grupos diagnóstico e 6ª semana ($p=0,2505$).

Tabela 7 – Concentrações individuais, mediana e desvio padrão da citocina TNF- α (pg/mL) nos grupos controle, grupo linfoma ao diagnóstico e 6ª semana de tratamento - São Paulo – 2016.

Animal	Grupo controle	Grupo linfoma	Grupo linfoma 6ª semana
1	374	3154	2928
2	2145	52,23	ND
3	703	1604	ND
4	1397	ND	ND
5	735	ND	ND
6	935	ND	ND
7	517	ND	1980
8	442	ND	ND
9	ND	6415	5763
10	302	139	199
11	714	ND	ND
12	33,53	ND	ND
13	ND	1542	1308
14	184	ND	ND
15	888	112	28,02
16	ND	350	ND
17	870	115	ND
18	ND	13,96	96,95
19	408	1150	3486
		ND	ND
Mediana	442	33,095	ND
Desvio padrão	535,3245	1529,976	1535,481

Legenda: ND – níveis não detectáveis

FONTE: (PAVAN, 2016)

Figura 5 - Representação gráfica das concentrações de TNF α nos grupos controle e linfoma ao diagnóstico e 6ª semana

FONTE: (PAVAN, 2016)

Observou-se, com relação ao TNF- α , que 57% dos animais apresentaram concentrações detectáveis de TNF- α , com ampla variação e 43% não apresentaram níveis detectáveis. Seis animais apresentaram, ao diagnóstico, concentrações superiores ao dobro da média apresentada pelo grupo. Esses animais mantiveram concentrações elevadas também na remissão. Apenas um animal com concentração elevada, não apresentou níveis detectáveis na remissão. Oito animais apresentaram níveis não detectáveis ao diagnóstico e assim se mantiveram durante a remissão. Dois animais com níveis baixos ao diagnóstico não apresentaram níveis detectáveis na remissão.

A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre o grupo controle e o grupo linfoma ao diagnóstico ($p=0,1092$), nem entre os grupos diagnóstico e 6ª semana ($p=0,5523$).

6 DISCUSSÃO

A função regulatória das citocinas inclui o controle das respostas imunes celular e humoral, quimiotaxia, inflamação, regressão tumoral, febre e resposta de fase aguda.

Por exercerem todas essas atividades regulatórias, as diversas citocinas têm atividades distintas e seu efeito se dá sobre várias linhagens celulares, podendo atuar em várias fases de sua ontogênese. As citocinas são sintetizadas apenas quando necessárias, seja em condições fisiológicas ou reativas e a inter-relação entre elas é muito importante, pois uma vez que determinada citocina seja produzida em maior quantidade, outras deverão ser produzidas para antagonizar o efeito da primeira e manter o balanço.

Com relação às citocinas e câncer, pesquisas mostram consideráveis evidências de que o microambiente tumoral determina a expressão local de citocinas, como também a atividade das células ali presentes. A complexa interdependência entre as células do câncer, o estroma tumoral e as células hematopoiéticas infiltradas determinam o tipo de resposta imune local, induzida, em parte, pelo padrão de citocinas e quimiocinas reguladoras da inflamação no local (TRINCHIERI, 2011). A extensa infiltração de leucócitos em tumores sólidos é controlada, em parte, pela produção local de quimiocinas por células tumorais e essas quimiocinas, em conjunto com as citocinas e os fatores de crescimento influenciam na sobrevivência das células tumorais e na neoangiogênese (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2006).

Assim, nos linfomas, o controle pode estar alterado e algumas citocinas podem ser secretadas continuamente, sem o mecanismo de *feedback*, oferecendo vantagem de crescimento para as células neoplásicas. Dessa forma, pode-se inclusive pensar que as várias formas de linfoma poderiam estar associadas ao perfil das citocinas produzidas pela neoplasias ou em resposta a ela.

Ainda, no caso dos linfomas, os reconhecidos efeitos da quimioterapia durante o tratamento, ocasionando acentuada redução na contagem de leucócitos poderiam também interferir no equilíbrio das citocinas. Entretanto, Fowler et al. 2011, estudando as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α em cães com linfoma verificou que seus

níveis séricos não são associados diretamente à contagem de leucócitos totais, neutrófilos e monócitos. Assim sendo, a mensuração sérica das citocinas poderia ser tomada como uma mensuração mais coerente da atividade do sistema imune, do que a contagem de leucócitos.

Considerando ainda o tratamento antineoplásico, seria esperado que, uma vez que a contagem de leucócitos não interfere na concentração sérica das citocinas, o balanço poderia ser retomado após a fase de indução da remissão, quando o clínico avalia se o animal apresenta resposta ao tratamento e a classifica como completa, parcial, ausência de remissão ou doença progressiva, mais especificamente nos casos de resposta completa ou parcial.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que no momento do diagnóstico, existe diferença no perfil de citocinas quando comparado ao controle. Com relação aos níveis séricos de IL-2, menor concentração foi observada nos cães com linfoma em relação ao controle, entretanto, esses achados não corroboram a maior parte dos dados de literatura. São comuns estudos em que se constata aumento de IL-2 em pacientes com linfoma ao diagnóstico, quando comparados ao grupo controle, como relata o estudo de Tange, 1990. Além disso, esse autor descreve concentrações mais elevadas em pacientes com linfoma de alto grau em comparação ao grupo de linfoma de baixo grau e ainda relaciona aumento mais expressivo em pacientes sintomáticos quando comparados aos assintomáticos.

Segundo Toji, et al., 2015, que estudaram níveis séricos do receptor de interleucina-2 (IL-2R) parecem refletir a atividade e massa tumoral em pacientes humanos com linfoma não-Hodgkin. Achados de um estudo conduzido por Wagner, 1987, sugerem que a IL-2R pode ser um valioso marcador tumoral e indicador prognóstico em pacientes portadores de linfoma e descreve ainda, que é provável que os níveis de IL-2R marcadamente elevados indiquem a secreção de IL-2 pelas células tumorais e, por conseguinte, revela-se específica para neoplasia linfóide, enquanto concentrações minimamente elevadas poderiam refletir a presença de níveis aumentados de linfócitos ativados em tais pacientes.

As menores concentrações de IL-2 encontradas neste estudo poderiam refletir a baixa funcionalidade dos linfócitos, uma vez que a IL-2 é produzida quase que exclusivamente por linfócitos T e ativada pela mesma linhagem de células (NAOUM, 2009), atuando como um fator de crescimento considerado autócrino. Importante considerar que baixos níveis de IL-2 podem ainda levar à pior evolução do quadro se

considerarmos que esta interleucina estimula as células NK e pode haver redução da atividade do sistema inato e adaptativo.

Uma possível justificativa para não corroborarmos os dados de literatura, poderia ser o número de animais do grupo linfoma (20) quando comparado à ampla amostragem analisada pelos demais autores citados nesse estudo, principalmente em se tratando de estudos em seres humanos, a exemplo de Stasi, 2008, que constatou aumento nas concentrações séricas de IL-2 em 105 indivíduos recém diagnosticados com linfoma não-Hodgkin, nos quais as concentrações de IL-2 eram acentuadamente elevadas.

Por outro lado, um dos escassos e mais recente estudo, realizado por Mitelman, 2009, porém em linfoma de Hodgkin clássico, corrobora esses resultados. Foram determinadas as concentrações séricas de citocinas de resposta Th1 (IL-2, TNF, INF- γ) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) em 45 pacientes, descrevendo aumento dos níveis das citocinas TNF, INF- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 quando comparados com o grupo controle, mas não foi evidenciada diferença em relação às concentrações séricas de IL-2 entre o grupo experimental e grupo controle. O autor concluiu que esses resultados sugerem que a IL-10 possa estar regulando negativamente a resposta imune citotóxica (Th1) pela inibição da IL-2.

De acordo com Poppema, 1996, linfócitos periféricos de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, quando colocados em cultura com agentes mitogênicos, tal como a concavalina A, apresentam baixo índice de proliferação e ausência de síntese de IL-2. Sabe-se que a ausência de síntese de IL-2 é uma característica de células anérgicas e que esta citocina tem um papel chave na imunidade adaptativa Th1, pelo estímulo da proliferação de linfócitos CD4⁺ e da atividade antitumoral e citolítica das células NK e dos linfócitos T CD8 citotóxicos. Portanto, é provável que exista algum mecanismo no linfoma que iniba a produção de IL-2, contribuindo com a anergia celular descrita na literatura e evasão das células malignas às respostas imunes do hospedeiro. Sabe-se que a IL-10 é produzida por linfócitos Th2 e tem função inibitória sobre a produção de INF- γ e IL-2, regulando negativamente a imunidade celular Th1. Portanto, de acordo com os nossos resultados e os dados da literatura, a IL-10 sérica elevada, no grupo de pacientes com variáveis que implicam pior prognóstico, poderia estar regulando negativamente uma resposta imune Th1 ou citotóxica, contribuindo assim com a progressão da doença (MITELMAN, 2009).

No trabalho conduzido por Mitelman, 2009, a citocina IL-2 foi correlacionada com as variáveis clínicas nos pacientes e observou-se concentrações séricas elevadas nos estágios I e II, portanto mais precoces, quando comparada aos estágios III e IV, sugerindo que esta citocina diminui com a progressão da doença. Esses achados podem justificar o achado de baixas concentrações de IL-2 neste estudo, uma vez que a maioria (85%) dos animais com linfoma, enquadrava-se no estágio IV da doença. É possível que, nesse caso, a citocina IL-10 poderia ser a responsável pela regulação negativa da IL-2, contribuindo para uma resposta imune com perfil Th2, pouco efetiva em neoplasias, resultando na disseminação da doença.

A IL-6 é uma das mais importantes citocinas associadas a linfomas em seres humanos e estudos sugerem seu envolvimento no desenvolvimento da neoplasia, uma vez que ela estimula o desenvolvimento de linhagens de células B linfomatosas e atua como um fator de crescimento autócrino nessas células, pois em muitos casos o aumento de sua produção está diretamente associado à elevada expressão de Ki-67, marcador de proliferação celular.

Elevados níveis de IL-6 têm sido observados em pacientes com linfoma recém-diagnosticados, além daqueles com aumento de proteínas de fase aguda. Merlo et al., 2007, observou que a proteína C reativa, a mais importante proteína de fase aguda na espécie canina, aumenta ao diagnóstico em cães com linfoma e esse aumento poderia estar diretamente relacionado à elevação dos níveis de IL-6.

Em humanos com linfoma, o aumento de IL-6 é um fator prognóstico negativo associado a baixa sobrevida (SNICK, 1990). Pelo menos para os linfomas B, existe correlação direta entre as citocinas circulantes e o mRNA para IL-6 nas células neoplásicas, indicando que essas células alteradas produzem pelo menos parte da citocina identificada na circulação. Um estudo conduzido por El Far (2004) demonstrou altas concentrações séricas de IL-6 em pacientes com linfoma não-Hodgkin e, após a indução da remissão, significativa queda nos níveis séricos desta interleucina próximo ao nível do grupo controle, ou seja, a manutenção de níveis aumentados poderia estar relacionado à atividade da doença. O mesmo estudo avaliou a correlação entre as IL-6 e IL-10 nesses pacientes e constatou correlação positiva entre tais citocinas, ou seja, o aumento de uma foi acompanhado pelo aumento da outra.

No presente estudo, os níveis de IL-6 foram significativamente menores ao diagnóstico quando comparados ao controle, mas a maioria (57%) dos animais manteve níveis estáveis entre o diagnóstico e a remissão. Não foi possível identificar diferenças estatísticas nas concentrações entre animais com respostas completas e parciais, haja vista que apenas quatro animais apresentaram resposta parcial, entretanto, a análise individual mostrou que animais com níveis elevados tenderam a apresentar resposta parcial e um animal que apresentou concentrações elevadas ao diagnóstico, com redução drástica na fase de remissão, foi o que apresentou a maior sobrevida. Talvez esses achados sejam em parte associados ao tipo celular presente, o que seria uma limitação do estudo, já que não foi possível realizar a imunofenotipagem.

A análise do comportamento da IL-6 também é importante uma vez que estudos humanos, a exemplo de Zhang et al., 2012, mostraram que a IL-6 é um importante fator de crescimento e sobrevivência para linfomas de células do manto, um tipo agressivo de linfoma de células B, mediando a sinalização por ativação da via STAT3, que mantém o crescimento das células e propicia resistência ao tratamento, portanto, o bloqueio da IL-6 pelo uso de monoclonais poderia melhorar a resposta ao tratamento desses pacientes.

Não foram encontrados estudos sobre a expressão de receptores de IL-6 em cães, até para avaliar se poderia haver alta expressão nas células linfóides neoplásicas e esse fator poderia contribuir, na fase adiantada da doença em que esses animais se encontravam, com menor concentração sérica da citocina.

A IL-10 é considerada uma interleucina anti-inflamatória e imunossupressora, o que favorece o escape das células neoplásicas da vigilância imunológica (MOCELLIN, 1990). Mas ela é uma citocina pleiotrópica e, portanto, capaz de exercer diferentes efeitos em distintos grupos celulares da imunidade inata e adaptativa. Além disso, a IL-10 é uma citocina que pode ser expressa pelas próprias células tumorais, possivelmente suprimindo a resposta antitumoral. Além disso, pode ser produzida por células ativadas envolvidas numa reação antitumoral do hospedeiro, sendo assim um indicador de uma resposta inflamatória potente ao invés de imunossupressão (EL FAR, 2004).

Nesse estudo, a análise estatística mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo linfoma ao diagnóstico. Os valores dos animais com linfoma foram elevados em relação ao controle e não houve diferença significativa entre os

momentos do diagnóstico e 6ª semana. Isso corrobora dados de literatura, como no estudo conduzido por El Far (2004), que constatou aumentos expressivos dos níveis séricos de IL-10 ao diagnóstico em pacientes humanos com linfoma não-Hodgkin e, quando da remissão da doença, diminuição significativa em seus níveis séricos próximos ao nível do grupo controle, referindo uma possível relação dos níveis elevados de IL-10 com a atividade da doença. Poderia se esperar uma possível queda nos níveis séricos de IL-10 relacionada ao tratamento quimioterápico, o uso de corticosteroides e a consequente supressão do sistema imunológico induzida pela quimioterapia, mas neste estudo não foi observada diferença significativa entre os momentos diagnóstico e 6ª semana de tratamento, tão somente entre o grupo controle e diagnóstico.

Embora muitos imunologistas tenham considerado a IL-10 uma citocina meramente imunossupressiva, a complexa relação entre esta molécula e o câncer ainda não está completamente elucidada. A tarefa de classificação desta interleucina como um imunossupressor ou uma citocina imunoestimulante é particularmente desafiadora, tendo em consideração que, *in vivo*, esta molécula pode influenciar o crescimento e a progressão do câncer, afetando fenômenos não relacionados ao sistema imunológico, como angiogênese e proliferação/ apoptose de células malignas (MOCELLIN, 1990).

Em outro estudo, realizado por Blay (1993), em pacientes com linfoma não-Hodgkin, foram observadas concentrações séricas elevadas de IL-10 no momento do diagnóstico e níveis quase indetectáveis quando da constatação da remissão. No presente estudo, não foram observados muitos animais com concentrações indetectáveis na remissão, mas houve diferença significativa entre grupo controle e diagnóstico.

Vale ressaltar que aumento nas concentrações de IL-10 tem sido associado a mau prognóstico e evolução desfavorável durante o tratamento, como fator independente, não estando correlacionada a outros fatores prognósticos como estadiamento e graduação histológica (EL FAR, 2004). Embora o presente estudo não tenha avaliado essa relação, é um dado que requer outras investigações, já que se for considerado que os níveis alterados da IL-10, assim como a IL-6 podem refletir atividade da doença, poderia ser sugerido tratamento anticitocina como terapia adjuvante, para melhorar a resposta do paciente.

Quanto ao TNF- α , sua produção é relacionada tanto a efeitos imunomoduladores quanto a inflamatórios. Níveis elevados têm sido observados em pacientes com linfoma, principalmente linfoma não-Hodgkin, no entanto, a importância biológica e clínica da secreção de TNF- α em linfomas é controversa (LISSONI, 1999). É uma citocina frequentemente encontrada em biópsias em tecidos humanos, produzido tanto por células epiteliais, nos tumores ovarianos e renais, quanto por células estromais, como tumores de mama (BALKWILL, 2006).

Um estudo realizado por Lissoni, 1999, observou que as concentrações médias séricas de TNF- α observadas em pacientes humanos com linfoma e tratados, foram significativamente mais elevadas do que aquelas observadas nos controles e correlacionou o pronunciado aumento dessas concentrações, em pacientes em estágios mais avançados, como graus IV e V da doença. Entretanto, relatou que pacientes com doença estável, as concentrações médias dessa citocina diminuíram significativamente durante o tratamento.

Os dados do presente estudo não corroboram os achados desse autor, contudo, pois nesse caso, os cães deveriam apresentar concentrações elevadas ao diagnóstico, já que ampla maioria apresentava estágios avançados da doença e, posteriormente, apresentou resposta completa ao tratamento. Contudo, Fowler et al. 2011, trabalhando com cães com linfoma e estimulando a produção de citocinas de diferentes formas, constataram menor capacidade de produção de TNF- α e essa capacidade não melhorou após a indução da remissão. Neste estudo, não houve diferença na comparação entre os grupos, ou seja, a produção não aumentou ao diagnóstico e assim se manteve na fase de remissão. Dessa forma, 43% dos animais com linfoma não apresentou níveis detectáveis de TNF- α ao diagnóstico e assim se mantiveram durante o tratamento. Apenas um animal com níveis indetectáveis ao diagnóstico passou a apresentar nível elevado na fase de remissão, mas não foi possível relacionar esse comportamento a qualquer outra variável.

A depleção do TNF- α poderia ser explicada considerando que os animais do grupo linfoma foram diagnosticados em estágio mais adiantado da doença e, portanto, poderiam apresentar concentrações de TNF- α já diminuídas por ser essa uma citocina de fase aguda, ou ainda, os cães com linfoma apresentam, de fato, menor capacidade de produção de TNF- α .

Com relação à MCP-1, esta é reconhecida como uma citocina angiogênica. Em estudos sobre a expressão de cDNA em humanos com linfoma, observou-se

que os níveis foram mais elevados naqueles com linfomas mais agressivos do que nas formas indolentes. No presente estudo não houve significância entre os grupos. Apesar de dados de literatura (PERRY, 2010) demonstrarem o aumento da MCP-1 relacionado com menor tempo de intervalo livre de doença, não foi possível observar diferença no impacto da sobrevida dos pacientes. Contudo, o presente estudo não avaliou a variável recidiva. Os achados deste estudo não corroboram os dados encontrados por Perry e colaboradores (2010), que observaram níveis elevados de MCP-1 em cães com linfoma pré-tratamento. No presente estudo, observamos somente que, consoante aos dados de Perry, o grupo controle manteve seus valores semelhantes, mas sem diferença significativa com o grupo linfoma ao diagnóstico e 6ª semana.

Em um estudo conduzido por Luciani, 1998, detectou-se a expressão de MCP-1 em 23 de 24 casos de linfoma de Hodgkin. O autor associou a MPC-1 como fator determinante no padrão inflamatório da doença de Hodgkin e essa interpretação foi fundamentada pela observação de elevações nos níveis dessa citocina, que induziria também ativação do endotélio vascular, entretanto, esse estudo constatou a expressão de MPC-1 nos tecidos e não a concentração sérica. Valkovic, 2010, analisou a habilidade do linfoma não-Hodgkin em produzir mRNA MCP-1 e constatou que a maioria dos casos agressivos de linfoma não-Hodgkin demonstrou forte marcação citoplasmática, mas o mecanismo pelo qual a MCP-1 influencia na patogenia dos linfomas não está esclarecido. Embora os dois estudos, em tempos e com técnicas diferentes tenham resultado na mesma observação, não é possível ainda associar os níveis séricos de MCP-1 a alterações específicas da evolução do linfoma-não Hodgkin.

Neste estudo, embora não tenham sido observadas diferenças significantes nas concentrações de MCP-1, a taxa MCP-1: IL-10, consideradas as medianas das duas citocinas, apresentou-se alterada. Isso pode ser fundamentado pelo aumento das concentrações de IL-10 ao diagnóstico, pois sabe-se que a IL-10 pode diminuir os níveis de MCP-1 (PERRY, 2010). Embora o TNF- α tenha a capacidade de elevar as concentrações de MCP-1, os animais estudados apresentaram baixas concentrações de TNF- α , sendo assim, não haveria também essa contribuição ao aumento das concentrações de MCP-1.

7 CONCLUSÕES

Considerando a metodologia aplicada neste estudo, foi possível concluir que em cães com linfoma multicêntrico:

- as concentrações de IL-2 encontram-se baixas ao diagnóstico e assim se mantêm na fase inicial do tratamento;
- as concentrações de IL-6 foram significativamente menores ao diagnóstico quando comparados ao controle e assim se mantiveram na fase inicial do tratamento;
- as concentrações séricas de IL-10 mostraram-se aumentadas significativamente no grupo linfoma ao diagnóstico quando comparada ao grupo controle, contudo seus níveis mantiveram-se elevados na 6ª semana de tratamento;
- as concentrações de TNF- α e de MCP-1 não apresentaram diferença significativa na comparação entre os grupos linfoma ao diagnóstico e controle, bem como entre o diagnóstico e a 6ª semana de tratamento.

7.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A classificação imunomorfológica dos linfomas caninos é feita através da técnica de imunoistoquímica, utilizando-se marcadores celulares específicos, que é considerado o “padrão ouro” para a fenotipagem dos linfomas e o ideal para a classificação dessa neoplasia. Contudo, devido ao tipo de rotina de atendimento não foi possível realizar a biópsia de linfonodos e optou-se pela realização da técnica PCR (*Polymerase chain reaction*) como alternativa. Entretanto, não foi possível a padronização da técnica. Os dados sobre o que foi realizado na tentativa de padronização encontram-se nos anexos.

Considerando a importância das citocinas nas respostas imunológicas, mais estudos que correlacionem os níveis alterados dessas moléculas com o fenótipo das células envolvidas no linfoma se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

BALKWILL, F. TNF-alfa in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v.25, n. 3, p. 409-416, 2006.

Balkwill, F. Tumor necrosis factor and cancer. **Natures Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-371, 2009.

BLAY, J.Y., BURDIN, N., ROUSSET, F., LENOIR, G., BIRON, P., PHILIP, T., BANCHEREAU, J., FAVROT, M Serum Interleukin-10 in Non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. **Blood**, v. 82, n. 7, p. 2169-2174, 1993.

BROOKE, L.; FOWLER, S. M. A., A. E. DeClue.; B.L. Fowler. Blunted pathogen-associated molecular pattern motif induced TNF, IL-6 and IL-10 production from whole blood in dogs with lymphoma . **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, p. 167–171, 2011.

CÁPUA, M. L. B. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1245-1251, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/1649>>. Acesso em: 25 fev. 2016

CHAMMAS, R. ; SILVA, D. C. P. ; WAINSTEIN, A. J. A. ; Abdallah, K.A.. Imunologia clinica das neoplasias. In: VOLTARELLI, J. C.; DONADI, E.A.; CARVALHO, I. F. de; ARRUDA, L. K.; LOUZADA JR, P.; SARTI, W. (Org.). **Imunologia clinica na prática médica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009. p. 447-460.

correlates with CD25 expression in patients with T lymphoblastic lymphoma

COSTA, M. R. P. Fator de necrose tumoral: um novo paradigma. **Revista Médica Ana Costa**, v. 10, n. 4, p.1-7, 2005.

COZEN, G. O.; INGLES, A. S; MASOOD, R; MARTINEZ-MAZA, O.; COCKBURN, M.G. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.103, p.3216-3221, 2004

DESHMANE, S. L., KREMLEV, S., AMINI, S., SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 29, p. 313–326, 2009.

EL FAR, M.; FOUDA, M.; YAHYA, R.; EL BAZ, H. Serum IL-10 and IL-6 levels at diagnosis as independent predictors of outcome in non-Hodgkin's lymphoma. **Journal of Physiology and Biochemistry**., v. 60, n. 4, p. 253-258, 2004

FAN, T. M. Lymphoma updates. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 33, n. 3, p. 455-471, 2003.

FIGHERA, R. A. **Leucemia em medicina veterinária**. Santa Maria: O autor, 2000. Cap.6, p.32-38.

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

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

GILBERT, L. A.; HEMANN, M. T. Context-specific roles for paracrine IL-6 in lymphomagenesis. *Genes & Development*, v. 26, n. 15, p. 1758-1768, 2012.

HAHN, K. A.; HAHN K. A.; RICHARDSON, R.C.; TECLAW, R. F.; CLINE, J.M.; CARLTON, W. W.; DENICOLA, D. B.; BONNEY, P. L. Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma?. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, n. 1, p. 3-10, 1992.

JACOBS, R. M.; MESSICK, J. B.; VALLI, V. E. Tumors of hemolymphatic system. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4 ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 33-34.

Lejeune, F.J.; Ruegg, C.; Lienard, D. Clinical applications of TNF-a in cancer. *Current Opinion in Immunology*, v. 10, n. 5, p. 573-580, 1998.

LICHTENSTEIN, A. Anemia in lymphoma: interleukin-6, hepcidin and erythropoietin **Leukemia & Lymphoma**, v. 55, n. 2, p. 231–232, 2014.

LUCIANI, M. G.; STOPPACCIARO, A.; PERI, G.; MANTOVANI, A.; RUCO, L. P. The monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and interleukin 8 (IL-8) in Hodgkin's disease and in solid tumours, *Molecular Pathology*, v. 51, p. 273–276, 1998.

MERLO, A. Estudos das concentrações séricas de proteína-C reativa e amilóide A em cães com linfoma submetidos à quimioterapia [Serum concentrations of C-reactive protein and amyloid A in dogs with lymphoma submitted to chemotherapy]. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MEUTEN, D. J.; ARMSTRONG, P. J. Moléstias da paratiróide e metabolismo do cálcio. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3.ed. São Paulo : Manole, 1992. Cap.94, p.1683-1705.

MITELMAN, A. K.; BUCCHERI, V.; PRACCHIA, L. F.; RUBENS, C. V., POPPE, S.; CAVALCANTE, A. M. M. P.; MONTEIRO, S. M.. Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.31, n. 4, p. 260-266, 2009.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F. M.; YOUNG, H. A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 5, p. 1043-1051, 2005.

MORRISON, W. B. **Lymphoma in dogs and cats**. Jackson: Teton NewMedia, 2005. 124p.

MOULTON, J. E., HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Los Angeles : University of California, 1990. Cap. 6, p.231-307.

NAOUM, P. C. Avanços Tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, n. 2, p. 20,. 2001.

NAOUM, P. C. **Citocinas e interleucinas**. São José do Rio Preto: Academia de Ciencia. e Tecnologia. de São José do Rio Preto, 2009.

of malignancy and presence of constitutional symptoms. **Acta Oncologica**, v. 29, n. 5, p. 581-583, 1990. DOI:10.3109/02841869009090055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2206570> >. Acesso em: 15/01/15.

POPPEMA, S. Immunology of Hodgkin's disease. *Baillière's Clinical Haematology*, v. 9, n. 4, p. 447-457, 1996.

PROOST, P. Monocyte chemotactic proteins 1, 2 and 3. In: MIRE-SLUIS, A. R; THORPE, R. **Cytokines**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 489-501.

REYNOLDS G. M; BILLINGHAM, L. J.; GRAY, L. J.; FLAVEL , J.R.; NAJAFIPOUR, S.; CROCKER, J. Interleukin 6 expression by Hodgkin/Reed-Sternberg cells is associated with the presence of 'B' symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease. **British Journal of Haematology**, v. 118, p. 195-201, 2002.

RICHARDS, C. D. Interleukin-6. In: MIRE-SLUIS, A. R; THORPE, R. **Cytokines**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 87-92.

ROSENTHAL, R. C. The treatment of multicentric canine lymphoma. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.20, n.4, p.1093-1104, 1990.

SCHOTTENFELD. D; BEEBE-DIMMER, J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 56, n. 2, p. 69-83, 2006.

SEYMOR, J.F.; TALPAZ, M.; HAGEMEISTER, F. B.; CABANILLAS, F.; KURZROCK, R. Clinical correlates of elevated levels of interleukin-6 in patients with untreated Hodgkin's disease. **American Journal of Medicine**, v. 102, p. 21-28, 1997.

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

STASI, R.; ZINZANI, P. L.; GALIENI, P.; LAUTO, V. M.; DAMASIO, E.; DISPENSA, E.; DAMMACCO, F., PAPA, G. ;TURA, S. Prognostic value of serum IL-10 and soluble IL-2 receptor levels in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology*, v.88, n. 4, p. 770-777, 1994.

- SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L., ROCHA, N. S.; PESSOA, A. W. P. Classificação citológica dos linfomas caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 47-54, 2010.
- TANGEN, J. M.; ABRAHAMSEN, A. F.; OSTENSTAD, B.; BERGHEIM, J. Interleukin-2 receptor levels in Non-Hodgkin's lymphoma correlation to histological degree
- TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 4, p. 209-216, 1994.
- THORPE, R. Interleukin-2. In: MIRE-SLUIJS, A. R.; THORPE, R. **Cytokines**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 19-23.
- TIZARD, Ian. R. Como se inicia a inflamação. In: **Imunologia Veterinária**. 8 ed. Texas: Texas A&M University, 2008. p. 22.
- TOJI, T.; TAKATA, K.; SATO, Y.; TAKATA, T. M. HAYASHI, E.; HABARA, T.; MAEDA, Y.; TANIMOTO, M.; YOSHINO, T. Serum level of soluble interleukin-2 receptor
- TRINCHIERI, G. Inflammation. In: DEVITA JR., V.T.; LAWRENCE, T.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 193-202.
- VAIL, D. M. Hematopoietic tumors. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. p. 507-523.
- VAIL, D. M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 4 ed. Canada: Saunders Elsevier, 2007. p. 699-733.
- VAIL, D. M.; MACEWEN, E. G., YOUNG, K. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G., ed. **Small Animal Clinical Oncology**, 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 558-590.
- VALKOVIC, T.; TIFTER, A. D. N. I.; HASAN, M.; ISEJDIC, I. H.; ZOMBORI D.; GRAHOVAC, B. Macrophage chemotactic protein-1 mRNA levels in non-Hodgkin lymphoma. *Clinical and Experimental Medicine*, 10:229-235, 2010.
- VAN FURTH R. COHN Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 128, p.415-435, 1968.
- VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. *Annual Review of Immunology*, v. 8, n. 1, p. 253-278, 1990.
- VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, jul-ago.2001.
- VIRJI, M. A.; MERCER, D. W.; HERBERMAN, R. B. Tumor markers in cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Journal for Clinicians**,. v. 38, n. 2, p. 104-126, 1988.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n.1, 2007.

WAGNER, D. K.; KIWANUKA, J.; EDWARDS, B. K.; RUBIN, L. A.; NELSON, D. L.; MAGRATH, I. T. Soluble interleukin-2 receptor levels in patients with undifferentiated and lymphoblastic lymphomas: correlation with survival. *Journal of Clinical Oncology*, v. 5, n. 8, p. 1262-1274, 1987.

WAGNER, D. K.; KIWANUKA, J.; EDWARDS, B.K.; RUBIN, L. A.; NELSON, D. L.; MAGRATH, I. Soluble Interleukin-2 Receptor Levels in Patients With Undifferentiated and Lymphoblastic Lymphomas: Correlation With Survival. **Journal of Clinical Oncology**, Vol 5, No 8 (August), pp 1262-1274, 1987.

WELLMAN, M. L. Neoplasia hematopoética e linfóide. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1996. p. 745-747.

WILCOCK, B.P., YAGER, J.A. The behavior of epidermotropic lymphoma in 25 dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v.30, p.754-759, 1989.

ZHANG,L.; YANG,J.; QIAN,J.; LI,H.; ROMAGUERA, J. E.; KWAK,W. K.; WANG. M.; YI, Q.. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. **Blood**, v. 120, p. 3783–3792, 2012.

ANEXO A – Quadro 2 – Valores individuais relativos aos hemogramas do grupo controle - São Paulo – 2016

Animal	Hg (g/dL)	Ht (%)	Plaqx10(3) (/ul)	Leuco (ul)	Neutro (ul)	Linfo (ul)	Mono (ul)	Eosi (ul)
1	18,6	55,4	288	8,8	6072	1232	440	1056
2	15,7	45,7	273	10,6	7102	2438	424	530
3	19	56,7	289	9,2	5336	2576	368	920
4	16,3	48,2	356	9,7	5723	2910	388	679
5	15,8	47,3	237	8,1	5184	2106	243	567
6	20,5	59,3	176	8	5200	1760	240	800
7	15,5	46,3	494	20,4	15300	3060	816	1224
8	16,7	49,3	282	9	5220	2430	270	1080
9	15,5	45,8	219	12,7	6223	4953	762	762
10	17,4	49,2	261	11,8	6490	3186	590	1534
11	17,6	50,5	244	8,2	5576	1558	902	164
12	17,8	53,1	286	12	6360	3360	720	1560
13	17,2	49	302	10,6	6678	2120	530	1272
14	15,7	45,3	284	9	4140	2160	270	2430
15	15,9	47,4	286	10,2	6426	2754	306	714
16	16,9	48,2	310	14,4	9936	2448	720	1296
17	16,7	49,3	353	16.900	10309	2366	676	3549
18	15,8	45,3	265	10.900	7521	2289	436	654
19	16,9	49,2	357	15.700	11147	3140	785	628

Quadro 3- Valores individuais relativos aos bioquímicos do grupo controle – São Paulo- 2016

Animal	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Pt tt (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/l)	FA (U/l)	Calcio ionico (mg/dL)
1	35,7	1,07	7,27	4,09	34,2	23,9	1,3
2	47,2	1,05	7,28	3,19	18,1	11,8	1,4
3	39,6	0,89	7,05	3,88	23,7	24,1	1,3
4	47,1	1,17	7,25	3,86	20,1	9,2	1,3
5	36,4	0,93	6,38	3,6	35,1	36,1	1,3
6	54,4	1,31	7,22	3,83	44,1	13,9	1,33
7	43,1	1,03	8,42	3,21	21,9	33,7	1,2
8	30,6	0,88	6,46	3,77	91,8	21,2	1,2
9	33,9	1,15	7,84	4,7	23,2	61,5	1,3
10	28,6	1,12	7,63	4,43	70,4	12,2	1,3
11	31,5	1,03	6,52	3,83	28,3	30,3	1,3
12	36,1	0,91	7,05	4,13	30	25,1	1,3
13	50,3	1,29	7,7	3,6	37	13,9	1,4
14	37,4	1,05	8,72	3,41	18,4	28	1,4
15	55,1	1,26	8,22	3,31	27	17	1,3
16	47,5	1,1	7,16	3,33	18,5	7,7	1,3
17	34,8	0,96	7,06	3,97	9,3	16,2	1,4
18	39,7	1,17	6,77	3,55	28,1	22,1	1,25
19	22,6	1,03	6,14	3,56	23,2	37,3	1,34

ANEXO B – Quadro 4 – Valores individuais relativos aos hemogramas do grupo experimental previamente à quimioterapia - São Paulo – 2016

Animal	Hg (g/dL)	Ht (%)	Plaqx10(3) (/ul)	Leuco (ul)	Neutro (ul)	Linfo (ul)	Mono (ul)	Eosi (ul)	Linfo atip (ul)
1	11,9	35	108	12900	8772	3096	258	774	
2	18,8	58	196	19600	15288	784	3528		
3	12,7	37	240	4900	3136	1078	588	98	
4	13,7	43	291	15600	13104	1872	624		
5	15,6	44	203	9700	7372	1164	388		
6	11,3	32	281	18300	14274	1464	1464		
7	15,8	45	326	10900	8284	1744	436	436	
8	13,8	39	154	5700	4389	798	513		
9	19,1	57	326	6000	4080	1440	240	240	
10	15	42	181	18600	3348	3348	372		
11	12,4	40	433	17500	14700	1400	700	700	
12	13,7	43	167	10400	8320	624	1040	416	
13	10,4	30	343	9760	7610	1540	380	210	
14	10,9	33	70	9000	7290	990	720		
15	17,1	48	247	19070	8050	9630	510	760	
16	15,5	46	140	17200	8084	4300	1548		3268
17	20,8	59	211	13450	7370	4800	630	450	
18	15,2	48	400	10.500	7245	2520	2520	315	
19	12,5	38	301	22.590	17690	3300	1390	140	
20	14,7	41	249	9050	4880	3210	300	620	

Quadro 5 – Valores individuais relativos aos hemogramas do grupo experimental na 6ª semana de tratamento - São Paulo – 2016

Animal	Hg (g/dL)	Ht (%)	Plaqx10(3) (/ul)	Leuco (ul)	Neutro (ul)	Linfo (ul)	Mono (ul)	Eosi (ul)
1	12,3	34	183	9600	8256	480	672	192
2	15,1	45	243	8530	6490	1200	320	490
3	15	44	248	13470	7990	4740	430	370
4	11,1	32,1	723	5100	3519	306	1224	51
5	12,2	38	408	6000	4080	840	960	120
6	10,1	30	125	4800	3840	768	192	
7	12	34	306	10800	7992	1188	864	756
8	12	35	439	3300	1320	1452	528	
9	15,5	48	253	5420	3580	1180	402	200
10	11,3	33,6	341	33300	25308	5661	1332	333
11	11,1	35	454	16530	12890	1760	1150	680
12	11,9	35	370	10300	7416	1854	412	618

13	13,8	40	263	4300	3100	780	290	110
14	12,9	38	532	21010	18290	1830	760	100
15	16,2	49	25	33200	5644	26560	332	662
16	14,1	44	200	25200	12600	11592	1008	
17	14,1	43,8	211	11000	3410	3960	3630	
18	7,6	49	368	10.830	7880	2040	450	420
19	12,9	38	531	14.670	11570	2020	820	210
20	7,7	50	344	7920	5290	1910	250	420

Quadro 6 – Valores individuais relativos aos exames bioquímicos e cálcio ionizado do grupo experimental prévio à quimioterapia - São Paulo – 2016

Animal	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	PT (mg/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Cálcio ion.
1	36	0,99	7	2,2	20,5	71,2	1,3
2	34,5	0,88	13,2	2,9	13,2	8,6	1,3
3	39,7	1	5,8	3,2	22,8	14,8	1,4
4	33	0,71	6	3	14,8	84,8	1,3
5	39,4	0,76	5,9	3,6	77,3	68,1	1,3
6	52,7	1,09	5,74	3,32	30,3	255,1	1,4
7	29,6	0,86	5,8	2,9	19,6	39,8	1,4
8	61,2	0,65	4,6	2,8	41,2	363,7	1,3
9	17,6	0,63	6,1	3,2	42	21,1	1,3
10	32,8	1	5,1	3	43	14,9	1,4
11	30,3	0,89	5,5	2,7	29,5	16,3	1,3
12	52,9	1,3	5,5	2,6	24,1	22,6	1,3
13	33,3	0,67	6,6	3,1	12,3	34,5	1,3
14	39,8	0,8	6,4	4,1	25,6	36,6	1,3
15	39,6	1	8,9	0,32	19,3	32	1,3
16	34,3	0,94	5,5	2,4	26,3	18,6	1,3
17	29,9	1,2	7,5	3,8	31	23,6	1,3
18	54,8	0,82	7,2	4,1	49,1	24,1	1,3
19	23,7	1	6,5	3	21,5	39,2	1,25
20	42,2	0,86	6,9	3,7	72,2	26,1	1,42

Quadro 7 – Valores individuais relativos aos exames bioquímicos e cálcio ionizado do grupo experimental na 6ª semana de tratamento - São Paulo – 2016

Animal	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	PT (mg/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Cálcio ion.
1	55,2	1,2	6,1	2,6	29,4	56,2	1,3
2	64,9	1	7	3,4	32,2	30,6	1,4
3	29,5	8	7,1	3,6	32,2	96,6	1,3
4	22,7	0,77	5,8	3,4	31,8	44,2	1,3
5	40,1	0,89	5,2	2,4	17,8	53,7	1,3
6	59,3	1	5,9	2,6	37	28,3	1,3
7	60,2	1	5,7	2,6	24,5	18,6	1,3
8	77,8	1,7	6,3	3,5	35,2	324,9	1,3
9	34	1	6,1	2,9	31,3	21,7	1,3
10	66,3	1,25	5,78	2,71	26,5	29,2	1,3
11	29,8	0,59	4,5	2,5	30,3	118,8	1,3
12	69,6	1,3	8,5	3,8	28,1	126,9	1,4
13	40,5	0,74	6,4	3,6	31,4	28,9	1,3
14	19,5	0,65	7,5	4,6	28,6	28,8	1,3
15	29,4	1,1	7,8	2,6	15,2	29,8	1,3
16	30,6	0,82	6,5	3,7	16,2	64,4	1,3
17	18,6	0,89	6,3	3,5	16,9	86	1,4
18	58	0,76	6,9	4,1	22,9	22,6	1,4
19	50,1	1	5,9	3,3	39,3	32,2	1,3
20	37,2	0,88	6,5	4,4	52,3	14,1	1,3

4.1 COLETA DE MATERIAL PARA PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA FENOTIPAGEM DOS LINFOMAS

Para a padronização da técnica de PCR para fenotipagem dos linfomas a fim de se obter um método diagnóstico mais rápido e menos invasivo, foram coletados 2 linfonodos de 2 animais com diagnóstico de linfoma confirmados por exames histopatológico e avaliação imunohistoquímica, apresentando imunoexpressão de CD79a e CD20 ou CD3 padrão regional, sendo imunofenótipos B e T, respectivamente. Essas avaliações foram realizadas no Laboratório VetPat, Campinas, SP. Parte dos mesmos materiais enviados para análise imunohistoquímica foi utilizada na realização da PCR para posterior comparação dos resultados.

Por meio de maceração do linfonodo obtido por biópsia, adquiriu-se material para armazenamento em solução de estabilização e proteção do RNA (RNAlater – Applied Biosystems®) e nele foi mantido até sua utilização, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal- FMVZ-USP.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Adicionou-se 100 µL da amostra com RNA later, centrifugou-se a 5.000G em temperatura ambiente durante 10 minutos até formação do pelet. A solução sobrenadante de RNA later foi descartada e então, adicionado 200 µL de PBS e então, obedeceu-se o protocolo segundo orientação do fabricante.

- *Lise*

Adicionou-se 25 µL de proteinase K na concentração de 20 mg/ml e em seguida, acrescentou-se 200 µL de buffer de lise. A amostra foi incubada a 56°C por 15 minutos e posteriormente, centrifugada em temperatura ambiente (22°C).

- *Binding e washing*

Adicionou-se 250 µL de etanol absoluto no tubo lisado e foi incubado durante 5 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi transferida com etanol no tubo com coluna e centrifugada durante 1 minuto a 7.000 G em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e foi realizada a troca do tubo coletor. Adicionou-se 500 µL de *wash buffer* e centrifugado a 7.000G por 1 minuto, descartado o

filtrado, sem fazer o descarte do tubo e então realizada novamente a lavagem com 500 µL de *wash buffer* com etanol na coluna. Centrifugado novamente a 7.000 G durante 1 minuto. Descartado o tubo com o filtrado, foi inserido um tubo novo na coluna e centrifugado a fim de que secasse a membrana completamente. Descartado o tubo com o filtrado.

- Eluição

A coluna foi mantida e inserida no tubo de recuperação. Adicionou-se 50µL de água RNase free (E3) no centro da coluna. Incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e então, a coluna foi centrifugada em velocidade máxima durante 1 minuto.

Após essas etapas da extração, as amostras foram mantidas em Eppendorfs a temperatura de -22°C.

A integridade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose de alta resolução, a 1% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV.

As concentrações das amostras de RNA foram determinadas utilizando-se o NanoDrop™.

4.2 PRIMERS

Os primers a seguir representam alguns dos utilizados nas tentativas de padronização da técnica PCR. A imagem referente à reação encontra-se na sequência.

Linfoma T: TCRa_F e TCRa_R1 (reação T1)
 TCRa_F e TCRa_R2 (reação T2)
 TCRa_F, TCRa_R1 e TCRa_R2 (reação 3)

Linfoma B:
 Reação CBmaior: CBmaior_F e CBmaior_R
 Reação CBmenor: CBmenor_F e CBmenor_R

Figura 1- PCR para fenotipagem de linfoma B (colunas 1 a 9) ou T (colunas 11 a 15). Números 10 e 16 representam os controles. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado pelo Sybr safe (Invitrogen®) e marcador de tamanho molecular GeneRuler 100bp ladder (ThermoFisher). Seta indica fragmento de aproximadamente 90bp (T) e 120bp (B)

FONTE: PAVAN, 2014.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da IL-2 no grupo linfoma.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da IL-6 no grupo linfoma.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da IL-10 no grupo linfoma.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da MCP-1 no grupo linfoma.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação do TNF α no grupo linfoma.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da IL-2 no grupo controle.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da IL-6 no grupo controle.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da IL-10 no grupo controle.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação da MCP-1 no grupo controle.

Figura representando curvas padrão e coeficientes de variação do controle de qualidade dos testes para determinação do TNF- α no grupo controle.