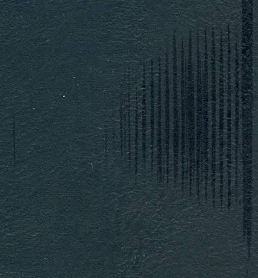
LUCAS CAMPOS DE SÁ RODRIGUES

Estudo da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas ABCB1, ABCC1 e ABCG2 em cães com linfoma multicêntrico, submetidos a três diferentes protocolos de tratamento antineoplásico



São Paulo
2010

LUCAS CAMPOS DE SÁ RODRIGUES

Estudo da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas ABCB1, ABCC1 e ABCG2, em cães com linfoma multicêntrico, submetidos a três diferentes protocolos de tratamento antineoplásico

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas

São Paulo

2010

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.2399
FMVZ

Rodrigues, Lucas Campos de Sá
Estudo da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas ABCB1, ABCC1 e ABCG2, em cães com linfoma multicêntrico, submetidos a três diferentes protocolos de tratamento antineoplásico / Lucas Campos de Sá Rodrigues. -- 2010.
146 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas.

1. Cães. 2. Linfoma. 3. ABCB1. 4. ABCC1. 5. ABCG2 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 "Estudo da expressão de genes de resistência a múltiplas drogas em três diferentes protocolos quimioterápicos antineoplásicos para tratamento do linfoma canino", protocolado sob o nº 1971/2010, utilizando 30 (trinta) cães, sob a responsabilidade da 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 29/09/2010.

We certify that the Research "Study of multiple drug resistance gene expression in three different protocols for canine lymphoma treatment", protocol number 1971/2010, utilizing 30 (thirty) 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 09/29/2010.

São Paulo, 22 de outubro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Lucas Campos de Sá

Título: Estudo da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas ABCB1, ABCC1 e ABCG2, em cães com linfoma multicêntrico, submetidos a três diferentes protocolos de tratamento antineoplásico

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Celso e Norma, por acreditarem que o sonho de um menino de "cuidar de bichos" pudesse se tornar uma profissão tão prazerosa e gratificante e, por me darem condição para continuar estudando, com intuito de ajudar criaturas que nos ensinam dia-a-dia o verdadeiro valor da amizade, fidelidade e amor incondicional.

Aos meus avós, Francisco (in memoriam) e Norma, Oswaldo e Dada pelo exemplo de dignidade, perseverança e honestidade em toda vida.

A todos meus pacientes que contribuiram com a realização desse trabalho. Espero ter retribuido, embora com pouco, mas com muita dedicação, promovendo qualidade de vida e dignidade até o final.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas pela oportunidade de realizar esse projeto de pesquisa e, principalmente, pela oportunidade de ajudar os animais doentes. O desenvolvimento de pesquisa na área de oncologia clínica veterinária cria uma esperança para muitos proprietários que, desejam a todo custo, curar e ajudar seus animais. Sinto-me honrado por participar da sua equipe.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski pela disposição em ajudar a realizar esse trabalho.

Agradeço imensamente a toda ajuda e ensinamentos da Débora Levy, desde o início até o último segundo da realização desse projeto. Sem você, o trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson na qualidade de coordenador da Comissão de Pós-Graduação do Programa de Clínica Veterinária, que liberou a verba PROAP paras as despesas com compra de reagentes e kits de análises.

Aos pós-graduandos Thais Macedo, Tatiana Pavan, Valter Winkel, Rodrigo Ubukata, Camila Ferrreiro Pinto pelo cuidado e dedicação aos pacientes.

A equipe do Laboratório de Hematologia Molecular, LIM-31, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente a Linah Akemi Fukuya pelo armazenamento e processamento das amostras.

As Médicas Veterinárias do HOVET Denise Maria Nunes Simões, Vera Assunta Batisttini Fortunato Wirth, Khadine Kazue Kanayama, Paula Rumy Gonçalves Monteiro e Bruna Maria Pereira Coelho, pela triagem e assistência aos tratamento dos pacientes.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela processamento das amostras dos animais, sempre agilizando os resultados de exames e cooperando para o andamento dos casos.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Costa Nascimento da FEG-UNESP e Medicina-UNITAU pela ajuda nas análises estatísticas, e por todo os ensinamentos.

A minha irmã Beatriz e meu irmão Marcos por estem sempre presentes.

A Poliana Claus que sempre esteve do meu lado, entendendo minha dedicacão profissional.

Aos meus tios, tias e “agregados” por todo o suporte, e por sempre me apoiarem.

Aos meu amigos que me proporcionaram diversão e muitas risadas quando precisava.

A equipe de Médicos Veterinários e colaboradores do Estima Hospital Veterinário e Pet&Cia – Saúde Animal, que entenderam o tempo de dedicação aos estudos, e me ajudaram nas conquistas profissionais.

RESUMO

RODRIGUES, L.C.S. **Estudo da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas ABCB1, ABCC1 e ABCG2, em cães com linfoma multicêntrico, submetidos a três diferentes protocolos de tratamento antineoplásico.** [*Study of ABCB1, ABCC1, ABCG2 multidrug resistance gene expression in canine multicentric lymphoma, submitted to three different chemotherapy protocols*]. 2011. 146 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

Um dos principais desafios no tratamento quimioterápico em seres humanos e animais é a resistência que as células neoplásicas apresentam, sendo esse mecanismo responsável por falhas no tratamento e recidivas da doença. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida e ocorre em função da expressão de transportadores de membrana ABC, como a glicoproteína P (ABCB1/MDR), proteínas de resistência a múltiplas drogas (ABCC1/MRP) e proteína de resistência do câncer de mama (ABCG2/BCRP). O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum em cães, altamente responsiva à quimioterapia, mas que recidiva durante o tratamento antineoplásico, sendo a resistência das células neoplásicas aos quimioterápicos um fator responsável pela alta taxa de recidiva e óbito dos animais. Neste estudo avaliou-se a expressão de genes relacionados à resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma, no diagnóstico e na recidiva da doença, em três diferentes protocolos quimioterápicos utilizados na rotina clínica. A expressão dos genes ABCB1, ABCC1, ACBG2 foi determinada por RT-PCR (PCR em tempo real) em 25 animais naturalmente acometidos pela doença, divididos aleatoriamente em 3 grupos tratados com os protocolos quimioterápicos COP, VCM e Short-Madison, além de um *“pool”* controle constituído por linfonodos normais de oito animais. A expressão dos genes foi detectada em todas as amostras, tanto de linfonodos normais quanto de animais com linfoma. No diagnóstico da doença, a expressão do gene ABCC1 foi relacionada negativamente com idade (p=0,008) e positivamente com duração da remissão (p=0,027) e sobrevida (p=0,007), entretanto para os genes ABCB1 e ABCG2 não houve diferença estatística significante. Na recidiva, a expressão dos genes não sofreu variação estatística significante em função do tipo e duração da remissão e sobrevida. Não houve variação na expressão dos genes ABCB1, ACBC1 e ABCG2 no momento da recidiva quando comparado ao protocolo quimioterápico utilizado.

Palavras-chave: Cães. Linfoma. ABCB1. ABCC1. ABCG2

ABSTRACT

RODRIGUES, L.C.S. **Study of ABCB1, ABCC1, ABCG2 multidrug resistance gene expression in canine multicentric lymphoma, submitted to three different chemotherapy protocols.** [Estudo da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas, ABCB1, ABCC1 e ABCG2, em cães com linfoma multicêntrico, submetidos a três diferentes protocolos de tratamento antineoplásico]. 2011. 146 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

One of the main challenges of the chemotherapy treatment in human and animals is the resistance of the neoplasic cells, being this mechanism responsible for failures in the treatment and relapse of the disease. The resistance could be intrinsic or acquired and it occurs due to the expression of ABC membrane transporters, such as p-glycoprotein (ABCB1/MDR), resistance protein to multiple drugs (ABCC1/MRP) and resistance protein of breast cancer (ABCG2/BCRP). Lymphoma is the most common hematopoietic cancer disease in dogs, highly responsive to chemotherapy, but relapse during chemotherapy treatment, being the resistance of neoplastic cells to chemotherapy drugs the responsible factor for the high rate of relapse and death of animals. In this study, genes expression related to multiples drugs resistance it was evaluated in dogs with lymphoma, in the diagnosis and in the relapse of the disease in three different chemotherapy protocols used in the clinical routine. The genes expression ABCB1, ABCC1, ACBG2 was determined by RT-PCR (real time PCR) in 25 animals naturally undertaken by the illness, randomly divided into 3 groups treated with the chemotherapy protocols COP, VCM and Short-Madison, besides a *"pool"* control constituted by normal lymph node of eight animals. The genes expression was detected in all the samples, both in the normal lymph node and in the animals with lymphoma. In the diagnosis of the disease, the gene expression ABCC1 was negatively related with age (p=0,008) and positively with the duration of remission (p=0,027) and survival (p=0,007); however, for ABCB1 and ABCG2 there was no statiscally significant difference. In the relapse, the genes expression had no statiscally significant difference due to the type and duration of remission and survival. There was no variation in the genes expression ABCB1, ACBC1 and ABCG2 in the moment of relapse when compared to the chemotherapy protocol used.

Keywords: Dogs. Lymphoma. ABCB1. ABCC1. ABCG2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático das possibilidades de arranjo do transportador transmembrânico ABC. (A) *half transporter*com domínio transmembrânico contendo 6 α-hélices. (B) *half transporter* com domínio transmembrânico associado ao TAP contendo 9 α-hélices. (C) *full transporter* contendo dois domínios transmembranicos e 2 domínios de ligação com de nucleotídeo. (D) *full transporter* contendo três domínios transmembranicos (TMD0, TMD1, TMD2) e 2 domínios de ligação com de nucleotídeo (NBD1, NBD2). Extraído de Lage H. (2008)..... 46

Figura 2 - Construção de um modelo molecular do MDR/glicoproteína-P, demonstrando em 2 diferentes ângulos da proteína, as α- hélices estão numeradas de H1 a H12 e cada domínio representado por uma coloração diferente. Na imagem B, a porção extracelular que conecta a α- hélice transmembrânica 1-2 e 7-8 não foram demonstradas para facilitar a visualização. Extraído de Stenham et al., (2003)..... 48

Figura 3 - Diagrama esquemático mostrando a estrutura de diferentes transportadores ABC. Os transportadores MRP 1,2,3,6,7 apresentam 17 domínios transmembrânicos (TDM) distribuídos em 3 regiões MSD1, MSD2 e MSD0. A região MSD0 não esta presente nos transportadores MDR1 e 2 e MRP 4,5,8 e 9 e que apresentam 12 domínios transmembrânicos (TDM) (adaptado de KUO et al, 2009)..... 54

Figura 4 - A - Desenho esquemático do transportador ABC na membrana plasmática lipídica, a proteína contem 2 domínios transmembrânicos (TDM) e 2 domínios N-terminal para ligação do nucleotídeo (NBD). B - Desenho esquemático do transportados ABCG2 mostrando a estrutura definida como “half transporter” com seis segumentos transmembrânicos na camada bilipídica um domínio TDM e um domínio N-terminal (NBD) (Adapatado de CHOUDHURI et al., 2006)..... 57

Figura 5 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene ABCB1..... 91

Figura 6 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene ABCC1..... 92

Figura 7 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene ABCG2..... 93

Figura 8 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene do controle endógeno.. 94

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de duração da remissão (Kaplan-Meier) e valores de p (teste de log-rank) de cães com linfoma multicêntrico tratados com protocolos quimioterápicos COP, VCM e Madison - São Paulo- 2010..... 89

Gráfico 2 - Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de p (teste de log-rank) de cães com linfoma multicêntrico tratados com protocolos quimioterápicos COP, VCM e Madison - São Paulo – 2010..... 90

Gráfico 3 - Dispersão com relação à idade e expressão de ABCC1, nos casos de linfoma multicêntrico em cães, no momento do diagnóstico, em relação ao controle..... 100

Gráfico 4 - Dispersão com relação ao tempo de remissão e expressão de ABCC1, nos casos de linfoma multicêntrico em cães, no momento do diagnóstico, em relação ao controle..... 100

Gráfico 5 - Dispersão com relação à sobrevida e expressão de ABCC1, nos casos de linfoma multicêntrico em cães, no momento do diagnóstico, em relação ao controle..... 101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema de Estadiamento clínico para linfoma segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1980)..... 69

Quadro 2 - Doses dos antineoplásicos utilizados no protocolo de tratamento COP..... 74

Quadro 3 - Esquema do protocolo quimioterápico COP, utilizado para tratar cães com linfoma multicêntrico, atendidos na Oncologia Clínica no Serviço de Clínica Médica Clínica do Departamento de Clínica Médica – HOVET da FMVZ-USP..... 75

Quadro 4 - Doses de antineoplásicos utilizados no protocolo de tratamento VCM..... 76

Quadro 5 - Esquema do protocolo quimioterápico VCM, utilizado para tratar cães com linfoma multicêntrico, atendidos na Oncologia Clínica no Serviço de Clínica Médica – HOVET - FMVZ-USP..... 77

Quadro 6 - Doses de antineoplásicos utilizados no protocolo de tratamento Short-Madison..... 78

Quadro 7 - Esquema do protocolo quimioterápico Short-Madison, utilizado para tratar cães com linfoma multicêntrico, atendidos na Oncologia Clínica, no Serviço de Clínica Médica – HOVET - FMVZ-USP. 78

Quadro 8 - Genes estudados com número de catálogo disponibilizado pelo fabricante, Applied Biosystems..... 82

Quadro 9 - Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico segundo identificação (ID), definição racial, idade em anos, sexo, classificação citológica conforme Cowell, Dorsey & Meinkoth (2003) e estadio clínico - São Paulo – 2010..... 86

Quadro 10- Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico segundo identificação (ID), protocolo de tratamento utilizado, tipo de remissão, duração da remissão (dias) e sobrevida (dias) - São Paulo -2010..... 88

Quadro 11- Expressão de RNAm dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, para cães com linfoma multicêntrico. Modulação da expressão gênica na recidiva relacionada ao diagnóstico (REC/DIAG), modulação da expressão gênica no diagnóstico relacionada aos linfonodos normais (DIAG/CONT) e modulação da expressão gênica na recidiva relacionada aos linfonodos normais (REC/CONT) - São Paulo – 2010..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico, e verificação da homogeneidade de três diferentes protocolos quimioterápicos COP, VCM e Madison, segundo idade e sexo - São Paulo - 2010..... 87

Tabela 2 - Valores descritivos da expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 segundo média, dp, mediana, mínimo e máximo, para 25 cães com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2010..... 97

Tabela 3 - Valores descritivos da expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 segundo média, dp, mediana, mínimo e máximo antes do tratamento, relacionada ao controle, para 25 cães com linfoma multicêntrico, conforme estadiamente clínico - São Paulo - 2010..... 98

Tabela 4 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman das expressões dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, ao diagnóstico, segundo idade, tempo de remissão e sobrevida - São Paulo – 2010..... 99

Tabela 5 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman das expressões dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, antes do tratamento, segundo idade, tempo de remissão e sobrevida e protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo - 2010..... 103

Tabela 6 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, na recidiva em relação a expressão no diagnóstico - São Paulo – 2010..... 104

Tabela 7 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, no diagnóstico em relação a expressão dos genes no controle São Paulo – 2010..... 105

Tabela 8 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, após o tratamento em relação ao controle - São Paulo – 2010..... 106

Tabela 9 - Valores descritivos das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, modulação da expressão na recidiva comparada com o diagnóstico, em relação ao protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo – 2010..... 107

Tabela 10- Valores descritivos das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, modulação da expressão no diagnóstico comparada ao controle em relação ao protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo – 2010..... 108

Tabela 11- Valores descritivos das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, modulação da expressão na recidiva comparada com o controle, em relação ao protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo – 2010..... 109

LISTA DE ABREVIATURAS

β_2MG:	β_2-microglobulina
μl:	Microlitro
μM:	Micromolar
ABC:	ATP *binding cassette*
ABCB1:	ATP *binding cassete* B1
ABCC1:	ATP *binding cassete* C1
ABCG2:	ATP *binding cassete* G2
ALT:	Alanina aminotransferase
AST:	Aspartato aminotransferase
ATP:	Adenosina trifosfato
BCRP:	Gene da resistência a drogas relacionado ao câncer de mama
Ct	*Cycle threshold*
cDNA:	DNA complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
Dp	Desvio padrão
$E_2$17βG:	Estradiol-17-β-D-glucuronideo
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético
FM-USP:	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FMVZ-USP:	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FA:	Fosfatase alcalina
FLNB:	Gene Filamina B
g:	Grama

GSH:	Conjugado de glutationa
GSSG:	Glutationa oxidada
GS-X:	Transportador de conjugado de glutationa
kDa:	KiloDalton
LIM:	Laboratório de Investigação Médica
LTC4:	Leucotrieno C4
M:	Molar
MDR:	Resistência a múltiplas drogas
MDR1:	Resistência a múltiplas drogas 1
mg:	Miligrama
mg/Kg:	Miligramas por quilo
mg/m^2:	Miligramas por metro quadrado
MHz:	Megahertz
mm:	Milímetro
MRP:	Proteína associada a resistência a múltiplas drogas
NBD:	Domínios de nucleotide
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PAAF:	Punção aspirativa com agulha fina
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
P-gp:	P-glicoproteína
REAL:	*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*
RNA:	Ácido ribinucléico

RNAm:	RNA mensageiro
RT-PCR:	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TAP:	Glicoproteína transmembrânico
TMD:	Domínio transmembrânico
UV:	Ultravioleta
VCOG:	*Veterinary Cooperative Oncology Group*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 34

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 38

2.1 LINFOMA CANINO……..……...…..... 38

2.2 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS..... 43

2.3 ABCB1/MDR1/GLICOPROTEÍNA P..... 47

2.4 ABCC1/MRP..... 53

2.5 ABCG2/BCRP..... 56

2.6 AFINIDADE DOS TRANSPORTADORES ABC COM OS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS..... 59

2.7 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS NO LINFOMA CANINO 61

3 OBJETIVOS……..…… 64

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 66

4.1 CASUÍSTICA..... 66

4.2 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO..... 66

4.3 GRUPO CONTROLE..... 66

4.4 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS..... 67

4.5 DIAGNÓSTICO DO LINFOMA MULTICÊNTRICO..... 68

4.6 ESTADIAMENTO..... 68

4.7 EXAMES COMPLEMENTARES..... 70

4.7.1 Hemograma.……..... 70

4.7.2 Análises Bioquímicas..... 70

4.7.3 Urina I..... 71

4.7.4 Ultrassom abdominal..... 71

4.7.5 Exame radiográfico do tórax..... 71

4.7.6 Ecocardiograma..... 72

4.7.7 Mielograma..... 72

4.8 TRATAMENTO..... 73

4.8.1 Protocolo COP..... 73

4.8.2 Protocolo VCM..... 75

4.8.3 Protocolo Short-Madison..... 77

4.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO..... 79

4.10 COLETA DE MATERIAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ABCB1, ABCC1 E ABCG2 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO..... 80

4.11 EXTRAÇÃO DE RNA..... 81

4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES..... 82

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 83

5 RESULTADOS..... 85

5.1 CASUÍSTICA..... 85

5.2 RESPOSTA AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO..... 87

5.3 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DA PCR EM TEMPO REAL..... 91

5.3.1 ABCB1..... 92

5.3.2 ABCC1..... 93

5.3.3 ABCG2..... 94

5.3.4 Controle endógeno..... 95

5.4 EXPRESSÃO DOS GENES ABCB1, ABCC1 E ABCG2 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO..... 97

5.5 EXPRESSÃO DOS GENES ABCB1, ABCC1 E ABCG2 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO CANINO NA RECIDIVA, COMPARADA COM O DIAGNÓSTICO..... 102

5.6 RELAÇÃO DA EXPRESSÃO ENTRE OS GENES ABCB1, ABCC1 E ABCG2..... 104

6 DISCUSSÃO..... 111

7 CONCLUSÃO..... 124

REFERÊNCIAS..... 126

APÊNDICE..... 146

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas são comuns em seres humanos e animais e caracterizadas por apresentar alto índice de mortalidade entre os pacientes. A mortalidade está, na maioria das vezes, associada à falha na resposta terapêutica, resultando em recidivas e metástases. No tratamento oncológico, diversas modalidades terapêuticas são empregadas com o intuito de controlar a proliferação celular e conseqüentemente o avanço da doença, tais como cirurgia, quimioterapia antineoplásica, radioterapia, imunoterapia, terapia com alvos moleculares entre outros. A quimioterapia se destaca dentre essas modalidades, por ter ampla ação em todo o organismo controlando não somente as recidivas locais como também as possíveis metástases à distância, comuns nos processos malignos. Entretanto, o sucesso do tratamento antineoplásico é individual e varia de forma intensa entre os pacientes.

Para otimizar a resposta individual ao tratamento oncológico é importante compreender os mecanismos moleculares inerentes à ação dos quimioterápicos e as alterações intracelulares que ocorrem nas células neoplásicas durante o tratamento. Atualmente, existe um consenso entre os oncologistas, de que a principal causa de falha na resposta à quimioterapia está associada a resistências das células neoplásicas aos agentes antineoplásicos, o que representa uma das barreiras mais significativas ao tratamento efetivo das neoplasias malignas em seres humanos e nos animais.

A célula neoplásica pode apresentar resistência prévia ao tratamento antineoplásico ou ainda, pode adquirir essa resistência durante o tratamento. Entende-se por resistência ao tratamento quimioterápico, os vários mecanismos que a célula neoplásica desenvolve para impedir a ação citostática ou citotóxica dos fármacos. A resistência tumoral aos antineoplásicos, seja primária ou adquirida, explica a resposta individual ao tratamento e falhas terapêuticas.

Na medicina veterinária, a quimioterapia antineoplásica é amplamente utilizada com objetivos diferentes, mas sempre com o intuito de aumentar a

sobrevivência dos pacientes e melhorar a qualidade de vida nos animais. Os objetivos que justificam a utilização dessa modalidade terapêutica incluem controlar a recidiva local, a disseminação de metástases e promover remissão total ou parcial da doença.

Uma das formas já estabelecidas para evitar a resistência que as células neoplásicas desenvolvem aos agentes antineoplásicos é associar no protocolo de tratamento, fármacos que tenham mecanismos de ação diferentes. Os quimioterápicos podem agir impedindo a proliferação celular ou causando a morte das células neoplásicas e ainda, podem agir em fases específicas ou de forma inespecífica no ciclo celular. Dessa forma, os protocolos quimioterápicos são elaborados com o intuito de associar várias medicações, com diferentes mecanismos de ação de forma a aumentar a reposta terapêutica.

Porém, essa estratégia, isoladamente, não é capaz de impedir o desenvolvimento de resistência tumoral, pois as células neoplásicas podem desenvolver resistência simultaneamente a vários agentes antineoplásicos, evitando assim seus efeitos citotóxicos ou citostáticos. Esse fenômeno é conhecido como resistência pleotrópica ou resistência a múltiplas drogas (MDR).

Os mecanismos que permitem que a célula neoplásica adquira essa resistência ao tratamento quimioterápico podem estar associados ao aumento da expressão de transportadores transmembrânicos, que acabam por levar ao efluxo dos quimioterápicos, diminuindo a concentração intracitoplasmática dos fármacos. Ou ainda, a modificação da afinidade dos sítios de ação dos quimioterápicos nas células alvo. Além disso, as células neoplásicas podem aumentar o mecanismo de reparo do DNA, inativando os danos provocados pelos antineoplásicos às células e alterar o mecanismo de morte celular programada.

A resistência a múltiplas drogas é um problema muito freqüente nos animais com linfoma e, embora muitos protocolos quimioterápicos tenham sido estudados para controlar a doença, a duração da remissão e a sobrevida são curtas para muitos pacientes, mesmo para aqueles que apresentam remissão total da doença no início do tratamento.

O estudo da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas no linfoma canino pode permitir melhor compreensão do fenômeno de resistência quimioterápica a ser aplicado tanto em benefício dos animais, quanto como modelo de estudo para o linfoma não Hodgkin humano. O estudo de expressão gênica abre precedente para futuros estudos de inativação desses genes com o intuito de melhorar a resposta ao tratamento clínico dos pacientes.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LINFOMA CANINO

Dentre as neoplasias malignas do cão tratadas primariamente com agentes antineoplásicos, o linfoma é considerada a principal. Trata-se de uma neoplasia que corresponde a cerca de 8-9% de todas aquelas diagnosticadas nos cães (PRIESTER; MACKAY, 1980). Entre as neoplasias hematopoéticas é a mais comum nessa espécie, representando 84% dos casos (MOULTON; HARVEY, 1990; DOBSON et al., 2002; CHUN, 2009). O linfoma canino é caracterizado pela proliferação de linfócitos que pode ocorrer em diversas regiões do organismo sendo, portanto, classificado em função da sua localização anatômica em multicêntrico, alimentar, mediastinal, cutâneo e extranodal (ETTINGER, 2003; RUTLEY; MACDONALD, 2007; WITHROW; VAIL, 2007).

A etiologia do linfoma ainda não está bem definida. Algumas possibilidades estão sendo investigadas, mas ainda sem nenhuma comprovação definitiva (WITHROW; VAIL, 2007). Algumas possibilidades etiológicas incluem infecção retroviral, contaminação por herbicidas (HAYES et al., 1991; HAYES; TARONE; CANTOR, 1995), anormalidades cromossomais (HAHN; RICHARDSON; HAHN, 1994; THOMAS et al., 2003) e disfunção de imunidade (OWEN; BOSTOCK; HALLIWELL, 1975; KELLER, 1992; FOSTER et al., 2000). O que se acredita é que, como em outros cânceres, o processo seja multifatorial.

A doença acomete cães de meia idade a idosos, sendo que a média varia entre 6 e 9 anos. Estudos retrospectivos não apontam predisposição sexual (TESKE, 1994). Segundo dados bibliográficos internacional, as raças mais acometidas são Boxer, Basset hounds, São Bernardo, Scottish terrier, Bulldogs (WITHROW; VAIL, 2007), Airedale terriers, Dachshund e Sptiz Alemão (TESKE, 1994).

Os sintomas associados ao linfoma canino são variados e relacionados à localização anatômica. Os linfomas multicêntricos são os mais comuns, compreendendo cerca de 80% dos casos. Os proprietários relatam principalmente linfonodomegalia generalizada. A maioria dos cães é assintomática, porém 20 a 40% dos animais podem apresentar anorexia, letargia, febre, perda de peso, êmese, diarréia e melena. Em estágios mais avançados podem apresentar hepatoesplenomegalia, além de infiltração pulmonar difusa (ETTINGER, 2003). Cães com linfoma gastrintestinal ou alimentar aparecem com menor frequência, de 5 a 7% dos casos e apresentam alterações relacionadas ao trata digestório como má absorção e perda de peso (WITHROW; VAIL, 2007). O linfoma mediastinal representa 5% dos casos, com envolvimento do linfonodo mediastinal cranial e/ou timo, nesse caso, os animais podem apresentar dispnéia devido a efusão pleural, além de hipercalcemia (ETTINGER, 2003, WITHROW; VAIL, 2007).

O diagnóstico do linfoma na espécie canina é feito com base na história clínica, exame físico do paciente e pela avaliação das células neoplásicas por meio da citologia ou histopatológico. Os exames complementares auxiliam no estadiamento da doença, além da avaliação do estado geral, e são realizados por meio de hemograma, análises bioquímicas, radiografias de tórax, ultrassom abdominal e mielograma (ROSENTHAL, 1990; RUTLEY, MACDONALD, 2007; MARCONATO, 2010). Uma das maneiras mais simples e rápida de avaliar linfonodos internos e periféricos é por meio da punção aspirativa com agulha fina (COWELL; DORSEY; MEINKOTH, 2003). A citologia realizada em material colhido de linfonodos periféricos neoplásicos pode ser realizada em poucos minutos, sem nenhum risco ao animal. (no prelo)

A análise histológica é uma das mais importantes ferramentas para o diagnóstico dos linfomas, entretanto, sua principal desvantagem em medicina veterinária, reside no fato da coleta de material necessitar de técnicas mais invasivas, muitas vezes não aceitas pelos proprietários. Muitos sistemas de classificação histológica são usados para descrever os linfomas caninos. *National Cancer Institute Working Formulation* (NCI) e o Sistema de Classificação de Kiel caracterizam o índice mitótico, tamanho e formato celular, porém o primeiro se baseia na arquitetura (difuso e folicular) e no tipo celular enquanto o segundo avalia a morfologia (centroblástico, centrocítico e imunoblástico) além do imunofenótipo

celular (célula B e T) (COWELL; DORSEY; MEINKOTH, 2003). Segundo Dobson (2004), o sistema Kiel de classificação ainda parece ser o sistema mais apropriado para ser utilizado na medicina veterinária, pois prioriza menos a arquitetura, que na maioria das vezes é difusa no caso dos cães, e subdivide os linfomas de alto grau.

Na medicina humana, há uma diversidade microscópica do linfoma não-Hodgkin que é acompanhada por uma característica de comportamento clínico da doença, dessa forma os patologistas sub-classificam o linfoma possibilitando determinar melhor o tratamento e estabelecer o prognóstico dos pacientes (DOBSON, 2004). Mais recentemente, em 2002, a Organização Mundial de Saúde (OMS) atualizou o *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms* (REAL) em animais domésticos, revisando as subclassificações dos linfomas em cães, seguindo os padrões da neoplasia humana. Porém, essa classificação não foi correlacionada com características biológicas e prognósticas, pois ainda faltam estudos clínicos (VALLI et al., 2002).

Sem tratamento, a maioria dos cães com linfoma evolui para o óbito em 4 a 6 semanas, devido à natureza sistêmica da doença. Sendo assim, a quimioterapia é a modalidade terapêutica mais adequada para o tratamento (ETTINGER, 2003). As células neoplásicas são sensíveis aos agentes antineoplásicos e a remissão completa da doença é observada na maioria dos animais tratados com protocolos quimioterápicos convencionais. Na forma multicêntrica da doença, quando tratada com protocolos baseados no CHOP: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona, a taxa de remissão completa é de 80 a 85% (WITHROW; VAIL, 2007), com significante aumento da sobrevida (KELLER et al., 1993; GARRET et al., 2002; HOSOYA et al., 2007). Entretanto, a resposta individual dos cães ao tratamento e a duração da remissão permanecem imprevisíveis. As dificuldades encontradas pelos médicos veterinários no tratamento do linfoma canino se assemelham àquelas vistas pelos médicos no tratamento do linfoma difuso de grandes células B em seres humanos, pois embora os pacientes apresentem o mesmo diagnóstico, existem diferenças marcantes na resposta ao tratamento.

Vários protocolos quimioterápicos estão relatados em trabalhos científicos e são rotineiramente utilizados no tratamento dos animais, sendo o protocolo COP, que combina a utilização de vincristina, ciclofosfamida e prednisona, um dos

primeiros a ser utilizado na terapia para linfoma em cães (SQUIRE et al., 1973; COTTER; GOLDSTEIN, 1983; CATER; HARRIS; WITHROW, 1987). Animais tratados com esse protocolo apresentam remissão completa da doença em 75% dos casos e uma sobrevida média de 6 meses (ROSENTHAL, 1996). O protocolo L-VCM combina L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida e metotrexato. Sua eficácia é considerada boa e a taxa de resposta completa com esse tratamento é de 77% com uma sobrevida média de 265 dias (MACEWEN et al., 1987).

O protocolo mais utilizado atualmente para o tratamento dos cães foi elaborado com base no tratamento do linfoma em humanos, utilizando os mesmos conceitos: curta duração, fracionamento e a associação de doxorrubicina. A doxorrubicina é um agente antracíclico e, quando associada de forma cíclica ao protocolo quimioterápico, aumenta a sobrevida dos animais (KELLER et al., 1993; VALERIUS et al., 1997; HOSOYA et al., 2007). Esse protocolo, conhecido como CHOP, inclui ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e predisona, e nos Estados Unidos é conhecido como a combinação que apresenta melhor taxa de resposta ao tratamento e maior tempo de livre de doença (KELLER et al., 1993; TESKE et al., 1994; VALERIUS et al., 1997; HOSOYA et al., 2007; SIMON et al., 2008). Diversas formas de associação e combinação desses antineoplásicos foram publicadas (KELLER et al., 1993; SIMON et al., 2008), sendo o protocolo com 19 semanas de tratamento, preconizado pela Universidade de Madison WI (Short-UW), caracterizado por apresentar boa eficácia, baixa toxicidade e aumento do tempo de sobrevida dos animais (VALERIUS et al., 1997; GARRET et al., 2002).

Originalmente o protocolo da Universidade de Madison WI, compreendia 25 semanas de tratamento e incluía uma aplicação de L-asparaginase na primeira semana de tratamento, considerando que as células neoplásicas linfóides necessitam de grande quantidade do aminoácido asparagina para manter seu rápido crescimento e proliferação e que o mesmo é imprescindível para a síntese de DNA, RNA e proteínas, culminando na morte da célula (MACDONALD et al., 2005).

Entretanto, estudos comparando protocolos quimioterápicos com base no CHOP com e sem L-asparaginase não encontraram diferenças estatísticas quanto à resposta ao tratamento, duração da remissão e sobrevida dos pacientes (VALERIUS et al., 1997; MACDONALD et al., 2005). Além disso, a L-asparaginase é considerada

o quimioterápico com maior custo dentre as medicações (MACDONALD et al., 2005), fato importante quando se considera que o proprietário se responsabiliza pelos custos do tratamento, além do quê, a associação de L-asparaginase com vincristina na primeira semana de tratamento quimioterápico aumenta o número de animais com neutropenia (NORTHRUP et al., 2002). Da mesma forma, um estudo comparando os protocolos com ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e prednisona no esquema longo (25 semanas) ou curto (19 semanas) não mostrou diferença em relação a resposta ao tratamento e sobrevida dos animais (SIMON et at., 2008).

Outra adaptação do protocolo de Madison-Wi (UW-25) desenvolvido inicialmente com 25 semanas de tratamento, além da diminuição em 6 semanas, foi a retirada de outros dois fármacos, o clorambucil, que era utilizado na dose de 1,4mg/Kg por via oral na semana 13 e na semana 21 e do metotrexato, que era administrado na dose de 0,8mg/Kg na semana 17, e que foram substituídos por ciclofosfamida. Quando o protocolo com 19 semanas foi comparado com o protocolo de 25 semanas (o qual inclui L-asparaginase, clorambucil e metotrexato), não se observou diferença na toxicidade e tempo de sobrevida dos pacientes. Além disso, o protocolo curto tem a vantagem de poder ser utilizado para reindução da remissão, no caso dos animais que apresentem recidiva da doença (GARRET et al., 2002).

Quanto ao prognóstico, idade, peso, sexo e estadiamento foram estudados e não mostraram importância, tanto em relação ao tempo de sobrevida, quanto ao intervalo livre de doença nos animais tratados com quimioterapia (KIULPEL et al., 1999). Muitos esforços têm sido realizados para identificar as características do linfoma e as condições clínicas dos animais que podem ser úteis para entender a resposta à quimioterapia e o prognóstico desses casos (TESKE et al., 1994; DOBSON et al., 2001). Algumas características foram relacionadas com a resposta ao tratamento, como o estágio clínico da doença (DOBSON; GORMAN, 1994, TESKE et al., 1994), grau histológico da neoplasia, imunofenótipo (TESKE et al., 1994), e marcadores de proliferação (AgNOR) (KIUPEL; RESKE; BOSTOCK, 1999).

O tratamento do linfoma canino continua em evolução e, embora a taxa de remissão da doença e sobrevida dos pacientes com quimioterapia sejam consideradas satisfatórias (LEGENDRE, 2007), outras técnicas de tratamento como

transplante de medula óssea (LURIE et al., 2009) e utilização de alvos moleculares (IMPELLIZERI et al., 2006) continuam sendo estudadas e visam melhorar o controle da doença. Com relação ao tratamento antineoplásico, a resistência que as células neoplásicas desenvolvem, representa um desafio para os pesquisadores e estudos que levem a avanços na utilização de inibidores de mecanismos de resistência podem implicar em uma melhora dos resultados de controle da doença e sobrevida dos animais em quimioterapia.

2.2 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

A eficácia da terapia antineoplásica pode ser afetada por diferentes fatores, como por exemplo, a duração da exposição da célula tumoral a uma concentração efetiva de quimioterápico, bem como a presença de enzimas que inativam os fármacos, o transporte transmembrânico de drogas e o desequilíbrio entre vias de apoptose e de proliferação celular (WITHROW; VAIL, 2007). A utilização da chamada poliquimioterapia, que consiste na combinação de vários agentes antineoplásicos, com mecanismos de ação diferentes para a entrada dos fármacos na célula e no alvo molecular no interior dela, visa a tornar a quimioterapia uma modalidade terapêutica mais efetiva, diminuindo o potencial de desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas células neoplásicas. Entretanto, as células podem expressar mecanismos que conferem resistência a vários fármacos simultaneamente, e esse mecanismo é conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) (GOTTESMAN; PASTAN, 1993).

O MDR é definido com a resistência das células neoplásicas às ações citostáticas ou citotóxicas de múltiplas drogas com estruturas e funções diferentes, comumente utilizadas na terapia antineoplásica (GOTTESMAN; PASTAN, 1993). Muitos mecanismos de resistência celular, que têm a função de proteção das células de diferentes tecidos estão presentes na maioria das células normais, porém nas

células neoplásicas, a resistência contra agentes neoplásicos pode ocorrer antes (resistência intrínseca) ou durante o tratamento quimioterápico (resistência adquirida). Um dos mecanismos mais bem caracterizados de resistência da célula cancerosa aos agentes quimioterápicos é a superexpressão de transportadores ABC, tais como glicoproteína P, proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR), proteína relacionada a resistência de pulmão (LRP) e proteína de resistência do câncer de mama (BCRP) (BERGMAN, 2003; BRACHT et al., 2007).

Nos mamíferos, os mecanismos de resistência a múltiplas drogas ficaram conhecidos após estudo realizado por Biedler e Riehm em 1970. Nesse trabalho, os autores demonstraram resistência cruzada entre vários agentes antineoplásicos como os alcalóides da vinca e daunorrubicina, em células ovarianas de hamster chinês, resistentes à actinomicina D. Alguns anos mais tarde, utilizando células ovarianas de hamster chinês resistentes a colchicina, o transportador MDR1/glicoproteína P foi isolado da membrana plasmática de células que demonstravam o fenótipo clássico de MDR (JULIANO; LING, 1976). O fenótipo clássico de MDR é caracterizado pela resistência cruzada contra agentes antineoplásicos tais como alcalóides da vinca, antracíclicos e taxanos (LAGE, 2008).

A glicoproteína P é uma proteína transmembrânica codificada a partir do gene MDR1. Essa proteína atua como uma bomba de efluxo ativo de fármacos na membrana plasmática das células, removendo agentes químicos do meio intracelular. Atualmente, sabe-se que essa e outras proteínas transportadoras, são dependentes da energia do ATP e fazem parte de uma grande família de transportadores, chamada transportadores ABC (ATP *binding cassete*) (BREEDVELD; BEIJNEN; SCHELLENS, 2006), que são encontradas em todos os organismos vivos, de microorganismos aos seres humanos (GLAVINAS et al., 2004; VALERA, 2006).

As proteínas dessa família são organizadas estruturalmente pela combinação de domínios conservados transmembrânicos e uma ligação com ATP. A característica mais marcante dessa superfamília é a sequência de 215 aminoácidos altamente conservada (ATP-binding casette ou domínio de ligação do peptídeo – nucleotide binding domain – NBD). O domínio de ligação do peptídeo (NBD) combina proteína com fosfato para hidrólise do ATP e fornecimento de energia a

vários processos celulares que não somente o transporte transmembrânico. Entretanto, o transportador transmembrânico ABC se torna ativo quando o domínio de ligação do peptídeo é associado ao domínio transmembrânico hidrofóbico chamado TMD, composto por seis α-hélices transmembrânicas (STENHAM et al., 2003; LAGE, 2008). Esses domínios transmembrânicos provavelmente determinam a especificidade para o substrato molecular transportado pelo transportador transmembrânico ABC (GLAVINAS et al., 2004; LAGE, 2008). A estrutura mínima necessária para que as substâncias químicas possam ser transportadas pelo transportador ABC, ou seja, para que as proteínas ABC se tornem ativas, são dois domínios transmembrânicos (TMD_1 e TMD_2) e dois domínios de ligação de nucleotídeo (NBD_1 e NBD_2) (GLAVINAS et al., 2004).

Os quatro domínios podem estar dispostos dentro de uma mesma cadeia polipeptídica, sendo chamados de *full transporter* ou pode estar agrupados separadamente, sendo chamado de *half transporter,* os quais somente se tornam funcionantes após dimerização específica (GLAVINAS et al., 2004). Os domínios de ligação de nucleotídeos e os domínios transmembrânicos podem estar arranjados de diferentes formas com base na codificação dos genes. Os *half transporters,* por exemplo, apresentam apenas um domínio transmembrânico ligado a um domínio de ligação de nucleotídeo. Este domínio transmembrânico pode conter seis α-hélices (Figura 1A) ou ainda estar associado à molécula TAP, que é um glicoproteína transmembrânica, e apresentar mais α-hélices (Figura 1B), tendo ainda que sofrer dimerização para se tornar ativo (LAGE, 2008). Os chamados *full transporters* são formados por 4 domínios, 2 transmembrânicos e 2 de ligação com nucleotídeo (Figura 1C) ou ainda apresentar um domínio transmembrânico associado chamado de TMD0 (Figura 1D).

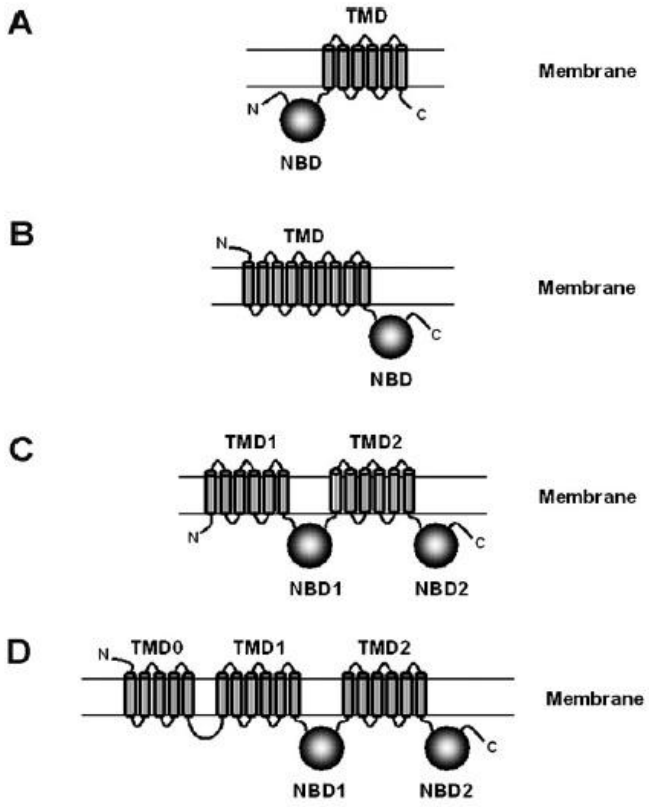


Figura 1 - Desenho esquemático das possibilidades de arranjo do transportador transmembrânico ABC. (A) *half transporter* com domínio transmembrânico contendo 6 α-hélices. (B) *half transporter* com domínio transmembrânico associado ao TAP contendo 9 α-hélices. (C) *full transporter* contendo dois domínios transmembranicos e 2 domínios de ligação com de nucleotídeo. (D) *full transporter* contendo três domínios transmembrânicos (TMD0, TMD1, TMD2) e 2 domínios de ligação com de nucleotídeo (NBD1, NBD2). Extraído de Lage H. (2008).

A principal característica que diferencia o transportador ABC de outros transportadores transmembrânicos dos mamíferos é a ampla variedade de substratos que podem ser transportados por essas proteínas. Essa característica explica a resistência cruzada das células a diferentes agentes e componentes, ocasionada pelo mesmo transportador (CERVENAK et al., 2006).

Dentre os substratos transportados pelos transportadores ABC com maior relevância clínica destacam-se os agentes antineoplásicos. Sabe-se que a principal causa de falha no tratamento antineoplásico está associada à resistência das células neoplásicas aos componentes quimioterápicos, pelo aumento da expressão das proteínas transmembrânicas ABC. O termo transportador ABC foi introduzido em

1992 por Christopher Higgins (HIGGINS, 1992), baseado no domínio altamente conservado de ATP (ATP-binding cassete) que caracteriza essa família (CHOUDHURI; KLAASSEN, 2006). Durante o projeto de seqüenciamento genômico humano, 49 proteínas transportadoras ABC foram identificadas e classificadas em sete grupos: ABCA1-ABCA12, ABCB1-ABCB11, ABCC1-ABCC13, ABCD1-ABCD4, ABCE1, ABCF1-ABCF3, e ABCG1-ABCG5 (KUO et al., 2009). Os membros da superfamília ABC estão associados com um amplo espectro de funções fisiológicas, incluindo a detoxificação de compostos químicos, defesa contra xenobióticos, reações oxidativas, processo de absorção e secreção, metabolismo de lipídeos e apresentação de antígenos (GLAVINAS et al., 2004; KUO, 2009).

2.3 ABCB1/MDR-1/GLICOPROTEÍNA P

O primeiro transportador de membrana da família ABC descoberto foi a glicoproteína P. A glicoproteína P foi isolada pela primeira vez em célula de ovário de hamster chinês resistentes à colchicina por Juliano e Ling (1976). Esses autores correlacionaram a permeabilidade reduzida da droga em células resistentes, à presença de glicoproteína P. Fojo et al. (1986) foram os pesquisadores que mapearam o gene MDR-1 na região 7q21.12, que codifica a glicoproteína P. Atualmente, o gene MDR-1 é conhecido como gene ABCB1.

O gene ABCB1/MDR-1 está envolvido no metabolismo de esteróides e na proteção celular contra compostos tóxicos (KUO et al., 2009). Sua expressão é freqüentemente observada em diferentes cânceres humanos e nos tecidos excretores normais como rins, trato gastrintestinal, precursores hematopoiéticos, células do sistema imune e glândulas adrenais (MARZOLINI et al., 2004). Nos cães, a glicoproteína P foi identificada no fígado, epitélio tubular renal proximal, córtex adrenal, epitélio do cólon e capilar endotelial do cérebro (GINN, 1996).

A glicoproteína P é uma fosfoglicoproteína de 170kDa composta por 1280 aminoácidos e constituída de dois segmento homólogos. É formada por quatro domínios sendo dois domínios transmembrânicos formados por seis α–hélices cada e dois domínios de ligação com o nucleotídeo (Figura 2), presente na face apical da maioria das células epiteliais do organismo. O transporte realizado por essa proteína é dependente de ATP e pode ocorrer contra o gradiente de concentração (BREEDVELD; BEIJNEN; SCHELLENS, 2006), sendo capaz de aumentar o efluxo da célula de um grande número de drogas e xenobióticos, reduzindo assim, a concentração citotóxica intracelular.

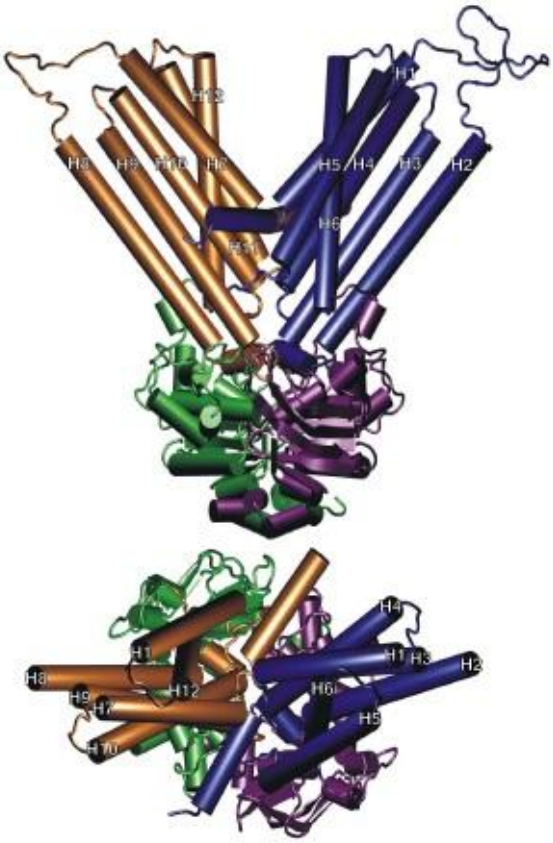


Figura 2 - Construção de um modelo molecular do MDR/glicoproteína P, demonstrando em 2 diferentes ângulos da proteína, as α- hélices estão numeradas de H1 a H12 e cada domínio representado por uma coloração diferente. Na imagem B, a porção extracelular que conecta a α- hélice transmembrânica 1-2 e 7-8 não foram demonstradas para facilitar a visualização. Extraído de Stenham et al., (2003).

Quando a glicoproteína P está ativa, ela retira os fármacos antineoplásicos do meio intracelular, não permitindo que haja tempo suficiente para a interação do antineoplásico com seu alvo molecular na célula. Apesar de estudos mostrarem que os transportadores ABC localizam-se na membrana plasmática das células, alguns autores demonstraram que esses transportadores podem estar expressos em membranas intracelulares, como a membrana nuclear (SUROWIAK et al., 2006) ou membranas de vesículas intracitoplasmáticas (DIETEL et al., 1990) prevenindo assim a interação dos agentes antineoplásicos com alvos moleculares nucleares.

Os agentes citotóxicos que podem levar à expressão adquirida da glicoproteína P são os alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina), antraciclinas (doxorrubimicina, daunorrubicina, mitoxantrone), epipodofilotoxinas (etoposídios), antibióticos (Actinomicina D), taxanos (paclitaxel) e corticóides, dentre outros (AMBUDKAR et al., 2003; LAGE, 2003). O uso de corticóides previamente à quimioterapia no tratamento do linfoma canino, constitui um fator prognóstico negativo, possivelmente relacionado à indução da expressão da glicoproteína P pela prednisona (BERGMAN; OGILVIE; POWERS, 1996). Segundo Moore et al. (1995) embora existam vários mecanismos para a neoplasia adquirir resistência às drogas, em cães com linfoma, uma alta expressão da glicoproteína P é o principal fator que leva a resistência a múltiplas drogas.

Além dos diversos quimioterápicos, existem outros fármacos considerados substratos da glicoproteína P. São eles a ivermectina, ondasentrona, itraconazol, cetoconazol, ciclosporina, rifampicina, fenobarbital, digoxina, doxiciclina, omeprazol, anti-histamínicos (BERMAN, 2003) e loperamida (SARTOR et al., 2004). Esta informação é importante, uma vez que a utilização concomitante desses fármacos com quimioterápicos antineoplásicos pode alterar a farmacocinética e toxicidade dos agentes empregados no protocolo quimioterápico, além da possibilidade de indução da resistência a múltiplas drogas.

Alguns moduladores do MDR/glicoproteína P já foram descritos e revisados por Lage (2008), e podem agir com mecanismos biológicos distintos. O verapamil, nifedipine e azidopine são bloqueadores dos canais de cálcio que podem modular a atividade da glicoproteína P, bem como os imussupressores ou derivados como a ciclosporina A, valspodar (PSC833) e tacrolimus, assim como os antiarritimicos

como amiodarona, quinidina, os anti-hipertensivos reserpina e ioimbina, os antibióticos como cefalosporina, derivados de hormônios esteróides como progesterona e tamoxifen, além dos antivirais inibidores de protease, sequinavir, indinavir e retanavir.

Muitos métodos estão disponíveis para a detecção da glicoproteína P nos tecidos. Alguns métodos avaliam a amplificação do DNA (*southern blot* ou reação da cadeia da polimerase – PCR) ou o RNA (*northern blot*, *slot blot*, hibridação *in situ* e PCR), ou ainda detectam diretamente a proteína (*Western blot,* citometria de fluxo e imunoistoquímica) (BERGMAN; OGILVIE; POWERS, 1996; SCHLEIS et al., 2008). Os resultados não são similares com o uso de técnicas diferentes, por exemplo, o uso do *southern blot* é controverso, pois embora a seqüência gênica que codifica a glicoproteina P seja amplificada para algumas células, isso não ocorre sempre, mostrando que, nesse caso, a amplificação do gene MDR-1 não seria necessária para a formação da glicoproteína P (FUQUA; MORETTI-ROJAS; SENEIDER, 1987). Por outro lado, o uso do *Western blot* pode superestimar a expressão da proteína P, devido à reação cruzada, considerando que o anticorpo C219 utilizado pode se ligar à cadeia pesada da miosina muscular formando uma marcação de 200 kDa muito próxima aos 170 kDa da glicoproteína P (THIEBAULT et al., 1989). Por meio de *Western blot*, a glicoproteína P foi identificada em apenas uma amostra dentre 30 linfomas em cães e, na recidiva, utilizando a mesma metodologia, apenas 3 de 8 amostras expressaram a proteína (MOORE et al., 1995).

Utilizando o mesmo tipo de anticorpo monoclonal usado nas marcações por imunoistoquímica, a glicoproteína P canina pode ser identificada pela ligação com o anticorpo C494 (GINN, 1996), além de outros dois anticorpos que podem ser utilizados nessa marcação, o C219 e JSB-I. A desvantagem da utilização imunistoquímica do anticorpo CS219 é que esse pode apresentar reação cruzada com outro transportador transmembrânico chamado MRP3 (KARTNER; EVERNDEN-PORELLE; BRANDALEY, 1985).

A detecção da glicoproteína P em cães, pela técnica de imunoistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal para a glicoproteína P humana, o C219, foi aplicada em três estudos, mesmo sem a certeza, na época, de que o anticorpo conseguisse reconhecer totalmente a glicoproteína canina, apesar de evidências

apontarem para isso (MOORE et al., 1995; BERGMAN; OGILVIE; POWERS, 1996; GINN, 1996). Uma das potenciais limitações metodológicas detectada na imunoistoquímica foi a menor sensibilidade técnica principalmente no linfoma canino, segundo estudo de Bergman, Ogilvie e Powers (1996), no qual quase todas as células neoplásicas apresentam marcação positiva para glicoproteína P. Neste caso, a diferenciação da expressão protéica entre os animais foi realizada por quantificação de cada amostra após implementação de uma metodologia de escore.

Em outro estudo, utilizando imunoistoquímica, a maior parte dos linfonodos (67%) de 91 animais com linfoma multicêntrico não tratados, não expressaram glicoproteína P, porém quando a recidiva foi detectada nesses mesmos pacientes, o número de amostras que expressaram a proteína aumentou substancialmente, chegando a 83% quando utilizado o anticorpo C494 e 73% quando o anticorpo utilizado foi o C219 (LEE et al., 1996). O aumento da expressão de glicoproteína P também foi maior nos animais que tiveram recidiva do linfoma em um estudo imunoistoquímico, realizado por Bergman em 2003, utilizando também o anticorpo C219, comparado com a expressão no início do tratamento. Nesse mesmo trabalho além da avaliação na recidiva, a expressão foi verificada no momento do óbito desses animais, onde a expressão foi ainda maior.

O primeiro estudo que detectou a expressão do RNA através de RT-PCR em cães foi publicado em 1998 por Steingold et al.. Após alguns anos Culmsee et al. (2004) quantificaram a expressão de RNA também por meio de RT-PCR e encontraram expressão em amostras de fígado e linfonodos normais. Com a técnica de quantificação de RNA (RT-PCR) a expressão gênica de MDR-1 em linfonodos normais caninos foi claramente detectada, contrariando os resultados encontrados pela avaliação imunoistoquímica publicada por Ginn (1996), provavelmente pela diferença de sensibilidade das duas técnicas empregadas, sendo a técnica de quantificação de RNA mais precisa (CULMSEE et al., 2004).

Recentemente, a expressão de RNA foi avaliada por RT-PCR no linfoma em cães antes do tratamento e na recidiva. As expressões foram maiores nas neoplasias resistentes após tratamento com o protocolo de Madison Wisconsin (25 semanas) (TOMIYASU et al., 2010).

Os padrões de expressão da glicoproteína P em tumores humanos distribuem-se em quatro categorias (GINN, 1996; KIKUCHI, 2001). A primeira é representada por tumores que já expressavam a glicoproteína em estado não-neoplásico e são também tradicionalmente refratários ao tratamento com drogas afetadas pelo fenômeno MDR, como neoplasias em órgãos como glândulas adrenais e rins. A segunda categoria envolve tumores que apresentam uma expressão ocasional da glicoproteína P, como os vários tipos de leucemia, linfoma não-Hodgkin e alguns casos de neoplasias mamárias. Estes são inicialmente sensíveis à quimioterapia. A terceira relaciona-se a neoplasias que desenvolvem uma rara expressão da glicoproteína P e apresentam uma sensibilidade variável à quimioterapia. Incluem-se nesse grupo a maioria das neoplasias mamárias, melanomas, tumores da vesícula urinária, tireóide, timo, ovário e próstata. A quarta categoria abriga tumores que expressam a glicoproteína P após o tratamento e está relacionado a um mau prognóstico. Nessa categoria incluímos o linfoma não Hodgkin de grau intermediário de malignidade, mieloma múltiplo, leucemias mielóides agudas, sarcomas que se desenvolvem na infância, tumores ovarianos e neuroblastomas. A expressão da glicoproteína P em certos cânceres deste grupo além do mau prognóstico, esta relacionada à progressão da doença e previsível resistência a múltiplas drogas (BERMANN et al., 1996; LIU; OHSHIMA; KIKUCHI, 2001).

Em humanos, uma alta expressão da glicoproteína P foi observada em linfoma nasal extra nodal NK/LT, caracterizado por ser um linfoma não Hodgkin, mais agressivo e com pior prognóstico, e correlacionada com a evolução clínica dos pacientes. Dentre os pacientes com alta expressão de glicoproteína, apenas 20% tiveram remissão completa da doença enquanto 35% apresentaram doença progressiva mesmo com a quimioterapia (WANG et al., 2008).

Um estudo realizado com osteossarcoma canino verificou que a expressão da glicoproteína P induzida pela doxorrubicina, foi capaz de conferir resistência cruzada à vincristina, utilizada posteriormente, reduzindo sua citotoxicidade. Sabe-se que a vincristina e doxorubicina pertencem a grupos farmacológicos diferentes, são estruturalmente diferentes, porém ambas são substratos para glicoproteína P (MEALEY et al., 1998). *In vitro*, a resistência cruzada entre doxorrubicina e vincristina também foi verificada em um estudo utilizando cultura celular de linfoma B

canino (GL-1). As células que foram expostas a doxorrubicina por tempo prolongado tornaram-se resistentes a este antineoplásico e a vincristina (UOZURMI et al., 2005).

2.4 ABCC1/MRP

Em 1992, Cole e Deeley identificaram a partir de modelos *in vitro*, outro transportador ABC mediador do fenótipo de resistência a múltiplas drogas, chamado de ABCC1. Esse transportador é uma proteína transmembrânica responsável pela remoção de drogas do meio intracelular conhecido primariamente por *Proteína Associada a Resistência a Múltiplas Drogas* ou MRP. Trata-se de uma proteína de 190kDa que possui um domínio N-terminal extra que está ausente na glicoproteína P (COLE; DEELEY, 1998; BORST et al., 2000). As MRPs constituem uma família de transportadores que são responsáveis por diminuirem o acúmulo intracelular de drogas, preferencialmente por mecanismos de extrusão unidirecional de quimioterápicos (BRENDEL; ZENTNER, 2002; KRUH et al., 2007). Nessa família de transportadores, 9 membros foram encontrados no estudo do genoma humano, conhecidos originalmente por MRP1 ao MRP9 que correspondem, atualmente, a ABCC1 até ABCC6 e ABCC10 a ABCC12 respectivamente. O MRP1, assim como os transportadores MRP2, 3, 6 e 7, tem um domínio membrânico adicional, localizado na região extra N-terminal conhecido como MSD_0, confome figura 3 (DALAS et al., 2004; KUO et al., 2009). Esse domínio não é encontrado no MDR1,2 e nos MRP4,5,8 e 9 e não parecer ser essencial para as funções catalíticas do MRP1, pois a deleção experimental desse domínio não compromete a atividade de transporte de substrato do transportador (BAKOS et al., 1998).

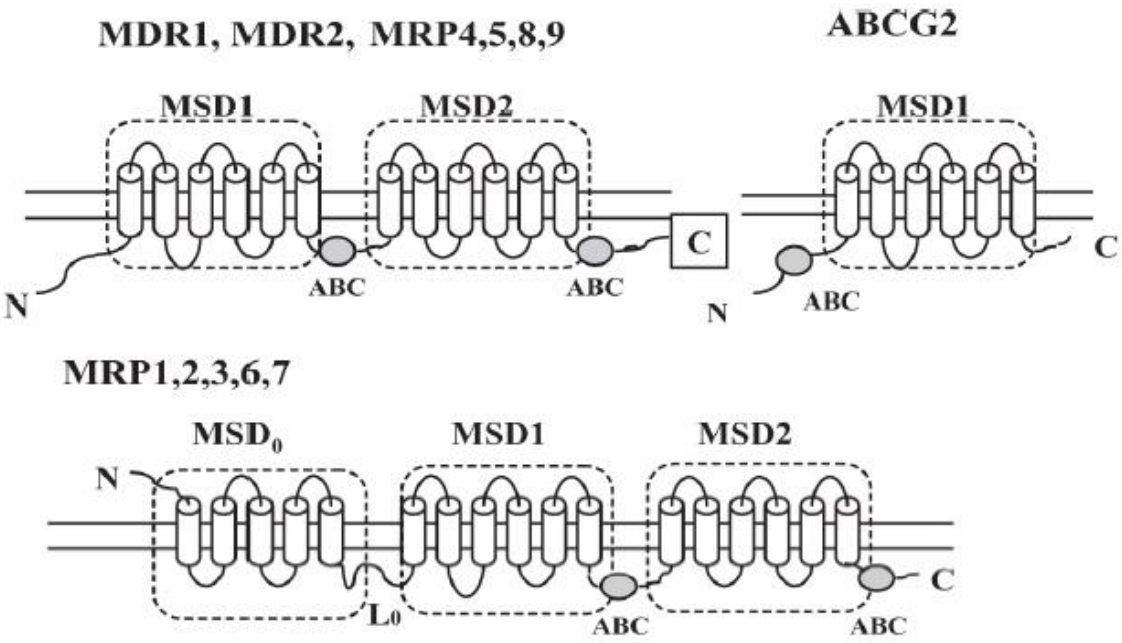


Figura 3 - Diagrama esquemático mostrando a estrutura de diferentes transportadores ABC. Os transportadores MRP 1,2,3,6,7 apresentam 17 domínios transmembrânicos (TDM) distribuídos em 3 regiões MSD1, MSD2 e MSD0. A região MSD0 não esta presente nos transportadores MDR1 e 2 e MRP 4,5,8 e 9 e que apresentam 12 domínios transmembrânicos (TDM) (adaptado de KUO et al, 2009).

Dentre os membros da família ABCC existem grande homologias, como por exemplo a homologia entre os transportadores MRP1 e 3 é de 49%, enquanto a homologia entre os transportadores MRP1 e MRP3 é de 58% (GRANDHADN; KIM, 2008). O MRP1 foi primeiramente identificado em cultura celular de carcinoma de pequenas células de pulmão (COLE et al., 1992), mas posteriormente foi identificado em outros tecidos como em epitélio cutâneo, respiratório, digestório, rins, placenta, em alguns tecidos linfóides, tais como tonsilas, linfonodos, timo e polpa branca esplênica e em musculatura lisa e esquelética (FLENS et al., 1996). Ao contrário da glicoproteína P, que está expressa principalmente em tecidos que funcionam como barreiras, a proteína MRP1 está expressa na maioria dos tecidos (AMBUDKAR et al., 2003).

Diferente da glicoproteína P que elimina xenobióticos do meio intracelular para secreções ou locais onde esses compostos poderão ser eliminados do

organismo, tais como bile, intestino e sangue, o transportador MRP-1 é em transportador basolateral cuja atividade resulta no transporte de compostos do meio intracelular para o tecido cuja célula epitelial encontra-se em contato. Sua ação inclui o transporte de diversos conjugados e não-conjugados de anions e cátions orgânicos. Fisiologicamente incluem o transporte de leucotrienos C_4 (LTC4) (LEIER et al., 1994), bilirrubina livre (RIGATO et al., 2004) e conjugada (JEDLITSCHKY et al., 1997) e glutationa oxidada (GSSG) (LEIER et al., 1996).

Quando se compara o tipo de substrato transportado pela glicoproteína P e MRP-1 observa-se marcante diferença. Os substratos transportados pela glicoproteína P são compostos neutros ou com discreta positividade lipofílica. Já o MRP1 está apto para transportar ânios lipofílicos, incluindo diversas glutationas, conjugados de glucuronato e sulfatos tais como leucotrieno (LTC4) que é um importante mediador de resposta inflamatória, além de estrógeno ($E_2$17βG) e ácidos biliares sulfatados (LEIER et al., 1994; LOE et al., 1996). As glutationas e os conjugados glucuronatos são produtos da fase II do processo de detoxificação celular de xenobióticos hidrofóbicos e na fase III do processo de extrusão, conhecido como bomba GS-X, caracterizada por Ishikawa (1992) em vários tipos celulares. Essa característica do transportador MRP1 em transportar conjugados de glutationa somada à variedade de locais de expressão do mesmo indica que o MRP1 é um transportador GS-X (KRUH et al., 1995).

A ligação da glutationa ao receptor MRP-1 causa uma alteração conformacional do receptor resultando no aumento da ligação com ATP e aumento da afinidade para substratos transportados com a glutationa tais como estrógeno e vincristina (ROTHNIE et al., 2008).

Para que o transportador MRP-1 consiga eliminar substâncias lipofílicas intracelulares é necessária a presença da glutationa livre no citoplasma celular, que se liga concomitantemente ao transportador. O exato mecanismo pelo qual a glutationa participa do processo de efluxo de substâncias naturais pelo MDR1 ainda é incerto e alguns estudos experimentais apontam que agentes antineoplásicos como alcalóides da vinca e antracíclicos também são co-transportados com a glutationa (KRUH; BELINSKY, 2003).

Os agentes antineoplásicos que são transportados para o meio extra celular pelo transportador MRP1 levantados na bibliografia são os antracíclicos:

doxorrubicina (CONRAD et al., 2002) e daunorrubicina (ZHAN et al., 2002), os alcalóides da vinca: vincristina e vimblastina (ZHAN et al., 2002), epipodofilotoxinas e captotencinas (ZHAN et al., 2002). Além desses antineoplásicos, o metotrexato também é transportado pelo MRP1 e, por ser um ânion orgânico, forma um complexo com moléculas de glutationa e é lançado para fora da célula (BORST et al., 2000). Entretanto, os transportadores MRP1 não são capazes de conferir resistência aos taxanos (COLE et al., 1994; ZAMAN et al., 1994; BREUNINGER et al., 1995; CHEN et al., 1999; KRUH et al., 2007). Outros substratos incluem os antivirais sequinavir (JANNEH et al., 2005), ritonavir (DEELEY; COLE, 2006), além de antibióticos como difloxacina e grepafloxacina (DEELEY; COLE, 2006).

Em humanos, o MRP está envolvido na resistência aos quimioterápicos em casos de leucemias, linfomas, fibrossarcoma, neoplasias de pulmão, mama, útero, próstata e carcinoma de bexiga (BERGER et al., 1997; LAGE, 2003).

2.5 ABCG2/BCRP

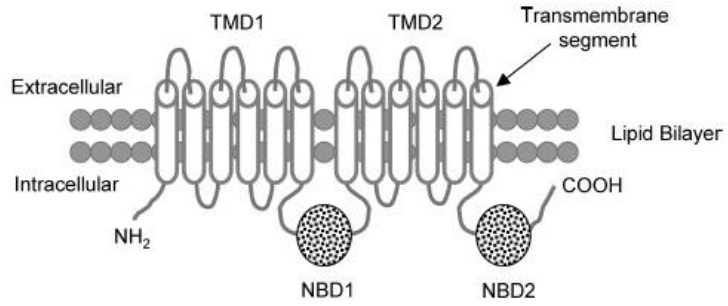
O transportador de membrana ativo e dependente de ATP chamado ABCG2/BCRP foi primeiramente isolado em uma linhagem celular de neoplasia mamária denominada de MCF-7/AdrVp em 1998 (ALLIKMETS et al., 1998; DOYLE et al., 1998), e por isso chamado de *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP gene). Essa descoberta ocorreu após o bloqueio funcional da glicoproteína P pela ação do verapamil. Atualmente é considerado o transportador transmembrânico de quimioterápicos mais importante, responsável pelas falhas no tratamento antineoplásico em humanos (LAGE, 2008).

O transportador ABCG2/BCRP é capaz de transportar diferentes substâncias como fármacos citotóxicos, toxinas e carcinógenos. Dentre os fármacos citotóxicos, esse transportador é capaz de fazer a extrusão do mitoxantrone (ROSS et al., 2000; MALIEPAARD et al., 2001) , doxorrubicina e topotecan (MALIEPAARD et al., 2001)

além da 7-etil-hidroxicamptotecina (SN38) (KAWABATA et al., 2001), ou inibidores de tirosinaquinase (OZVEGY-LACZKA et al., 2005).

O transportador ABCG2 é expresso em diversos tecidos em seres humanos incluindo placenta, fígado, rins, intestino e cérebro (BREEDVELD; BEIJNEN; SCHELLENS, 2006; CERVENAK et al., 2006). É uma proteína de 72kDa composta por 665 aminoácidos. O transportador apresenta um domínio N-terminal de ligação de ATP (NBF) e um domínio transmembrânico C-terminal (TDM). Essa estrutura do transportador representa metade dos outros transportadores e esta disposta de maneira invertida, e é por isso conhecido com um “half transporter” (Figura 4). Desde a descoberta dos “half transporter” acredita-se que a homodimerização ou a oligodimerização seja necessária para tornar o transportador ativo (ROSS et al., 2000; LAGE, 2008; ROBEY et al., 2009).

A



B

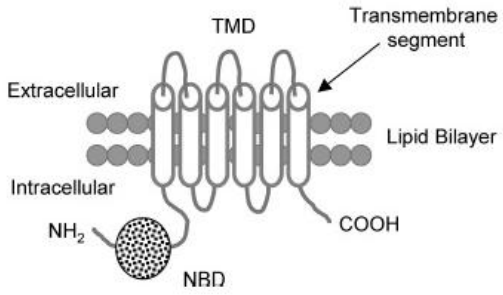


Figura 4 – A - Desenho esquemático do transportador ABC na membrana plasmática lipídica, a proteína contem 2 domínios transmembrânicos (TDM) e 2 domínios N-terminal para ligação do nucleotídeo (NBD). B - Desenho esquemático do transportados ABCG2 mostrando a estrutura definida como “half transporter” com seis segmentos transmembrânicos na camada bilipídica um domínio TDM e um domínio N-terminal (NBD) (Adapatado de CHOUDHURI et al., 2006).

Em humanos, o transportador ABCG2 foi identificado em diferentes tecidos normais, tais como, células do cólon, intestino delgado, glândula sebácea, células acinares pancreáticas, hepatócitos, células dos canalículos biliares, pneumócitos alveolares, tecido mamário, endotélio venoso e capilar, zona reticular da glândula adrenal, túbulos corticais dos rins e epitélio prostático (MALIEPAARD et al., 2001; FETSCH et al., 2006). Nas células epiteliais polarizadas, o transportador ABCG2 é expresso na membrana apical, e devido sua distribuição tecidual, sugere-se que sua fisiologia esteja associada à regulação da absorção intestinal e secreção biliar de xenobioticos potencialmente tóxicos (CERVENAK et al., 2006). Sua alta expressão placentária possivelmente está relacionada à proteção do feto contra a exposição a drogas (JONKER et al., 2002). Além desses tecidos, a expressão do transportador ABCG2 foi identificada em várias *stem cells*, sendo um considerado um marcador de células pluripotentes (KIM et al., 2002).

A proteína BCRP foi detectada em vários modelos experimentais *in vitro* de células neoplásicas de diferentes origens, incluindo linhagens de células hematológicas e neoplasias sólidas (LAGE, 2008). A avaliação da expressão de ABCG2 foi estudada nas leucemias mielóide e linfóide aguda em humanos, no início tratamento e na recidiva, e não houve diferença na expressão dessa proteína nessas duas fases da doença (FEDASENKA et al., 2008). Em outro estudo, a expressão da ABCG2 foi avaliada por RNAm e detecção de proteína, e uma alta expressão foi identificada em 27 a 33% das células blásticas de pacientes com leucemia aguda (ROSS et al., 2000). Cada vez mais estudos conseguem correlacionar a expressão da ABCG2 com pior prognóstico na leucemia aguda (CERVENAK et al., 2006).

Em tumores sólidos, o transportador BCRP foi identificado por meio de imunoistoquímica em neoplasias de origens diferentes, mas principalmente nas neoplasias de trato digestório, endométrio, pulmão e pele (melanoma) (DIETRA et al., 2002). Para as neoplasias sólidas, a expressão de BCRP tem relação com a resposta quimioterápica em pacientes tratados com antracíclicos, demonstrada em alguns estudos (BURGER et al., 2003), mas ainda não foi totalmente elucidada, pelo fato de outros estudos não conseguirem demonstrar essa relação utilizando técnicas de RT-PCR (FANEYTE et al., 2002), indicando nesse casos que mais estudos sejam

realizados para o completo entendimento da relação entre expressão de BCRP, resposta a quimioterapia e prognóstico.

2.6 AFINIDADE DOS TRANSPORTADORES ABC COM OS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Para que um agente antineoplásico tenha sua ação citotóxica ou citostática ele deve atingir o meio intracelular e interferir com a síntese de RNA, DNA ou proteínas. Existem dois mecanismos para que os fármacos consigam entrar na célula e são dependentes da lipossolubilidade de cada agente e da sua capacidade de atravessar a membrana plasmática das células (AMBUDKAR et al., 2003).

Os antineoplásicos hidrofílicos como a cisplatina, análogos de nucleosídeos e antifolatos, que não conseguem cruzar a membrana citoplasmática isoladamente, por difusão passiva, precisam ser transportados por transportadores específicos ou pelos canais hidrofílicos na membrana plasmática, para que estes agentes alcancem o meio intracelular e exerçam sua ação (AMBUDKAR et al., 2003). Neste caso, a resistência pode ser originada a partir de mutações geradas nestes transportadores, resultando no impedimento da entrada destes compostos na célula (AMBUDKAR et al., 2003).

Em relação aos agentes hidrofóbicos, como os alcalóides da vinca, antraciclinas, actinomicina D, etoposídeo e paclitaxel, estes atravessam a membrana citoplasmática por difusão, sem a necessidade de transportadores específicos. Assim, a única forma de manter esses antineoplásicos fora da célula é pela ativação dos sistemas de transporte dependentes de energia, como a família das proteínas transportadoras ABC, cujo principal representante, a glicoproteína P, leva à extrusão dessas drogas, resultando no fenótipo MDR (AMBUDKAR et al., 2003).

Assim, uma das maneiras de melhorar a resposta terapêutica aos agentes antineoplásicos é por meio da inibição dos transportadores ABC, aumentando a concentração intracitoplasmática dos fármacos, bem como o seu tempo de ação na célula. O verapamil e a ciclosporina A são conhecidos inibidores da glicoproteína P. Na verdade, os agentes inibidores da glicoproteína P formam um grupo diverso e bem caracterizado de substâncias que incluem bloqueadores de canais de cálcio e sódio, antagonistas da calmodulina, anestésicos locais, esteróides, agentes imunossupressores, inibidores da proteína quinase, flavonóides, detergentes, alcalóides, compostos macrolídeos, metilxantinas derivadas da pentoxifilina, entre outros. Essas substâncias reversoras do MDR mediado pela glicoproteína P podem agir por diferentes mecanismos: (1) interação direta da molécula de glicoproteína P com seu sítio de ligação com ATP, onde a droga se liga ao sítio ou em outro lugar que seja crítico para a função do transporte; (2) modulação da expressão da glicoproteína P; (3) modulação da atividade da glicoproteína P pela inibição das modificações pós-translacionais (fosforilação ou glicosilação); (4) modulação indireta das atividades de transporte da glicoproteína P por outros sistemas (BREIER et al., 2005).

A ação do verapamil foi avaliada em células de linfoma B canino *in vitro*, sendo eficiente em reverter a função da glicoproteína P, por competir com os sítios de ligação dos antineoplásicos, em células expostas e resistentes a doxorrubicina. Ainda nesse estudo, verificou-se que o efeito do verapamil é dose depedente (UORZURMI et al., 2005).

2.7 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS NO LINFOMA CANINO

O aumento da longevidade dos animais de companhia, consequência de melhor manejo alimentar, profilático e terapêutico, possibilita, atualmente, diagnosticar doenças neoplásicas e degenerativas com maior freqüência. Somado a isso, avanços na medicina veterinária e a disposição de proprietários tornam as possibilidades terapêuticas na oncologia uma realidade na clínica de pequenos animais.

A quimioterapia antineoplásica é o principal tratamento dos cânceres sistêmicos nos humanos e nos animais, além de ser utilizada como adjuvante após cirurgias, radioterapia, imunoterapia e uso de moduladores gênicos. É importante opção no controle da doença e aumento da expectativa de vida de muitos animais. Embora o tratamento quimioterápico possa ser eficaz em alguns casos, a maior parte dos cânceres metastáticos apresenta resistência à quimioterapia. Em outros casos a neoplasia primária ou a doença metastática pode responder inicialmente ao tratamento, porém adquire resistência, inviabilizando a continuidade do tratamento (GONZALEZ; SCHIENGOLD; CHIES, 2006).

O tratamento do linfoma canino envolve a combinação de fármacos antineoplásicos de diferentes grupos como alquilantes, antimicrotúbulos e antracíclicos. Mesmo assim, as recidivas ocorrem em pouco tempo após o período de indução. Embora existam vários mecanismos para que o tumor adquira resistência aos fármacos, em cães com linfoma uma alta expressão da glicoproteína P é o principal fator que leva a resistência a múltiplas drogas (MOORE et al., 1995; BERGMAN, OGILVIE, POWERS, 1996; LEE et al., 1996). Ao contrário dos agentes antimicrotúbulos e antracíclios, os agentes alquilantes não são afetados pelo fenótipo MDR, além disso, esses agentes raramente apresentam resistência cruzada. Dessa maneira, protocolos de resgate que utilizam agentes alquilantes parecem ser mais efetivos no tratamento do linfoma (RASSNICK et al., 2002). Como exemplo, o protocolo de resgate MOPP (mecloretamina, vincristina, procarbazina e prednisona), contém dois agentes alquilantes: mecloretamina e procarbazina. Por

outro lado, a vincristina e a prednisona utilizadas nesse protocolo apresentam benefícios incertos, pois os mecanismos de resistências dessas drogas podem ser mediados pela glicoproteína P. Uma possível hipótese é de que a vincristina e prednisona apresentam eficácia nas células neoplásicas após ação da mecloretamina e procarbazina, pois essas induzem apoptose nas células com fenótipo de MDR (RASSNICK et al., 2002).

Por meio de RT-PCR e Dot Blotting, a expressão dos genes de resistência MDR, MRP e LRP e de seus produtos foi estudado em cães com linfoma. No momento do diagnóstico, animais que não tinham recebido previamente nenhuma terapia apresentam 93% de expressão dos genes de resistência e 85,8%, 71,5% e 85,8% dos produtos gênicos, respectivamente de MDR, MRP e LRP. Esses animais foram tratados e quando apresentaram recidiva da doença, os genes foram novamente avaliados apresentando 100% de expressão (REZENDE, 2005).

Novas medicações estão sendo utilizadas em pacientes com câncer com o objetivo de bloquear a atividade da glicoproteína P para diferentes antineoplásicos. Recentemente, uma nova medicação moduladora desta glicoproteína foi associada ao paclitaxel para aumenta sua eficácia. A medicação denominada como HM30181 administrada por via oral em ratos aumento de 3,4% para 41,3% a biodisponibilidade do paclitaxel. Essa medicação empregada nesse estudo foi eficaz para modular a expressão da glicoproteína P especificamente, pois o mesmo não mostrou eficiência na modulação da MRP1(ABCC1), MRP2(ABCC2), MRP3(ABCC3) e inibiu parcialmente o BCRP (ABCG2) (KWAK et al., 2010).

No linfoma canino, embora a associação da expressão da glicoproteína P seja diretamente relacionada com resistência à quimioterapia, resultado nas falhas terapêuticas e insucesso no tratamento (MOORE et al., 1995; BERGMAN, OGILVIE, POWERS, 1996; LEE et al., 1996), estudos recentes falharam em mostrar uma correlação entre a expressão da glicoproteína P e a resistência aos antineoplásicos (TOMIYASU et al., 2010), apontando que outros transportadores e outros fatores possam interferir no fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

- Avaliar a expressão de genes relacionados à resistência a drogas (ABCB1, ABCC1, ABCG2) em linfonodos normais e naqueles de cães com linfoma multicêntrico.
- Comparar a expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas no momento do diagnóstico do linfoma multicêntrico, antes do início do tratamento, com a de linfonodos normais.
- Comparar a expressão desses genes de expressão com o tecido saudável.
- Avaliar a expressão de genes relacionados à resistência a drogas em cães com linfoma multicêntrico que apresentaram recidiva da doença após tratamento antineoplásico, comparando-a com a de linfonodos normais e a expressão antes do tratamento antineoplásico.
- Comparar a expressão dos genes de resistência no momento do diagnóstico e na recidiva da doença em três diferentes protocolos de tratamento.
- Analisar a expressão dos genes de resistência com relação à idade, duração da remissão e sobrevida global dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Amostras avaliadas nesse estudo foram coletadas de linfonodos de cães com diagnóstico de linfoma multicêntrico. Vinte animais foram atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e cinco em uma clínica particular no interior de São Paulo. Os cães desenvolveram espontaneamente a doença formando, portanto, um grupo heterogêneo em relação ao porte, raça e idade.

Antes de iniciar o estudo e coleta de material, os proprietários foram orientados sobre o estudo e consentiram na coleta do material e acompanhamento de seus animais. Os proprietários tiveram a opção de participar ou não do estudo, e aqueles que aceitaram, assinaram um termo de consentimento de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP.

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os animais que haviam recebido quaisquer tratamentos prévios, além daqueles que apresentaram outras neoplasias concomitantes ou comorbidades que comprometessem o tratamento.

4.3 GRUPO CONTROLE

Para o controle, foi feito um *pool* com 8 amostras de linfonodos normais de cães, machos ou fêmeas, domiciliados, com ou sem definição racial que vieram a óbito no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

Universidade de São Paulo por causas traumáticas ou doenças não sistêmicas. As amostras dos linfonodos foram coletadas e uma avaliação histopatológica foi realizada para descartar processo reacional, hiperplasia ou infiltração de células neoplásicas nos linfonodos utilizados para estudo. Os proprietários consentiram a utilização dos linfonodos dos seus animais.

4.4 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS

Os cães foram inicialmente atendidos no Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da FMVZ-USP. Após a realização da anamnese, exame físico e estabelecida a suspeita clínica de linfoma multicêntrico, os animais foram encaminhados para o atendimento em Oncologia Clínica, do mesmo Serviço.

Realizou-se nova anamnese e exame físico, incluindo a mensuração dos linfonodos periféricos. A confirmação diagnóstica do linfoma foi realizada por meio de punção aspirativa com agulha fina, seguida da confecção de esfregaços em lâminas e avaliação da morfologia celular pelo patologista. Com a confirmação citológica, os animais foram submetidos a exames complementares para o estadiamento da doença e avaliação geral.

Os exames complementares incluíram exames de imagem e exames laboratoriais. As amostras sanguíneas foram coletadas por punção venosa jugular, cefálica ou safena na dependência do porte do animal e facilidade para coleta. Do material coletado, 2,0mL de sangue foram armazenados em frasco contendo EDTA 10% para realização do hemograma e contagem de plaquetas. A análise da morfologia celular e contagem diferencial de leucócitos foram realizadas em esfregaço de sangue "*in natura*", sem adição de conservantes. Cerca de 4,0 mL do sangue coletado foram armazenados em tubo siliconizado sem anticoagulante e, posteriormente, centrifugados para obtenção de soro sanguíneo que foi aliquotado para a realização de avaliações bioquímicas. Uma amostra de cerca de 10,0 mL de urina foi coletada por micção espontânea, sondagem uretral ou ainda por meio de cistocentese para a realização de exame de urina tipo I.

4.5 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, mais reativos. Para tanto a punção aspirativa de linfonodo foi realizada com agulha 25 x 7 mm; o material coletado foi distendido em lâminas pela técnica de “squash” e, na seqüência, o esfregaço foi corado pela técnica de Rosenfeld, de acordo com procedimento adotado pelo Laboratório Clínico do VCM/ HOVET da FMVZ-USP.

4.6 ESTADIAMENTO

Utilizou-se o sistema de estadiamento clínico para linfomas em animais domésticos da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 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 sintomatologia, conforme quadro 1.

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 sem 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

Quadro 1 - Sistema de Estadiamento clínico para linfoma segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1980)

4.7 EXAMES COMPLEMENTARES

4.7.1 Hemograma

A contagem de células sanguíneas e plaquetas foi determinada em contador automático ABC Vet ® (Horiba ABX – São Paulo – Brazil), de uso veterinário. A contagem diferencial dos leucócitos e avaliação morfológica da linhagem eritróide e linfóide foi realizada em esfregaço a fresco preparado no momento da coleta da amostra. Os esfregaços foram corados pelo corante de Rosenfeld (BIRGEL, 1982). O hemograma foi realizado antes do início do tratamento quimioterápico e repetido regularmente durante o tratamento.

4.7.2 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram feitas em analisador automático (Lyasis-Roche® ou Labmax 240, Tokyo, Japan), utilizando, quando necessário, kits comerciais. As técnicas laboratoriais foram realizadas de acordo com os padrões do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Com as amostras de soro coletadas foram realizadas avaliação renal, por meio da determinação sérica de uréia e creatinina e avaliação hepática pelas avaliações séricas das concentrações de albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta, além de dosagem de cálcio e proteínas totais (técnicas descritas no APÊNDICE A).

4.7.3 Urina I

O exame químico foi realizado com tiras reagentes (Combur 10 M - Roche). A densidade urinária foi determinada por refratometria. O sedimento urinário foi obtido pela centrifugação de 10,0 mL de urina por 5 minutos a 200 g, obtendo-se o volume de sedimento de 1,0 mL. O exame de urina foi realizado antes do início do tratamento e a cada 30 dias ou quando o animal apresentava alguma alteração que indicasse a necessidade.

4.7.4 Ultrassom abdominal

O exame ultrassonográfico foi realizado em todos os animais no início do tratamento para detectar envolvimento e alterações em órgãos abdominais tais como fígado, baço e linfonodos e foi repetido após o início do tratamento antineoplásico (após a fase de indução da remissão) para avaliação quanto à resposta ao tratamento e, posteriormente, quando o animal apresentava recidiva da doença. Em alguns casos isolados, nos quais havia indicação, o exame foi repetido outras vezes durante o período de tratamento.

Os exames foram realizados pelo Serviço de Diagnóstico por imagem do VCI/HOVET da FMVZ-USP conforme padronização adotada pelo mesmo e, para tanto, utilizaram-se transdutores de 5,0 e 7,5 MHz, de acordo com o porte e peso do animal.

4.7.5 Exame radiográfico do tórax

A avaliação radiográfica de tórax foi realizada para avaliar envolvimento neoplásico em linfonodos torácicos e infiltração no parênquima pulmonar. Para tanto foram realizadas radiografias nas posições latero-lateral e ventro-dorsal, de acordo

com os métodos utilizados na rotina do Serviço de Diagnóstico por Imagem do VCI/HOVET da FMVZ-USP. 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 controle foram solicitados durante o acompanhamento clínico.

4.7.6 Ecocardiograma

O exame de avaliação ecocardiográfica foi solicitado para todos os pacientes que receberam o tratamento com o antineoplásico doxorrubicina. Esse antineoplásico pode provocar alterações miocárdicas 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.

4.7.7 Mielograma

A avaliação da medula óssea foi realizada em animais com suspeita de comprometimento medular, quando o paciente apresentava condição para a anestesia, mesmo que de curta duração, e o proprietário estava de acordo com o procedimento. O material foi coletado utilizando agulha hipodérmica 40 x 12mm ou 14 x 16mm, na dependência do porte do animal. Um mandril foi adaptado a essa agulha para evitar o entupimento com material ósseo na agulha. O material foi aspirado com uma seringa de 10,0 mL, heparinizada, e depositado em várias lâminas para realização do esfregaço.

4.8 TRATAMENTO

Após o diagnóstico e estadiamento, os proprietários receberam orientação detalhada sobre a enfermidade, as opções de tratamento e prognóstico. Foram oferecidas aos proprietários três opções de protocolos quimioterápicos que são utilizados rotineiramente pela Oncologia Clínica no Serviço de Clínica Médica do VCM/HOVET da FMVZ-USP. A escolha do protocolo foi feita com base na disposição financeira e de tempo de cada proprietário, sem que a condição clínica e o estadiamento do paciente tivesse relevância nessa decisão. De qualquer forma alterações concomitantes ao linfoma foram invariavelmente importantes para a exclusão de protocolos específicos.

4.8.1 Protocolo COP

Os cães com linfoma multicêntrico incluídos neste protocolo de tratamento antineoplásico receberam a combinação de vincristina, ciclofosfamida e prednisona por um período de até 52 semanas, conforme referido no quadro 3.

O tratamento antineoplásico foi dividido em duas fases, sendo a de indução a primeira delas, compreendendo quatro semanas. Na primeira semana de tratamento quimioterápico, os animais receberam uma dose de vincristina por via intravenosa. Antes da aplicação os animais foram cateterizados com cateter 22 G ou 20 G, recebendo lentamente solução fisiológica 0,9%, evitando veias puncionadas anteriormente ou que apresentassem edema. A tricotomia foi realizada no local e a anti-sepsia com álcool 70% realizada antes da venopunção. A dose do fármaco foi então calculada, manipulada, acondicionada em uma seringa e posteriormente aplicada em *bolus* diretamente no equipo, após o acesso venoso ter sido conferido. A ciclofosfamida foi administrada por via oral. Os proprietários foram orientados em relação à administração da drágea, quanto ao armazenamento e administração, protegida com luva 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 segunda e terceira semana de tratamento os pacientes receberam somente a vincristina aplicada usando mesma metodologia e na quarta semana, além da vincristina os animais foram novamente tratados com ciclofosfamida.

ANTINEOPLÁSICO	**DOSE**
Vincristina	0,75 mg/m^2
Ciclofosfamida	250 mg/m^2
Prednisona	40 mg/m^2 durante 14 dias e depois 40 mg/m^2 em dias alternados até o final do tratamento.

Quadro 2 - Doses dos antineoplásicos utilizados no protocolo de tratamento COP

Na fase de manutenção, os animais receberam vincristina e ciclofosfamida a cada 3 semanas e prednisona em dias alternados, até 52 semanas conforme quadro 3.

Esquema do protocolo quimioterápico COP																						
Quimioterápico	**Semanas**																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Vincristina	X	X	X	X			X			X			X			X			X			X
Ciclofosfamida	X			X			X			X			X			X			X			X
Prednisona	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Quimioterápico	**Semanas**																					
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Vincristina	X			X			X			X			X			X			X			X
Ciclofosfamida	X			X			X			X			X			X			X			X
Prednisona	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Quimioterápico	**Semanas**																					
	45	46	47	48	49	50	51	52														
Vincristina	X			X			X															
Ciclofosfamida	X			X			X															
Prednisona	X	X	X	X	X	X	X	X														

Quadro 3 - Esquema do protocolo quimioterápico COP, utilizado para tratar cães com linfoma multicêntrico, atendidos na Oncologia Clínica no Serviço de Clínica Médica Clínica do Departamento de Clínica Médica – HOVET da FMVZ-USP

4.8.2 Protocolo VCM

Nesse protocolo os animais foram tratados com uma aplicação intramuscular de L-asparaginase por via intramuscular em dose única, no primeiro dia de quimioterapia, seguida da aplicação intravenosa de vincristina e de aplicações semanais de ciclofosfamida e metotrexato, conforme quadro 5.

A fase de indução da remissão incluiu as quatro primeiras semanas de tratamento. Assim como a vincristina, o metotrexato também foi administrado por via intravenosa após cateterização da veia cefálica ou safena com cateter 22 G ou 20 G.

Os cães receberam solução fisiológica 0,9% durante alguns minutos garantindo que o acesso venoso não oferecia risco de extravazamento. Antes da cateterização o local foi preparado com tricotomia, e utilização de álcool 70% para anti-sepsia. A ciclofosfamida foi administrada por via oral pelos proprietários, que foram orientados com instruções sobre a segurança na administração. As doses dos antineoplásicos utilizados nesse protocolo estão descritas no quadro 4.

ANTINEOPLÁSICO	**DOSE**
L-Asparaginase	10.000UI/m^2
Vincristina	0,75 mg/m^2
Ciclofosfamida	250 mg/m^2
Metotrexato	0,8mg/Kg

Quadro 4 - Doses de antineoplásicos utilizados no protocolo de tratamento VCM

Na fase de manutenção, o tratamento manteve-se com aplicações alternadas e semanais de antineoplásicos até 25 semanas. Após a 27ª semana, as aplicações ocorreram a cada 2 semanas até a semana 52. Os animais que apresentaram algum tipo de toxicidade à ciclofosfamida tiveram essa medicação substituída por clorambucil.

Esquema do protocolo quimioterápico do grupo VCM																						
Quimioterápico	**Semanas**																					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**
L-Asparaginase	X																					
Vincristina	X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X	
Ciclofosfamida		X				X				X				X				X				X
Metotrexato				X				X				X				X				X		
Quimioterápico	**Semanas**																					
	23	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40**	**41**	**42**	**43**	**44**
Vincristina	X		X				X				X				X				X			
Ciclofosfamida		X							X								X					
Metotrexato					X								X								X	
Quimioterápico	**Semanas**																					
	45	**46**	**47**	**48**	**49**	**50**	**51**	**52**														
Vincristina	X				X																	
Ciclofosfamida			X																			
Metotrexato							X															

Quadro 5 - Esquema do protocolo quimioterápico VCM, utilizado para tratar cães com linfoma multicêntrico, atendidos na Oncologia Clínica no Serviço de Clínica Médica – HOVET - FMVZ-USP

4.8.3 Protocolo Short-Madison

Esse protocolo de curta duração, além de antineoplásicos utilizados nos protocolos anteriores, também envolve a utilização da doxorrubicina. Na primeira e terceira semana de tratamento o animal é tratado com vincristina por via intravenosa, na segunda semana recebe ciclofosfamida por via oral e na quarta semana a doxorrubicina intravenosa. 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 6.

ANTINEOPLÁSICO	DOSE
Vincristina	0,7 mg/m^2
Ciclofosfamida	250 mg/m^2
Doxorrubicina	30 mg/m^2
Prednisona	2,0 mg/Kg durante 7 dias 1,5 mg/Kg durante 7 dias 1,0 mg/Kg durante 7 dias 0,5 mg/Kg durante 7 dias

Quadro 6 - Doses de antineoplásicos utilizados no protocolo de tratamento Short-Madison

Na fase de manutenção os animais foram tratados com mais três ciclos de indução, exceto com a utilização da prednisona. A doxorrubicina foi utilizada após reconstituição do liofilizado em solução fisiológica a 0,9%, resultando em diluição final de 2,0mg/mL. Os animais foram cuidadosamente cateterizados após tricotomia e anti-sepsia e receberam solução fisiológica durante 15 minutos para garantir que o acesso venoso estivesse adequado. Receberam então, a dose total do antineoplásico diluído em uma bolsa de 100,0mL de solução fisiológica a 0,9%, administrada durante 20 minutos. Após a administração os animais permaneceram aproximadamente 10 minutos em fluidoterapia antes de serem liberados. Durante todo o procedimento, os animais permaneceram sobre a mesa de atendimento contidos e supervisionados. O esquema completo de administração de antineoplásicos esta exposto no quadro 7.

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**	**19**			
Vincristina	X		X			X		X			X		X			X		X			
Ciclofosfamida		X					X					X					X					
Doxorrubicina				X					X					X					X			
Prednisona	X	X	X	X																		

Quadro 7 - Esquema do protocolo quimioterápico Short-Madison, utilizado para tratar cães com linfoma multicêntrico, atendidos na Oncologia Clínica, no Serviço de Clínica Médica – HOVET - FMVZ-USP

4.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO

Ao final do período de indução da remissão (4 semanas), os animais foram criteriosamente avaliados e a resposta ao tratamento quimioterápico foi estabelecida por meio de exame físico completo, incluído 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)* publicado em 2009, considerando a mensuração dos linofonodos e os exames de imagem. Os animais foram classificados em quatro grupos: remissão total, remissão parcial, doença progressiva e doença estável (VAIL et al., 2009).

Os animais com desaparecimento total das evidências de doença, ou seja, com retorno ao tamanho normal dos linfonodos, baço e fígado sem evidência de novos sítios de doença foram classificados como em remissão total. Os animais em remissão parcial tiveram uma redução de 30% da somatória dos diâmetros maiores de todos os linfonodos periféricos aumentados. Já no grupo de animais com doença progressiva foram considerados aqueles com aumento de 20% da somatória dos diâmetros maiores em relação à menor medida atingida. Por fim, os animais com doença estável 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 de tratamento, todos os linfonodos dos pacientes foram mensurados para acompanhamento da resposta. Após o termino do protocolo, os pacientes foram avaliados mensalmente para exames de rotina e acompanhamento da progressão da doença através da mensuração dos linfonodos e exames de imagem, em cada avaliação os pacientes eram categorizados em relação ao tipo de resposta.

4.10 COLETA DE MATERIAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ABCB1, ABCC1 E ABCG2 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO

Para a realização de RT-PCR, as amostras foram coletadas de linfonodos afetados após confirmação do diagnóstico citológico e na detecção da recidiva. Por meio de uma agulha de calibre 25 x 0,8mm ou 40 x 12mm, os linfonodos foram puncionados e o material imediatamente armazenado em solução de estabilização e proteção do RNA (RNAlater – Applied Biosystems®) e nele foi mantido até sua utilização e armazenamento no Laboratório de Hematologia Molecular, LIM-31, FM-USP.

Os animais do estudo foram avaliados quanto à expressão de três genes de resistência ABCB1, ABCC1 e ABCG2. Essas expressões foram avaliadas em relação a um *pool* de 8 linfonodos normais (controle), no diagnóstico (antes do início do tratamento antineoplásico) e no momento da recidiva da doença. Com esses resultados, calculou-se a quantificação relativa da expressão gênica seguindo o seguinte critério:

a) modulação da expressão gênica na recidiva em relação à expressão dos genes no diagnóstico. Esse resultado foi chamado “REC-DIAG” (modulação gênica pós-tratamento em relação ao diagnóstico). Para a avaliação da modulação relativa, a expressão dos genes no diagnóstico foi considerada 1, portanto o valor “REC-DIAG” representa o aumento (>1,0) ou a diminuição (0,99) da expressão.

b) modulação da expressão dos genes no linfoma multicêntrico canino em relação aos linfonodos normais, chamado de “DIAG-CONT”. Para a avaliação da modulação relativa, a expressão dos genes no linfonodo normal (controle) foi considerada 1, portanto o valor “DIAG-CONT” representa o aumento (>1,0) ou a diminuição (0,99) da expressão.

c) modulação da expressão dos genes no linfoma multicêntrico canino na recidiva da doença em relação aos linfonodos normais chamado de “REC-CONT”. Para a avaliação da modulação relativa, a expressão dos genes no linfonodo normal (controle) foi considerada 1, portanto o valor “REC-CONT” representa o aumento (>1,0) ou a diminuição (0,99) da expressão.

4.11 EXTRAÇÃO DE RNA

Adicionou-se 1,0 mL de TRIzol para cada 1,0 grama de aspirado de linfonodo e homogenizou-se a amostra com uma pipeta, sendo, posteriormente incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio e a amostra foi agitada vigorosamente durante 15 segundos, seguindo-se um período de 3 minutos de repouso à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa do preparado foi transferida para um novo tubo previamente esterilizado. Adicionou-se 500 µL de isopropanol e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 g durante 10 minutos a 4^{o}C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1,0 mL de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e homogeneizado em vortex, suavemente, por 15 segundos. Centrifugou-se a 7.500 g por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi colocado para secar ao ar por 15 minutos à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µL de água tratada com DEPC, conforme Chomczynski e Sacchin (1987). 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™.

4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES

PCR em tempo real foi utilizada para a análise da expressão dos genes ABCB1, ABCC1, ABCG2, utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. A expressão de cada RNAm foi normalizada em relação à expressão do gene FLNB de acordo com as instruções do fabricante do aparelho “Rotor-Gene RG 3000”(Cobertt Reseach). Os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de C_T (*Cyclo of Threshold*) entre as duplicatas não ultrapassou 0,5. Todos os ensaios utilizaram amostra referência e um controle de amplificação, ao qual não foi adicionada amostra.

Os experimentos PCR em tempo real foram realizados utilizando-se 250ng/µL de RNA e o SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen®), em volume final de 12,5 µL. A condição usual de programação dos ciclos foi de 50 °C por 15 minutos para síntese de cDNA, 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos.

Os sistemas Taq Man™ (Applied Biosystems) foram:

Gene	**Número de catálogo**
ABCB1	Cf02622146_m1
ABCC1	Cf02644361_gH
ABCG2	Cf2672122_w1
FLNB	Cf02675138_mH

Quadro 8 - Genes estudados com número de catálogo disponibilizado pelo fabricante, Applied Biosystems.

Para calcular a quantificação relativa foi utilizado o método $\Delta\Delta C_T$, que utiliza a seguinte fórmula: $\Delta C_T = C_T$ gene alvo - C_T gene endógeno, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ do gene alvo - ΔC_T do gene endógeno. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVACK et al., 2001).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e mediana. Para as variáveis qualitativas calcularam-se freqüências absolutas e relativas.

Para garantir se havia homogeneidade entre os grupos de animais tratados, em relação a sexo e idade, o teste estatístico de Fisher foi aplicado.

Para a comparação de médias de três grupos foi utilizada a Análise de Variância a um fator, quando a suposição de normalidade foi rejeitada foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ROSNER, 1986).

Para se testar a homogeneidade entre as proporções foi utilizado o teste exato de Fisher (quando ocorreram freqüências esperadas menores de 5).

Para o estudo de correlações entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (ROSNER, 1986).

As curvas de sobrevida global foram construídas a partir do método de Kaplan-Meirer. A comparação entre as curvas de sobrevida foi realizada pelo teste de log-rank.

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo 25 cães com linfoma multicêntrico. Os animais tinham entre 2 e 15 anos (média 7,6 anos com desvio padrão de 3,2 e mediana de 7 anos), sendo 52,0% (13/25) fêmeas e 48,0% (12/25) machos. A maioria dos animais era cães com raça definida, sendo Rottweiler e Cocker spaniel as raças mais acometidas representando, cada uma, 12,0% dos animais atendidos. Outras raças incluídas nesse estudo foram Poodle, Boxer, Pit bull e Pastor alemão. Os animais sem definição racial representaram 12,0% dos animais deste estudo. As raças consideradas de grande porte, como Rottweiler, Doberman, Boxer, Pit bull, Pastor alemão, Golden retriever e Labrador representaram 44,0% dos casos e as raças consideradas de porte médio e pequeno, tais como Cocker spaniel, Poodle, Bulldog, Basset hound, Whippet, Schnauzer, Yorkshire e Fox terrier, representaram 56% dos animais (Quadro 9).

Em relação à avaliação citológica, a maioria dos linfomas foi classificada como Linfoblástico, representando 80,0% (20/25), seguida pelo Linfoma Linfocítico de Pequenas Células 20% (5/25) conforme quadro 9.

Os animais que apresentavam algum sintoma referido pelo proprietário representaram 52,0% (13/25) e 48,0% (12/25) dos animais não tinham sintomas exceto o aumento dos linfonodos periféricos. Dentre os animais considerados assintomáticos (a), 16,0% (4/25) estavam no estágio III, 28,0% (7/25) no estágio IV e apenas um animal (4%) no estágio V. Dentre os animais com sintomas (b), 32,0% (8/25) estavam no estagio IV e 20% (5/25) no estágio V (Quadro 9).

ID	Raça	Idade	Sexo	Diagnóstico citológico	Estadiamento
1	Doberman	5	F	Linfoblástico	V (b)
2	Poodle	14	M	Linfoblástico	IV (b)
3	Pit bull	6	M	Linfoblástico	V (a)
4	Doberman	6	F	Linfoblástico	V (b)
5	Boxer	7	M	Linfoc. Peqn.	V (b)
6	Boxer	9	F	Linfoblástico	III (a)
7	Rottweiler	4	F	Linfoblástico	IV (b)
8	Pastor alemão	2	M	Linfoblástico	V (b)
9	S.R.D.	6	F	Linfoc. Peqn.	IV (b)
10	S.R.D.	5	M	Linfoblástico	IV (b)
11	Cocker spaniel	6	F	Linfoblástico	III (a)
12	Cocker spaniel	10	M	Linfoc. Peqn.	IV (b)
13	Bulldog	7	M	Linfoblástico	IV (b)
14	Rottweiler	5	F	Linfoblástico	IV (a)
15	Basset hound	7	M	Linfoc. Peqn.	IV (a)
16	Whippet	11	F	Linfoblástico	IV (a)
17	Poodle	6	M	Linfoblástico	IV (a)
18	Golden retrivier	7	M	Linfoblástico	IV(b)
19	Schnauzer	5	F	Linfoblástico	III (a)
20	S.R.D.	10	F	Linfoblástico	III (a)
21	Cocker spaniel	13	F	Linfoblástico	IV (a)
22	Yorkshire	15	F	Linfoblástico	V (b)
23	Rottweiler	7	M	Linfoc. Peqn.	IV (b)
24	Fox terrier	6	M	Linfoblástico	IV (a)
25	Labrador	10	F	Linfoblástico	IV (a)

Legenda: SRD: sem raça definida, Linfoc. Peqn.: Linfoma Linfocítico de Pequenas Células.

Quadro 9 - Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico segundo identificação (ID), definição racial, idade em anos, sexo, classificação citológica conforme Cowell, Dorsey & Meinkoth (2003) e estadio clínico - São Paulo - 2010

5.2 RESPOSTA AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Os animais do estudo foram tratados com três protocolos quimioterápicos diferentes: COP, VCM e Short-Madison. A maior parte dos animais tratados, 64,0% (16/25) apresentou remissão completa e 36,0% (9/25) remissão parcial. A duração da remissão variou de 28 a 330 dias (média de 132,5 dias com desvio-padrão de 101,1 dias e mediana de 100 dias) (Quadro 10).

Até o momento quatro animais permanecem vivos. Dos 21 animais que vieram a óbito, o tempo de sobrevida variou de 45 a 529 dias (média de 233,1 dias com desvio-padrão de 159,4 dias e mediana de 180 dias) (Quadro 10).

A tabela 1 mostra a homogeneidade dos grupos de cães com linfoma multicêntrico. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cada protocolo de tratamento, e essa distribuição foi homogênea segundo idade e sexo.

Tabela 1- Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico, e verificação da homogeneidade dos grupos em três diferentes protocolos quimioterápicos COP, VCM e Madison, segundo idade e sexo - São Paulo - 2010

	PROTOCOLO			
	COP (n=10)	VCM (n=8)	Madison (n=7)	p
Idade	6,40 ± 3,24	7,38 ± 2,07	9,43 ± 3,69	0,154(1)
Sexo Fem.	5 (38,5%)	3 (23,1%)	5 (38,5%)	0,470(2)

(1) nível descritivo de probabilidade da Analise de Variância a um fator
(2) nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

ID	Protocolo	Tipo de remissão	Duração (dias)	Sobrevida (dias)
1	COP	COMPLETA	270	529
2	COP	COMPLETA	60	90
3	COP	PARCIAL	30	100
4	COP	COMPLETA	45	180
5	COP	COMPLETA	80	110
6	COP	PARCIAL	30	45
7	COP	COMPLETA	40	270
8	COP	PARCIAL	100	150
9	COP	COMPLETA	210	330
10	COP	PARCIAL	28	180
11	VCM	COMPLETA	270	529
12	VCM	PARCIAL	40	90
13	VCM	PARCIAL	50	45
14	VCM	COMPLETA	120	402
15	VCM	COMPLETA	240	450
16	VCM	COMPLETA	210	405
17	VCM	COMPLETA	120	VIVO
18	VCM	PARCIAL	30	80
19	MADISON	COMPLETA	230	VIVO
20	MADISON	PARCIAL	90	240
21	MADISON	COMPLETA	330	360
22	MADISON	PARCIAL	30	90
23	MADISON	COMPLETA	120	220
24	MADISON	COMPLETA	300	VIVO
25	MADISON	COMPLETA	240	VIVO

Quadro 10 - Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico segundo identificação (ID), protocolo de tratamento utilizado, tipo de remissão, duração da remissão (dias) e sobrevida (dias) - São Paulo -2010

Graficamente, a duração da remissão e a sobrevida dos animais foram representadas pela curva de Kaplan-Meier, respectivamente pelos gráfico 1 e 2.

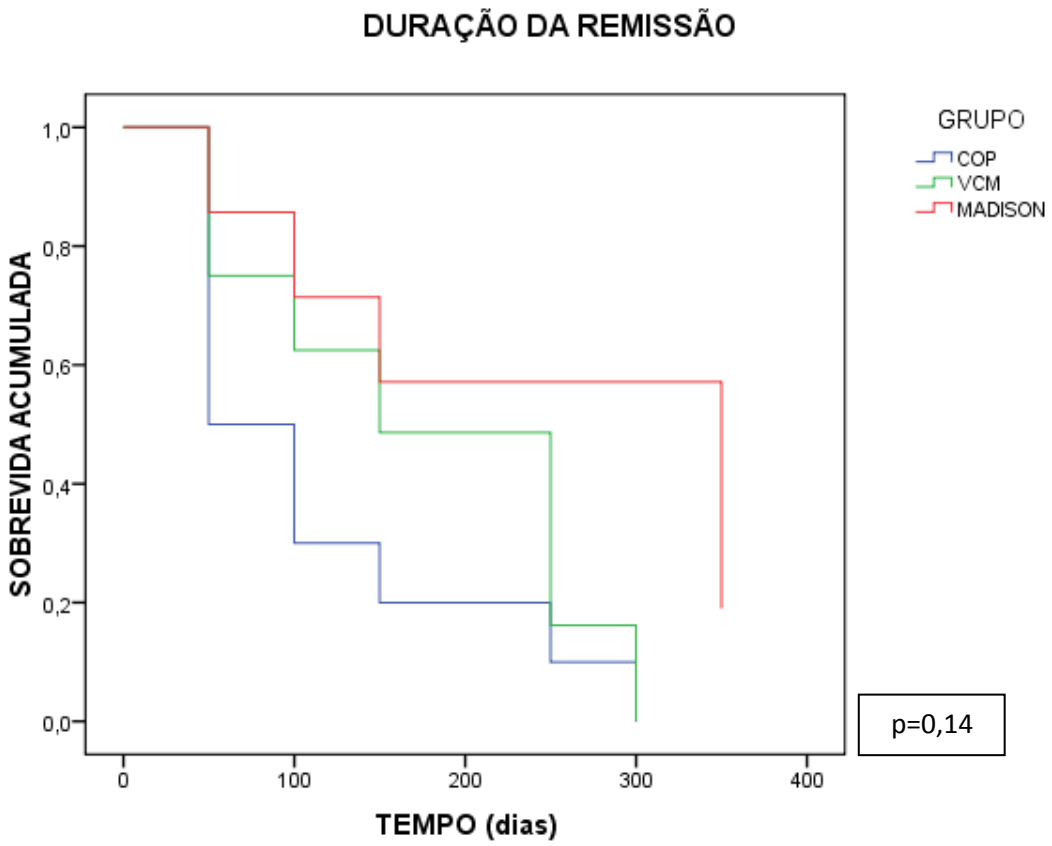


Gráfico 1- Curva de duração da remissão (Kaplan-Meier) e valores de p (teste de log-rank) de cães com linfoma multicêntrico tratados com protocolos quimioterápicos COP, VCM e Madison - São Paulo- 2010

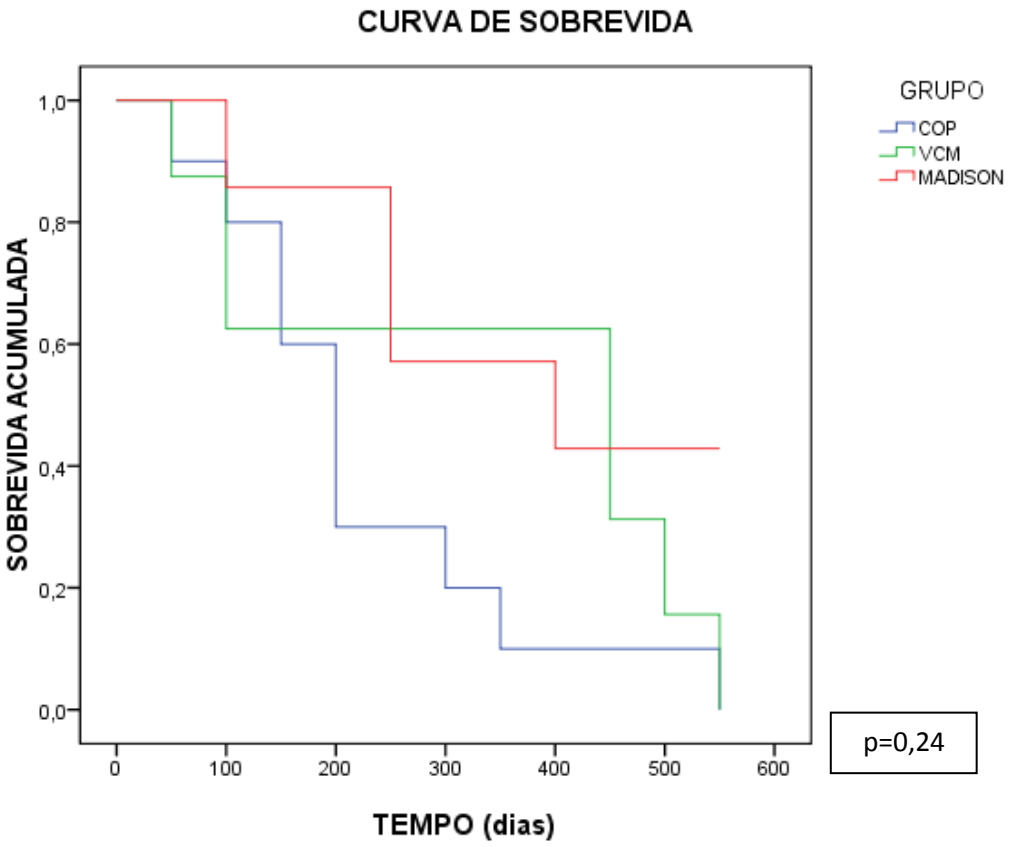


Gráfico 2 - Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de p (teste de log-rank) de cães com linfoma multicêntrico tratados com protocolos quimioterápicos COP, VCM e Madison - São Paulo - 2010

5.3 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DA PCR EM TEMPO REAL

5.3.1 ABCB1

Para a análise de eficiência foram realizadas diluições seriadas do RNAm de um *pool* de RNA de 8 linfonodos que não apresentaram alterações ao exame histopatológico, nas concentrações de 15,62, 31,25, 62,5 e 125ng. A escolha dessas concentrações deveu-se ao fato de que a concentração de uso nos experimentos foi 50ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou *cycle threshold* (C_T), onde o aumento do sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

A figura 5 demonstra a regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência foi calculada através da fórmula $E = (10^{-1/slope} -1)x100$. Desta forma a eficiência de amplificação do gene ABCB1 foi de 99,0%.

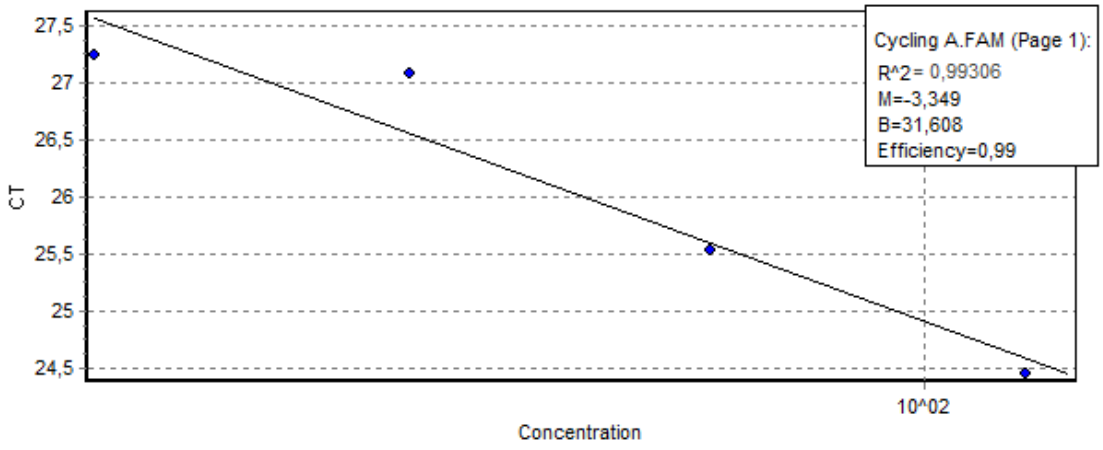


Figura 5 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene ABCB1

5.3.2 ABCC1

Para a análise de eficiência foram realizadas diluições seriadas do RNAm de um *pool* de RNA de 8 linfonodos que não apresentaram alterações ao exame histopatológico, nas concentrações de 15,62, 31,25, 62,5 e 125ng. A escolha dessas concentrações deveu-se ao fato de que a concentração de uso nos experimentos foi 50ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou *cycle threshold* (C_T), onde o aumento do sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

A figura 6 demonstra a regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência foi calculada através da fórmula $E = (10^{-1/slope} -1)x100$. Desta forma a eficiência de amplificação do gene ABCC1 foi de 103,0%.

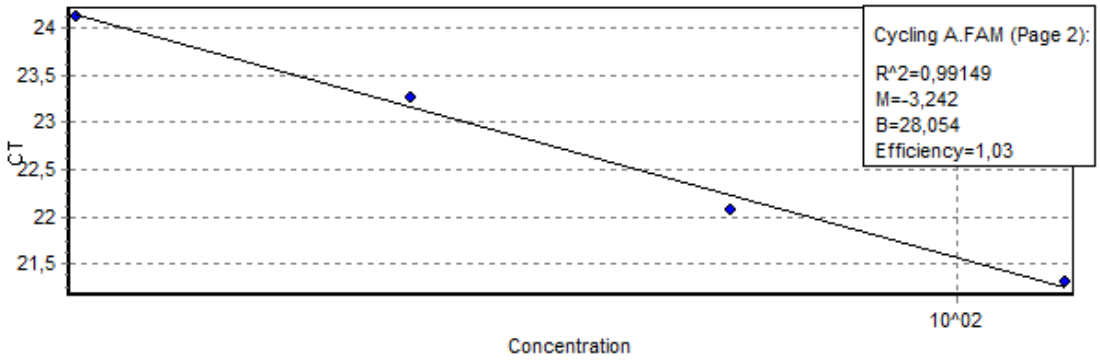


Figura 6 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene ABCC1

5.3.3 ABCG2

Para a análise de eficiência foram realizadas diluições seriadas do RNAm de um *pool* de RNA de 8 linfonodos que não apresentaram alterações ao exame histopatológico, nas concentrações de 15,62, 31,25, 62,5 e 125ng. A escolha dessas concentrações deveu-se ao fato de que a concentração de uso nos experimentos foi 50ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou *cycle threshold* (C_T), onde o aumento do sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

A figura 7 demonstra a regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência foi calculada através da fórmula $E = (10^{-1/slope} -1)x100$. Desta forma a eficiência de amplificação do gene ABCG2 foi de 88,0%.

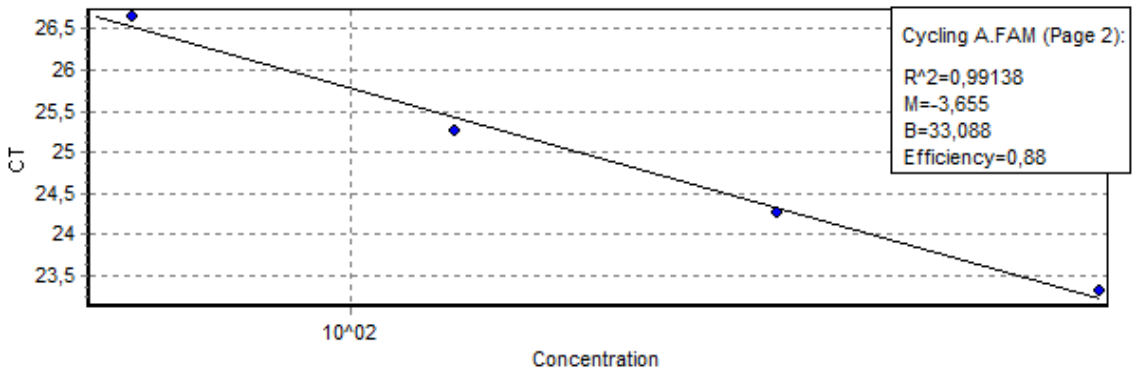


Figura 7 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene ABCG2

5.3.4 Controle endógeno

Para a análise de eficiência foram realizadas diluições seriadas do RNAm de um *pool* de RNA de 8 linfonodos que não apresentaram alterações ao exame histopatológico, nas concentrações de 15,62, 31,25, 62,5 e 125ng. A escolha dessas concentrações deveu-se ao fato de que a concentração de uso nos experimentos foi 50ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou *cycle threshold* (C_T), onde o aumento do sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

A figura 8 demonstra a regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência foi calculada através da fórmula $E = (10^{-1/slope} -1)x100$. Desta forma a eficiência de amplificação do gene do controle endógeno foi de 97,0%.

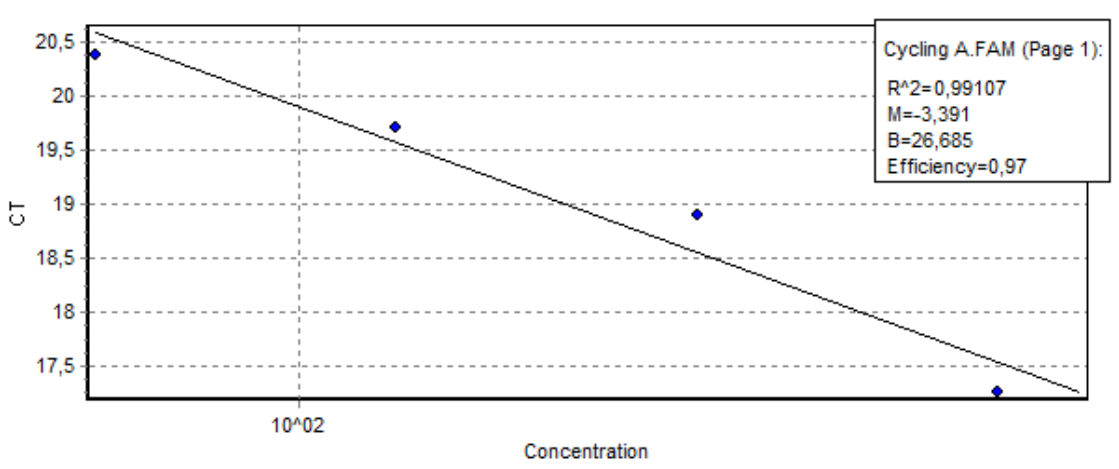


Figura 8 - Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene do controle endógeno

5.4 EXPRESSÃO DOS GENES ABCB1, ABCC1 E ABCG2 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO

Os animais do estudo foram avaliados quanto à expressão de três genes de resistência ABCB1, ABCC1 e ABCG2. Essas expressões foram avaliadas em relação a um *pool* de linfonodos normais (controle), no diagnóstico (antes do início do tratamento antineoplásico) e no momento da recidiva da doença.

Considerando-se os animais com linfoma no momento do diagnóstico, antes do início do tratamento, a expressão do gene ABCB1 foi maior em relação ao controle (linfonodos normais) em 56,0% (14/25) dos casos e menor em 44,0% (11/25) dos cães. Para o gene ABCC1, 88,0% (22/25) dos cães tiveram maior expressão e 12,0% (3/25) tiveram menor expressão do gene no diagnóstico comparado com o linfonodos normais. E, por fim, a expressão do gene ABCG2 foi maior em 52,0% (13/25) e menor em 48,0% (12/25) dos cães com linfoma (Quadro 11).

	ABCB1			ABCC1			ABCG2		
ID	REC/ DIAG	DIAG/ CONT	REC/ CONT	REC/ DIAG	DIAG/ CONT	REC/ CONT	REC/ DIAG	DIAG/ CONT	REC/ CONT
1	2.75	0.57	1.09	0.12	99.04	12.3	0.29	0.45	0.13
2	0.1	41.93	4.17	0.47	0.61	0.68	0.46	1.87	0.86
3	0.34	7.26	2.43	0.93	53.82	49.87	0.46	0.38	0.18
4	3.75	0.55	2.08	0.11	9.06	1.04	2.49	0.49	1.21
5	2.12	0.27	0.57	5.19	0.44	2.3	0.82	1.49	1.22
6	1.13	10.7	12.13	0	2.73	0	2.93	0.69	2.03
7	1.08	1.45	1.57	0.46	19.29	8.94	0.73	0.36	0.26
8	5.32	0.38	2.06	0.11	26.35	2.85	0.31	8.17	2.55
9	0.49	0.53	0.26	1.21	6.5	7.89	0.25	0.28	0.56
10	65.42	2.53	165.42	1.02	6.59	6.68	0.21	1.64	0.33
11	0.32	2.57	0.88	0.13	94.35	12.21	0.26	4.29	1.11
12	0.09	24.76	2.23	0.33	1.04	0.34	1.42	1.78	2.51
13	0.41	1.68	0.69	1.22	12.91	15.67	1.18	1.1	1.29
14	0.21	0.4	0.08	0.56	16.68	9.25	2.11	0.16	0.33
15	0.82	2.3	1.88	0.05	26.72	1.27	0.24	2.79	0.67
16	1.59	0.11	0.17	1.54	4.03	6.23	2.21	0.6	1.34
17	35.26	0.29	10.27	0.92	12.38	11.39	1.31	2.33	3.07
18	0.83	0.1	0.09	4.65	0.21	1	2.13	0.65	1.39
19	0.26	1.38	0.35	0.09	17.75	1.66	14.4	0.19	2.71
20	11.31	0.21	2.45	0.59	1.56	0.93	6.3	0.42	2.64
21	0.03	22.16	0.7	0.2	102.54	20.11	0.11	14.22	1.54
22	0.03	7.01	0.24	0.19	5.35	1.02	0.33	0.53	0.17
23	9.67	0.03	0.28	1.18	1.07	1.27	1.18	3.61	4.29
24	0.27	2.68	0.72	0.03	11.16	0.38	0.81	1.09	0.88
25	0.35	8.46	2.97	0.57	5.31	3.05	1.2	1.55	1.87

Quadro 11 **-** Expressão de RNAm dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, para cães com linfoma multicêntrico. Modulação da expressão gênica na recidiva relacionada ao diagnóstico (REC/DIAG), modulação da expressão gênica no diagnóstico relacionada aos linfonodos normais (DIAG/CONT) e modulação da expressão gênica na recidiva relacionada aos linfonodos normais (REC/CONT) - São Paulo - 2010

Tabela 2 **-** Valores descritivos da expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 segundo média, dp, mediana, mínimo e máximo, para 25 cães com linfoma multicêntrico - São Paulo - 2010

Expressão	Relação	N	Média	Dp	Mediana	Mínimo	Máximo
ABCB1	REC/DIAG	25	5,76	14,40	0,82	0,03	65,42
	DIAG/CONT	25	5,61	9,99	1,45	0,03	41,93
	REC/CONT	25	8,63	32,80	1,09	0,08	165,42
ABCC1	REC/DIAG	25	0,87	1,30	0,47	0,00	5,19
	DIAG/CONT	25	21,50	31,38	9,06	0,21	102,54
	REC/CONT	25	7,13	10,49	2,85	0,00	49,87
ABCG2	REC/DIAG	25	1,77	2,95	0,82	0,11	14,40
	DIAG/CONT	25	2,05	3,08	1,09	0,16	14,22
	REC/CONT	25	1,41	1,08	1,22	0,13	4,29

Legenda: N: número de animais, dp: desvio padrão.

A modulação da expressão gênica no diagnóstico (DIAG/CONT) foi correlacionada com o estadiamento clínico e subestadio (a ou b). Nessa avaliação, a expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, não mostrou diferença significativa entre os 4 grupos analisados(Tabela 3).

Tabela 3 **-** Valores descritivos da expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 segundo média, dp, mediana, mínimo e máximo antes do tratamento, relacionada ao controle, para 25 cães com linfoma multicêntrico, conforme estadiamento clínico - São Paulo - 2010

Expressão	Estadiamento	n	Média	dp	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
ABCB1	III (a)	4	3,72	4,76	1,98	0,21	10,70	
	IV (a)	8	4,56	7,64	1,35	0,10	22,16	0,892
	IV (b)	7	10,42	16,45	1,68	0,03	41,93	
	V	6	2,67	3,46	0,56	0,27	7,26	
ABCC1	III (a)	4	29,10	44,12	10,24	1,56	94,35	
	IV (a)	8	22,38	33,43	11,77	0,21	102,54	0,618
	IV (b)	7	6,86	7,04	6,50	0,61	19,29	
	V	6	32,34	38,04	17,71	0,44	99,04	
ABCG2	III (a)	4	1,40	1,94	0,56	0,19	4,29	
	IV (a)	8	2,92	4,65	1,32	0,16	14,22	0,761
	IV (b)	7	1,52	1,13	1,64	0,28	3,61	
	V	6	1,92	3,09	0,51	0,38	8,17	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

A correlação entre a expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 foi também analisada com relação à idade, duração da remissão e sobrevida no diagnóstico dos cães com linfoma conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman das expressões dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, ao diagnóstico, segundo idade, tempo de remissão e sobrevida - São Paulo - 2010

Expressão		Idade	Tempo de remissão	Sobrevida
ABCB1	r	0,297	-0,046	-0,229
	p	0,150	0,826	0,318
ABCC1	r	-0,517	0,441	0,570
	p	0,008	0,027	0,007
ABCG2	r	0,272	0,212	-0,059
	p	0,188	0,309	0,799

Observa-se na tabela 4 que a expressão de ABCC1 apresentou correlação negativa e foi significante com relação à idade (Gráfico 3) e correlação significante e positiva com tempo de remissão (Gráfico 4) e sobrevida (Gráfico 5). Assim, quanto maior a idade, menor a expressão de ABCC1 e quanto maior o tempo de remissão e sobrevida, maior a expressão de ABCC1. Esses resultados estão demonstrados graficamente a seguir.

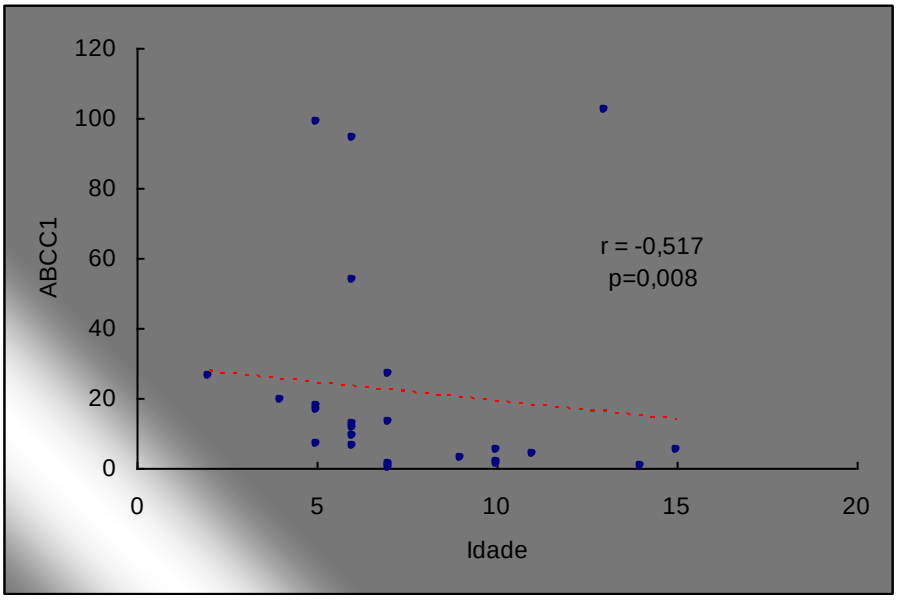


Gráfico 3 - Dispersão com relação à idade e expressão de ABCC1, nos casos de linfoma multicêntrico em cães, no momento do diagnóstico, em relação ao controle

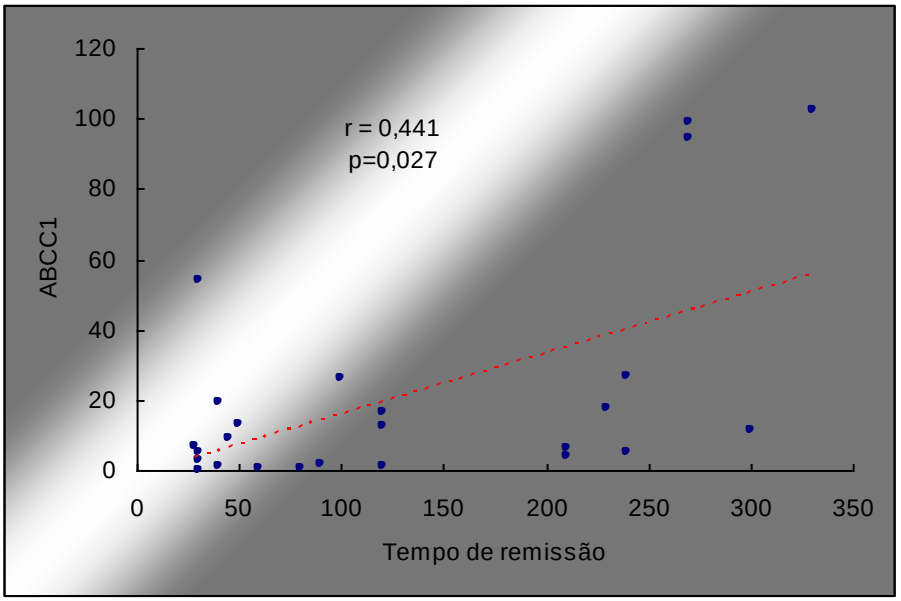


Gráfico 4 **-** Dispersão com relação ao tempo de remissão e expressão de ABCC1, nos casos de linfoma multicêntrico em cães, no momento do diagnóstico, em relação ao controle

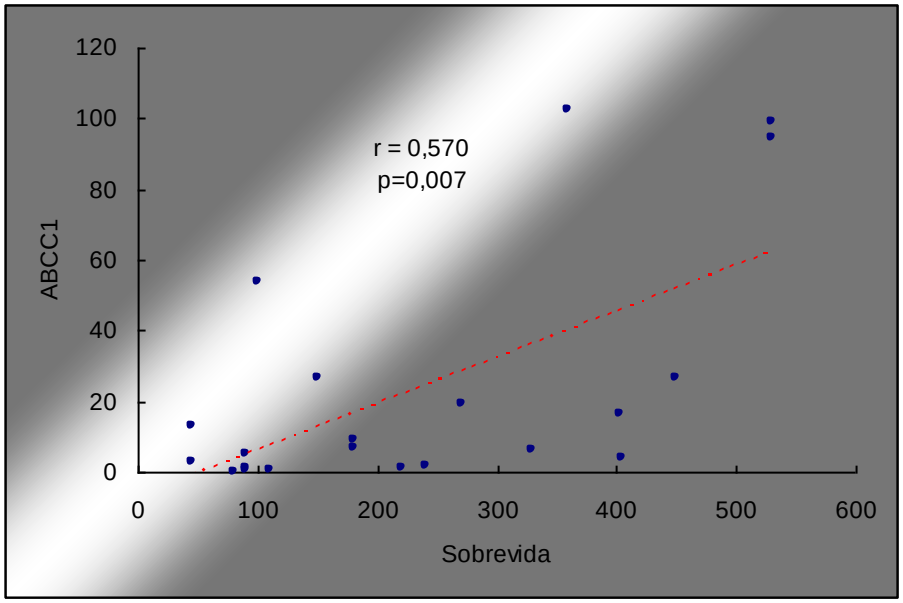


Gráfico 5 **-** Dispersão com relação à sobrevida e expressão de ABCC1, nos casos de linfoma multicêntrico em cães, no momento do diagnóstico, em relação ao controle

5.5 EXPRESSÃO DOS GENES ABCB1, ABCC1 E ABCG2 NO LINFOMA MULTICÊNTRICO CANINO NA RECIDIVA, COMPARADA COM O DIAGNÓSTICO

Os resultados a seguir mostram o quanto a expressão gênica na recidiva, ou seja, após o tratamento, alterou-se em relação à expressão no diagnóstico (antes do tratamento), correlacionando-se com idade, tempo de remissão e sobrevida dos animais, segundo cada protocolo de tratamento, conforme tabela 5.

Na recidiva do linfoma a expressão do gene ABCB1 foi maior em relação ao diagnóstico em 44,0% (11/25) dos casos e menor em 56,0% (14/25) dos cães. Para o gene ABCC1, 28,0% (7/25) dos cães tiveram maior expressão e 72,0% (18/25) tiveram menor expressão do gene na recidiva comparado com o diagnóstico. Por fim, a expressão do gene ABCG2 foi maior em 52,0% (13/25) e menor em 48,0% (12/25) dos cães com linfoma (Quadro 11).

Tabela 5 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman das expressões dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, antes do tratamento, segundo idade, tempo de remissão e sobrevida e protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo - 2010

Protocolo	Expressão		Idade	Tempo de Remissão	Sobrevida
	ABCB1	r	-0,554	-0,024	0,310
		p	0,097	0,947	0,383
COP	ABCC1	r	0,148	0,061	0,162
		p	0,683	0,867	0,656
	ABCG2	r	0,463	-0,253	-0,537
		p	0,178	0,481	0,110
	ABCB1	r	0,135	0,096	0,036
		p	0,750	0,821	0,939
VCM	ABCC1	r	0,282	-0,587	-0,643
		p	0,498	0,126	0,119
	ABCG2	r	0,319	-0,479	-0,357
		p	0,441	0,230	0,432
	ABCB1	r	-0,345	-0,252	0,105
		p	0,448	0,585	0,895
Madison	ABCC1	r	0,270	-0,321	0,200
		p	0,558	0,482	0,800
	ABCG2	r	-0,631	-0,286	-0,200
		p	0,129	0,535	0,800

Pelos dados da tabela 5, observa-se que as diferença de expressão dos genes após o tratamento não apresentou correlação significativa com idade, tempo de remissão e sobrevida.

5.6 RELAÇÃO DA EXPRESSÃO ENTRE OS GENES ABCB1, ABCC1 E ABCG2

A correlação da expressão entre os genes foi avaliada no linfoma multicêntrico canino na recidiva em relação ao diagnóstico e demonstrada na tabela 6. Observa-se, pela tabela abaixo, que as diferenças de expressão não apresentam correlação significante entre si.

Tabela 6 **-** Valores do coeficiente de correlação de Spearman das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, na recidiva em relação a expressão no diagnóstico - São Paulo - 2010

		ABCB1	ABCC1	ABCG2
ABCB1	r	1,000	0,196	0,204
	p	-	0,347	0,328
ABCC1	r	0,196	1,000	0,014
	p	0,347	-	0,948
ABCG2	r	0,204	0,014	1,000
	p	0,328	0,948	-

A correlação da expressão entre os genes foi avaliada no linfoma multicêntrico canino no diagnóstico comparando com o controle e, esta demonstrada na tabela 7. Observa-se, pela tabela abaixo, que as diferenças de expressão não apresentam correlação significante entre si.

Tabela 7 **-** Valores do coeficiente de correlação de Spearman das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, no diagnóstico em relação a expressão dos genes no controle São Paulo - 2010

		ABCB1	ABCC1	ABCG2
ABCB1	r	1,000	0,196	0,204
	p	-	0,347	0,328
ABCC1	r	0,196	1,000	0,014
	p	0,347	-	0,948
ABCG2	r	0,204	0,014	1,000
	p	0,328	0,948	-

A mesma análise foi realizada sobre a expressão dos genes na recidiva da doença em relação ao controle, e mais uma vez a expressão na recidiva não apresentou correlação significativa (Tabela 8).

Tabela 8 **-** Valores do coeficiente de correlação de Spearman das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, após o tratamento em relação ao controle - São Paulo - 2010

		ABCB1	ABCC1	ABCG2
ABCB1	r	1,000	-0,133	0,124
	p	-	0,527	0,555
ABCC1	r	-0,133	1,000	-0,300
	p	0,527	-	0,145
ABCG2	r	0,124	-0,300	1,000
	p	0,555	0,145	-

Para os diferentes protocolos, a relação dos genes também foi estudada comparando-se a expressão na recidiva com o diagnóstico, e não houve diferença significante (Tabela 9).

Tabela 9 **-** Valores descritivos das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, modulação da expressão na recidiva comparada com o diagnóstico, em relação ao protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo - 2010

Expressão	Protocolo	N	Média	Dp	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
ABCB1	COP	10	8,25	1,63	20,16	0,10	65,42	
	VCM	8	4,94	0,62	12,26	0,09	35,26	0,247
	Madison	7	3,13	0,27	5,05	0,03	11,31	
ABCC1	COP	10	0,96	0,47	1,55	0,00	5,19	
	VCM	8	1,18	0,74	1,50	0,05	4,65	0,507
	Madison	7	0,41	0,20	0,41	0,03	1,18	
ABCG2	COP	10	0,90	0,46	0,98	0,21	2,93	
	VCM	8	1,36	1,37	0,79	0,24	2,21	0,441
	Madison	7	3,48	1,18	5,26	0,11	14,40	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis
Legenda: N: número de animais, dp: desvio padrão.

Ainda para os diferentes protocolos, a relação dos genes também foi estudada para a expressão no momento do diagnóstico relacionada ao controle, e não houve significância entre as diferenças das expressões (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores descritivos das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, modulação da expressão no diagnóstico comparada ao controle em relação ao protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo - 2010

Expressão	Protocolo	N	Média	Dp	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
ABCB1	COP	10	6,62	1,01	12,90	0,27	41,93	
	VCM	8	4,03	1,04	8,44	0,10	24,76	0,682
	Madison	7	5,99	2,68	7,85	0,03	22,16	
ABCC1	COP	10	22,44	7,83	31,47	0,44	99,04	
	VCM	8	21,04	12,65	30,91	0,21	94,35	0,970
	Madison	7	20,68	5,35	36,56	1,07	102,54	
ABCG2	COP	10	1,58	0,59	2,39	0,28	8,17	
	VCM	8	1,71	1,44	1,38	0,16	4,29	0,626
	Madison	7	3,09	1,09	5,04	0,19	14,22	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis
Legenda: N: número de animais, dp: desvio padrão.

A relação da expressão dos genes nos diferentes protocolos também foi estudada na recidiva relacionada ao controle, e não houve significância entre as diferenças das expressões (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores descritivos das diferenças de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, no linfoma canino, modulação da expressão na recidiva comparada com o controle, em relação ao protocolo quimioterápico utilizado - São Paulo - 2010

Expressão	Protocolo	N	Média	dp	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
ABCB1	COP	10	19,18	2,07	51,50	0,26	165,42	
	VCM	8	2,04	0,79	3,42	0,08	10,27	0,182
	Madison	7	1,10	0,70	1,13	0,24	2,97	
ABCC1	COP	10	9,26	4,77	14,85	0,00	49,87	
	VCM	8	7,17	7,74	5,86	0,34	15,67	0,552
	Madison	7	4,06	1,27	7,13	0,38	20,11	
ABCG2	COP	10	0,93	0,71	0,83	0,13	2,55	
	VCM	8	1,46	1,32	0,91	0,33	3,07	0,115
	Madison	7	2,01	1,87	1,35	0,17	4,29	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis
Legenda: N: número de animais, dp: desvio padrão.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A quimioterapia é uma das mais importantes formas de se tratar neoplasias malignas em seres humanos e nos animais, principalmente as neoplasias hematopoéticas, entretanto, o insucesso dessa terapia é freqüente entre os pacientes dificultando o controle da doença e mantendo uma alta taxa de mortalidade dentre os tratados. A principal causa da falha do tratamento antineoplásico está associada à resistência das células cancerosas aos agentes antineoplásicos, secundariamente ao aumento da expressão das proteínas transmembrânicas ABC (GLAVINAS et al., 2004). Em seres humanos e nos animais, a expressão dos transportadores transmembrânicos ABC tem ganhado importância no âmbito científico, podendo em alguns casos, ser utilizada como marcador prognóstico de evolução clínica e para a determinação de um tratamento antineoplásico individualizado. Entretanto, a correlação da expressão desses transportadores com a resistência clínica quimioterápica, resposta a quimioterapia e sobrevida não estão bem definidos, principalmente nos animais.

Com relação ao presente estudo, dentre os 25 cães com linfoma multicêntrico avaliados, todos apresentavam estágio III a V. Segundo a bibliografia consultada, 20% dos cães são atendidos nos estágios I e II, e a maioria dos cães não apresenta sintomas no momento do diagnóstico (subestadiamento a) (WITHROW; VAIL, 2007), o que não foi verificado nesse estudo. Possivelmente por questões culturais e financeiras, tem-se como conseqüência, o maior tempo que os proprietários levam para procurar atendimento veterinário.

A maior parte dos 25 animais tratados (64%) apresentou remissão completa e 36% apresentaram remissão parcial, concordando com os resultados observados por Rosenthal (1990); Fan (2003) e Withrow e Vail (2007). Os animais tratados com protocolo COP tiveram uma taxa de remissão completa de 60%, menor do que os dados encontrados na bibliografia consultada que são de 70,0% a 75% (COTTER; GOLDSTEIN, 1983; CATER, HARRIS; WITHROW, 1987). Embora com uma taxa de remissão completa maior, os animais desse estudo também tiveram resultados inferiores aos levantados na bibliografia, para os protocolos VCM e Short-Madison. No protocolo VCM, a taxa de remissão completa foi de 62,5% enquanto que a

descrita é de 75% (ROSENTHAL 1996). Dentre os três protocolos, os animais tratados com o protocolo Short-Madison tiveram melhor resposta, atingindo 71,4% de remissão completa, sendo ainda assim, menor do que os 94,0% descritos por Garret et al. (2002).

O tempo médio da duração da remissão foi de 132,5 dias (mediana de 100 dias), porém com alto desvio-padrão de 101,1 e a sobrevida média foi de 233,1 dias (mediana de 180 dias) com desvio padrão de 159,4 dias mostrando uma grande variação na resposta individual dos pacientes. As médias da duração da remissão e sobrevida ficaram abaixo dos resultados descritos na bibliografia consultada (FAN, 2003; HOSOYA et al., 2007; WITHROW, VAIL; 2007). Uma possível explicação para esse fato tem por base o atendimento tardio dos cães com linfoma. Embora muitos proprietários sejam atentos a qualquer alteração que seus animais possam apresentar, outros não percebem alterações no volume dos linfonodos, procurando auxílio profissional somente quando os sintomas são mais evidentes, em conseqüência do avanço da doença. Outra hipótese seria o desenvolvimento da resistência propriamente dito, o que contribuiria para diminuir a remissão e a sobrevida.

Três genes de resistência foram avaliados, o gene ABCB1, também conhecido com MDR-1, o gene ABCC1 ou MRP-1 e o gene ABCG2 ou BCRP. Embora os primeiros trabalhos sobre resistência a múltiplas drogas, mais especificamente sobre a expressão de glicoproteína P, tenham sido publicados há cerca de 15 anos (MOORE et al., 1995; BERGMAN; OGILVIE; POWERS, 1996), ainda pouco se sabe sobre a expressão e atividade dos transportadores e sua correlação com o prognóstico dos animais, resposta ao tratamento, e se a expressão dos genes poderia influenciar na escolha do tratamento quimioterápico.

Neste trabalho, a expressão quantitativa dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 foi avaliada pela técnica de RT-PCR (PCR em tempo real) em linfonodos normais, no aspirado de linfonodo de animais com linfoma multicêntrico ao diagnóstico (antes do tratamento) e na recidiva. Essa técnica foi utilizada pela primeira vez para detecção de MDR-1 (ABCB1), em linfoma canino *in vivo* e *in vitro* por Steingold et al. (1998). Após esse estudo, Culmsee et al. (2004) avaliaram quantitativamente a expressão do ABCB1 em tecidos normais e neoplásicos de cães. Embora outros

estudos qualitativos de expressão de genes de resistência a droga tenham sido realizados em linfoma canino (REZENDE, 2005), somente após a utilização da técnica de RT-PCR quantitativa (CULMSEE et al., 2004), a expressão de ABCB1 pode ser realmente comparada entre os diferentes tecidos, neoplasias ou para diferentes estadiamentos de uma determinada neoplasia.

O método escolhido para coleta de material e posterior avaliação da expressão gênica nesta pesquisa foi a punção aspirativa com agulha fina, e posterior armazenamento do material em solução de estabilização e proteção do RNA (RNAlater – Applied Biosystems®). O RNA extraído a partir da amostra conservada apresentava boa qualidade e quantidade suficiente para análise, permitindo uma boa avaliação da expressão de RNA. Há pouco tempo, o método preconizado para avaliação da expressão gênica em linfonodos caninos partia de um linfonodo excisado cirurgicamente, o que garantia grande quantidade de amostra para as avaliações. Starkey e Murphy (2009) publicaram um estudo comparativo da expressão gênica em cães com linfoma utilizando amostras coletadas pela punção aspirativa com agulha fina e amostras de linfonodo coletadas cirurgicamente, e os resultados em relação à quantidade e qualidade dos genes foi equivalente. Anteriormente a esse trabalho, um estudo qualitativo de expressão de RNA utilizou amostras coletadas com punção com agulha em linfonodo canino conseguindo também uma boa amostra (REZENDE, 2005). Em humanos, também existem resultados equivalentes para a expressão de genes de amostras coletadas por punção aspirativa ou excisão cirúrgica em linfoma não-Hodgkin (MORRISON et al., 2006). Porém, essa técnica de coleta não pode ser usada indiscriminadamente para todas as neoplasias; para carcinoma ovariano e pancreático humano, por exemplo, há uma grande diferença da expressão gênica para os diferentes métodos de coleta de material (CENTENO et al., 2005), mas verificou-se, neste caso, que ela é adequada para estudo de expressão gênica em linfonodos de cães.

Quando se compara a expressão da glicoproteína P em linfonodos normais de cães por meio de diferentes técnicas, resultados distintos podem ser observados. Ginn (1996) utilizando a técnica de imunoistoquímica verificou que os linfonodos normais não expressaram a glicoproteína P, enquanto que por meio de RT-PCR quantitativa, o RNAm ABCB1 foi detectado por CULMSEE et al., (2004). Concordando com o estudo de Culmsee et al. (2004), os resultados desse trabalho

também mostraram a expressão do gene ABCB1 em linfonodos normais de cães. Uma possível justificativa para que a glicoproteína P não pudesse ter sido identificada pela técnica de imunoistoquímica pode ser atribuída à menor sensibilidade dessa técnica na marcação desse transportador, quando comparada com RT-PCR. Utilizando a técnica de citometria de fluxo no linfonodo normal de cães, a glicoproteína P também foi identificada em 100% dos animais (SCHLEIS et al., 2008), mostrando mais uma vez a presença do RNAm e da proteína no linfonodo normal dos cães.

A imunoistoquímica também apresenta uma menor sensibilidade na detecção do transportador ABCG2/BCRP. Em cultura celular de carcinoma mamário humano, a técnica de imunoistoquímica falhou em identificar algumas amostra cujo RNAm fora identificado por meio de RT-PCR. Segundo os autores do trabalho, essa diferença é decorrente do nível basal do BCRP nessas células (FANEYTE, et al., 2002).

As células que apresentam grande atividade secretória tais como célula dos rins, células hepáticas e placentárias têm alta expressão do gene ABCC1 (MRP-1). Em linfonodo humano, a imunoistoquímica marcou parcialmente o MRP-1 nas células foliculares e paracorticais (FLENS et al., 1996). Em linfonodo canino, por meio de citometria de fluxo, o transportador ABCC1 foi encontrado em 61,9% (13/21) de material aspirado de linfonodos poplíteos normais (SCHLEIS et al., 2008), enquanto que neste estudo, por meio de RT-PCR quantitativo, todas as amostras de linfonodo normal canino expressaram o RNAm do gene ABCC1. Para o gene ABCG2, poucos dados bibliográficos foram encontrados sobre a expressão do gene ou da marcação da proteína por imunoistoquímica ou *Western blot* em cães. Há relato em humanos sobre a alta expressão do BCRP por meio de imunoistoquímica ou *Northern blot* em placenta, baixa expressão em cérebro, próstata, intestino delgado, testículo, ovário e fígado e ausência de expressão no coração, pulmão, rim, pâncreas, baço, timo e leucócitos circulantes (DOYLE et al., 1998). Nas amostras normais de linfonodos de cães, encontramos a expressão do gene ABCG2, parecendo ser esta a primeira descrição em linfonodos de cães.

A expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 foi analisada em relação ao estadiamento clínico no linfoma, mostrando que animais em diversas fases da

doença tiveram expressões gênicas similares. Esse resultado confronta o comportamento dos genes de resistência ABCB1, ABCC1 e LRP estudados por RT-PCR em linfoma não-Hodgkin humano (LI et al., 2009), no qual alta expressão gênica foi detectada nos pacientes que apresentavam a doença em fase avançada. Uma possível explicação para essa diferença está no fato de que os dentre os cães com linfoma estudados, não havia animais no estadio I e II, que pudessem, talvez, apresentar menor expressão dos genes.

Quando correlacionou-se a idade com a expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2, observou-se uma correlação negativa significante apenas para o gene ABCC1 (p= 0,008). Assim, quanto maior a idade dos cães com linfoma, menor a expressão do gene ABCC1 no momento do diagnóstico. Este fato contraria a hipótese de que a idade aumentaria a expressão de genes de resistência a drogas, devido à maior exposição celular a agentes externos. Porém, são poucos os trabalhos encontrados na bibliografia que correlacionam a expressão de genes de resistência com idade, para que um consenso seja adotado. Em humanos, por exemplo, a expressão do gene ABCC1 na leucemia mielocítica não está relacionada à idade dos pacientes (van de HEUVEL-EIBRINK et al., 2007). Por outro lado, a relação da expressão do gene ABCC1 e idade pode apresentar padrões diferentes para cada célula e para cada espécie, pois em células mononucleares da medula óssea de camundongos idosos, os transportadores ABCB1 e ABCC1 têm maior atividade quando comparada a de camundongos jovens, contrariando nossos resultados, mas o mesmo não acontece em células do timo, onde a idade não interfere com a atividade do transportador ABCC1 (KYLE-CEZARR; ECHEVARRIA-LIMA; RUMJANEK, 2007). A expressão e atividade deste transportador têm resultados distintos quanto à espécie, doença e tipo celular envolvido, não sendo possível, até o momento, estabelecer uma justificativa para esta correlação.

No linfoma canino a expressão do gene ABCG2 não foi correlacionada com idade, mostrando um resultado similar ao estudo em leucemia linfoblástica em humanos, no qual a expressão do gene ABCG2 e de seu transportador também não foi correlacionada com a idade dos pacientes, além de não apresentar relação com resposta clínica ao tratamento (SUVANNASANKHA et al., 2004). Por outro lado, pacientes humanos com leucemia mielocítica aguda com mais de 60 anos de idade apresentam maior expressão dos genes ABCB1 e ABCG2 conforme idade (van de

HEUVEL-EIBRINK et al., 2007) quando comparada com pacientes mais jovens (DAMIANI et al., 2006). Os autores sugeriram que nos pacientes com leucemia mielocítica aguda, novas estratégias de tratamento como modulação dos genes de resistência a droga MDR-1 e BCRP deveriam ser associadas com intuito de melhorar as respostas terapêuticas (van de HEUVEL-EIBRINK et al., 2007).

Em cães, a relação entre a expressão de genes de resistência com idade foi sugerida por Culmsee et al. (2004) em tecido hepático de cães. Os autores inferiram que a modulação da expressão pode ter sido influenciada pela idade, já que os animais considerados doentes eram mais velhos do que os animais saudáveis (CULMSEE et al., 2006). Embora esse trabalho aponte para uma correlação entre idade e expressão de ABCB1, o que não foi encontrada neste estudo com linfoma, esta correlação pode ser diferente para diferentes tecidos, e ainda sofrer variação entre o tecido normal e neoplásico. Estudos envolvendo tecidos e neoplasias diferentes e poderão esclarecer essa correlação.

A expressão da glicoproteína P é relatada em trabalhos científicos há duas décadas como fator prognóstico em várias neoplasias em humanos, e o aumento da expressão desta proteína foi inversamente correlacionada com resposta ao tratamento quimioterápico (CHAN et al., 1991; CHAN et al., 1993; WANG et al., 2008). No linfoma canino, esse tipo de observação também foi relatado em diferentes trabalhos, mostrando que o aumento da expressão da glicoproteína P marcada pelo anticorpo C219 por meio de imunoistoquímica, era maior na recidiva da doença, e que tinha relação com duração da remissão e sobrevida dos pacientes (BERGMAN, OGILVIE, POWERS, 1996). Resultado semelhante foi observado utilizando a técnica de *Western blot* no qual apenas 3% (1/30) dos pacientes tinham expressão da glicoproteína P no momento do diagnóstico e na recidiva a expressão foi verificada em 40% (3/8) dos casos (MOORE et at. 1995). Um estudo qualitativo da expressão do gene ABCB1 por RT-PCR foi realizado em cães com linfoma multicêntrico. No diagnóstico, 93,3% (14/15) dos animais expressavam o gene ABCB1, ainda nesse trabalho a sua proteína foi detectada por Dot Blotting estando presente em 85,8% (12/14) dos animais. Na recidiva da doença, a expressão gênica aumentou para 100% (15/15) dos animais em 92,9% (13/14) dos cães detectou-se a proteína (REZENDE, 2005). No presente estudo, todas as amostras coletadas ao diagnóstico expressavam o gene ABCB1, sendo a expressão maior em 56,0%

(14/25) dos linfomas, e menor em 44,0%, em relação ao controle. Porém não houve modulação desta expressão após o tratamento da doença.

Utilizando os anticorpos contra glicoproteína P C494 e C219, Lee et al. (1996) observaram aumento da expressão com ambos os anticorpos. Na recidiva da doença, esse aumento foi considerável e o resultado sugeriu a esses autores que o mecanismo da glicoproteína P poderia estar envolvido no insucesso do tratamento no linfoma canino. Todos esses resultados contrariam os obtidos nesse trabalho, pois embora tenhamos observado um aumento da expressão do RNAm ABCB1, esse aumento não foi significante e não correlacionou-se com duração da remissão e sobrevida dos pacientes. Por outro lado, nossos resultados podem ser comparados com os de Steingold et al. (1998) que utilizaram a técnica de RT-PCR semi-quantitativo para detecção do MDR-1 (ABCB1) e observaram aumento da expressão em apenas 18% (2/11) dos cães tratados com quimioterapia; a expressão do gene foi detectada em todos os casos de linfoma na recidiva, resultado também encontrado neste estudo.

Todas as pesquisas que identificaram a expressão do gene ABCB1 em linfoma multicêntrico canino mostraram que, mesmo em pequena quantidade, o gene estava expresso em quase todas as amostras no momento do diagnóstico. Neste estudo, isso também foi observado, e a modulação da expressão na recidiva, embora maior no estudo realizado por Steingold et al. (1998); Culmsee et al. (2004) e Rezende (2005) não foi correlacionada com características clínicas dos pacientes. Recentemente, outro trabalho tentando correlacionar a expressão de ABCB1 no linfoma canino com resposta ao tratamento antineoplásico, também não apontou uma diferença na expressão gênica (TOMIYASU et al., 2010).

Em seres humanos, a expressão da glicoproteína P foi estudada por imunoistoquímica em 25 pacientes com linfoma cutâneo de células T. Dentre os pacientes 72% (18/25) expressavam a glicoproteína P, sendo que 9 foram tratados com protocolos antineoplásicos e a outra metade recebeu placebo. Todos os pacientes com expressão da glicoproteína P tratados ou não, evoluíram com doença progressiva e morreram em pouco tempo. Acredita-se que neste caso, devido à alta expressão da glicoproteína P na maior parte dos tumores, outros mecanismos de resistência possam também estar envolvidos (JILLELLA et al., 2000).

Em outras neoplasias hematopoéticas em humanos, como a leucemia mielóide, a expressão do MDR-1 detectada por meio de imunoistoquímica foi inicialmente relacionada como fator prognóstico negativo. Os pacientes com alta expressão do MDR-1 apresentaram menor duração da remissão e menor sobrevida (Del POETA et al., 1996; van den HEUVEL-EIBRINK et al., 1997). Quando se comparou a expressão da glicoproteína P na recidiva da doença com o momento do diagnóstico, observou-se ainda o aumento da expressão do MDR-1, ou seja na leucemia mielocitica aguda, os pacientes tratados e que não respondiam mais a terapia antineoplásica tinham maior expressão de glicoproteína P, que possivelmente diminuía a resposta antitumoral dos agentes quimioterápicos (WOOD et al., 1994; GUERCI et al., 1995; LIST, 1996). Entretanto, alguns anos depois, os mesmos autores, utilizando técnicas e RT-PCR quantitativo demonstraram resultados diferentes para a leucemia mielocítica aguda. Os pacientes que tinham maior expressão do RNAm do gene ABCB1 detectada por RT-PCR não tinham menor duração da remissão ou menor sobrevida, ou seja, a expressão do gene ABCB1 não estava mais relacionada a um fator prognóstico negativo da doença (van den HEUVEL-EIBRINK et al., 2002; van den HEUVEL-EIBRINK et al., 2007).

Este fato observado para a leucemia mielocítica aguda em humanos mimetiza as observações encontradas no linfoma multicêntrico canino. Muito embora a expressão da glicoproteína P por meio de imunoistoquímica (BERGMAN, OGILVIE, POWERS, 1996) ou *Western blot* (MOORE et al., 1995) tenha sido considerada um fator prognostico negativo, observamos que a expressão do RNAm não se correlacionou com a duração da remissão e sobrevida dos pacientes.

A expressão do RNAm ABCC1 no momento do diagnóstico apresentou correlação positiva e significante com a duração da remissão e sobrevida dos pacientes. Ou seja, quanto maior a expressão do gene ABCC1 no diagnóstico da doença, maior o tempo de duração da remissão e maior a sobrevida dos pacientes. Em neoplasias hematopoéticas em humanos, o RNAm ABCC1 foi detectado por RT-PCR em leucemia mielocítia aguda (van den HEUVEL-EIBRINK et al., 2007) porém nenhuma relação clinica foi correlacionada a expressão gênica. Em cães com linfoma multicêntrico, a expressão gênica do ABCC1 foi estudada em grupos de cães quimiossensíveis e quimiorresistentes ao tratamento antineoplásico e nenhuma alteração da expressão foi observada (TOMIYASU et al., 2010). Uma hipótese que

justificaria a correlação positiva entre expressão de ABCC1 e tempo de duração da remissão e sobrevida observada neste trabalho, relaciona-se ao fato da expressão do ABCC1 estar aumentada em 88,0% (22/25) dos cães no diagnóstico e da modulação do gene na recidiva ter sofrido pequena variação (0,87). Os animais que no diagnóstico já apresentavam um menor expressão do gene ABCC1 foram os animais que também tiveram pior prognóstico da doença (ID: 2, 5, 12 e 18), com uma sobrevida máxima de 110 dias, exceto para o animal ID: 23 que teve uma sobrevida de 220 dias (ainda abaixo do esperado). Assim, neste estudo, mesmo com uma pequena modulação da expressão gênica após o tratamento, animais com menor expressão do gene ABCC1 no diagnóstico tiveram pior prognóstico da doença. Estudos prévios não avaliaram a expressão do gene no diagnóstico em relação a um grupo controle, e sim avaliaram a modulação desse gene na recidiva. E, assim como neste estudo, viram que o tratamento não induz o aumento ou a diminuição da expressão gênica (STEINGOLD et al., 1998; TOMIYASU et al., 2010).

Em um estudo quantitativo da expressão de RNAm por RT-PCR observou-se um aumento do número de cães que expressavam o gene após o tratamento quimioterápico no linfoma multicêntrico canino. Antes do tratamento, ou seja, no diagnóstico 93,3% (14/15) dos cães expressavam o gene e após o tratamento 100% expressavam o RNAm, em relação a detecção do transportador por Dot blotting o aumento foi de 71,5% para 85,8% dos casos (REZENDE, 2005). Embora para o linfoma e outras neoplasias hematopoiéticas, a expressão de ABCC1 não tenha uma implicação clínica, em carcinoma mamário humano, a expressão do ABCC1 está relacionada a fator prognóstico negativo, com diminuição da sobrevida de pacientes principalmente dos pacientes que apresentam resistência a antracíclicos (BURGER et al., 2003). A expressão do gene ABCC1 e de seu transportador foi estudado por RT-PCR e *immunoblotting* em 40 pacientes humano com linfoma no diagnóstico e na recidiva. Os autores não encontraram diferença significativa quanto à expressão do gene no diagnóstico em relação à recidiva (ZHAN et al., 1997). Os autores concluíram que o gene ABCC1 não constituiria o mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência nesses pacientes, e isso ocorre também em diversas linhagens celulares que expressam o gene, porém não desenvolvem o fenótipo de resistência (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; LEONARD; FOJO; BATES, 2003).

O transportador ABCC1 foi estudado por imunistoquímica em 48 casos de linfoma difuso de células B no momento do diagnóstico e em 44,0% (21/48) a expressão foi observada. Porém, não houve diferença estatística quanto ao tipo de remissão e sobrevida entre os pacientes que expressavam ou não o gene ABCC1, indicando mais uma vez que talvez não ocorra a participação dessa proteína no fenótipo de resistência (FILIPITS et al., 2000). Resultado semelhante ao linfoma canino, no qual a expressão de RNAm ABCC1 não mostrou correlação com modulação do gene a nenhum tratamento antieoplásico utilizado.

Em relação ao gene ABCG2, no momento do diagnóstico os animais apresentaram um aumento médio de 2,05 vezes na expressão gênica quando comparada com a expressão nos linfonodos normais. Na recidiva da doença, não houve diferença significante, sendo esse resultado diferente daquele encontrado em leucemia mielocítica aguda em humanos, onde houve aumento significante da expressão do BCRP correlacionada com a resistência clínica dos pacientes (ROSS et al., 2000; van den HEUVEL-EIBRINK et al., 2002; UGGLA et al., 2005). Já em pacientes humanos com leucemia linfocítica aguda, a expressão do BCRP por RT-PCR foi baixa no diagnóstico dos pacientes e não correlacionada com características clínicas (SUVANNASANKHA et al., 2004).

Neste estudo, a modulação dos genes de resistência a múltiplas drogas, foi avaliada em protocolos quimioterápicos diferentes com o objetivo de verificar se a modulação sofreria variação em função dos protocolos antineoplásicos utilizados para cada grupo. Porém, não houve variação da modulação dos genes em função do protocolo quimioterápico utilizado. Como não houve um padrão de expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 na recidiva, no diagnostico, ou seja, antes do tratamento, pouca diferença fariam os quimioterápicos nessa modulação, no linfoma canino. A expressão adquirida da glicoproteína P já foi relacionada a vincristina, doxorrubicina e prednisolona (AMBUDKAR, et., 2003; LAGE, 2003), utilizadas nos protocolos quimioterápicos. Um fator importante para que justifique a não modulação da expressão do ABCB1 após o tratamento, é o fato da vincristina estar presente em todos os protocolos utilizados.

Uma hipótese analisada neste estudo é de que pacientes que tivessem uma maior expressão de ABCG2 antes do tratamento pudessem apresentar menor tempo

de duração da remissão e menor sobrevida com o protocolo Short-Madison e um maior tempo de remissão e sobrevida com o protocolo VCM, pois já foi recentemente demonstrado *in vitro* que a expressão do transportador ABCG2 em cultura celular MDCK-II causa resistência a doxorrubicina e não ao metotrexato (HONSCHA et al., 2009). Porém, entre o grupo dos animais tratados com protocolo Short-Madison (que inclui a doxorrubicina), o animal de número 21 apresentou alta expressão de ABCG2 no diagnóstico em relação ao controle (aumento de 14,22), mas apresentou remissão completa da doença e uma duração de remissão e tempo de sobrevida de 330 e 360 dias respectivamente, que é considerada uma boa resposta clínica ao tratamento.

Muitos estudos têm mostrado resultados conflitantes sobre a atividade do BCRP nas células neoplásicas, principalmente os carcinomas mamários, onde esse transportador foi pela primeira vez identificado (ALLIKMETS et al., 1998; DOYLE et al., 1998). Burger et al. (2003) encontraram uma correlação negativa entre a expressão do RNAm do ABCG2 e resposta clínica ao tratamento antineoplásico, ou seja, os pacientes com maior expressão de ABCG2 nos carcinomas mamários tinham pior resposta ao tratamento e isso foi mais importante no grupo de pacientes que foi tratado com protocolo quimioterápico FAC (5'fluorouracil, ciclofosfamida e doxorrubicina) do que em relação ao protocolo que não incluía doxorrubicina, o CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5'fluorouracil). Segundo os autores, os resultados sugerem que os antracíclicos estariam atuando removendo das células neoplásicas mamárias, por meio do transportador BCRP, o antineoplásico, resultando em uma pior resposta terapêutica. Em contraste, outros dois estudos, também com neoplasia mamária, não comprovaram uma correlação entre a expressão do RNAm e a resposta clínica ao tratamento (KANZAKI et al., 2001; FANEYTE et al., 2002).

Em linfoma multicêntrico canino resistente ao protocolo de Madison Wisconsin de 25 semanas, a expressão de RNAm do gene ABCB1 por RT-PCR foi maior em 4 dos 10 cães classificados como resistentes ao tratamento (TOMIYASU et al., 2010). Da mesma forma, em nosso estudo, 2 dos 25 cães que tiveram altas expressões de ABCB1 no diagnóstico (ID 2: 41,93 e ID 12: 24,76) também tiveram uma curta duração da remissão (ID 2: 60 dias e ID 40 dias) e sobrevida (ID 2: 90 dias e ID 90 dias). Apesar disso, a expressão dos genes foi muito heterogênea, não

sendo possível estabelecer qualquer relação os dados com diferença estatisticamente significante.

Este estudo não demonstrou uma modulação da expressão dos genes ABCB1, ACBC1 e ABCG2 no linfoma canino na recidiva quando comparado com o diagnóstico, porém, pelo fato da resistência ao tratamento antineoplásico ser marcante nos animais acredita-se que outros transportadores poderiam contribuir para o fenótipo de resistência a múltiplas drogas, além de outros mecanismos de resistência adquirida que poderiam interferir com essa resposta.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que foi desenvolvido este estudo, pode-se concluir que:

O RNAm detectado por RT-PCR dos genes ABCB1, ACBC1 e ACBG2 encontra-se expresso no linfonodo normal dos cães e nos linfonodos dos animais com linfoma multicêntrico, tanto no momento do diagnóstico quanto na recidiva.

A expressão do RNAm dos genes ABCB1, ACBC1 e ABCG2 no diagnóstico não está correlacionada com estadiamento clínico no caso do linfoma multicêntrico canino.

A expressão do RNAm do gene ABCC1 no momento do diagnóstico do linfoma multicêntrico em cães apresenta correlação negativa com idade e positiva em relação a tempo de remissão e sobrevida dos pacientes.

A modulação da expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2 na recidiva comparada ao momento do diagnóstico não se correlacionou com o tempo de remissão e a sobrevida dos pacientes.

Os diferentes protocolos de tratamento antineoplásico COP, VCM e Madison não interferiram com a modulação da expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCG2.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALLIKMETS, R.; SCHRIML, L. M.; HUTCHINSON, A.; ROMANO-SPICA, V.; DEAN, M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 58, p. 5337–5339, 1998.

AMBUDKAR, S. V.; KIMCHI-SAFARTY, C.; SAUNA, Z. E.; GOTTESMAN, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, p. 7468-7485, 2003.

ANDRADE A. L.; LUVIZOTTO, M. C. R.; CRUSCO, S. E.; FERRAI, H. F.; LOPES, R. A. Avaliação imunohistoquímica da expressão da glicoproteína-P em tumores de mama de cadelas tratadas com prednisona. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 75-84, 2008.

BAKOS, E.; EVERS, R.; SZAKACS, G.; TUSNADY, G. E.; WELKER, E.; SZABO, K.; DE HM VAN, D. L.; BORST, P.; VARADI, A.; SARKADI, B.; Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 32167–32175, 1998.

BERGER, W.; HAUPTMANN, E.; ELBLING, L.; VETTERLEIN, M.; KOKOSCHKA, E. M.; MICKSCHE, M. Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemorresistance of human melanoma cells. **Internal Journal of Cancer**, v. 71, p. 108-115, 1997.

BERGMAN, P. J. Mechanisms of anticancer drug resistance. **The Veterinary Clinics – Small Animal Practice**, v. 33, p. 651-667, 2003.

BERGMAN, P. J.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E. Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 6, p. 354-359, 1996.

BERGEMEYER, H. U. Glutamate-oxaloacetate transaminase: Methods of enzymatic analysis. **Verlag Chemie**, v. 2, n. 7, p. 727-773, 1974.

BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. **Cancer Research**, v. 30, n. 4, p. 1174-1184, 1970.

BIERGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 2-34.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJHHOLDS, J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 16, p. 1295-1302, 2000.

BLACKWOOD, L.; SULLIVAN, M.; LAWAON, H. Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a reviews of 84 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 62-69, 1997.

BRACHT, K.; KIFER, T.; DÖLKEN, G.; BEDNARSKI, P. J. Characterization of three B-cell lymphoma cell lines from chemotherapy resistant patients with respect to in vitro sensitivity to 21 antitumor agents, ABC-transportes expression and cellular redox status. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 133, p. 957-967, 2007.

BREEDVELD, P.; BEIJNEN, J. N.; SCHELLENS, J. H. Use of p-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailabily and CNS penetration of anticancer drugs. **Trends in Phamacological Sciences**, v. 27, n. 1. p. 17-24, 2006.

BRENDEL,M.; ZENTNER, J. Brain-tumour drig resistance: the bare essentials. **Lancet Oncology**, v. 3, n. 7, p. 397-406, 2002.

BRENN S. H.; COUTO S. S.; CRAFT D. M.; LEUNG, C.; BERMAN, P. J. Evaluation of P-glycoprotein expression in feline lymphoma and correlation with clinical outcome. **Veterinary Comparative Pathology**, v. 6, n. 3, p. 201-211, 2008.

BURGER, H.; FOEKENS, J. A.; LOOK, M. P.; MEIJER-VAN GELDER, M. E.; KLIJN, J. G.; WIEMER, E. A.; STOTER, G.; NOOTER, K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 827-836, 2003.

CARTER, R. F.; HARRIS, C. K.; WITHROW, S. J. Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 23, p. 221- XXX, 1987.

CENTENO, B. A.; ENKEMANN, S. A.; COPPOLA, D.; HUNSTSMANM S.; BLOOM, G.; YEATMAN, T. J. Classification of human tumors using gene expression profiles

abtained after microarray analysis of fine-needle aspiration biopsy samples. **Cancer**, v. 105, p. 101-109, 2005.

CHAN, H. S.; HADDAD, G.; THORNER, P.S.; DEBOER, G.; LIN, Y.P.; ONDRUSEK, N.; YEGER, H.; LING, V. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 23, p. 1608-1614, 1991.

CHAN, H. S.; THORNER, P. S.; HADDAD, G.; DEBOER, G.; GALLIE, B. L.; LING, V. Multidrug resistance in cancers of childhood: clinical relevance and circumvention. **Advances in Pharmacology**, v. 24, p. 157-197, 1993.

CHEN, Y. N.; MICKLEY, L. A.; SCHWARTZ, A. M.; ACTON, E. M.; HWANG, J. L.; FOJO, A. T. Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. **The Journal of the Biological Chemistry**, v. 265, p. 10073-10080, 1990.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

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

CHUN, R.; GARRETT, L. D.; VAIL, D. M Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.163-192.

COLE, S. P.; DEELEY, R. G. Multidrug resistance mediated by the ATB-binding cassette transporter protein MRP. **Bioessays**, v. 33 p. 920-931, 1998.

COLE, S. P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K. C.; STEWART, A. J.; KURZ, E. U.; DUNCAN, A. M.; DEELEY, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, v. 258, p. 1650-1654, 1992.

COWELL, R. L.; DORSEY, K. E.; MEINKOTH, J. H. Lymph node cytology. **The Veterinary Clinics Small Animal Pratice**, v. 33, p. 47-67, 2003.

CONRAD, S.; KAUFFMANN, H. M.; ITO, K.; LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; SCHRENK, D.; COLE, S. P. A naturally occurring mutation in MRP1 results in a

selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance. **Pharmacogenetics,** v. 12, p. 321–330, 2002.

COTTER, S. M. Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincritine, and prednisone: I.treatment of dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 19, p. 159- 165, 1983.

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

DALLAS, S.; SCHLICHTER, L.; BENDAYAN, R. Multidrug resistance protein (MRP) 4- and MRP 5-mediated efflux of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenineby microglia. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 3, p. 1221-1229, 2004.

DAMIANI, D.; TIRIBELLI, M.; CALISTRI, E.; GEROMIN, A.; CHIARVESIO, A.; MICHELUTTI, A.; MICHELUTTI, A.; CAVALLIN, M.; FANIN, R. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Haematologica**, v. 91, n. 6, p. 825–828, 2006.

DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **FEBS Letters***,* v. 580, p. 1103–1111, 2006.

DEL POETA, G.; STASI, R.; ARONICA, G.; VENDITTI, A.; COX, M. C.; BRUNO, A.; MAIS, M.; TRIBALTO, M.; AMADORI, S.; PAPA, G. Clinical relevance of Pglycoprotein expression in *d*e novo acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 87, p. 1997-2004, 1996.

DIETEL, M.; ARPS, H.; LAGE, H.; NIENDORF, A.; Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistence in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. **Cancer Research**, v. 50, p. 6100-6106., 1990.

DIETRA, J.E.; SCHEFFER, G.L.; CATALA, I.; MALIEOAARD, M.; SCHELLENS, J.H.; SCHEPER, R.J.; GERMA-LLUNCH, J.R.; IZQUIERDO, M.A. Frequent expression of the multidrug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. **Journal of Pathology**, v. 198, p. 213-219, 2002.
DOBSON, J. M.; BLACKWOOD, L. B.; MCINNES, E. F.; BOSTOCK, D. E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T. M.; TOM, B. D. M. Prognostic variables in canine

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

DOBSON, J. M.; GORMAN, N. T. Canine multicentric lymphoma II: response to treatment by two different chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, p. 9-15, 1994.

DOBSON, J. M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGER, K.; WOOD, J. L. N. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 440-446, 2002.

DOUMAS, B. T.; BIGGS, H. G.; WATSON, W. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chemica Acta**, v. 31, p. 87-96, 1971.

DOYLE, L. A.; YANG, W.; ABRUZZO, L. E.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A. K.; ROSS, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 15665-15670, 1998.

DOYLE, L. A.; YANG, W.; ABRUZZO, L. E.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A. K.; ROSS, D. D. Cloning and characterization of breast cancer resistance protein (BCRP), a novel ATP-binding cassette (ABC) transporter that may contribute to the multidrugresistance phenotype of MCF-7/AdrVp breast cancer cells. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v. 39, 1998.

ETTINGER, S. N.; Principles of treatment for canine lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 92-97, 2003.

FAN, T. M. Lymphoma updates. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 33, p. 455-471, 2003.

FANEYTE, I. F.; KRISTEK, P. M. MALIEOAARD, M.; SCHEFFER, G. L.; SCHEPER, R. J.; SCHEKKEBS, J. H.; VAN DE VIJVER, M. J.; Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1068-1074, 2002.

FEDASENKA, U. U.; SHMAN, T. V.; SAVITSKI, V. P.; BELEVCEV, M. V. Expression of MDR1, LRP, BCRP and BCL-2 genes at diagnosis of childhood all: comparison with MDR status after induction therapy. **Experimental Oncology**, v. 30, n. 3, p. 248-252, 2008.

FETSCH, P. A.; ABATI, A.; LITMAN, T.; MORISAKI, K.; HONJO, Y.; MITTAL, K.; BATES, S.E. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance associated protein in normal tissues. **Cancer Letters**, v. 235, p. 84-92, 2006.

FILIPITS, M.; JAEGER, U.; SIMONITSCH, I.; CHIZZALI-BONFADIN, C.; HEINZL, H.; PIRKER, R. Clinical relevance of the lung resistance protein in diffuse large B-cell lymphomas. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 9, p. 3417-3423, 2000.

FLENS, M. J.; ZAMAN, G. J. R.; VALK, P. V. C.; IZQUIERDO, M. A.; SCHROEIJERS, A. B.; SCHEFFER, G. L; GROEP, P. V. D.; HAAS, M. D.; MEIJER, C. J. L. M.; SCHEPER, R. J. Tissue distribuituion of the multidrug resistence protein. **American Journal of Pathology**, v. 148, n. 4, p. 1237-1247, 1996.

FOJO, A.; LEBO, R.; SHIMIZU, N.; CHIN, J. E.; RONINSON, I. B.; MERLINO, G. T.; GOTTESMAN, M. M.; PASTANI, I. Localization of multidrug resistance-associated DNA sequence to human chromosome 7. **Somantic Cell and Molecular Genetics**, v. 12, n. 4, p. 415-420, 1986.

FUQUA, S. A. W.; MORETTI-ROJAS, I. M.; SHNEIDER, S. I.; McGUIRE, W. L. P-glycoprotein expression in human breast cancer cell. **Cancer Research**, v. 47, p. 2103-2106, 1987.

FOSTER, A. P.; STURGESS, C. P.; GOULD, D. J.; IWASAKI, T.; DAY, M. J Pemphigus foliaceus in association with systemic lupus erythematosus, and subsequent lymphoma in a cocker spaniel. **The Journal of Small Animal Pratice**, v. 41, n. 6, p. 266-270, 2000.

GAMST, O.; TRY, K. Determination of serum-phosphate without deproteinization by ultraviolet spectrophotometry of the phosphomolybdic acid complex. Scandinavian **Journal of Clinical Laboratory Investigation**, v. 40, p. 483-486, 1980.

GARRET, L. D.; THAMM, D. H.; CHUN, R.; DUDLEY, R.; VAIL, D. M. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 704-709, 2002.

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

GLAVINAS, H.; KRAJCSI,P.; CSEREPES, J.; SARKADI, B. The role of ABC transportes in drug resistance metabolism and toxicity. **Current Drug Delivery**, v. 1, n. 1. p. 27-42, 2004.

GONZALEZ T. P.; SCHIENGOLD, M.; CHIES, J. A. B. Implicações clínicas dos Polimorfismos do gene de resistência a múltiplas drogas MDR1 (ABCB1). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 4, n. 3/4, p. 27-38, 2006.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; MAXIMA, M. D. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

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

GUERCI, A.; MERLIN, J. L.; MISSOUM, N.; FELDMANN, L.; MARCHAL, S.; WITZ, F.; ROSE, C.; GUERCI, O. Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and Pglycoprotein expression simultaneously determined by flow cytometry. **Blood**, v. 85, p. 2147-2153, 1995

GRADHAND, U.; KIM, R. B.; Pharmacogenomics of MRP transporters (ACBCC1-5) and BCRP (ABCG2). **Drug Metabolism Reviews**, v. 40, p. 317-354, 2008.

GUO, Y.; KO, K.; RITTER, C. A.; CHEN, Z. S.; GRUBE, M.; JEDLITSCHKY, G.; IIIMER, T.; AYRES, M.; BECK, J. F.; SIEGMUND, W.; EHNINGER, G.; GANDHI, V.; KROEMER, H. K.; KRUH, G. D.; SCHAICH, M. Expression of ABCC-Type nucleotide exporters in blast of adul acute myeloid leukemia: Relation to long-term survival. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 5, p. 1762-1769, 2009.

HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C.; HAHN, E. A.; Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 528-540, 1994.

HAYES. H. M.; TARONE, R. E.; CANTOR, K. P. On The association between canine malignant lymphoma and opportunity for exposure to 2,4- dichlorophenoxyacetic acid. **Environmental Research**, v. 70, n. 2, p. 119-125, 1995.
HAYES, H. M.; TARONE, R. E.; CANTOR, K. P.; JESSEM C. R.; Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with do owner's use of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid herbicides. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 3, p. 12226-12231, 1991.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; STEIN, H.; BANKS, P. M.; CHAN, J. K.; CLEARY, M. L.; DELSOL, G.; WOLF-PEETERS, C.DE.; FALINI, B.; GATTER, K. C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. **Blood**, v. 84, p. 1361-1392, 1994.

HEYDEN, S. V. D.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R. Tissue distribution of P-glycoprotein in cats. **Anatomia Histologia Embryologia - Journal of Veterinary Medice**, v. 38,p. 455-460, 2009.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: From microorganisms to man. **Annual Review of Cell Biology**, v. 8, p. 67–113, 1992.

HONSCHA, K. U.; SCHIRMER, A.; REISCHAUER, A.; SCHOON, H-A.; EINSPANIER, A.; GABEL, G. Expression of ABC-transport protein canine mammary cancer: consequences of chemotherapy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 218-223, 2009.

HOSOYA, K.; KISSEBERTH, W. C.; LORD, L. K.; ALVAREZ, F. J.; LARA-GARCIA, A.; KOSAREK, C. E.; LONDON, C. A.; COUTO, C. G. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 1355-1363, 2007.

IMPELLIZERI, J. A.; HOWELL, K.; MCKEEVER, K. P.; CROW, S. E. The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 556-558, 2006.

ISHIKAWA, T. The ATP-dependent gluthathione s-conjugate export pump. **Trends in Biochemical. Sciences**, v. 17, n. 11, p. 463-468, 1992.

JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; HUMMEL-EISENBEISS, J.; BURCHELL, B.; KEPPLER, D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. **The Biochemical Journal**, v. 327, p. 305–310, 1997.

JILLELLA, A. P.; MURREN, J. R.; KHAWAJA, K. H.; LONGLET, B. J.; EDELSON, R. L.; COOPER, D. L.; P-glycoprotein expression and multidrug resistance in cutaneous T-cell lymphoma. Cancer Investigation, v. 8, n. 7, p. 609-613, 2000.

JONKER, J. W.; BUITELAAR, M.; WAGENAAR, E.; VAN DER VALK, M. A.; SCHEFFER, G. L.; SCHEPER, R. J.; PLOSCH, T.; KUIPERS, F.; ELFERINCK, R. P.; ROSING, H.; BEIJNENM J. H.; SCHINKEL, A. H. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15649-15654, 2002.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulation drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 455, p. 152-162, 1976.

KANZAKI, A.; TOI, M.; NAKAYAMA, K.; BANDO, H.; MUTOH, M.; UCHIDA, T.; FUKUMOTO, M.; TAKEBAYASHI, Y. Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. Japanese Journal of Cancer Research, v. 92, p. 452–458, 2001.

KAWABATA, S.; OKA, M.; SHIOZAWA, K.; TSUKAMOTO, K.; NAKATOMI, K.; SODA, H.; FUKUDA, M.; IKEGAMI, Y.; SUGAHARA, K.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S.; DOYLE, L. A.; ROSS, D. D.; KOHNO, S. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 280, n. 5, p. 1216-1223, 2001.

KARTNER, N. D.; EVERNDEN-PORELLE, G.; BRANDALEY, L. V. Detection of glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. **Nature**, v. 316, p. 820-823, 1985.

KELLER, E. T. Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. **Cancer**, v. 70, p. 2334-2337, 1992.

KELLER, E. T.; MACEWEN, E. G.; ROSENTHAL, R. C.; HELFAND, S. C.; FOX, L. E. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorrubicin for canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, p. 289-295, 1993.

KIM, M.; TURNQUIST, H.; JACKSOM, J.; SGAGIAS, M.; YAM Y.; GONG, M.; DEAN, M.; SHARP, J. G.; COWAN, K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoetic stem cells. **Clinical Cancer Research**, v. 1, p. 22-28, 2002.
KIUPEL, M.; RESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 292-300, 1999.

KUO, M. T.; BEDNARSKI, P.; KOHNO,K.; SALENO, M.; TARASIUK, J.; ZUNINO, F. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **Antioxidant Redox Signalization**, v. 11, n.1, p. 99-134, 2009.

KRUH, G. D.; YANPING, G.; HOPPER-BORGE, E.; BELINSKY, M. G.; CHEN, Z. S. ABCC10, ABCC11, and ABCC12. **European Journal of Applied Physiology**, v. 453, p. 675-684, 2007.

KRUH, G. D.; BELINSKY, M. G. The MRO family of drug efflux pumps. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7537-7552, 2003.

KRUH, G. D.; GAUGHAN, K. T.; GODWIN, A.; CHAN, A. Expression pattern of MRP in human tissues and adult solid tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 1256–1258, 1995.

KWAK, J-O.; LEE, S. H.; LEE, G. S.; KIM, M. S.; AHN, Y-G.; LEE, J. H.; KIM, S. W.; KIM, K. H.; LEE, M. G. Selective inhibidor of MDR1(ABCB1) by HM30181 increases oral bioavailability and therapeutic efficacy of paclitaxel. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, p. 92-98, 2010.

KYLE-CEZAR, F.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; RUMJANEK, V. M. Independent regulation of ABCB1 and ABCC activities in thymocytes and bone marrow mononuclear cells during aging. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 238-248, 2007.

LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 188-199, 2003.

LEGENDRE, A. M.; Treatment of dogs with lymphoma: a work in progress. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 1166-1167, 2007.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G.; KEPPLER, D. ATPdependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **The Biochemical Journal**, v. 314, p. 433–437, 1996.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G.; KEPPLER, D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 27807-27810, 1994.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHLER, M.; BUCHHOLZ, U.; BROM, M.; KEPPLER, D. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, p. 201-205, 1996.

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

LI E.; LI R.; ZHANG Z. Clinical significance of P-glicoprotein expression in breast cancer. **Zhounghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 20, p. 371-373, 1998.

LI, L.; SU, L. P.; MA, L.; ZHAO, J.; ZHU, L.; ZHOU, Y. A. Expression and significance of P-gp/mdr1 mRNA, MRP and LRP in non-Hodgkin's lymphoma. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 31, n. 3, p. 199-202, 2009.

LIST, A. F. Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 10, p. 937–942, 1996.

LIU, Q.; OHSHIMA, K.; KIKUCHI, M. High expression of mdr-1 gene and p-glycoprotein in initial and rebiopsy specimens of relapsed B-cell lymphoma. **Histopathology**, v. 38, p. 209-216, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHNITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOE, D. W.; ALMQUIST, K. C.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G. ATP-dependent 17-beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9683-9689, 1996.

LÓPEZ-KARPOVITCH, X.; GRAUE, G.; CRESPO-SOLÍS, E.; PIEDRAS, J. Multidrug resistance-1 in T lymphocytes and natural killer cells of adults with idiopatjic thrombocytopenic purpura: effect of prednisone treatment. **Achieves of Medical Research**, v. 39, p. 541-545, 2008.

LURIE, D. M.; GORDON, I. K.; THÉON, A. P.; RODRIGUEZ, C. O.; SUTER, S. E.; KENT, M. S. Sequential low-dose rate half-body irradiation and chemotherapy for the treatment of canine multicentric lymphoma. **Journal so Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n.5, p. 1064-1070, 2009.

LUSTGARTEN, J. A. WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic, method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MA, L.; PRATT, S. E.; CAO, J.; DANTZIG, A. H.; MOORE, R. E.; SLAPAK, C. A. Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 1335-1342, 2002.

MACDONALD, V. S.; THAMM, D. H.; KURZMAN, I. D.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 732-736, 2005.

MALIEPAARD, M.; SCHEFFER, G. L.; FANEYTE, I. F.; VAN GASTELEN, M, A, PIJNENBORG, A. C.; SCHINKEL, A. H.; VAN DE VIJVER, M. J.; SCHEPER, R. J.; SCHELLENS, J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. **Cancer Research**, v. 61, n. 8, p. 3458-3464, 2001.

MARCONATO, L. The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: A review of recent developments and future prospects. **The Veterinary Journal**, 2010. No prelo.

MARZOLINE, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T.; KIM, R. B. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 1, p. 13-33, 2004.

MICHAYLOVA, V.; LLLKOVA, P. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. **Analyses Chim Acta**, v. 53, p. 194-198, 1971.

MIYOSHI, N.; TOJO, E.; OISHI, A.; FUJIKI, M.; MISUMI, K.; SAKAMOTO, H.; KAMEYAMA, K.; SHIMIZU, T.; YASUDA, N. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, n. 6, p. 531-533, 2002.

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

MORRISON, C.; PALATINI, J.; RIGGENBACH, J.; RADMACHER, M.; PORCU, P. Fine-needle aspiration biopsy of non-Hodgkin lymphoma for use in expression microarray analysis. **Cancer**, v. 108, p. 311-318, 2006.

MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of lymphoid and hematopoietic tissue. In: MEUTEN, D. J.**Tumors of domestic animals**. 3. ed., Berkekley: University of California Press, 1990. p. 231-307.

NIEHANS, G. A.; JASZCZ, W.; BRUNETTO, V.; PERRI, R. T.; GAJL-PECZALSAK, K.; WICK, M. R.; TSURUO, T.; BLOOMFIELD, C. D.; Immunohistochemical identification of p-glycoprotein in previously untreated, diffuse large cell and immunoblastic lymphomas. **Cancer Research**, v. 52, p. 3768-3775, 1992.

NIES, A. T.; JEDLITSCHKY, G.; KÖNIG, J.; HEROLD-MENDE, C.; STEINER, H. H.; SCHMITT, H. P.; KEPPLER, D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. **Neuroscience**, v. 129, p. 349–360, 2004.

NORTHRUP, N. C.; RASSNICK, K. M.; SNYDER, L. A.; STONE, M. S.; KRISTAL, O.; COTTER, S. M.; MOORE, A. S. Neutropenia associated with vincristine and L-asparaginse induction chemotherapy for canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 570-575, 2002.

OWEN, L. N.; BOSTOCK, D. E.; HALLIWELL, R. E. W. Cell-mediated and humoral immunity in dogs with spontaneous lymphosarcoma. **European Journal of Cancer**, v. 11, p. 18-91, 1975.

OZVEGY-LACZKA, C.; CSEREPES, J.; ELKIND, N. B.; SARKADI, B.; Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. **Drug Resistance Updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 8, n. 1-2, p. 15-26, 2005.

PENTILLA, I. M.; JOKELA, H. A.; VITALA, A. J. Activities of aspartato and alanino aminotransferase and alkaline phosphatase in sera of healthy subjects. **The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 35, n. 3, p. 275-284, 1975.

PRIESTER, W. A.; MCKAY, F. W. The occurrence of tumors in domestic animals. **Nation Cancer Institute Monograph**, v. 54, p. 221-225, 1980.

POON, R. T.; NG, I. O.; LAU, C.; YU, W. C.; YANG, Z. F.; FAN, S. T.; WONG, J. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, p. 1775–1785, 2002.

RAAIJMAKERS, H. G. P.; IZQUIERDO, H. M.; LOKHORSR, H. M.; LEEUW, C. D. E.; BELIEN, J. A. M.; DEKKER, A. W.; SCHEPER, R. J.; SONNEVELD, P. Lung-resistence-related protein expression is a negative predictive factor for response to conventional low but no to intensified dose alkylanting chemotherapy in multiple myeloma, **Blood**, v. 91, n. 3, p. 1029-1036, 1998.

RASSNICK, K. M.; MAUDIN, G. E.; AL-SARRAF, R.; MAULDIN, G. N.; MOORE, A. S.; MOONEY, S. C. MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 576-580, 2002.

REZENDE, B. C. G. **Estudo da resistência a múltiplas drogas no linfoma canino**. 2005. 121F. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RIGATO, I.; PASCOLO, L.; FERNETTI, C.; OSTROW, J. D.; TIRIBELLI, C. The human multidrugresistance-associated protein MRP1 mediates ATP-dependent transport of unconjugated bilirubin. **Biochemical Journal**, v. 383, p. 335–341, 2004.

RIORDAN, J. R.; LING, V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicines permability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 12701-12705, 1979.

ROGERS, K. S. L-Asparaginase for treatment of lymphoid neoplasia in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.194, p.1626-1630, 1989.

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

ROSNER, B. **Fundamentals of biostatistics**. 2. Ed. Boston: PWS Publishers, 1986. 584p.

ROSS, D. D.; KARP, J. E.; CHEN, T. T.; DOYLE, L. A. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 365-368, 2000.

ROTHNIE, A.; CONSEIL, G.; LAU, A. Y. T.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Mechanistic differences between GSH transport by multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) and GSH modulation of MRP-1mediated transport. **Molecular Pharmacology**, v. 74, p. 1630-1640, 2008.

RUTLEY, M.; MACDONALD, V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 9, p. 977-979, 2007.

SAGLAM, A.; HAYRAN, M.; UNER, A. Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins in mature T/NK-cell lymphomas. **APMIS:** acta patholofica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, v. 116, p. 791-800, 2008.

SAKAEDA, T.; NAKAMURA, T.; OKUMURA, K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 11, p. 1391-1400, 2002.

SARTOR, L. L.; BENTJEN, S. A.; TREPANIER, L.; MEALEY, K. L. Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 1, p. 117-118, 2004.

SAUERBREY, A.; VOIGT, A.; WITTIG, S.; HÄFER, R.; ZINTL, F. Messenger RNA analusis of the multidrug resistance related protein (MRP1) and the lung resistance protein (LRP) in the novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, v. 43, n. 4, p. 875-879, 2002.

SCHLEIS, S. E.; LEBLANC, A. K.; NEILSEN, N. R.; LEBLANC, C. J. Flow cytometric evaluation of multidrug resistance proteins on grossly normal canine nodal lymphocyte membranes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 10, 2008.

SHEN, D. W.; FOJO, A.; CHIN, J. E.; RONINSON, I. B.; RICHERT, N.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Human multidrug resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification. **Science**, v. 232, p. 643-645, 1986.

SIMON, D.; MORENO, S. N.; HIRSCHBERGER, J.; MORITZ, A.; KOHN, B.; NEUMANN, S.; JURINA, K.; SCHARVOGEL, S.; SCHWEDES, C.; REINACHER, M.;BEYERBACH, M.; NOLTE, I. Efficacy of a continous multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent protocol in a dog with lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 232, n, 6, p. 879-885, 2008.

SQUIERE, R. A.; BUSH, M.; MELBY, E. C.; NEELEY, L. M. L YARBOROUGH, B Clinical and pathological stuady of canine lymphoma: clinical staging, cell classification and therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, p. 565-574, 1973.

STARKEY, M. P.; MURPHY, S. Using lymph node fine needle aspirates for gene expression profiling of canine lymphoma. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 56-71, 2009.

STENHAM, D. R.; CAMPBELL, J. D.; SANSOM, M. S.; HIGGINS, C. F.; KERR, I. D.; LINTON, K. J. An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulfide cross-linking and homology modeling. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 15, p. 2287-2289, 2003.

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

SUROWIAK, P.; MATERNA, V.; KAPLENKO, I.; SPACZYNSKI, M.; DOLINSKA-KRAJEWAKA, B.; GEBAROWSKA, E.; DIETAL, M.; ZABEL, M.; LAGE, H. ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with reisitance to cisplatin and clinical outcome. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 7149-7158, 2006.

SWERTS, K.; DE MOERLOOSE, B.; DHOOGE, C.; LAUREYS, G.; BENOIT, Y.; PHILIPPE, J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 3, p. 295-309, 2006.

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

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v.16, n.4, p.209-219, 1994.

THIEBAULT, F.; TSURUO, T.; HAMADA, H. Immunohistochemical localization in normal tissue of diferents epitopes in a multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. **The Journal of Histochemistry and Cytochenistry**, v. 37, p. 389-394, 1989.

THOMAS, R.; SMITH, K. C.; OSTRANDER, E. A.; GALIBERT, F.; BREEN, M. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridization and a panel of single locus probes. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1530-1537, 2003.

TIFFANY, T. O.; JANSEN, J. M.; BRITO, C. A. Enzymatic kinetic rate and end-point analysis of substrate by use of a GEMSAEC fast analysis. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 829, 1972.

UGGLA, B.; STAHL, E.; WAGSATER, D.; PAUL, C.; KARLSSON, M. G.; SIRSJO, A.; TIDEFELT, U. BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients. **Leukemia Research**, v. 29, n. 2, p. 141–146, 2005.

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

VAIL, D. M.; MICHELS, G. M.; KHANNA, C.; SELTING K. A.; LONDON, C.A. Veterinary Cooperative Oncology Group. Respose evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) - a veterinary cooperative oncology group (VCOG) consensus document. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 28-37, 2009.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK M. M.; VAN DER HOLT, B.; TE BOEKHORST, P. A. W.; PIETERS, R.; SCHOESTER, M.; LOWENBERG, B.; SONNEVELD, P. *MDR*-1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in *de novo* acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 99, p. 76-83, 1997

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; SONNEVELD, P.; PIETERS, R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resist ance (MDR) proteins in leukemia. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, p. 94-110, 2000.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINCK, M. M.; WIEMER, E. A. C.; PRINS, A.; MEIJERINK, J. P. P.; VOSSEBELD, P. J. M.; VAN DER HOLT, B.; PIETERS, R.; SONNEVELD, P. Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). **Leukemia,** v. 16, p. 833-839, 2002.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; VAN DER HOLT, B.; BURNETT, A. K.; KNAUF, W. U.; FEY, M. F.; VERHOEF, G. E. G. VELLENGA, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; LOWENBERG, B.; SONNEVELD, P. CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age. **Annals of Hematology**, v. 86, p. 329-337, 2007.

VALERA, E. T. Análise do perfil de expressão de genes relacionados à resistência múltiplas a drogas em tumores do sistema nervosa central por PCR quantitativa. Puericultura e Pediatria. 2006. 127f. Tese Doutorado Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto: 127.

VALERA, E. T.; SCRIDELI, C.A.; QUEIROZ, R.G.; MORI, B.M.; TONE, L.G. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and

lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 122, n. 4, p. 166-171, 2004.

VALERIUS, K. D.; OGILVIE, G. K.; MALLINCKRODT, C. H.; GETZY, D. M. Doxorrubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 4, p. 512-516, 1997.

VALLI, V. E.; JACOBS, R. M.; PARODI, A. L.; VERNAUWAND, MOORE, P. F. **Histophatology classification of hematopoietic tumors of domestic animals**. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 2002.

VEZZALI, E.; PARODI, A. L.; MARCATO, P. S.; BETTINI, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to WHO. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 38-49, 2010.

WANG, B.; LI, X. W.; MA, X.; HONG, X.; GUO, Y. Immunohistochemical expression and clinical significance of P-glycoprotein in previously untrated extra nodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. **American Journal of Hematology**, v. 83, p. 795-799, 2008.

WANG, B.; LI, X. Q.; MA, X.; HONG, X.; LU, H.; GUO, Y. Immunohistochemical expression and clinical significance of P-glycoprotein in previously untreated extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. **American Journal of Hematology**, v. 83, p. 795-799, 2008.

WEINSTEIN, R. S.; GROGAN, T. M.; KUSZAK, J. R.; JAKATES, S. M.; KLUSKENS, L. F.; COONS, J. S. Multidrug resistance gene product (p-glycoprotein) in normal tissues and tumors. **In**: Advances in Pathology and Laboratory Medicine, pp. 207-234. Mosby-Year Book, St. Louis, MO, 1991.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2007, p.699–733.

WOOD, P.; BURGESS, R.; MACGREGOR, A.; YIN, J. A. P-glycoprotein expression on acute myeloid leukaemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. **British Journal of Haematology**, v. 87, p. 509-514, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.OMS. **TNM classification of tumours in domestic animals**. Geneva: WHO Pr, 1980. P.46-47.

ZHAN, Z.; SANDOR, V. A.; GAMELIN, E.; REGIS, J.; DICKSTEIN, B.; WILSON, W.; FOJO, A. T.; BATES, S. E. Expression if the multidrug resistance-associated protein gene in refractory lymphoma: quantitation by a validated polymerase chain reaction assay. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3797-800, 1997.

ZHANG, D. W.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G. Determinants of the substrate specificity of multidrug resistance protein 1: role of amino acid residues with hydrogen bonding potential in predicted transmembrane helix 17. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 20934–20941, 2002.

APÊNDICE

Alanina aminotransferase (ALT)	Biosystems: método cinético ultra-violeta	Bergmeyer, 1974
Albumina	Método colirimétrico do Verde de Bromocresol	Doumas-Biggs (DOUMAS et al., 1971)
Aspartato aminotransferase (AST)	Biosystems: método cinético ultra-violeta	Bergmeyer, 1974
Cálcio	Método colorimétrico arsenazo Biosystems	Michaylova e LLLkova, 1971
Creatinina	Método colorimétrico de Jaffé modificado (picrato alcalino)	Lustgarten e Wenk, 1972
Fosfatase Alcalina (FA)	Método cinético colorimétrico SCE	Pentilla et al., 1975
Fósforo inorgânico	Método enzimático colorimétrico Biosystems	Gamst e Try, 1980
Proteínas séricas totais	Método colorimétrico do Biureto	Gornall, 1949
Uréia	Método enzimático da uréase/GLDH em ultra-violeta: Diasys	Tiffany et al., 1972

Quadro A - Técnicas de análises bioquímicas realizadas nos pacientes com linfoma multicêntrico