ANA LUIZA NAIRISMAGI ALVES

**Estudo da expressão imunoistoquímica de marcadores de
resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma cutâneo**

São Paulo

2017

ANA LUIZA NAIRISMAGI ALVES

Estudo da expressão imunoistoquímica de marcadores de resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma cutâneo

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

Departamento:

VCM - Departamento de Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas

São Paulo

2017

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. 3536
FMVZ

Alves, Ana Luiza Nairismagi

Estudo da expressão imunoistoquímica de marcadores de resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma cutâneo. / Ana Luiza Nairismagi Alves. -- 2017.

89 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas.

1. Tumores cutâneos. 2. Neoplasias hematopoiéticas. 3. Transportadores ABC. 4. LRP. 5. Imunofenótipo. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da expressão imunoistoquímica dos marcadores de resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma cutâneo.", protocolada sob o CEUA nº 7880200317, sob a responsabilidade de **Silvia Regina Ricci Lucas e equipe; Ana Luiza Nairismagi Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 10/05/2017.

We certify that the proposal "Immunohistochemical expression of multiple drugs resistance markers in dogs with cutaneous lymphoma.", utilizing 15 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7880200317, under the responsibility of **Silvia Regina Ricci Lucas and team; Ana Luiza Nairismagi Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/10/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **07/2017**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 20 anos**

N: **15**

Linhagem: **todas**

Peso: **0 a 60 kg**

Resumo: O linfoma cutâneo é a localização anatômica dos linfomas que possui um pior prognóstico em cães, com uma curta sobrevida e resposta parcial à quimioterapia anti-neoplásica. Os mecanismos de resistência a múltiplas drogas são uma possível causa da falha na resposta quimioterápica. Um dos mecanismos da resistência a múltiplas drogas (MDR) é o efluxo ativo de drogas por proteínas transportadoras da superfamília ATP-Binding Cassette (ABC) ligadas à membrana celular. A alta expressão destas proteínas tem sido associada à diminuição da sensibilidade a agentes citotóxicos. Os transportadores ABC associados a MDR já relatados em medicina veterinária incluem a glicoproteína P (PgP □ ABCB1), a proteína de resistência a múltiplas drogas (MRP1 □ ABCC1) e proteína de resistência do câncer de mama (BCRP- ABCG2). Assim, este trabalho pretende, pelo método da imunistoquímica, avaliar a expressão das proteínas de resistência a múltiplas drogas e correlacionar com a sobrevida do animal. Serão analisadas as amostras de pelo menos 15 animais com linfoma cutâneo. O material será proveniente de casos em que a biópsia e o exame histopatológico tenham sido realizados para conclusão do diagnóstico. A imunoistoquímica será realizada para a imunofenotipagem do linfoma, além dos marcadores de resistência

Local do experimento: Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular - Departamento de Patologia - FMVZ-USP

São Paulo, 04 de julho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Ana Luiza Nairismagi

Título: **Estudo da expressão imunoistoquímica de marcadores de resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma cutâneo**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Roberto, que, esteja onde estiver, sei que está muito orgulhoso de mais esta conquista. O seu apoio, incentivo e confiança em mim durante toda a sua vida foram fundamentais para que eu sempre fosse atrás dos meus objetivos. Meu maior desejo era que você estivesse compartilhando mais este momento comigo. Meu amor e minhas saudades são eternas;

À minha mãe Sandra, que sempre me apoiou incondicionalmente e nunca deixou que eu desistisse dos meus objetivos, que é o meu maior exemplo de mulher e de força e por quem eu tenho um amor que não cabe em mim;

Às minhas irmãs Marina e Maria Clara, que sempre me deram tanto amor e sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor, que sempre acreditaram mais em mim do que eu mesma e que me deram o melhor presente que eu poderia receber, ser tia do Igor e da Alícia;

À minha avó Anna, minha tia Carmella e ao Dô, que são exemplos de amor e de força;

Às minhas tias Márcia e Marisa, que, ainda bem, puderam acompanhar essa jornada de perto e que me incentivaram sempre;

À Cecília, minha irmã do coração, por quem eu nem tenho palavras para descrever todo o meu amor, respeito e gratidão, por todo o apoio e incentivo incondicionais;

À Claudia, amiga mais do que querida, sempre pronta a me ouvir nos momentos mais difíceis e a comemorar nos momentos mais felizes;

Ao Arnaldo, Raphael, Érika, Renata, Fernanda e Danielle, amigos que a veterinária me trouxe e que ficaram para a vida, que tem todo o meu amor, respeito e admiração pelas pessoas e profissionais que se tornaram. Ao Fernando por todo o

carinho e que, mesmo tão longe, acompanhou tudo tão de perto e me aguentou nesta jornada tão turbulenta;

À Sasha, minha cachorra mais amada e por quem eu mudei todo o rumo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP pela oportunidade de realizar este trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro durante todo o meu período da pós-graduação;

À Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas, minha orientadora desde a época da iniciação científica, pela confiança e por todo o seu conhecimento compartilhado, pela amizade e pelas horas de conversa em sua sala, por todo o aprendizado sobre Oncologia Veterinária e sobre a vida;

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati por abrir as portas do LAPMOL (Laboratório de Patologia e Morfologia Molecular) do Departamento de Patologia da FMVZ-USP e tornar possível a realização das imunoistoquímicas deste trabalho disponibilizando todo o material do seu laboratório. Obrigada por todo o ensinamento e pela disponibilidade de analisar comigo cada lâmina, respondendo sempre as minhas dúvidas sobre as marcações;

Ao Dr. Lucas Campos de Sá Rodrigues, responsável pelo Estima Hospital Veterinário, e à Dra. Renata Sobral, responsável pela Oncocane, por disponibilizarem os blocos dos exames histopatológicos dos casos de linfoma cutâneo atendidos nessas instituições, bem como os dados clínicos dos animais;

Ao Dr. Valter de Medeiros Winkel, amigo desde o tempo da minha iniciação científica e o melhor colega de trabalho que eu poderia ter, por toda a ajuda neste trabalho, desde a confecção das lâminas de imunoistoquímica até a análise das marcações. Sem você, toda essa minha jornada na pós-graduação seria muito mais árdua. Minha gratidão é eterna;

À Verônica Mollica Govoni e Jéssica Soares Garcia, companheiras de pós-graduação, por todo o apoio durante este processo, tanto no laboratório quanto nas disciplinas e nos Congressos;

À toda a equipe do LAPMOL, Tereza Cristina da Silva, Isabel Veloso, Ísis Paixão, Guilherme Romualdo e David Salas pelo auxílio sempre necessário durante as realizações das minhas imunoistoquímicas;

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli e Marguiti Soares por abrirem as portas do laboratório de Oncologia Comparada e permitirem que eu cortasse os blocos parafinados para confeccionar as lâminas de imunoistoquímica;

À Juliana Satie Hatarashi e ao Alexandre Novaes pelo companheirismo e pelo auxílio na realização das técnicas de imunoistoquímica e na análise das lâminas.

“O conhecimento nos faz responsáveis” – Che Guevara

RESUMO

ALVES, A.L.N. **Estudo da expressão imunoistoquímica de marcadores de resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma cutâneo.** [Study of the immunohistochemical expression of multiple drug resistance markers in dogs with cutaneous lymphoma]. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Linfomas pertencem a um grupo de neoplasias em que há proliferação monoclonal de linfócitos malignos, sendo uma das neoplasias mais frequentemente diagnosticadas em cães. Podem ser classificados quanto à forma anatômica em multicêntrico, mediastinal, digestório e extranodal. Dentre os extranodais, os linfomas cutâneos são classificados histologicamente como epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos e são predominantemente de imunfenótipo T, com raros casos do tipo B. A principal característica histopatológica do linfoma epiteliotrópico em cães é o tropismo das células neoplásicas pela epiderme, mucosa ou estruturas anexas, enquanto o linfoma não epiteliotrópico é caracterizado pela infiltração dérmica e subcutânea sem invasão das estruturas anexas. Os linfomas cutâneos caninos têm progressão rápida, são considerados bastante agressivos e com mau prognóstico, com baixa taxa de resposta à quimioterapia. Um dos fatores que podem contribuir para isso é a resistência das células a múltiplas drogas e entre esses mecanismos de resistência estão o efluxo de drogas do meio intracelular para o extracelular por meio dos transportadores da família ABC, como a glicoproteína-P, MRP (multiple resistance protein) e BCRP (breast câncer resistance protein) e a LRP (lung resistance protein), uma proteína vault responsável pelo transporte nucleocitoplasmático. O objetivo deste estudo foi caracterizar imunofenotipicamente os linfomas cutâneos, a proliferação celular por meio do marcador Ki67, a expressão das proteínas de resistência glicoproteína-P, MRP, BCRP e LRP e avaliar a relação dessas proteínas com a sobrevida dos animais. Foi realizado um estudo retrospectivo com 21 casos de cães linfomas cutâneos com diagnóstico histopatológico. A técnica de imunoistoquímica foi utilizada para determinar a imunofenotipagem dos linfomas pelos marcadores CD3 e CD20, a proliferação celular por Ki67 e a expressão de glicoproteína-P, MRP, BCRP e LRP. Dos 21 animais, 38% tiveram diagnóstico histopatológico de linfoma epiteliotrópico, 52%

eram linfomas não epiteliotrópicos, 5% dos casos de linfoma não tiveram epiteliotropismo definido e 5% foram classificados como neoplasia de células redondas. O imunofenótipo predominante foi CD3+CD20- (76%), 15% dos casos eram CD3-CD20+ e 9% eram CD3+CD20+. A mediana de células marcadas para Ki67 foi de 31%. Com relação aos marcadores de resistência a múltiplas drogas, a mediana da marcação de glicoproteína-P foi de 40%, a de LRP foi de 65% enquanto para MRP e BCRP, 19% e 23%, respectivamente. Os linfomas cutâneos não epiteliotrópicos foram mais frequentes que os epiteliotrópicos e o imunfenótipo predominante foi o T. A ocorrência de linfócitos CD3-CD20+ e CD3+CD20+ indica a necessidade de mais estudos e um painel mais amplo de anticorpos para subtipagem desses linfomas. A glicoproteína-P teve maior expressão nos linfomas não epiteliotrópicos do que nos epiteliotrópicos e não houve correlação entre as proteínas de resistência e o tempo de sobrevida dos animais, sugerindo que, além da biologia da neoplasia, outros mecanismos de resistência a múltiplas drogas diferente dos estudados possam ter um papel relevante na baixa resposta do linfoma cutâneo à quimioterapia.

Palavras-chave: Tumores cutâneos. Neoplasias hematopoiéticas. Transportadores ABC. LRP. Imunofenotipagem.

ABSTRACT

ALVES, A.L.N. **Study of the immunohistochemical expression of multiple drug resistance markers in dogs with cutaneous lymphoma.** [Estudo da expressão imunoistoquímica de marcadores de resistência a múltiplas drogas em cães com linfoma cutâneo]. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Lymphoma is a group of blood cell tumors that develop from monoclonal proliferation of malignant lymphocytes. Lymphoma is the most frequent neoplasia in dogs and can be anatomically classified in multicentric, mediastinal, digestive and extranodal. Cutaneous lymphomas – an extranodal type of lymphoma are classified histologically in epitheliotropic and non-epitheliotropic and are predominantly of T-cell immunophenotype, and rare cases of B cell phenotype. The main histopathological characteristic of epitheliotropic lymphoma in dogs is the tropism of neoplastic cells by the epidermis, mucosa or adjacent structures, while non-epitheliotropic lymphoma is characterized by dermal and subcutaneous infiltration without invasion of adjacent structures. Canine cutaneous lymphomas have rapid progression, are considered very aggressive and have poor prognosis. These dogs, usually have a low rate of response to chemotherapy which can be associated to an antineoplastic *resistance*. Among mechanisms of resistance are efflux of drugs from intracellular to extracellular through ABC family transporters such as P-glycoprotein, MRP (multiple resistance protein) and BCRP (breast cancer resistance protein) and LRP (lung resistance protein), a vault protein responsible for nucleocytoplasmic transport. The aim of this study was to characterize immunophenotypically cutaneous lymphomas, measure cell proliferation using the Ki67 marker, the expression of resistance proteins P-glycoprotein, MRP, BCRP and LRP and to evaluate the relationship of these proteins with the survival of the animals. A retrospective study was performed with 21 cases of dogs with cutaneous lymphoma with histopathological diagnosis. Immunohistochemical was used to immunophenotyping of lymphomas by CD3 and CD20 markers, Ki67 cell proliferation, and P-glycoprotein, MRP, BCRP and LRP expression. Of the 21 animals, 38% had histopathological diagnosis of epitheliotropic lymphoma, 52% were non-epitheliotropic lymphomas, 5% of lymphoma cases had no definition and 5% were classified as round cell neoplasia. The predominant

immunophenotype was CD3+CD20- (76%), 15% of the cases were CD3-CD20 + and 9% were CD3 + CD20 +. The median of cells labeled for Ki67 was 31%. Regarding the markers of resistance to multiple drugs, the median of the P-glycoprotein label was 40%, which 65% of LRP while for MRP and BCRP, 19% and 23%, respectively. Non-epitheliotropic cutaneous lymphomas were more frequent than epitheliotropic lymphomas and the predominant immunophenotype was T. The occurrence of CD3-CD20+ and CD3+CD20+ lymphocytes indicates the need for further studies and a wider panel of antibodies for subtyping these lymphomas. P-glycoprotein had higher expression in non-epitheliotropic lymphomas than in epitheliotropic lymphomas and there was no correlation between resistance proteins and survival time of the animals, suggesting that in addition to the biology of neoplasia other mechanisms of resistance to multiple drugs different from those studied may play a relevant role in the low response of cutaneous lymphoma to chemotherapy.

Keywords: Skin tumours. Hematopoietic neoplasm. ABC transporters. LRP. Immunophenotype.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura molecular dos transportadores ABCC1, ABCB1 e ABCG2.....	34
Figura 2 - Modelo esquemático da estrutura molecular da vault.	40
Figura 3 - Fotomicrografia de expressão de CD3 e CD20 em linfoma cutâneo - imunofenótipo CD3+CD20-.	50
Figura 4 - Fotomicrografia da expressão de CD3 e CD20 em linfoma cutâneo – imunofenótipo CD3 ⁻ CD20 ⁺	51
Figura 5 - Fotomicrografia da expressão de CD3 e CD20 em linfoma cutâneo – imunofenótipo CD3+CD20+.	51
Figura 6 - Fotomicrografia das diferentes expressões do marcador de proliferação celular Ki67 nos linfomas cutâneos.	53
Figura 7 – Fotomicrografia das diferentes expressões de ABCB1 no linfoma cutâneo de cães.....	55
Figura 9 – Fotomicrografia das diferentes expressões da LRP nos linfomas cutâneos.....	57
Figura 12 - Fotomicrografias da expressão de ABCC1 nos linfomas cutâneos.	59
Figura 13 - Fotomicrografia da intensidade de expressão de ABCG2 nos linfomas cutâneos.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos dados de sobrevida dos animais com linfoma epiteliotrópico e não-epiteliotrópico.	49
Gráfico 2 - Distribuição do número de animais com imunofenótipo CD3 ⁺ CD20 ⁻ , CD3 ⁻ CD20 ⁺ , CD3 ⁺ CD20 ⁺ entre os linfomas epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos.	52
Gráfico 3 - Distribuição da porcentagem de células marcadas para Ki67 nos linfomas epiteliotrópico e não-epiteliotrópico.	54
Gráfico 4 - Dispersão da porcentagem de células marcadas para Ki67 de acordo com a sobrevida dos animais (meses).	54
Gráfico 5 - Distribuição de expressão de ABCB1 nos linfomas cutâneos epiteliotrópicos e não-epiteliotrópicos.	56
Gráfico 6 - Dispersão da porcentagem de células marcadas para ABCB1 de acordo com a sobrevida dos animais.	56
Gráfico 7 - Distribuição da porcentagem de células marcadas para a LRP nos linfomas cutâneos epiteliotrópicos e não-epiteliotrópicos.	58
Gráfico 8 - Dispersão da porcentagem de células marcadas para LRP de acordo com a sobrevida dos animais.	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação WHO-EORTC dos linfomas cutâneos humanos com manifestações cutâneas primárias (adaptada de Willenze et al., 2005).....	20
Quadro 2 - Marcadores analisados pela técnica de imunoistoquímica, com os respectivos anticorpos, diluição e tampão utilizado.....	44
Quadro 3 - Dados de raça, idade, sexo, tipo histológico, imunofenótipo, sobrevida, resposta ao tratamento e expressão de Ki67, ABCB1, LRP, ABCC1 e ABCG2 dos cães com linfoma cutâneo.....	62

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1	LINFOMA CUTÂNEO HUMANO	19
1.2	LINFOMA CUTÂNEO CANINO	23
1.2.1	ETIOLOGIA.....	24
1.2.2	LINFOMA CUTÂNEO CANINO EPITELIOTRÓPICO.....	25
1.2.3	LINFOMA CUTÂNEO CANINO NÃO EPITELIOTRÓPICO.....	27
1.2.4	DIAGNÓSTICO	28
1.2.5	TRATAMENTO.....	30
1.2.6	PROGNÓSTICO	32
1.3	RESISTÊNCIA DE CÉLULAS TUMORAIS A MÚLTIPLAS DROGAS.....	33
1.3.1	TRANSPORTADORES ABC.....	33
1.3.2	PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA PULMONAR.....	39
2	OBJETIVOS.....	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3	RESULTADOS.....	48
3.1	RESULTADOS DA IMUNOFENOTIPAGEM – EXPRESSÃO DE CD3 E CD20.	50
3.2	ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – EXPRESSÃO DE KI67.	52
3.3	EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA – ABCB1, ABCC1, ABCG2 E LRP.....	55
4	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	APÊNDICES	86

1 REVISÃO DE LITERATURA

Linfoma, também conhecido pelos sinônimos Linfossarcoma ou Linfoma maligno, pertence a um grupo de neoplasias em que há a proliferação monoclonal de linfócitos malignos (ITO; FRANTZ; MODIANO, 2014). Manifesta-se geralmente em tecidos linfóides, a exemplo do baço, linfonodos e fígado, entretanto, pode ocorrer em quase todos os tecidos do organismo (VAIL; YOUNG, 2007)

É uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas em cães (VAIL; YOUNG, 2007; ZANDVLIET, 2016). Em sua revisão de literatura de 2016, Zandvliet constatou que a incidência anual da doença varia de 13 a 114 a cada 100 mil cães. A etiologia do linfoma em cães não é completamente definida e acredita-se que seja multifatorial, envolvendo alterações genéticas, ambientais, imunossupressão, inflamação crônica e fatores dietéticos (VAIL; YOUNG, 2007). Em um estudo de 2012, Huang et al. encontraram evidências de que o vírus Epstein-Barr pode estar relacionado ao aparecimento espontâneo de linfomas de células B em cães, entretanto, a etiologia viral do linfoma em cães não é tão bem estabelecida como em gatos.

Os linfomas podem ser classificados quanto à forma anatômica em multicêntrico, mediastinal, digestório e extranodal, sendo mais comum em cães a forma multicêntrica e em gatos a digestória. (VAIL; YOUNG, 2007; COUTO, 2010). A forma multicêntrica é caracterizada por linfonodomegalia local ou generalizada, que pode ou não ser acompanhada por acometimento do fígado, do baço e/ou da medula óssea. Já na forma mediastinal, ocorre linfonodomegalia mediastinal com ou sem envolvimento do timo. Na forma digestória ocorre infiltração multifocal ou difusa do trato gastrintestinal podendo ou não acometer os linfonodos mesentéricos. Na forma extranodal qualquer órgão pode ser acometido, como por exemplo, os rins, os olhos e a pele (VAIL; YOUNG, 2007; COUTO, 2010).

A pele pode ser considerada um órgão imune, já que é uma barreira entre o organismo e o ambiente externo e tem participação importante nas respostas imunes e reações inflamatórias (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005; SANCHES JÚNIOR; MORICZ; FESTA NETO, 2006). Entre as células que participam das respostas imunes na pele estão as células de Langerhans, linfócitos T, leucócitos polimorfonucleares e mastócitos; os linfócitos B não estão presentes na pele em uma situação fisiológica (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005).

Os linfomas cutâneos primários pertencem a um grupo heterogêneo de linfomas não-Hodgkin de células T ou B que se manifestam na pele (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005; OLSEN, 2015). Representam 1% de todos os tumores de pele e de 3 a 8% de todos os casos de linfoma em cães (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005). Em humanos, os linfomas cutâneos primários representam cerca de 19% dos linfomas extranodais, sendo o principal sítio desta forma de linfoma (BRADFORD; DEVESA; ANDERSON, 2009; OLSEN, 2015).

Como os linfócitos B não estão presentes na pele, a etiopatogenia dos linfomas cutâneos de células B ainda é desconhecida, mas acredita-se que eles se originem de linfócitos dos centros germinativos ou da zona marginal ativados e estimulados cronicamente por antígenos (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005).

1.1 LINFOMA CUTÂNEO HUMANO

Desde o final dos anos 70, os linfomas cutâneos humanos são classificados considerando o imunofenótipo (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005). A classificação mais aceita é a proposta em conjunto por WHO-EORTC (World Health Organization - European Organization for Research and Treatment of Cancer), em que os linfomas cutâneos primários são classificados quanto ao imunofenótipo apresentado pelas células neoplásicas, ou seja, em linfomas de células T ou B e ainda, considerando-se as características clínicas, histopatológicas e moleculares apresentadas pelo tumor (BURG et al., 2005; MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

A classificação imunofenotípica é feita de acordo com as moléculas CD (cluster of differentiation) presentes nas células. Os linfócitos T apresentam imunofenótipo CD3+ e, quando são de memória, CD45RO+, enquanto os linfócitos B apresentam imunofenótipo CD19+ CD20+ CD79a+ (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005). A identificação do imunofenótipo permite determinar o prognóstico e a melhor opção de tratamento para cada tipo de linfoma cutâneo (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005; SANCHES JÚNIOR; MORICZ; FESTA NETO, 2006).

Quadro 1 - Classificação WHO-EORTC dos linfomas cutâneos humanos com manifestações cutâneas primárias (adaptada de Willenze et al., 2005).

Linfoma cutâneo de células T e células NK
Micose fungóide (MF)
Variante e subtipos de MF
MF foliculotrópico
Reticulose pagetóide
Pele indolente granulomatosa
Síndrome de Sézary
Leucemia/Linfoma de células T do adulto
Doenças proliferativas cutâneas primárias CD30 ⁺
Linfoma cutâneo primário anaplásico de células grandes
Papulose linfomatóide
Linfoma de células T subcutâneo tipo-paniculite
Linfoma extranodal de células T/NK, tipo nasal
Linfoma cutâneo primário periférico de células T, inespecífico
Linfoma cutâneo primário epidermotrópico agressivo de células T CD8 ⁺ (provisório)
Linfoma cutâneo de células T γ/δ (provisório)
Linfoma cutâneo primário de células T CD4 ⁺ pleomórficas de tamanho pequeno e médio (provisório)
Linfoma cutâneo de células B
Linfoma cutâneo primário de células B de zona marginal
Linfoma cutâneo primário centro-folicular
Linfoma cutâneo primário difuso de grandes células B, tipo da perna
Linfoma cutâneo primário difuso de grandes células B, outro
Linfoma intravascular de grandes células B
Neoplasia de precursor hematológico
Neoplasia hematodérmica CD4 ⁺ /CD56 ⁺ (linfoma blástico de células NK)

FONTE: (adaptada de Willenze et al., 2005).

A micose fungóide, forma de linfoma cutâneo mais comumente diagnosticada (BURG et al., 2005; MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006), é um linfoma cutâneo de células T epidermotrópico caracterizado pela apresentação em manchas e placas e, em raros casos, em nódulos. A progressão da doença é lenta, podendo levar anos ou décadas para as manchas se transformarem em placas ou até nódulos. A caracterização histopatológica é dada pela presença de linfócitos atípicos com núcleo cerebriforme na camada basal da epiderme, demonstrando o epidermotropismo. Os microabscessos de Pautrier,

coleções intraepidérmicas de células atípicas, são característicos desta forma de linfoma, apesar de serem observados em poucos casos. Com a progressão para o estágio de tumor, os infiltrados dérmicos tornam-se mais difusos e o epidermotropismo pode ser perdido. Imunofenotipicamente caracterizam-se por serem CD3⁺, CD4⁺, CD45RO⁺ e CD8⁻ (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

A reticulose pagetóide é uma variante da micose fungóide caracterizada pela presença localizada de manchas ou placas com proliferação intraepidermal de células T neoplásicas. Os pacientes apresentam manchas ou placas solitárias, que podem ser psoríaseforme ou hiperqueratótica, geralmente localizada nas extremidades e de progressão lenta. Ao microscópio observa-se epiderme hiperplásica com células pagetóides atípicas, que possuem núcleos grandes ou médios, podendo ser hipercromáticos ou cerebriformes e citoplasma vacuolizado. Estas células podem estar isoladas ou dispostas em ninhos. A derme superior pode mostrar um infiltrado misto de linfócitos ou histiócitos, mas não contém células T neoplásicas. O imunofenótipo das células T neoplásicas pode ser tanto CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻ quanto CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺; o marcador CD30 pode estar expresso em alguns casos (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

A Síndrome de Sézary é definida pela tríade eritrodermia, linfadenopatia generalizada e presença de células T neoplásicas (células de Sézary) na pele, linfonodos e sangue periférico. É uma doença rara que acomete exclusivamente adultos. Em um terço dos casos a caracterização histológica pode ser inespecífica, já que os infiltrados celulares são frequentemente monótonos e o epidermotropismo pode estar ausente. As células T neoplásicas apresentam um fenótipo CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, as células de Sézary circulantes podem não expressar CD7 e CD26 (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006)

As doenças linfoproliferativas cutâneas primárias CD30⁺ são o segundo grupo mais comum de linfomas cutâneos de células T. Atualmente, considera-se que essas doenças abrangem um espectro que vai desde a papulose linfomatóide, definida como uma doença cutânea papulonecrótica ou papulonodular crônica, recorrente, autolimitante com características histológicas sugestivas de linfoma maligno (CD30⁺), até o linfoma cutâneo primário anaplásico de células grandes, que se apresenta como nódulos ou tumores solitários ou generalizados que podem ter redução espontânea parcial ou completa, e histologicamente se apresenta como um

infiltrado difuso, não epidermotrópico, com sobreposição coesa de grandes células tumorais CD30⁺ e com a morfologia característica de células anaplásicas (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

Os linfomas cutâneos primários periféricos de células T representam um grupo heterogêneo de linfomas de células que não se encaixam em nenhum subtipo. A apresentação clínica pode ser de nódulos ou tumores solitários ou generalizados sem predileção por uma região do corpo. As lesões cutâneas apresentam infiltrados nodulares ou difusos com células T pleomórficas de tamanho médio ou grande, ou imunoblastos, com epidermotropismo geralmente ausente. A maioria dos casos tem um fenótipo de células T aberrante (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006), assim, pode-se encontrar linfomas cutâneos periféricos de células T com expressão de CD20, um tipo de linfoma raro, mas bem reconhecido e descrito na literatura (RAHEMTULLAH et al., 2008; BALMER et al., 2009; MARTIN et al., 2011; JIANG et al., 2012). Existem duas teorias formuladas que explicam a expressão de CD3 e CD20. A primeira diz que há uma pequena população de linfócitos T circulantes que apresentam a expressão de CD20 como fenótipo normal, cuja função ainda não foi elucidada (QUINTANILLA-MARTINEZ et al., 1994; RAHEMTULLAH et al., 2008; BALMER et al., 2009; MARTIN et al., 2011). A outra teoria fala que o CD20 pode ser considerado um marcador de ativação dos linfócitos, isso porque a administração in vitro de interleucina-2 em células de linfonodos de macaco induziu a expressão de CD20 pelos linfócitos T (TAKAMI et al., 1998; RAHEMTULLAH et al., 2008; BALMER et al., 2009; MARTIN et al., 2011).

Os linfomas cutâneos primários de células B são divididos em linfoma cutâneo primário de células B de zona marginal, linfoma cutâneo primário centro-folicular, linfoma cutâneo primário difuso de grandes células B, tipo da perna, linfoma cutâneo primário difuso de grandes células B, outro (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

O linfoma cutâneo primário de células B de zona marginal é caracterizado como um linfoma indolente composto por pequenas células B e se apresenta como placas, pápulas ou nódulos avermelhados ou violáceos no tronco ou extremidades do corpo. Este linfoma tem infiltrados nodulares a difusos com preservação da epiderme. Os infiltrados são compostos por pequenos linfócitos, células B da zona marginal (células tipo centrócito), células linfoplasmocitóides e plasmócitos, misturadas com um pequeno número de células tipo centroblastos ou imunoblastos

e muitas células T reativas. As células B da zona marginal expressam CD20, CD79a e bcl-2, mas são negativas para CD5, CD10 e bcl-6 (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

O linfoma cutâneo primário centro-folicular é definido como um tumor de células centro-foliculares neoplásicas, geralmente uma combinação de centrócitos (pequenas e grandes células centrais foliculares clivadas) e um número variável de centroblastos (grandes células centrais foliculares não clivadas com nucleolos proeminentes), com um padrão de crescimento folicular, folicular e difuso, ou difuso, que geralmente se apresenta na cabeça ou no tronco. Ele pode ser caracterizado imunofenotipicamente como CD20⁺, CD79⁺, bcl-6⁺, bcl-2⁻, MUM-1⁻ (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

O linfoma cutâneo primário difuso de grandes células B representa um grupo de linfomas de células que não podem ser classificados como nenhum outro tipo de linfoma de células B. Um exemplo é o linfoma intravascular de grandes células B, definido por um acúmulo de grandes células B neoplásicas nos vasos sanguíneos. Estes linfomas preferencialmente afetam o sistema nervoso central, os pulmões e a pele e estão geralmente associados a mau prognóstico. Podem apresentar-se como manchas, placas violáceas ou telangiectasias geralmente nas pernas ou no tronco. Histologicamente, vasos sanguíneos dilatados na derme e subcutâneo são preenchidos pela proliferação de grandes células B neoplásicas que podem causar oclusão vascular de vênulas, capilares e arteríolas (BURG et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006).

1.2 LINFOMA CUTÂNEO CANINO

Os linfomas cutâneos têm sido descritos em cães há pelo menos quatro décadas (SHADDUCK et al., 1978; JOHNSON; PATTERSON, 1981; MOORE; OLIVRY, 1994; MOORE; OLIVRY; NAYDANT, 1994; FOSTER et al., 1997; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MOORE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013) e, diferente da classificação dos linfomas cutâneos humanos, eles são considerados em medicina veterinária histologicamente como epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos. A forma epiteliotrópica parece ser mais comum em cães, enquanto a não epiteliotrópica em gatos (MOORE; OLIVRY, 1994). Na literatura veterinária brasileira, entretanto, aparentemente os

casos de linfomas não epiteliotrópicos em cães são mais frequentes do que os epiteliotrópicos (ARAÚJO et al., 2012; DIAS et al., 2015; HERNANDEZ, 2017). E segundo Hernandez (2017) existem aspectos mais semelhantes entre os linfomas cutâneos caninos e que é classificado em humanos como linfoma cutâneo de células T inespecífico.

Há maior prevalência dos linfomas epiteliotrópicos em Cocker Spaniels, Poodles e Boxers, enquanto para os não epiteliotrópicos não se relata predisposição (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MOORE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Não há predisposição sexual e a média de idade dos animais acometidos pela doença é de 9 anos (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MOORE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; DIAS et al., 2015).

1.2.1 ETIOLOGIA

A etiologia da doença ainda é desconhecida. Alguns autores apontam a dermatite crônica e atopia como fatores predisponentes (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), já que a ativação crônica e a proliferação de linfócitos T podem ser estimuladas por antígenos ambientais persistentes, sugere-se que a expansão clonal desses linfócitos ativados possa originar os linfomas cutâneos (FONTAINE et al., 2009). Em um estudo de 2016, Roccabianca et al. descreveram linfomas cutâneos em sítios de aplicação de injeções em felinos, sugerindo que a inflamação crônica persistente e a estimulação do sistema imune podem levar à transformação maligna dos linfócitos.

Santoro; Marsella e Hernandez, em um estudo de 2007, encontraram uma associação entre dermatite atópica e o linfoma cutâneo e relataram que os cães com dermatite atópica têm risco 12 vezes maior de desenvolver micose fungoide. Entretanto, essa correlação é ainda controversa para alguns autores (GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Em gatos e humanos a doença pode ter origem viral: vírus da leucemia felina nos gatos e o vírus linfotrópico T humano-1 e herpesvirus 4 e 8 em seres humanos.

Em cães, contudo, não há comprovação de origem viral da doença (FONTAINE et al., 2009).

1.2.2 LINFOMA CUTÂNEO CANINO EPITELIOTRÓPICO

Na medicina veterinária, os linfomas cutâneos epiteliotrópicos assemelham-se aos linfomas cutâneos de células T dos seres humanos, assim, a classificação da doença foi adaptada para o cão e subdividida em três subtipos: micose fungoide, reticulose pagetóide e Síndrome de Sézary (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

O linfoma cutâneo canino epiteliotrópico tem uma apresentação clínica bastante variada e que se assemelha a muitas outras dermatites, entretanto, ele possui quatro características principais: eritrodermia esfoliativa, localização mucocutânea, nódulos ou placas solitários ou múltiplos e doença ulcerativa da mucosa oral (GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Os aspectos clínicos da eritrodermia esfoliativa incluem eritema generalizado, hiperqueratose, hipopigmentação e alopecia e pode ser confundida com outras doenças cutâneas inflamatórias e esfoliativas; ao longo do tempo é comum o desenvolvimento de nódulos ou placas e a cabeça e o tronco são as regiões mais frequentemente afetadas, porém as lesões podem começar ou se desenvolver em qualquer região. A localização mucocutânea tem como característica eritema, despigmentação, alopecia, infiltração irregular, erosão e ulceração, sendo afetadas as junções mucocutâneas faciais da boca, plano nasal e pálpebras. Os nódulos ou placas solitários ou múltiplos são geralmente eritematosos e hiperqueratóticos ou com crostas; lesões maiores podem erodir e ulcerar e um grupo de lesões pode coalescer. A doença ulcerativa da mucosa oral pode envolver gengiva, o palato ou a língua (GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

A principal característica histopatológica da micose fungóide canina é o tropismo das células neoplásicas pela epiderme, mucosa ou estruturas anexas (fóliculo piloso, glândula sudorípara apócrina e glândula sebácea). Os linfócitos neoplásicos podem estar distribuídos de maneira difusa ou formar agregados

discretos, os microabscessos de Pautrier. O tropismo para as estruturas anexas pode ser mais proeminente do que a invasão na epiderme e a completa obliteração do folículo piloso e glândulas anexas pode ocorrer. O infiltrado geralmente afeta todo a extensão do folículo piloso, entretanto ele pode estar localizado apenas na região do istmo, criando um efeito nodular (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MOORE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010).

A reticulose pagetoide é uma condição rara na medicina veterinária, havendo poucos casos relatados na literatura (JOHNSON; PATTERSON, 1981; FONTAINE et al., 2009). Ela tem como particularidade histológica um infiltrado linfoide quase totalmente confinado à epiderme ou ao epitélio anexo, em lesões precoces. A derme superficial pode conter um infiltrado moderado de linfócitos reativos não neoplásicos e, ocasionalmente, histiócitos, plasmócitos e granulócitos. Um número variável de queratinócitos em apoptose pode ser observado em conjunto com um infiltrado de linfócitos, o qual pode substituir todos os queratinócitos de algumas regiões (JOHNSON; PATTERSON, 1981; FONTAINE et al., 2009). Clinicamente, as lesões apresentam crostas, ulceração e hipopigmentação e parecem privilegiar a região dos coxins palmares e plantares, contudo estas características não são específicas da reticulose pagetoide (FONTAINE et al., 2009).

A síndrome de Sézary é outra variante rara da micose fungoide canina com poucos casos descritos na literatura (THRALL et al., 1984; FOSTER et al., 1997; GHERNATI et al., 1999; RÜTGEN et al., 2016) e é caracterizada por linfócitos neoplásicos presentes em linfonodos e no sangue periférico, além da pele. Aproximadamente 50% desses linfócitos apresentam núcleos hipercromáticos e sulcados, sendo conhecidos como células de Sezary (GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Na medicina humana, descreve-se que as quimiocinas e os receptores de quimiocinas expressos pelas células de Sézary desempenham um papel importante na patogênese da doença, uma vez que eles facilitam a migração dos linfócitos do sangue para a pele e vice-versa (KOHNKEN et al., 2016).

As lesões cutâneas da Síndrome de Sézary são semelhantes às lesões da micose fungoide, não sendo possível distinguir as duas doenças. Contudo, pela síndrome apresentar uma característica leucêmica, é importante diferenciar da leucemia linfocítica com acometimento secundário da pele, a qual, no

histopatológico da pele, apresenta os linfócitos neoplásicos concentrados na derme com padrão perivascular e sem epiteliotropismo evidente (FONTAINE et al., 2009).

Interessante ressaltar que a maioria dos linfomas epiteliotrópicos nos humanos são compostos de células CD3⁺CD4⁺ enquanto que os de células CD3⁺CD8⁺ são incomuns. Em contraste, as células no linfoma epiteliotrópico canino expressam, na maioria dos casos, CD3 e CD8 ou são duplo negativas (CD4⁻ e CD8⁻) (MOORE; OLIVRY, 1994; DAY, 1995; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; GHERNATI et al., 1999; GROSS et al., 2005). Em 2016, Brachelente et al. relataram um caso de um cão de um linfoma cutâneo epiteliotrópico com expressão de CD3 e CD20, e sugeriram que os linfócitos malignos desse animal pudessem ter se originado de um pequeno conjunto de células T no sangue periférico e na medula óssea que expressam CD20.

1.2.3 LINFOMA CUTÂNEO CANINO NÃO EPITELIOTRÓPICO

Os linfomas cutâneos caninos não epiteliotrópicos são bem reconhecidos, porém pouco descritos na literatura (MOORE; OLIVRY, 1994; DAY, 1995; UENO et al., 2004; GROSS et al., 2005; YASUNO et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; MOORE; AFFOLTER; KELLER, 2013). Apesar de não ser o tipo mais comum em outras partes do mundo (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), parece ser o tipo de linfoma cutâneo canino mais comum em algumas regiões do Brasil (ARAÚJO et al., 2012; DIAS et al., 2015; HERNANDEZ, 2017).

O linfoma cutâneo não epiteliotrópico dos cães assemelha-se aos linfomas periféricos de células T, inespecíficos, relatados na medicina humana (MOORE; AFFOLTER; KELLER, 2013). Pode ser primário ou ocorrer em conjunto com formas disseminadas da doença. Além da forma clássica, cães e gatos podem também apresentar linfoma vasotrópico e vasoinvasivo e linfoma intravascular, também referido como angioendoteliomatose maligna (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Os linfomas não epiteliotrópicos apresentam-se como nódulos múltiplos ou solitários ou placas infiltradas e podem ocorrer em qualquer região do corpo, entretanto o acometimento da mucosa oral é raro (GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; MOORE; AFFOLTER; KELLER, 2013). Eritema, descamação e prurido são menos comuns do que no linfoma epiteliotrópico,

entretanto, a ulceração das lesões é mais comum. A progressão da doença é rápida, com disseminação a linfonodos e também sistêmica (GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Histologicamente, é caracterizado pela infiltração dérmica e subcutânea por linfócitos malignos sem invasão das estruturas anexas (GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; MOORE; AFFOLTER; KELLER, 2013), sendo que a morfologia celular é altamente variável e pode ser classificada como pequenas células, grandes células ou imunoblástica (GROSS et al., 2005).

O linfoma não epiteliotrópico vasotrópico e vasoinvasivo é caracterizado por nódulos dérmicos e subcutâneos ou placas negras flutuantes que podem progredir para úlceras em formato de cratera com exsudação e crostas. As lesões podem envolver a face, pálpebras, junções mucocutâneas e tronco (GROSS et al., 2005; YASUNO et al., 2009). Histologicamente, as lesões precoces podem apresentar características de resposta inflamatória granulomatosa angiocêntrica e, com o passar do tempo, há um aumento no número de grandes células redondas pleomórficas e marcante invasão de vasos (YASUNO et al., 2009).

Em humanos, o linfoma não epiteliotrópico cutâneo pode ter origem nas células B ou T, mas a maioria dos casos em cães e gatos tem origem nas células T, sendo os linfomas de células B extremamente raros (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Em um estudo de 2013 sobre linfomas cutâneos não epiteliotrópicos, Moore et al. observaram que os pequenos linfócitos mostraram expressão intensa e uniforme de CD3, enquanto que os grandes linfócitos tiveram intensidade variável na expressão desse marcador de forte a quase inexistente. A expressão de CD20 estava presente e limitada a uma pequena população de pequenos linfócitos, já Hernandez (2017), observou dois casos em 19 linfomas não epiteliotrópicos estudados, com imunofenótipo CD3+CD20+.

1.2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico inicial do linfoma cutâneo em cães pode ser feito por meio da citologia aspirativa por agulha fina de nódulos ou pelo *imprint* de lesões ulceradas, que vão sugerir uma neoplasia hematopoiética por apresentar células redondas (VAIL; YOUNG, 2007; FONTAINE et al., 2009).

O exame histopatológico é fundamental, pois permite identificar a característica histológica do tumor, já que a citologia não permite distinguir linfócitos atípicos de histiócitos, nem definir o epiteliotropismo (VAIL; YOUNG, 2007; FONTAINE et al., 2009).

Como os tumores de células redondas podem ter uma morfologia muito similar (FERNANDEZ et al., 2005; VAIL; YOUNG, 2007; FONTAINE et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012), principalmente nos tumores pouco diferenciados, um diagnóstico baseado apenas nos aspectos histopatológicos torna-se um desafio. A imunoistoquímica é, desse maneira, uma técnica importante no diagnóstico de neoplasias de células redondas, proporcionando a determinação mais precisa do prognóstico e do tratamento dessas neoplasias (FERNANDEZ et al., 2005; ARAÚJO et al., 2012). Em um estudo de 2012 sobre a caracterização imunoistoquímica das neoplasias de células redondas, Araújo et al. relataram que casos diagnosticados histologicamente como mastocitoma, histiocitoma e neoplasia de células redondas foram definidos como linfoma cutâneo após a marcação imunoistoquímica. As neoplasias linfoides são identificadas por apresentarem marcação pelos anticorpos monoclonais CD3 (para linfócitos T) ou CD20, CD79 (para linfócitos B) (DAY, 1995; FERNANDEZ et al., 2005; ARAÚJO et al., 2012; THALHEIM et al., 2013).

Além da caracterização do imunofenótipo, a imunoistoquímica permite a análise de marcadores prognósticos. Um marcador prognóstico bastante utilizado é o índice de proliferação celular, por meio da expressão de Ki-67, proteína nuclear que regula o ciclo celular e que pode ser reconhecida em todas as fases do ciclo mitótico, com exceção do G0, fase em que a célula não está se dividindo (FOURNEL-FLEURY et al., 1997b; GAMBICHLER et al., 2008; BROUDE et al., 2009; SOKOŁOWSKA et al., 2012). De acordo com Sokolowska et al. (2012) podemos dividir a expressão de Ki-67 nos linfomas caninos de acordo com o número de células marcadas, como baixa (menos que 20%), média (de 21 a 50%) e alta (acima de 50%).

Tanto nos linfomas humanos quanto nos linfomas caninos, maior expressão de Ki-67 indica pior prognóstico (DUMMER et al., 1995; ABELE et al., 1997; FOURNEL-FLEURY et al., 1997b; BRYANT; BANKS; O'MALLEY, 2006; BROUDE et al., 2009; DUARTE, 2013; FLOOD-KNAPIK et al., 2013). Segundo alguns autores, alta expressão de Ki-67 é observada nas fases mais avançadas do linfoma cutâneo (DUMMER et al., 1995; GAMBICHLER et al., 2008; EDINGER et al., 2009). Dummer

et al. (1995) observaram que 100% dos nódulos tumorais da micose fungoide humana, ou seja, um estágio mais avançado da doença, tinham expressão de Ki-67 maior do que 10%, enquanto o mesmo acontecia em 28% das lesões em placa, as quais aparecem em estágios iniciais da micose fungoide.

Em um estudo sobre a expressão de Ki-67 nos linfomas caninos, Fournel-Fleury et al. (1997) encontraram mediana de 16% de expressão nas lesões em nódulo da micose fungoide em cães. Duarte (2013) observou que 93% dos cães com linfoma cutâneo estudados apresentaram alto índice de proliferação celular, sendo que 86% desses animais tinham diagnóstico de linfoma não epiteliotrópico.

1.2.5 TRATAMENTO

Diversas modalidades de tratamento já foram utilizadas em cães, incluindo radiação, excisão cirúrgica de nódulo solitário, fármacos como retinóides e ácido linoleico e quimioterapia antineoplásica, com o uso de lomustina e dacarbazina, em monoterapia ou com o uso de protocolos combinados como o CHOP (vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisona). Entretanto, a remissão completa é rara e a recidiva rápida (DE LORIMIER, 2006; FONTAINE et al., 2009; MORGES et al., 2014; SOKOŁOWSKA-WOJDYŁO; OLEK-HRAB; RUCKEMANN-DZIURDZIŃSKA, 2015; ZANDVLIET, 2016; LAPRAIS; OLIVRY, 2017).

Segundo De Lorimier (2006), a cirurgia nos casos de linfoma cutâneo só é indicada quando há presença de um único nódulo; entretanto, pelo linfoma ser uma doença sistêmica, a cirurgia deve ser sempre considerada como um tratamento inicial e seguida de quimioterapia antineoplásica.

Fontaine et al. (2010), em sua revisão de literatura, reconhecem que o tratamento com altas concentrações de ácido linoleico tem baixa eficácia, assim como o tratamento tópico com retinoides e corticosteroides, que são utilizados no tratamento dos estágios iniciais da micose fungoide em humanos (RISBON et al., 2006; LANSIGAN; CHOI; FOSS, 2008)

Assim, é reconhecido que a quimioterapia sistêmica é a melhor escolha de tratamento para os linfomas cutâneos (ETTINGER, 2003; LANSIGAN; CHOI; FOSS, 2008; CHUN, 2009; FONTAINE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; ZANDVLIET, 2016; LAPRAIS; OLIVRY, 2017). O objetivo do tratamento quimioterápico sistêmico é a destruição das células tumorais e estas, por terem um

aumento na ativação da via de sinalização para sua proliferação, tornam-se alvos de medicamentos que têm como objetivo impedir os processos de divisão celular, assim como a duplicação e síntese de DNA e proteínas (LUQMANI, 2008).

Existem vários protocolos com múltiplos agentes utilizados para o tratamento do linfoma canino, a exemplo do protocolo CHOP, em que há administração de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona, o qual proporciona maior tempo de remissão e sobrevida nos linfomas caninos multicêntricos (ETTINGER, 2003; CHUN; GARRET; VAIL, 2007; CHUN, 2009).

A vincristina é um alcaloide da vinca que atua interrompendo a divisão celular na metáfase ao impedir a formação de microtúbulos e tem, portanto, atuação em uma fase específica do ciclo celular (CHUN; GARRET; VAIL, 2007). A ciclofosfamida é um agente alquilante que altera a estrutura do DNA ligando-se a ele e inserindo um grupo alquil e, desse modo, interferem na transcrição, replicação e reparação do DNA; sua atuação, portanto, é independente da fase do ciclo celular (CHUN; GARRET; VAIL, 2007). A doxorrubicina pertence ao grupo das antraciclinas e é derivada do grupo de leveduras *Streptomyces*, seus múltiplos mecanismos de ação incluem a intercalação de DNA, que conduz a inibição da síntese de proteínas e a formação de radicais livres. Assim como a ciclofosfamida, sua atuação não depende da fase do ciclo celular (CHUN; GARRET; VAIL, 2007). Os glicocorticoides como a prednisona induzem a apoptose de linfócitos e linfoblastos e, segundo Zandvliet (2016), alguns estudos apontam que o tratamento prévio com os glicocorticoides leva a menor taxa de resposta a quimioterapia e períodos de remissão mais curtos.

Apesar de ainda não haver protocolo estabelecido que controle o linfoma cutâneo a longo prazo, a quimioterapia com a lomustina parece ter maior índice de resposta e maior duração, quando comparada a outros protocolos de tratamento (RISBON et al., 2006; WILLIAMS et al., 2006; LAPRAIS; OLIVRY, 2017).

A lomustina é um agente alquilante da classe das nitrosureias que interfere na síntese de DNA e RNA e na reparação de DNA (WEISS; ISSEL, 1982; MOORE et al., 1999; RISBON et al., 2006; WILLIAMS et al., 2006). Em cães, a quimioterapia sistêmica com lomustina é realizada por via oral a cada três semanas com uma dose de 60 a 70 mg/m², sendo que a média de administração é de quatro ciclos de quimioterapia (FONTAINE et al., 2009).

Laprais e Olivry (2017), em sua revisão, sugerem que os protocolos quimioterápicos que contêm a lomustina podem levar a uma remissão completa da

doença em 30% dos casos e sobrevida de seis meses após o diagnóstico. Risbon et al (2006) encontraram um índice de resposta à quimioterapia com lomustina de mais de 80%, sendo que 50% tiveram resposta parcial e 32% tiveram resposta total ao tratamento. Ainda segundo estes pesquisadores, a mediana da duração da resposta foi de 94 dias para os cães que obtiveram resposta parcial e 128 dias para os cães que obtiveram resposta completa ao tratamento. Willians et al. (2006) relataram em seu estudo que 17% dos cães com linfoma cutâneo epiteliotrópico atingiram remissão completa e 65% tiveram remissão parcial no tratamento exclusivamente com a lomustina. Duarte (2013), entretanto, não observou nenhum caso de resposta total a lomustina em seu estudo no Brasil, com cães com linfoma cutâneo.

1.2.6 PROGNÓSTICO

O prognóstico dos linfomas varia e depende de vários fatores, tais como a localização da doença, o estágio clínico, a presença ou ausência de sintomas gerais, o grau histológico, a imunofenotipagem (células T ou células B), a exposição a quimioterapia anterior ou corticosteroides e subsequente desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas, os processos de morte celular (apoptose) alterados, a taxa de proliferação de tumor, a presença de comorbidades ou condições paraneoplásicas (VAIL; YOUNG, 2007).

De modo geral, animais que apresentam linfoma cutâneo epiteliotrópico não respondem bem ao tratamento, tendo um mau prognóstico, com sobrevida média variando entre cinco a dez meses desde o aparecimento das primeiras lesões (MOORE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). O mesmo acontece com os animais que apresentam a forma não epiteliotrópica do linfoma, em que a eutanásia é realizada em muitos casos, devido à baixa resposta ao tratamento. A sobrevida média desde o estabelecimento das primeiras lesões até o óbito é de quatro meses nos linfomas não epiteliotrópicos (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

1.3 RESISTÊNCIA DE CÉLULAS TUMORAIS A MÚLTIPLAS DROGAS

A resistência de células tumorais a fármacos citotóxicos é a maior causa de falha da quimioterapia e pode ser definida como a insensibilidade das células tumorais a fármacos citotóxicos pela inativação do fármaco ou pela remoção dos fármacos do seu citoplasma (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; LUQMANI, 2008; NIERO et al., 2014).

Esta resistência, intrínseca ou adquirida, é um reflexo do resultado de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas nas células cancerígenas (NIERO et al., 2014). Entre os mecanismos utilizados pelas células para contornar a citotoxicidade dos fármacos estão o metabolismo enzimático do fármaco (por exemplo, β -lactamase), a alteração do local alvo para prevenir a ligação ao fármaco (por exemplo, metilação do ribossomo), alteração da via metabólica (por exemplo, conversão reduzida de ciclofosfamida), aumento do reparo dos danos causados pelo fármaco (proteínas de reparo como a O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase) e extrusão direta do fármaco da célula, evitando assim que as concentrações citotóxicas sejam atingidas (LUQMANI, 2008; NIERO et al., 2014; WONG et al., 2014; KAMBAYASHI et al., 2015; TOMASZOWSKI; SCHIRRMACHER; KAINA, 2015).

1.3.1 TRANSPORTADORES ABC

Um dos mecanismos subjacentes da resistência a múltiplas drogas (RMD) é o efluxo ativo de drogas por proteínas transportadoras da superfamília ATP-Binding Cassette (ABC), ligadas à membrana celular (LUQMANI, 2008; KUNJACHAN et al., 2013; NIERO et al., 2014; WONG et al., 2014; JOHNSON; CHEN, 2017). As proteínas de resistência tiveram origem na necessidade evolutiva do organismo de se proteger contra componentes tóxicos externos e teve como efeito a presença desse tipo de mecanismo de defesa em todas as células (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; WONG et al., 2014). Assim, a principal função dessas proteínas é deixar a concentração do fármaco no meio intracelular abaixo do limiar em que provocaria a morte celular (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; LUQMANI, 2008).

Os transportadores da família ABC são encontrados em todos os organismos, mas a glicoproteína-P humana ABC (Pgp/ABCB1), a proteína associada a

resistência a múltiplas drogas-1 (MRP1/ABCC1) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP/ABCG2) estão entre os mais estudados devido ao seu papel no desenvolvimento de RMD no câncer (MEALEY et al., 2003, 2008; SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; LUQMANI, 2008; MEALEY, 2012; KUNJACHAN et al., 2013; NIERO et al., 2014; WONG et al., 2014; ZANDVLIET; TESKE; SCHRICKX, 2014). Estas proteínas transportadoras compreendem domínios transmembrânicos (TMDs), que são responsáveis pelo reconhecimento e transporte de fármacos, e domínios de ligação de nucleotídeos citoplasmáticos (NBDs) onde o ATP é hidrolisado (SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; WONG et al., 2014; JOHNSON; CHEN, 2017).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura molecular dos transportadores ABCC1, ABCB1 e ABCG2.

Legenda: ABCC1 – proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP), ABCB1 – glicoproteína-P, ABCG2 – proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP). TMD – domínio transmembrana, NBD – domínio de ligação de nucleotídeos citoplasmáticos. (FONTE: KUNJACHAN et al., 2013)

A alta expressão destes transportadores ABC tem sido associada à diminuição da sensibilidade a agentes citotóxicos, já que elas são responsáveis pelo transporte ativo de drogas para o ambiente extracelular, e podem determinar mau prognóstico em vários tipos de cânceres nos seres humanos e em cães (SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; MEALEY, 2012; ZANDVLIET; TESKE; SCHRICKX, 2014). Em humanos, por exemplo, a superexpressão de Pgp na

leucemia mieloide aguda está relacionada com menor taxa de remissão completa (TSUJI et al., 2012).

A glicoproteína-P é uma proteína de 170 kDa codificada pelo gene ABCB1 (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; MARTINEZ et al., 2008; HIFUMI et al., 2010; SOKOŁOWSKA et al., 2015) e está normalmente expressa em muitos tecidos humanos e caninos, incluindo glândulas adrenais, rim, fígado, intestino, placenta, barreira hematoencefálica, pulmão e células do sangue periférico (GINN, 1996; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; BRENN et al., 2008). Ela é responsável pela extrusão de quimioterápicos hidrofóbicos do interior da célula, como a doxorrubicina, mitoxantrona, vimblastina, vincristina, paclitaxel, actinomicina D e corticosteroides (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; BRENN et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; HIFUMI et al., 2010).

A expressão da Pgp já foi relatada em muitos tumores caninos (GINN, 1996; HIFUMI et al. 2010; LEE, 2007; MIYOSHI et al, 2002).

Os linfomas também apresentam expressão de Pgp (GINN, 1996; LEE et al., 1996; VAN HASELEN et al., 1999; JILLELLA et al., 2000; OHSAWA et al., 2005; REZENDE, 2005; SAGLAM; HAYRAN; UNER, 2008; RODRIGUES, 2010; DHALIWAL et al., 2013; ZANDVLIET et al., 2015; SOKOŁOWSKA et al., 2015). Em humanos, estudos encontraram expressão desse transportador ABC em linfomas de grandes células anaplásicas e em linfomas de células T/NK (SAGLAM; HAYRAN; UNER, 2008). Ohsawa et al. (2005) encontraram expressão de glicoproteína-P em 37% dos casos dos linfomas de células B estudados, além disso, observaram uma correlação positiva entre a expressão dessa proteína e menor taxa de remissão completa.

Em cães, Lee et al. (1996) analisaram a expressão de Pgp nos linfomas e encontraram 67% dos tumores estudados negativos para essa proteína, 15,5% dos tumores tinham de 10 a 50% de células marcadas e 17,5% tinham mais de 50% de linfócitos malignos expressando Pgp. Observaram ainda uma menor duração da primeira remissão e uma menor sobrevida nos animais que tinham mais de 50% de células marcadas. Dhaliwal et al (2013) também estudaram diversos tipos de linfomas em cães e constataram a expressão de Pgp em 80% dos casos estudados, contudo, não verificaram nenhuma relação com a sobrevida desses animais. Sokolowska et al. (2015) encontraram 32% dos casos dos linfomas caninos de células B com expressão de glicoproteína-P em até 10% das células neoplásicas,

8% dos casos tiveram de 10-50% de células marcadas e 20% tiveram mais de 50% de células marcadas. Dos únicos dois casos de linfomas de células T estudados por esses pesquisadores, um não apresentou expressão de Pgp e outro tinha até 10% de células marcadas. Rezende (2005) relatou alta frequência na expressão de ABCB1 em cães com linfoma multicêntrico ao diagnóstico e o aumento de sua expressão na recidiva. Em um estudo com RNAm, Zandvliet et al. (2015) não observaram relação entre o aumento de expressão da ABCB1 e a falha no tratamento devido à resistência a múltiplas drogas em cães, mesmo resultado observado por Rodrigues (2010).

Com relação aos linfomas cutâneos, van Haselen et al. (1999) encontraram expressão fraca de Pgp (até 5% de linfócitos marcados) em apenas um dos 14 casos de micose fungoide humanos estudados; nos linfomas cutâneos periféricos de células T, três dos sete CD30⁻ e um dos três CD30⁺ eram positivos para Pgp (de 5 a 50% de células marcadas) e nenhum teve forte marcação para essa proteína (mais de 50% de células marcadas); nos linfomas cutâneos de células B, dois dos oito casos estudados eram positivos para glicoproteína-P (de 5 a 50% de células marcadas). Em um estudo de 2000, Jillella et al. observaram que 72% dos linfomas cutâneos humanos de células T expressaram Pgp. Em 2013, Duarte avaliou a expressão gênica do ABCB1 nos linfomas cutâneos caninos e verificou que, apesar de haver algum nível de expressão, esta não se relacionou com o prognóstico desses animais.

A MRP1-ABCC1 é uma proteína transportadora da família ABC de 190 KDa codificada pelo gene ABCC1 (LAUTIER et al., 1996; MA et al., 2002; SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; PAWŁOWSKI et al., 2013) e está expressa em diferentes tecidos humanos, tais como pulmão, testículos, rins, músculo esquelético, fígado, bexiga e baço (KRISHNA; MAYER, 2000; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005) e em muitas neoplasias como carcinomas pulmonar, mamário, de bexiga, estômago, próstata e tireóide, glioma, retinoma, leucemia mielóide aguda e linfoma (DEELEY; COLE, 1997; MA et al., 2002; GREAVES et al., 2012; NIERO et al., 2014).

Esse transportador foi primeiro identificado em uma linhagem de células humanas altamente resistentes a doxorrubicina e, depois, percebeu-se que ele confere também resistência a muitas outras drogas como vincristina, vimblastina, epirrubicina, mitoxantrano, clorambucil e ciclofosfamida (LAUTIER et al., 1996;

SCHINKEL; JONKER, 2003). Diferente da Pgp, a MRP transporta principalmente substâncias conjugadas com a glutathione, ou seja, a eficiência desse transportador depende do fornecimento de glutathione para a célula (LAUTIER et al., 1996; SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005). Em um estudo *in vitro* utilizando células tumorais mamárias caninas, Pawloski et al, 2013, demonstraram que a superexpressão desta proteína se relaciona com a resistência a vinblastina e cisplatina. Já Ma et al, 2002, também em um estudo *in vitro*, demonstraram que a ABCC1 canina, diferente da humana, confere resistência a alcaloides da vinca e não à doxorrubicina.

Entre as neoplasias caninas, há estudos da expressão de MRP nos carcinomas pulmonares (HIFUMI et al., 2010), carcinoma de células de transição (LEE et al., 2007) e mastocitomas grau I e II (MIYOSHI et al., 2002) e nos linfomas (REZENDE, 2005; RODRIGUES, 2010; ZANDVLIET et al., 2015)

Nos linfomas humanos de células T/NK, Saglam, Hayran e Uner (2008) observaram que 72% dos pacientes expressaram MRP e que metade desses apresentaram uma forte marcação com mais de 20% das células marcadas. Ohsawa et al. (2004) também verificaram que a expressão de MRP nos linfomas humanos está relacionada com baixa resposta à quimioterapia, pois as pessoas que tiveram expressão dessa proteína tiveram menores taxas de remissão completa da doença. Entretanto, Güntüz et al. (2012) em seu estudo sobre a expressão gênica de MRP nos linfomas humanos não conseguiram correlacionar a expressão dessa proteína com a resposta ao tratamento e a sobrevida dos pacientes. Filipits et al. (2010) observaram que a expressão gênica de MRP não foi diferente nos humanos com linfoma difuso de grandes células B antes e após tratamento quimioterápico e, portanto, não influencia a resposta ao tratamento e na sobrevida desses pacientes

Rezende (2005) relatou alta frequência na expressão de ABCC1 em cães com linfoma multicêntrico ao diagnóstico e o aumento de sua expressão na recidiva. Esses resultados, entretanto, não corroboram com os de outros autores. Em um estudo longitudinal sobre a expressão de proteínas de resistência em linfomas multicêntricos de cães, Zandvliet et al. (2015) encontraram uma diminuição na expressão de RNAm de MRP nesses animais, mesmo resultado encontrado por Rodrigues (2010). Tomiyasu et al. (2010) não observaram diferenças na expressão gênica da MRP nos linfomas caninos antes e após o tratamento.

Nos linfomas cutâneos humanos, van Haselen et al. (1999) observaram que seis dos 14 casos de micose fungoide estudados tinham de 5 a 50% de linfócitos malignos marcados para MRP e sete dos 14 casos de micose fungoide tinham mais de 50% de células marcadas, isso tanto para as lesões iniciais em placa como para o estágio de tumor. Além disso, tumores com fenótipo CD4⁻/CD8⁻ tiveram mais células marcadas para MRP do que os tumores com fenótipo CD4⁺/CD8⁻. E ainda metade dos casos de micose fungoide tiveram um aumento na expressão de MRP pós tratamento. Nos casos estudados por esses pesquisadores, tanto os linfomas cutâneos de células T periféricos CD30⁺ e CD30⁻ quanto os linfomas cutâneos de células B tiveram uma expressão de MRP menor do que os casos de micose fungoide.

A BCRP-ABCG2 (proteína de resistência do câncer de mama) é o transportador ABC codificado pelo gene ABCG2 (SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; MEALEY, 2012) e recebeu esse nome por ter sido isolada pela primeira vez em uma linhagem de células de câncer de mama (SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005). Está normalmente expressa em uma variedade de tecidos incluindo o fígado, epitélio intestinal, placenta, barreira hematoencefálica, células-tronco hematopoiéticas, eritrócitos e tecido mamário (SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; MEALEY, 2012).

Como outros transportadores ABC, a ABCG2 bombeia substratos como o metotrexato, os inibidores de tirosinaquinase, doxorrubicina e mitoxantrona do citoplasma para fora da célula (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; MEALEY, 2012; NOGUCHI; KATAYAMA; SUGIMOTO, 2014). Ela também está expressa em diversos tipos de tumores como carcinoma mamário (NOWAK; MADEJ; DZIEGIEL, 2009; PAWŁOWSKI et al., 2013; LEVI et al., 2016), carcinoma pulmonar (VESEL et al., 2017), carcinoma renal (WANG et al., 2017), carcinoma hepatocelular (TANDIA et al., 2017) e linfomas (SAGLAM; HAYRAN; UNER, 2008; SZCZURASZEK et al., 2009; RODRIGUES, 2010; TOMIYASU et al., 2010; CAMPA et al., 2012; ZANDVLIET et al., 2015).

Saglam, Hayran e Uner (2008) verificaram que nos linfomas humanos de células T/NK, a BCRP estava expressa em 78% dos casos e esta pode ser uma característica intrínseca desses linfomas. Szczuraszek et al. (2009) observaram em seu estudo em humanos que houve a expressão da BCRP em 96% dos casos de

linfoma não-Hodgkin estudados e a localização da proteína é na membrana plasmática das células tumorais, além disso, os pacientes com maiores expressões de BCRP tiveram um menor tempo sem progressão da doença (até 30 meses), indicando que este pode ser um indicador prognóstico.

Em cães, Rodrigues (2010) encontrou um aumento médio de 2,05 vezes na expressão do gene ABCG2 no momento do diagnóstico do linfoma multicêntrico canino quando comparado a linfonodos normais, contudo esse aumento não teve relação com o tempo de remissão e de sobrevida dos animais. Zandvliet et al. (2015) também encontraram um aumento na expressão gênica da BCRP sem que isso influenciasse a resposta ao tratamento e a sobrevida. Tomiyasu et al. (2010) não observaram diferenças na expressão gênica de ABCG2 antes e após o tratamento dos linfomas caninos.

1.3.2 PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA PULMONAR

Além dos transportadores ABC, a proteína de resistência pulmonar (LRP) está associada com o mecanismo RMD (IZQUIERDO et al., 1996a, 1996b; MOSSINK et al., 2003; VAN ZON et al., 2003; PÉREZ-TOMÁS, 2006). A LRP é conhecida como a principal proteína vault humana, tendo sido identificada pela primeira vez em uma linhagem de células de câncer pulmonar resistentes a doxorrubicina, mas que não expressavam a glicoproteína-P (IZQUIERDO et al., 1996a, 1996b; MOSSINK et al., 2003; VAN ZON et al., 2003; PÉREZ-TOMÁS, 2006).

Vaults são partículas de ribonucleoproteína complexas localizadas principalmente no citoplasma e membrana nuclear (IZQUIERDO et al., 1996a, 1996b; MOSSINK et al., 2003; VAN ZON et al., 2003; PÉREZ-TOMÁS, 2006). Sua função ainda é desconhecida, mas por estarem altamente expressas em tecidos em que há exposição constante a xenobióticos como o epitélio brônquico, o córtex da glândula adrenal e em macrófagos, acredita-se que essas vaults desempenham algum tipo de função no transporte dessas substâncias do meio intracelular para o extracelular (IZQUIERDO et al., 1996a, 1996b; MOSSINK et al., 2003; VAN ZON et al., 2003; PÉREZ-TOMÁS, 2006). Outros tecidos que expressam as vaults são os rins, esôfago, estômago, pâncreas, intestino delgado (IZQUIERDO et al., 1996a)

Figura 2 - Modelo esquemático da estrutura molecular da vault.

(Fonte: IZQUIERDO et al., 1996b)

O papel das vaults na resistência a múltiplas drogas não é bem definido, mas elas podem estar envolvidas de três diferentes maneiras: podem mediar a resistência a múltiplas drogas transportando-as para fora do núcleo, para as bombas de transporte transmembrana (como os transportadores ABC, por exemplo), ou para as vesículas de exocitose (IZQUIERDO et al., 1996a, 1996b; MOSSINK et al., 2003; VAN ZON et al., 2003; PÉREZ-TOMÁS, 2006). Entre os agentes citotóxicos substratos da LRP estão a doxorrubicina, mitoxantrona, metotrexato, vincristina e cisplatina (MOSSINK et al., 2003).

A LRP está superexpressa principalmente em tumores sólidos como carcinoma colorretal, pancreático, renal, endometrial, pulmonar, ovariano e esofágico (IZQUIERDO et al., 1996a; HIFUMI et al., 2010; QIANG et al., 2013; HUANG et al., 2016) e nas neoplasias hematológicas como a leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda e os linfomas (FILIPITS et al., 2000; SONNEVELD, 2000; CHAUNCEY, 2001; REZENDE, 2005; SAGLAM; HAYRAN; UNER, 2008; TOMIYASU et al., 2010; TSUJI et al., 2012; MAXWELL; MOUSAVI-FARD, 2013; BHATIA et al., 2015).

A regulação positiva da LRP está associada a linfomas mais agressivos e menor taxa de resposta à quimioterapia (MAXWELL; MOUSAVI-FARD, 2013). Filipits et al., 2000, observaram que os pacientes com linfoma difuso de grandes células B que expressaram LRP (mais de 10% de células marcadas) tiveram menor taxa de resposta e menor sobrevida, mesmo resultado obtido por Ohsawa et al. (2005). Saglam, Hayram e Uner (2008), entretanto, não verificaram relação com a expressão de LRP e a sobrevida dos pacientes humanos com linfomas de células T/NK, mesma observação feita por Gündüz et al. em linfomas Hodgkin e não-

Hodgkin (2012). Rezende (2005), entretanto, relatou alta frequência na expressão de LRP em cães com linfoma multicêntrico ao diagnóstico e o aumento de sua expressão na recidiva.

Nos linfomas cutâneos, Van Haselen encontraram expressão de LRP em apenas um caso de micose fungoide com fenótipo CD4⁺/CD8⁻ e um caso de linfoma cutâneo periférico de células T CD30⁺. Não houve mudança no perfil de marcação após o tratamento.

2 OBJETIVOS

Considerando a importância dos linfomas cutâneos caninos na rotina clínica e as poucas pesquisas relacionados ao tema no Brasil, foram objetivos deste estudo.

- Caracterizar os linfomas cutâneos quanto às manifestações clínicas, histopatologia (epiteliotropismo), imunofenotipagem (linfócitos T ou B) e proliferação celular por meio de Ki67.

- Avaliar por meio de imunoistoquímica, a expressão de marcadores de resistência a múltiplas drogas ABCB1, ABCC1, ABCG2 e LRP, correlacionando-os, se possível, ao epiteliotropismo, ao imunofenótipo, à resposta ao tratamento e ao tempo de sobrevida do animal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

GRUPO EXPERIMENTAL

Trata-se de um estudo retrospectivo em que foram avaliados 21 casos de cães com linfoma cutâneo, com diagnóstico histopatológico firmado em material proveniente de biópsia excisional ou com *punch* e sem distinção etária, sexual ou racial. Os casos foram atendidos entre os anos de 2010 e 2016 em três Instituições distintas: Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Estima Hospital Veterinário (Taubaté – SP) e Oncocane (São Paulo – SP).

Os dados clínicos e de sobrevida dos animais foram obtidos pelo levantamento de prontuários, entretanto, devido à dificuldade de acesso a alguns prontuários, de contato com alguns tutores e à falta de informação, apenas 14 animais tiveram esses dados incluídos no estudo. Foram analisados os tipos de lesão (eritema, pápulas, nódulos, tumores, alopecia), o local e o número de lesões no momento do diagnóstico, o tipo de tratamento e o protocolo quimioterápico instituído, além da resposta ao tratamento e o histórico prévio de dermatopatia. Também foram obtidos dados de exames laboratoriais como hemograma e perfil bioquímico (uréia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina transferase, albumina e proteína total) no momento do diagnóstico. O tempo de sobrevida foi determinado a partir do diagnóstico de linfoma até o óbito ou eutanásia.

O mesmo material obtido por biópsia e utilizado para o diagnóstico foi separado para as provas imunoistoquímicas realizadas no LAPMOL (Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular) do Departamento de Patologia – VPT, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

As amostras emblocadas em parafina foram seccionadas em cortes de 5µm, apostas em lâminas silanizadas e submetidas às provas específicas de imunoistoquímica para imunofenotipagem (CD3, CD20), proliferação celular (Ki67) e expressão dos marcadores de proteínas de resistência a múltiplas drogas (ABCB1, ABCC1, LRP e ABCG2).

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

A desparafinização e hidratação das amostras em lâminas silanizadas foi feita com banhos de 5 minutos em xilol, xilol mais álcool, álcool 100%, álcool 95% e álcool 70%. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram mergulhadas em solução tampão indicada para cada tipo de anticorpo e colocadas na panela de pressão por 20 minutos. Ao término desse período, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada.

A seguir, para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram colocadas em solução de peróxido de hidrogênio a 6% por 30 minutos. Foram, então, lavadas em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem TBST (solução Tris salina tamponada com tween 20 - Spring Bioscience®). Foi então, aplicada uma gota (volume suficiente para cobrir o corte) do reagente Hydrogen Peroxidase Block (Spring Bioscience® – Código DHP-125) e as lâminas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente.

O excesso de reagente foi retirado e o anticorpo foi diluído (ScyTek Laboratories, Inc –Código ATG 125), de acordo com a titulação especificada no quadro 4. As lâminas foram então incubadas por 60 minutos em estufa a 25°C. Para o marcador MRP- ABCC1, a incubação foi *overnight* por 18 horas, em temperatura de 4°C. Após esse período, o excesso de reagente foi removido e as lâminas foram lavadas novamente com TBST.

Quadro 2 - Marcadores analisados pela técnica de imunoistoquímica, com os respectivos anticorpos, diluição e tampão utilizado.

Marcador	Anticorpo	Diluição	Tampão
CD3	anticorpo policlonal de coelho anti-CD3 (DAKO, Carpinteria, CA, USA)	1:3000	Tris-EDTA
CD20	anticorpo policlonal de coelho anti-CD20 (Spring Bioscience CA-USA)	1:2000	Tris-EDTA
ABCB1	anticorpo monoclonal de camundongo anti-glicoproteína P (C494; Enzo Life Sciences, New York, USA)	1:200	Tris-EDTA
LRP	anticorpo monoclonal de camundongo anti-LRP (1014; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)	1:100	Tris-EDTA

(Continuação)

ABCC1	anticorpo policlonal de cabra anti-MRP (MRP1 - C20; Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA)	1:50	Tris-EDTA
ABCG2	anticorpo monoclonal de camundongo anti-BCRP (BXP-21; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)	1:100	Tris-EDTA
Ki67	anticorpo monoclonal de camundongo anti-Ki67 (clone MIB-1; DAKO, Carpinteria, CA, USA)	1:50	Tris-EDTA

Para o sistema de visualização, foram utilizados dois reagentes. O primeiro reagente Polímero Reveal Complement (Spring Bioscience®– Código DCMT-125) foi aplicado nas lâminas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o excesso de reagente foi retirado, sendo aplicado o segundo reagente: Reveal HRP Conjugate HRP (Spring Bioscience®– Código DHRR-125) por 15 minutos, também em temperatura ambiente. As lâminas foram, então, lavadas com tampão de lavagem TBST. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) usando DAB Chromogen (Spring Bioscience® - Cód. DABC-004) diluído em Spring Bioscience®-DAB Substrate Código DABS-125. A solução foi aplicada nas lâminas e elas foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Na sequência foram lavadas em água corrente e água destilada para a contra-coloração com hematoxilina (Merck®). A desidratação dos cortes foi feita com banhos rápidos de álcool 70%, álcool 95%, álcool 100%, xilol mais álcool e xilol. As lâminas foram montadas utilizando-se Permount diluído em xilol.

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA PARA Ki67

A reação de desparafinização e hidratação das amostras cortadas em lâminas de microscopia previamente silanizadas, foi realizada com o uso de xilol e álcool (xilol I por 5 minutos – xilol II por 5 minutos – xilol mais álcool por 5 minutos – álcool 100% I por 5 minutos – álcool 100% II por 5 minutos – álcool 95% por 5 minutos - álcool 70% por 5 minutos, respectivamente). Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente (5 minutos) e água destilada (5 minutos) e foi realizada a recuperação antigênica (desmascaramento) em panela de pressão com o uso de tampão específico para o anticorpo.

O procedimento de lavagens foi repetido e, então, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio de peróxido de hidrogênio a 6% por 30 minutos, em ambiente protegido da luz. Procedeu-se novamente com as lavagens em água

corrente e destilada, acrescidas de três lavagens em PBS com tween 20x (solução salina tamponada com fosfato) por 5 minutos e, então, foi aplicado o anticorpo primário diluído no título especificado no quadro 4, por sobre o material, por 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida e escura.

Após o *overnight*, foi realizada a lavagem das lâminas com PBS por três ciclos e aplicou-se o anticorpo secundário polímero Super Picture e incubou-se em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Foram realizadas mais três lavagens das lâminas com solução PBS com tween 20x e procedeu-se com a aplicação do substrato 3,3' DAB durante 5 minutos, protegido da luz, a 37°C, sendo realizada novamente a lavagem das lâminas em água corrente (5 minutos) e água destilada (5 minutos). Após esta etapa, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e desidratadas com banhos rápidos de álcool 70%, álcool 95%, álcool 100%, xilol mais álcool e xilol. As lâminas foram montadas utilizando-se Permount diluído em xilol.

LEITURA E ANÁLISE DAS LÂMINAS DE IMUNOISTOQUÍMICA

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico por dois avaliadores e, caso houvesse discrepância nas avaliações, um terceiro avaliador era consultado. A imunofenotipagem foi determinada de acordo com a predominância de marcação (mais de 50% de células marcadas) dos anticorpos CD3 ou CD20.

A análise das proteínas de resistência ABCB1 (glicoproteína-P) e LRP foi semiquantitativa. A expressão desses marcadores foi determinada observando a lâmina em microscópio óptico com aumento de 40x, estimando-se a porcentagem de células marcadas. Foram consideradas positivas as amostras que tinham mais de 10% de células expressando o marcador. As amostras com até 50% de células marcadas foram classificadas como expressando a proteína e as com mais de 50% foram classificadas como alta expressão da proteína.

A análise de ABCC1-MRP e ABCG2-BCRP também foi semiquantitativa e, nesse caso, foi determinada a intensidade de marcação em microscópio óptico com aumento de 40x. As amostras foram classificadas em 0 (sem marcação), 1 (intensidade de marcação fraca), 2 (intensidade de marcação média) e 3 (intensidade de marcação forte).

Para o índice de proliferação Ki67, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e determinados os campos em que havia maior expressão do

marcador. Esses campos foram fotografados com o software Zen Imaging Software (versão 2.3 - Zeiss®) e 1000 células foram contadas com o auxílio programa Image-Pro Plus® (versão 4.5.0.29 para Windows® - Media Cybernetics, Inc.), determinando, assim, a porcentagem de células que expressaram o marcador.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a correlação entre a expressão das proteínas de resistência, proliferação celular, imunofenótipo, tipo histológico e sobrevida, foram utilizadas, inicialmente, estatística descritiva e análise da distribuição dos dados quanto à normalidade. Como os dados não apresentaram distribuição normal foi adotado um teste não paramétrico - Correlação de Spearman.

A expressão das proteínas de resistência e proliferação celular foram comparadas entre os grupos de linfoma epiteliotrópico e não-epiteliotrópico e como os dados não apresentavam distribuição normal, a comparação de medianas foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism6 (versão 6.01 para Windows® - GraphPad Software, Inc.). Para todas as análises foi adotado um nível de significância inferior a 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Dos 21 animais com linfoma cutâneo incluídos neste estudo, 11 eram fêmeas e dez eram machos. A mediana de idade foi de 10 anos (variando de 1 a 16 anos), seis animais não tinham raça definida (SRD), cinco eram Cocker Spaniel, quatro Labrador Retriever, dois eram Golden Retriever e o restante eram das raças Basset Hound, Boxer, Poodle e Scottish Terrier. Oito casos foram classificados histopatologicamente como linfoma epiteliotrópico, 11 casos como linfoma não epiteliotrópico, um caso não teve definido o epiteliotropismo e foi classificado apenas como linfoma, enquanto outro foi classificado apenas como neoplasia de células redondas. Em 12 dos 21 casos foi possível obter dados de sobrevida, cuja mediana foi de 4,5 meses (5 dias a 12 meses). Apenas um animal apresentou histórico clínico de dermatite atópica anterior ao linfoma.

Entre os 11 casos de linfoma não-epiteliotrópico, seis animais eram fêmeas e cinco eram machos. A mediana de idade dos animais ao diagnóstico foi de 9 anos (variando de 1 a 14 anos), quatro animais não tinham raça definida, dois eram Cocker Spaniel, dois Golden Retriever, um Labrador Retriever e um Poodle. Foram obtidos dados de sobrevida de seis animais, sendo que a mediana foi de 4 meses (5 dias a 12 meses). Entre os oito casos de linfoma epiteliotrópico, cinco animais eram machos e três eram fêmeas. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 10 anos (8 a 16 anos), três animais eram da raça Labrador Retriever, dois animais eram Cocker Spaniel, um animal não tinha raça definida, um era Basset Hound e o outro Scottish Terrier. Os dados de sobrevida foram obtidos de cinco animais, sendo que a mediana de sobrevida foi de 4 meses (2 a 8 meses). Não houve diferença significativa na mediana de sobrevida e de idade ao diagnóstico nos animais com linfoma epiteliotrópico e não-epiteliotrópico ($p=0,9848$ e $p=0,4507$, respectivamente).

O caso classificado histologicamente apenas como linfoma era de uma fêmea sem raça definida de 5 anos e sua sobrevida foi de 4 meses. O caso classificado histopatologicamente como neoplasia de células redondas era de uma fêmea da raça Cocker Spaniel de 10 anos de idade, seus dados de sobrevida não foram obtidos.

Gráfico 1 - Distribuição dos dados de sobrevida dos animais com linfoma epiteliotrópico e não-epiteliotrópico.

Fonte: (ALVES, 2017).

Os dados clínicos foram obtidos de quinze animais. Os sete animais com linfoma epiteliotrópico, dos quais foi possível acesso ao prontuário, apresentaram lesões cutâneas generalizadas, principalmente na forma de nódulos ulcerados. Em um caso, as lesões eram pápulas e um outro animal apresentava eritema, despigmentação e lesões alopecícas circulares. As lesões foram encontradas mais frequentemente em região dorsal e ventral, e menos comumente em face, com apenas três casos apresentando lesão nessa região.

Cinco dos seis animais diagnosticados com linfoma não epiteliotrópico apresentavam lesões cutâneas generalizadas na forma de nódulos ulcerados nas regiões dorsal e ventral. Um animal apresentou um único nódulo ulcerado em plano nasal. O animal que não teve o epiteliotropismo do linfoma definido tinha nódulos cutâneos ulcerados generalizados em região dorsal e ventral. O animal com diagnóstico histopatológico de neoplasia de células redondas apresentava nódulos cutâneos ulcerados em região ventral, de face e de língua.

Todos os animais com diagnóstico de linfoma epiteliotrópico foram submetidos à quimioterapia antineoplásica, cinco deles tiveram como primeira escolha o protocolo quimioterápico com lomustina, dois animais tiveram o protocolo CHOP modificado pela Universidade Madison-Wisconsin, pela indisponibilidade da lomustina no mercado no momento do diagnóstico. Seis dos sete animais tiveram

resposta parcial ao tratamento, um único animal tratado apenas com lomustina não respondeu ao tratamento e sua sobrevivência foi de dois meses.

Dos animais com linfoma não epiteliotrópico, quatro receberam quimioterapia antineoplásica com lomustina como protocolo de primeira escolha e todos tiveram resposta parcial ao tratamento. Outros dois animais não receberam nenhum tipo de tratamento quimioterápico, um deles teve uma sobrevivência menor do que um mês e o outro animal não se pode acessar os dados de sobrevivência.

Do animal com diagnóstico histopatológico de linfoma, o tratamento instituído foi a quimioterapia antineoplásica com lomustina e L-asparaginase, sendo que a resposta ao tratamento foi parcial nesse caso. Quanto ao animal com diagnóstico de neoplasia de células redondas, não se teve acesso ao tratamento instituído. Os dados laboratoriais dos animais encontram-se no Anexo 1.

3.1 RESULTADOS DA IMUNOFENOTIPAGEM – EXPRESSÃO DE CD3 E CD20.

Para a análise dos marcadores de imunofenotipagem CD3 e CD20, os marcadores foram considerados expressos quando, comparando as lâminas, um marcador mostrava-se predominante em relação ao outro. Assim, dos 21 linfomas cutâneos estudados, 16 tinham imunofenótipo CD3⁺CD20⁻, três eram CD3⁻CD20⁺ e dois eram CD3⁺CD20⁺.

Figura 3 - Fotomicrografia de expressão de CD3 e CD20 em linfoma cutâneo - imunofenótipo CD3⁺CD20⁻.

Legenda: Aumento de 5x. (A) Expressão de CD3. (B) Expressão de CD20. Fonte: (ALVES, 2017).

Figura 4 - Fotomicrografia da expressão de CD3 e CD20 em linfoma cutâneo – imunofenótipo CD3⁻CD20⁺.

Legenda: Aumento de 5x. (A) Expressão de CD3. (B) Expressão de CD20. Fonte: (ALVES, 2017).

Figura 5 - Fotomicrografia da expressão de CD3 e CD20 em linfoma cutâneo – imunofenótipo CD3⁺CD20⁺.

Legenda: Aumento de 5x. (A) Expressão de CD3. (B) Expressão de CD20. Fonte: (ALVES, 2017).

Entre os linfomas epiteliotrópicos, seis apresentaram imunofenótipo CD3⁺CD20⁻, um apresentava imunofenótipo CD3⁻CD20⁺ e outro apresentava CD3⁺CD20⁺. Nos linfomas não epiteliotrópicos, nove animais apresentavam imunofenótipo CD3⁺CD20⁻, um apresentava imunofenótipo CD3⁻CD20⁺ e outro apresentava CD3⁺CD20⁺. O caso classificado apenas como linfoma tinha imunofenótipo CD3⁺CD20⁻ e a neoplasia de células redondas apresentava imunofenótipo CD3⁻CD20⁺.

Gráfico 2 - Distribuição do número de animais com imunofenótipo CD3⁺CD20⁻, CD3⁻CD20⁺, CD3⁺CD20⁺ entre os linfomas epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos.

Fonte: (ALVES, 2017)

3.2 ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – EXPRESSÃO DE Ki67.

A marcação do índice de proliferação celular Ki67 teve mediana de 31% (variando de 9,2 a 88,7%) das células neoplásicas dos linfomas cutâneos. Os linfomas epiteliotrópicos tiveram mediana de células marcadas de 28,2% (variando de 9,2 a 38,5%), sendo que três casos tiveram baixa expressão de Ki67 (<20%) e cinco casos tiveram média expressão do marcador (21 a 50%). Os linfomas não-epiteliotrópicos tiveram mediana de expressão de Ki67 de 41,2% (14,5 a 88,7%), sendo que quatro animais tiveram baixa expressão de Ki67 (<20%), três animais tiveram média expressão (21 a 50%) e quatro animais tiveram alta expressão do marcador (>50%).

Figura 6 - Fotomicrografia das diferentes expressões do marcador de proliferação celular Ki67 nos linfomas cutâneos.

Legenda: Aumento de 40x. (A) baixa expressão de Ki67 (até 20% de células marcadas), (B) média expressão de Ki67 (de 20 a 50% de células marcadas), (C) alta expressão de Ki67 (mais de 50% de células marcadas). Fonte: (ALVES, 2017).

Não houve diferença significativa na expressão de Ki67 entre os linfomas epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos. O caso categorizado apenas como linfoma T teve 65,1% de células marcadas e o animal com neoplasia de células redondas (linfoma B) teve 31% de expressão de Ki67. Não houve correlação entre a expressão de Ki67 e a sobrevivência dos animais ($r = -0,1799$ e $p = 0,5505$).

3.3 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA – ABCB1, ABCC1, ABCG2 E LRP.

Para as expressões de Pgp (ABCB1) e LRP, foram consideradas positivas as amostras com mais de 10% de células marcadas; sendo assim, todas as amostras analisadas foram positivas para LRP e 19 das 21 amostras (90,5%) foram positivas para a Pgp. Para a marcação de MRP (ABCC1) e BCRP (ABCG2), a análise foi feita por intensidade de marcação. Dessa maneira, quatro amostras apresentaram marcação positiva para ABCC1 e cinco foram positivas para ABCG2.

Apenas um animal apresentou expressão dos quatro marcadores de resistência, seis animais apresentaram expressão de três proteínas de resistência, 13 animais apresentaram marcação de duas proteínas de resistência e um animal teve expressão de uma única proteína de resistência.

A mediana de expressão de ABCB1 (Pgp) nos linfomas cutâneos foi de 40% (10 a 90%) de células marcadas, sendo que 14 animais apresentaram até 50% de células marcadas e cinco animais apresentaram mais de 50% de células marcadas. Entre os linfomas epiteliotrópicos, a mediana de marcação foi de 25% (10 a 40%) e entre os não-epiteliotrópicos, a mediana foi de 50% (20 a 90%).

Figura 7 – Fotomicrografia das diferentes expressões de ABCB1 no linfoma cutâneo de cães.

Legenda: (A) amostra apresentando baixa expressão de ABCB1 (de 10 a 50% de células marcadas). (B) amostra apresentando alta expressão de ABCB1 (mais de 50% de células marcadas). Fonte: (ALVES, 2017).

Nenhuma amostra de linfoma epiteliotrópico apresentou alta expressão (mais de 50% de células marcadas) de ABCB1, enquanto que cinco das 11 (45%) amostras de linfoma não epiteliotrópico tiveram expressão maior do que 50%. A

amostra classificada apenas como linfoma (linfoma T), teve 40% das células marcadas para ABCB1 e a neoplasia de células redondas (linfoma B) teve 35% de células marcadas. Houve diferença significativa ($p=0,0468$) na expressão desse marcador quando comparados os linfomas epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos, entretanto, não houve correlação com a expressão de ABCB1 e a sobrevida dos animais ($r=0,1482$, $p=0,6421$).

Gráfico 5 - Distribuição de expressão de ABCB1 nos linfomas cutâneos epiteliotrópicos e não-epiteliotrópicos.

Fonte: (ALVES, 2017).

Gráfico 6 - Dispersão da porcentagem de células marcadas para ABCB1 de acordo com a sobrevida dos animais.

Fonte: (ALVES, 2017).

A mediana de expressão de LRP nos linfomas cutâneos foi de 65% (10 a 95%) de células marcadas, em 19% dessas amostras a expressão de LRP foi menor do que 50% (baixa expressão) e 81% apresentaram alta expressão (> 50% de células marcadas).

Figura 8 – Fotomicrografia das diferentes expressões da LRP nos linfomas cutâneos.

Legenda: Aumento de 20x. (A) baixa expressão de LRP – de 10 a 50% de células marcadas. (B) alta expressão de LRP – mais de 50% de células marcadas. Fonte: (ALVES, 2017).

Os linfomas epiteliotrópicos apresentaram mediana de expressão de LRP de 60% (10 a 95%) de células marcadas, sendo que, desses 22% apresentaram baixa expressão e 78% alta expressão do marcador. Os linfomas não epiteliotrópicos apresentaram mediana de expressão de LRP de 80% (20 a 90%), sendo que 91% tinham mais de 50% de células marcadas. A amostra classificada apenas como linfoma (linfoma T) apresentou 30% de células marcadas para LRP e a neoplasia de células redondas (linfoma B) tinha expressão de 65%.

Não houve diferença significativa ($p=0,2715$) na expressão de LRP quando comparadas as amostras de linfoma cutâneo epiteliotrópico e não epiteliotrópico e também não houve correlação entre a expressão desse marcador e a sobrevida do animal.

Gráfico 7 - Distribuição da porcentagem de células marcadas para a LRP nos linfomas cutâneos epiteliotrópicos e não-epiteliotrópicos.

Fonte: (ALVES, 2017).

Gráfico 8 - Dispersão da porcentagem de células marcadas para LRP de acordo com a sobrevida dos animais.

Fonte: (ALVES, 2017).

Quatro dos 21 animais incluídos neste estudo tiveram alta de expressão de ABCB1 e LRP, todos tinham classificação histopatológica de linfoma não-epiteliotrópico, três tinham imunofenótipo CD3⁺CD20⁻ e um tinha imunofenótipo CD3⁺CD20⁺. A mediana de sobrevida desses animais foi de cinco meses.

Diferente das expressões de ABCB1 e LRP, as expressões de ABCC1 e ABCG2 foram avaliadas de acordo com a intensidade de marcação, com graus que variaram de 0 – sem marcação a 3 – marcação intensa. Com relação à ABCC1, quatro amostras apresentaram expressão desse marcador, sendo duas com intensidade 1, uma com intensidade 2 e outra com intensidade 3.

Figura 9 - Fotomicrografias da expressão de ABCC1 nos linfomas cutâneos.

Legenda: (A) – ausência de expressão de ABCC1, (B) – expressão de ABCC1 com intensidade 1, (C) – expressão de ABCC1 com intensidade 2, (D) – expressão de ABCC1 com intensidade 3. Fonte: (ALVES, 2017)

O animal com intensidade 3 de marcação para ABCC1 teve dois meses de sobrevida, em contrapartida, os animais com intensidade de marcação 1 para ABCC1 tiveram três e 12 meses de sobrevida.

Com relação à ABCG2, cinco animais tiveram expressão desse marcador, sendo três com intensidade 1 e dois animais com intensidade 2.

Figura 10 - Fotomicrografia da intensidade de expressão de ABCG2 nos linfomas cutâneos.

Legenda: (A) – ausência de expressão de ABCG2, (B) – expressão de ABCG2 com intensidade 1, (C) – expressão de ABCG2 com intensidade 2. Fonte: (ALVES, 2017).

Dois animais que expressaram ABCG2 tiveram sobrevida de cinco meses, um expressou ABCG2 com intensidade 1 e outro com intensidade 2. O outro animal que expressou ABCG2 com intensidade 1, e que se obteve acesso ao prontuário, teve sobrevida de três meses.

Analisando a expressão dos diversos marcadores de resistência com a sobrevida dos animais, observa-se que o animal que expressou os quatro marcadores teve sobrevida de três meses, três dos quatro animais que expressaram três marcadores tiveram sobrevida de três, cinco e 12 meses, os animais que expressaram dois marcadores tiveram sobrevida que variou de menos de um mês a cinco meses, o animal que expressou apenas uma proteína de resistência teve sobrevida de 8 meses. Em contrapartida, o único animal que não apresentou resposta ao tratamento quimioterápico teve expressão de ABCB1 (30% de células marcadas), LRP (90% de células marcadas) e ABCC1 (marcação intensidade 3).

Considerando o reduzido número de casos de imunofenótipo B não foi possível comparar a expressão das proteínas entre linfomas T e B, assim como não foi possível a comparação com relação à resposta ao tratamento, já que, dos dados obtidos, as respostas foram majoritariamente parciais, à exceção de três animais, que não apresentaram resposta à quimioterapia.

Quadro 3 - Dados de raça, idade, sexo, tipo histológico, imunofenótipo, sobrevida, resposta ao tratamento e expressão de Ki67, ABCB1, LRP, ABCC1 e ABCG2 dos cães com linfoma cutâneo.

Animal	Raça	Idade (anos)	Sexo	Tipo Histológico	Imunofenótipo	Sobrevida (meses)	Resposta ao tratamento	Protocolo	Ki67	ABCB1	LRP	ABCC1	ABCG2
1	Basset Hound	11	macho	epiteliotrópico	T	-	-	-	33,5	10	10	0	0
2	Cocker Spaniel	10	fêmea	epiteliotrópico	B		8 parcial	CHOP mod. e lomustina	10,1	0	30	0	0
3	Labrador	10	macho	epiteliotrópico	T/B		2 sem	Lomustina e CHOP modificado	28,5	30	80	3	0
4	Scottish terrier	12	macho	epiteliotrópico	T		5 parcial	CHOP modificado	9,2	0	60	0	2
5	Cocker Spaniel	10	macho	epiteliotrópico	T		4 parcial	Lomustina e doxorrubina	38,5	40	80	0	0
6	Labrador	8	macho	epiteliotrópico	T	-	parcial	Lomustina e CHOP modificado	27,8	40	60	0	0
7	Labrador	10	fêmea	epiteliotrópico	T		2 parcial	Lomustina	37,8	20	95	0	0
8	SRD	16	fêmea	epiteliotrópico	B	-	parcial	Lomustina	10,1	10	60	0	2
9	SRD	12	macho	não epiteliotrópico	T	-	-	-	45,3	90	20	0	0
10	Golden Retriever	1	macho	não epiteliotrópico	T/B		6 -	-	24,2	80	80	0	0
11	Poodle	12	macho	não epiteliotrópico	T	0,15*	-	-	14,7	40	85	0	0
12	Boxer	4	macho	não epiteliotrópico	T	-	-	-	19,8	60	90	0	1
13	Cocker Spaniel	8	fêmea	não epiteliotrópico	T		12 parcial	Lomustina e CHOP modificado	41,2	50	85	1	0
14	Golden Retriever	5	fêmea	não epiteliotrópico	T		1 sem	-	88,7	20	60	0	0
15	SRD	14	fêmea	não epiteliotrópico	T	-	sem	-	50,4	30	90	0	0
16	SRD	13	fêmea	não epiteliotrópico	T		5 parcial	Lomustina e CHOP modificado	14,5	90	70	0	0
17	SRD	9	fêmea	não epiteliotrópico	T	-	-	-	58,4	20	60	2	0
18	Cocker Spaniel	11	fêmea	não epiteliotrópico	B	-	parcial	Lomustina e CHOP modificado	61	30	60	0	0
19	Labrador	8	macho	não epiteliotrópico	T		3 parcial	Lomustina e CHOP modificado	15,2	90	90	1	0
20	SRD	4	fêmea	linfoma	T		5 parcial	Lomustina	65,1	40	30	0	1
21	Cocker Spaniel	10	fêmea	Neoplasia de célulass redondas	B	-	parcial	Lomustina e L-asparaginase	23,7	10	70	0	1

Legenda: SRD (sem raça definida). Protocolo CHOP (vincristina – ciclofosfamida – doxorrubina – prednisona), Índice de proliferação celular Ki67 em porcentagem de células marcadas, proteínas de resistência ABCB1 e LRP em porcentagem de células marcadas, proteínas de resistência ABCC1 e ABCG2 em intensidade de marcação. *sobrevida em meses equivalente a 5 dias. Fonte (ALVES, 2017).

4 DISCUSSÃO

Os linfomas cutâneos compõem um grupo heterogêneo de neoplasias linfoides, cujo sítio primário é a pele. A doença parece acometer igualmente machos e fêmeas e, assim como descrito por Moore; Olivry (1994); Gross et al. (2005); Fontaine et al. (2009); Moore et al. (2009); Fontaine; Heimann; Day (2010); Miller; Griffin; Campbell (2013), neste estudo também não foi observada predisposição sexual, já que 52% dos animais estudados eram fêmeas e 48% machos.

A bibliografia veterinária também relata que na espécie canina, as raças que parecem ter maior predisposição para o linfoma cutâneo epiteliotrópico são Cocker Spaniel, Golden Retriever e Labrador Retriever e, de fato, os linfomas cutâneos epiteliotrópicos foram observados em animais dessas raças, como relatado por Gross et al. (2005), Fontaine et al. (2009) e Miller, Griffin e Campbell (2013), entretanto, não há como se afirmar essa predisposição devido ao número de casos analisados, ainda mais que, quanto aos linfomas não epiteliotrópicos, a literatura aponta que não há predisposição racial (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; MOORE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), e neste estudo, as mesmas raças, quais sejam Cocker Spaniel e Golden Retriever também estiveram representadas com quadros não epiteliotrópicos.

A mediana de idade dos animais ao diagnóstico foi de 9 anos com mediana de sobrevida de 4 meses, tanto para os linfomas epiteliotrópicos quanto para os não-epiteliotrópicos. Na bibliografia compulsada, a média de idade ao diagnóstico é de 9 anos e a média de sobrevida é de 5 a 10 meses para os linfomas epiteliotrópicos e de 4 meses para os não-epiteliotrópicos (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; MOORE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; DIAS et al., 2015) indicando que os linfomas cutâneos são mesmo mais frequentes em animais mais velhos e têm um mau prognóstico com relação ao tempo de sobrevida (MOORE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), embora a sobrevida observada ainda tenha sido um pouco maior do que aquela observada em 29 animais, no interior do Estado, por Hernandez, 2017.

As lesões apresentadas pelos animais estudados com diagnóstico de linfoma epiteliotrópico foram majoritariamente generalizadas, na forma de nódulos

ulcerados, sendo que alguns animais apresentaram pápulas eritematosas, crostas, e despigmentação, o que está de acordo com o descrito por outros autores (GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Os animais com linfoma cutâneo epiteliotrópico também apresentaram, em sua maioria, nódulos ulcerados, condizente com o demonstrado por outros autores (GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; MOORE; AFFOLTER; KELLER, 2013).

A dermatite atópica é apontada por alguns pesquisadores como principal fator predisponente para o desenvolvimento dos linfomas cutâneos (MOORE; OLIVRY, 1994; SANTORO; MARSELLA; HERNANDEZ, 2007), já que a inflamação constante induziria a ativação dos linfócitos e sua expansão clonal (FONTAINE et al., 2009), entretanto, neste estudo, apenas um dos animais apresentava histórico prévio de dermatite, ratificando que, como constatado por outros autores (GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), não é possível fazer uma relação direta entre a ocorrência de atopia e o desenvolvimento de linfoma cutâneo.

A literatura aponta que, na medicina veterinária, os linfomas cutâneos epiteliotrópicos são mais frequentes do que os não-epiteliotrópicos (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MOORE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), entretanto, a amostragem do presente estudo diverge destes dados, já que 52% dos animais apresentavam a forma não-epiteliotrópica da doença. Resultados similares foram apresentados por Dias et al. (2015) em estudo no qual 62% dos animais com linfoma cutâneo tinham a forma não-epiteliotrópica e Hernandez (2017), que estudou 29 casos de várias cidades do Estado de São Paulo e encontrou 75% da forma não-epiteliotrópica. Esse achado pode indicar que, diferente do que é demonstrado em outros países, no Brasil os linfomas cutâneos não epiteliotrópicos tendem a ser um diagnóstico mais frequente, entretanto, a falta de estudos com maior casuística ou mesmo estudos multicêntricos, ainda dificulta a conclusão sobre a forma mais prevalente da doença em nosso meio.

Considerando ainda o epiteliotropismo e a classificação da doença, de acordo com a classificação dos linfomas cutâneos utilizada na medicina veterinária, observa-se que linhagens de linfócitos diferentes estão inseridas no mesmo grupo de classificação, por apresentarem o mesmo comportamento com relação ao

epiteliotropismo. Na medicina humana, a classificação dos linfomas cutâneos de acordo com as células de origem é feita desde o final dos anos 70 (BURG et al., 2005; MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006), ou seja, há muito tempo que os linfomas cutâneos humanos são agrupados pelo tipo celular que deu origem ao processo. É possível que uma avaliação e reclassificação dos linfomas cutâneos em medicina veterinária, implicasse em melhor compreensão deste conjunto de neoplasias, evitando reunir, em um mesmo grupo, tumores com imunofenótipos distintos e permitiria maior conhecimento do comportamento biológico da neoplasia.

A identificação de uma célula acontece pelos tipos de molécula CD (cluster of differentiation) que ela expressa (MORICZ; SANCHES JÚNIOR, 2005). Segundo a bibliografia veterinária (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; FONTAINE et al., 2009; MOORE et al., 2009; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), imunofenotipicamente, os linfomas epiteliotrópicos em cães são linfócitos T (MOORE; OLIVRY, 1994; MOORE; OLIVRY; NAYDANT, 1994; GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; HERNANDEZ, 2017) entretanto, no presente estudo, houve um caso com expressão CD3-CD20+ (linfócito B) e outro CD3+CD20+. O mesmo aconteceu com os linfomas não epiteliotrópicos, em que um caso também apresentou imunofenótipo CD3-CD20+ e outro CD3+CD20+. Em 2016, Brachelente et al. relataram um caso de um cão Daschund com linfoma cutâneo que apresentava imunofenótipo CD3+CD20+.

Outros pesquisadores já relataram linfomas cutâneos com expressão de CD3 e CD20. Em estudos humanos, Rahemtullah et al. (2008) descreveram nove casos de linfomas cutâneos, sete deles classificados como linfomas periféricos de células T inespecíficos e dois classificados como micose fungoide CD3+CD20+. Em 2013, Hagen et al. descreveram três casos de micose fungoide com este imunofenótipo e, em 2014, Harms et al. descreveram mais dois casos de micose fungoide CD3+CD20+. Segundo estes autores, a dupla expressão destes marcadores pode refletir a natureza aberrante da população de células T, ou ainda que CD20 é ativada em um subconjunto das células infiltradas após sua conversão maligna e, como consequência, representa uma população com maior potencial de progressão rápida no ciclo celular. Devido ao número reduzido de casos observados neste estudo e relatados na literatura, não é possível relacionar a dupla expressão de CD3 e CD20 com um pior prognóstico. Outros estudos precisam ser realizados para

elucidar o papel do CD20 nos linfomas cutâneos, da mesma forma que outros marcadores específicos, por exemplo CD56 marcando linfócitos NK e a expressão de CD4, CD8, CD7 e CD30, poderiam auxiliar na compreensão do comportamento biológico dos linfomas cutâneos.

Como exemplo, a micose fungoide canina é comparada há décadas com a micose fungoide humana, por apresentar características histopatológicas semelhantes tais como o epidermotropismo e os microabcessos de Pautrier (MOORE; OLIVRY, 1994; BURG et al., 2005; GROSS et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Entretanto, elas diferem quanto a progressão da doença e a imunofenotipagem (MOORE; OLIVRY, 1994; MOORE; OLIVRY; NAYDANT, 1994; BURG et al., 2005; GROSS et al., 2005; WILLEMZE et al., 2005; KO, 2006; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), já que, em humanos, essa apresentação da neoplasia tem uma evolução lenta, com boa resposta à quimioterapia tópica com retinoide nas fases de manchas e placas (WILLEMZE et al., 2005; LANSIGAN; CHOI; FOSS, 2008). Em cães, a evolução é rápida, com sobrevida média de 4 meses após o diagnóstico e com resposta parcial ou ausência de resposta a terapia com retinoides (RISBON et al., 2006; FONTAINE; HEIMANN; DAY, 2010). Com relação ao imunofenótipo, a micose fungoide humana tem imunofenótipo de linfócito T helper (CD3+CD4+CD8-) (WILLEMZE et al., 2005; LANSIGAN; CHOI; FOSS, 2008), enquanto a micose fungoide canina apresenta imunofenótipo de linfócito T citotóxico (CD3+CD4-CD8+). Ou seja, apesar de terem a mesma denominação e algumas características histopatológicas semelhantes, a linhagem celular de origem das neoplasias é distinta, assim como a progressão da doença e seu prognóstico e talvez não seja realmente possível, traçar um paralelo da doença entre as duas espécies.

Quanto à agressividade do processo, a proteína relacionada à proliferação celular Ki67, tem sido utilizada como um marcador prognóstico nos linfomas, sendo que sua maior expressão indica maior proliferação celular e pior prognóstico (DUMMER et al., 1995; ABELE et al., 1997; FOURNEL-FLEURY et al., 1997b; BRYANT; BANKS; O'MALLEY, 2006; GAMBICHLER et al., 2008; BROYDE et al., 2009; DUARTE, 2013; FLOOD-KNAPIK et al., 2013). Neste estudo, observou-se mediana de expressão de Ki67 de 31%. Dummer et al. (1995) demonstraram que estágios mais avançados dos linfomas cutâneos humanos apresentavam expressão mais alta de Ki67, assim como Gambichler et al. (2008). Em cães Fournel-Fleury et

al. (1997) relataram mediana de expressão de 16% para o Ki67 nos linfomas cutâneos epiteliotrópicos. Em contrapartida, Duarte (2013) observou que 93% dos cães com linfoma cutâneo estudados apresentaram alto índice de proliferação celular, sendo que 86% desses animais tinham diagnóstico de linfoma não epiteliotrópico. Os linfomas cutâneos caninos, portanto, parecem apresentar índices de expressão de Ki67 semelhantes aos apresentados pelos linfomas cutâneos humanos em estágios mais avançados, mostrando intensa divisão celular. Apesar dos não epiteliotrópicos apresentarem maior expressão de ki67, não foi possível estabelecer uma correlação entre a proliferação celular e a sobrevida dos animais. Acreditamos que outros estudos com maior número de animais são necessários para definir essa relação.

Além da proliferação celular, a expressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas nos tumores de cães e humanos (LUQMANI, 2008; NIERO et al., 2014; WONG et al., 2014) pode influenciar a resposta ao tratamento. Entre as proteínas mais conhecidas, estão os transportadores ABC, responsáveis pela extrusão de drogas do meio intra para o extracelular e pela diminuição de sensibilidade das células aos agentes citotóxicos (SCHINKEL; JONKER, 2003; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; MEALEY, 2012; ZANDVLIET; TESKE; SCHRICKX, 2014).

Como relatado anteriormente, os linfomas cutâneos caninos não têm boa resposta à quimioterapia sistêmica. Neste estudo, 85% dos animais, dos quais foi possível acessar os prontuários, apresentaram resposta parcial aos protocolos quimioterápicos; os 15% restante dos animais ou não iniciaram ou não houve resposta ao tratamento. Entre os linfomas epiteliotrópicos, 85% tiveram resposta parcial à quimioterapia e 15% não tiveram resposta. Dos cinco animais que tiveram tratamento primário com lomustina, quatro tiveram resposta parcial e um não teve resposta ao quimioterápico. Este resultado diverge de alguns autores; Willians et al. (2006) relataram em seu estudo que 17% dos cães com linfoma cutâneo epiteliotrópico atingiram remissão completa e 65% tiveram remissão parcial no tratamento exclusivamente com a lomustina. Resultado parecido foi demonstrado por Risbon et al. (2006), em que 32% dos animais atingiram a remissão completa com o uso da lomustina. Contudo, Duarte (2013), em seu estudo sobre resposta à lomustina dos linfomas cutâneos caninos em 15 animais encontrou que apenas

53,5% dos animais responderam à quimioterapia, sendo que todos tiveram resposta parcial. Esses dados indicam que os linfomas cutâneos apresentam pouca resposta aos agentes quimioterápicos, mesmo à lomustina, considerada um fármaco importante por sua atuação em linfomas de imunofenótipo T e isso poderia estar relacionado a características biológicas ainda não determinadas nos linfomas cutâneos ou mesmo à resistência ao quimioterápico.

Neste estudo, a proteína de resistência Pgp/ABCB1 foi expressa em 90% dos linfomas cutâneos antes da sua exposição à quimioterapia antineoplásica, resultado que difere do relatado por Van Haselen et al. (1999) que encontrou apenas 22% dos linfomas cutâneos humanos expressando Pgp e está de acordo com o sugerido por Jillella et al. (2000), em que 72% dos linfomas epiteliotrópicos T humanos expressaram Pgp. A alta porcentagem de tumores expressando Pgp pode sugerir que a expressão deste marcador está relacionada com alterações genéticas ocorridas com a progressão da doença (JILLELLA et al., 2000) e aponta para a falha da resposta dos linfomas cutâneos ao protocolo CHOP, já que a vincristina, a doxorrubicina e os corticoides são substratos transportados por ABCB1 (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; BRENN et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; HIFUMI et al., 2010) para o meio extracelular, impedindo que estes atinjam a concentração intracelular mínima para induzir a morte celular.

Houve uma diferença significativa ($p = 0,0468$) na expressão de Pgp entre os linfomas epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos. Apesar deste estudo não ter encontrado diferenças no tempo de sobrevida dos animais que apresentaram estas duas formas do linfoma, a literatura aponta os linfomas não epiteliotrópicos com uma sobrevida menor do que os linfomas epiteliotrópicos (MOORE; OLIVRY, 1994; GROSS et al., 2005; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Assim, a alta expressão da Pgp poderia ser um fator relacionado ao pior prognóstico dos linfomas não epiteliotrópicos, devido à falha na resposta ao tratamento antineoplásico. Neste estudo não foi possível estabelecer relação entre a expressão deste marcador e a sobrevida dos animais, resultado que corrobora com o obtido por Dhaliwal et al. (2013), no qual apesar de 80% dos linfomas caninos apresentarem marcação para Pgp, não houve correlação com a sobrevida. Zandvliet et al. (2015) também não conseguiram correlacionar a expressão gênica de ABCB1 nos linfomas multicêntricos caninos com a resposta ao tratamento, mesmo resultado observado por Rodrigues (2010). Interessante ressaltar que esses são estudos clínicos que

trabalham com número pequeno de animais. No presente estudo, devido ao número de animais a que se teve acesso aos prontuários e aos dados de sobrevida, os resultados podem não representar a realidade e são necessários outros estudos para estabelecer se não existe de fato, relação entre este transportador e a sobrevida dos cães com linfoma cutâneo.

A LRP revelou-se um achado interessante, já que 100% das amostras expressaram o marcador, resultado distinto do retratado por Van Haselen et al. (1999), em seres humanos, em que apenas dois dos 32 casos de linfomas cutâneos estudados apresentaram expressão de LRP. Diferente da Pgp, a LRP é uma vault, partícula de ribonucleoproteína complexa localizada principalmente no citoplasma e membrana nuclear (IZQUIERDO et al., 1996a, 1996b; MOSSINK et al., 2003; VAN ZON et al., 2003; PÉREZ-TOMÁS, 2006). Maxwell e Mousavi-Fard (2013) indicaram que a regulação positiva da LRP está associada a linfomas não-Hodgkin de células B humanos mais agressivos e menor taxa de resposta à quimioterapia. Filipits et al. (2000) concluíram em seu trabalho que a alta expressão de LRP relaciona-se com uma baixa resposta ao tratamento e menor sobrevida em humanos com linfoma difuso de grandes células B. Mesmo resultado obtido por Ohsawa et al. (2005), que demonstraram menor taxa de resposta ao tratamento, menor sobrevida e pior prognóstico em humanos com alta expressão de LRP nos linfomas difusos de grandes células B. Tomiyasu et al (2010), entretanto, não encontraram diferenças na expressão gênica de LRP em cães com linfoma multicêntrico sensíveis e resistentes à quimioterapia. Do mesmo modo que Gündüz et al. (2012) não observaram relação entre a expressão gênica de LRP e a sobrevida de pacientes humanos com linfoma Hodgkin e não-Hodgkin. No presente trabalho, os linfomas cutâneos apresentaram mediana de 60% de células marcadas para LRP, o que poderia explicar a falha de resposta à quimioterapia sistêmica com vincristina e doxorrubicina, substrato que pode ser retirado do núcleo pela LRP (no caso da doxorrubicina) ou transportado pela LRP até um transportador ABC (no caso da vincristina) para ser eliminado da célula (MOSSINK et al., 2003), entretanto, apesar da alta expressão desta proteína de resistência, não foi observada correlação com a sobrevida dos animais.

A ABCC1 ou MRP parece ser um marcador de resistência importante em alguns linfomas humanos. Van Haselen et al. (1999) encontrou 13 dos 14 casos de micose fungoide humanos estudados expressando MRP. Szczuraszek et al. (2009) detectaram expressão de MRP em 81% dos casos de linfomas não-Hodgkin

humanos. Saglam, Hayran e Uner observaram expressão de MRP em 74% dos casos de linfomas de células T/NK em humanos. Ohsawa et al. (2005) relataram expressão de MRP em 63% dos casos de linfomas difusos de grandes células B em humanos e verificaram menor taxa de remissão completa nos pacientes que expressavam essa proteína. Greaves et al. (2012) também concluíram que a expressão de MRP nos linfomas Hodgkin em humanos indica um alto risco de falha no tratamento quimioterápico. Estes resultados diferem do observado neste estudo, em que apenas quatro dos 21 casos (19%) expressaram este transportador, o que está de acordo com os estudos de Rodrigues (2010) e Zandvliet et al. (2015), que demonstraram baixa expressão de RNAm de MRP nos linfomas multicêntricos de cães. Gündüz et al. (2012) encontraram expressão de MRP em 85% dos linfomas humanos não-Hodgkin e 50% dos linfomas Hodgkin, entretanto, não conseguiram relacionar com a sobrevida. É possível que para os linfomas cutâneos caninos, a explicação plausível seria a de Zandvliet et al., (2015) para os quais a MRP não teria um papel importante na resistência a drogas nos linfomas cutâneos assim como o verificado nos linfomas multicêntricos e, por isso, não houve seleção natural para que esse transportador tivesse expressão aumentada.

O transportador ABCG2-BCRP, ao contrário, está expresso nos linfomas multicêntricos em cães. Rodrigues (2010) e Zandvliet et al. (2015) observaram aumento na expressão gênica desta proteína, porém sem haver correlação com a sobrevida. Tomiyasu et al. (2010), entretanto, não encontraram diferenças na expressão gênica de ABCG2 em cães com linfoma pré e pós tratamento quimioterápico. Nos linfomas não-Hodgkins humanos, a BCRP estava expressa em 96% dos casos segundo estudo de Szczuraszek et al. (2009). Saglam, Hayran e Uner observaram expressão de BCRP em 78% dos linfomas de células T/NK em humanos. Neste trabalho, porém, apenas cinco dos 21 (23%) linfomas cutâneos em cães expressaram este transportador, podendo indicar também que, nos linfomas cutâneos caninos, essa proteína não foi selecionada para aumentar sua expressão, da mesma maneira que ocorre com a MRP (ZANDVLIET et al., 2015).

De modo geral, as proteínas de resistência a múltiplas drogas estão expressas nos linfomas cutâneos, contudo, suas expressões são variáveis e não parecem estar relacionadas ao mau prognóstico deste tipo de neoplasia, entretanto é preciso considerar o pequeno número de casos neste trabalho em que se teve acesso ao tempo de sobrevida do animal, o que impossibilitou estabelecer se a

coexpressão destes transportadores teria influência no prognóstico. (LUQMANI, 2008; NIERO et al., 2014; WONG et al., 2014).

De qualquer forma, o fenótipo de resistência a múltiplas drogas nas neoplasias não se dá apenas pela expressão de transportadores ABC ou de vaults como a LRP. Outros mecanismos podem ser utilizados como o metabolismo enzimático do fármaco, a alteração do local alvo para prevenir a ligação ao fármaco, alteração da via metabólica e o aumento do reparo dos danos causados pelo fármaco (LUQMANI, 2008; NIERO et al., 2014; WONG et al., 2014; KAMBAYASHI et al., 2015; TOMASZOWSKI; SCHIRRMACHER; KAINA, 2015).

Exemplificando, a lomustina é um agente alquilante e o quimioterápico antineoplásico de escolha para o tratamento dos linfomas cutâneos em cães (RISBON et al., 2006; WILLIAMS et al., 2006; LAPRAIS; OLIVRY, 2017), entretanto, os alquilantes não são substrato para o mecanismo de resistência mediado por Pgp, que impediria a atuação do quimioterápico nas células neoplásicas, dessa forma, no caso da lomustina, a resposta ao tratamento seria independente dos transportadores ABC e ainda assim, a resposta ao tratamento não é completa e, caso o seja, a recidiva é muito rápida. Como este fármaco age alquilando o DNA, a resistência à lomustina parece estar relacionada à expressão de moléculas de reparação do material genético como a O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (KAMBAYASHI et al., 2015; TOMASZOWSKI; SCHIRRMACHER; KAINA, 2015). Desse modo, parece que, além da biologia da neoplasia, outros mecanismos de resistência à múltiplas drogas podem ter um papel relevante nos linfomas cutâneos, além da extrusão de agentes citotóxicos que ocorre por intermédio dos transportadores ABC e da LRP.

6 CONCLUSÕES

Nas condições e com a metodologia aplicada neste estudo, foi possível concluir que:

Linfomas cutâneos não epiteliotrópicos foram mais frequentes que os epiteliotrópicos e o imunfenótipo predominante foi o T.

A ocorrência de linfócitos CD3-CD20+ e CD3+CD20+ indica a necessidade de mais estudos e um painel mais amplo de anticorpos para subtipagem desses linfomas.

Não houve diferença estatística significativa na expressão de Ki67 entre os linfomas epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos.

LRP foi a proteína de resistência expressa em 100% das amostras estudadas, sem diferença de expressão entre os linfomas epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos.

ABCB1 foi expressa em 90% dos linfomas cutâneos, sendo a expressão significativamente maior na forma não epiteliotrópica.

ABCC1 foi expressa em 19% e ABCG2 em 23% dos linfomas cutâneos estudados, respectivamente, sem diferenças entre epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos.

Não houve correlação entre a expressão de ABCB1, ABCC1, ABCG2 e LRP e a sobrevida dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABELE, M. C.; VALENTE, G.; KERIM, S.; NAVONE, R.; ONESTI, P.; CHIUSA, L.; RESEGOTTI, L.; PALESTRO, G. Significance of cell proliferation index in assessing histological prognostic categories in hodgkin ' s disease: An immunohistochemical study with Ki67 and MIB-1 monoclonal antibodies. **Haematologica**, v. 82, p. 281–285, 1997.
- ARAÚJO, M. R.; PREIS, I. S.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D.; ECCO, R. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 772–780, 2012.
- BALMER, N. N.; HUGHEY, L.; BUSAM, K. J.; REDDY, V.; ANDEA, A. Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma with aberrant coexpression of CD20: case report and review of the literature. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 31, n. 2, p. 187–92, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318808>>.
- BHATIA, P.; MASIH, S.; VARMA, N.; BANSAL, D.; TREHAN, A. High expression of lung resistance protein mrna at diagnosis predicts poor early response to induction chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 15, p. 6663–6668, 2015.
- BRADFORD, P. T.; DEVESA, S. S.; ANDERSON, W. F. Cutaneous lymphoma incidence patters in the United States: a population based study of 3884 cases. **Blood**, v. 113, n. 21, p. 5064–5074, 2009.
- BRENN, S. H.; COUTO, S. S.; CRAFT, D. M.; LEUNG, C.; BERGMAN, P. J. Evaluation of P-glycoprotein expression in feline lymphoma and correlation with clinical outcome. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 3, p. 201–211, 2008.
- BROYDE, A.; BOYCOV, O.; STRENOV, Y.; OKON, E.; SHPILBERG, O.; BAIREY, O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 6, p. 338–343, 2009.
- BRYANT, R. J.; BANKS, P. M.; O'MALLEY, D. P. Ki67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders. **Histopathology**, v. 48, n. 5, p. 505–515, 2006.
- BURG, G.; KEMPF, W.; COZZIO, A.; FEIT, J.; WILLEMZE, R.; JAFFE, E. S.; DUMMER, R.; BERTI, E.; CERRONI, L.; CHIMENTI, S.; DIAZ-PEREZ, J. L.; GRANGE, F.; HARRIS, N. L.; KAZAKOV, D. V.; KERL, H.; KURRER, M.; KNOBLER, R.; MEIJER, C. J. L. M.; PIMPINELLI, N.; RALFKIAER, E.; RUSSELL-JONES, R.; SANDER, C.; SANTUCCI, M.; STERRY, W.; SWERDLOW, S. H.; VERMEER, M. H.; WECHSLER, J.; WHITTAKER, S. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: Histological and molecular aspects. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 32, n. 10, p. 647–674, 2005.

CAMPA, D.; BUTTERBACH, K.; SLAGER, S. L.; SKIBOLA, C. F.; DE SANJOSÉ, S.; BENAVENTE, Y.; BECKER, N.; FORETOVA, L.; MAYNADIE, M.; COCCO, P.; STAINES, A.; KAKS, R.; BOFFETTA, P.; BRENNAN, P.; CONDE, L.; BRACCI, P. M.; CAPORASO, N. E.; STROM, S. S.; CAMP, N. J.; CERHAN, J. R.; CONSORTIUM, G.; CANZIAN, F.; NIETERS, A. A comprehensive study of polymorphisms in the ABCB1, ABCC2, ABCG2, NR1I2 genes and lymphoma risk. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 4, p. 803–812, 2012.

CHAUNCEY, T. R. Drug resistance mechanisms in acute leukemia. 2001.
CHUN, R. Lymphoma: Which chemotherapy protocol and why? **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 157–162, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2009.03.003>>.

CHUN, R.; GARRET, L. D.; VAIL, D. M. Cancer Chemoterapy. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (Ed.). **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Fourth ed. St Louis, Missouri: Elsevier Inc, 2007. p. 163–192.

COUTO, C. G. Linfoma no cão e gato. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. (Ed.). **Medicina Interna de Pequenos Animais**. quarta edição, Elsevier, 2010. p. 1176–1188.

DAY, M. J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, n. 1, p. 79–96, 1995.

DE LORIMIER, L. P. Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 213–228, 2006.

DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). **Seminars in Cancer Biology**, v. 8, n. 3, p. 193–204, 1997.

DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; EHRHART, E.; VALLI, V. E.; DERVISIS, N. G. Clinicopathologic significance of histologic grade, ppg, and p53 expression in canine lymphoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 49, n. 3, p. 175–184, 2013. Disponível em: <<http://jaaha.org/doi/abs/10.5326/JAAHA-MS-5843>>.

DIAS, F. R.; ANAI, L. A.; JARK, P.; VARGAS HERNANDEZ, G.; SIERRA MATIZ, O. R.; CALAZANS, S. G. Estudo retrospectivo de 33 casos de linfoma cutâneo canino. **Revista Investigação**, v. 14, n. 3, p. 8, 2015.

DUARTE, A. R. **Resposta Do Linfoma Cutâneo Canino À Lomustina – Achados Clínicos , Imunohistoquímicos E Expressão Do Mdr-1**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

DUMMER, R.; MICHIE, S. A.; KELL, D.; GOULD, J. W.; HAEFFNER, A. C.;

SMOLLER, B. R.; WARNKE, R. A.; WOOD, G. S. Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 22, n. 1, p. 11–17, 1995.

EDINGER, J. T.; CLARK, B. Z.; PUCEVICH, B. E.; GESKIN, L. J.; SWERDLOW, S. H. CD30 expression and proliferative fraction in nontransformed mycosis fungoides. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 33, n. 12, p. 1860–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898220>>.

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

FERNANDEZ, N. J.; WEST, K. H.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 437–445, 2005. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.42-4-437>>.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10999723>>.

FLOOD-KNAPIK, K. E.; DURHAM, A. C.; GREGOR, T. P.; SANCHEZ, M. D.; DURNEY, M. E.; SORENMO, K. U. Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 4, p. 272–286, 2013.

FONTAINE, J.; BOVENS, C.; BETTENAY, S.; MUELLER, R. S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1–14, mar. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5829.2008.00176.x>>.

FONTAINE, J.; HEIMANN, M.; DAY, M. J. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: A review of 30 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 3, p. 267–275, 2010.

FOSTER, A. P.; EVANS, E.; KERLIN, R. L.; VAIL, D. M. Cutaneous T-cell lymphoma with Sézary syndrome in a dog. **Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 26, n. 4, p. 188–192, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12658584>>.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: Comparison with human non-hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 1, p. 35–59, 1997a.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; CHABANNE, L.; GHERNATI, I.; MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-

67 antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 1, p. 61–72, 1997b.

GAMBICHLER, T.; BISCHOFF, S.; BECHARA, F. G.; ALTMAYER, P.; KREUTER, A. Expression of proliferation markers and cell cycle regulators in T cell lymphoproliferative skin disorders. **Journal of Dermatological Science**, v. 49, n. 2, p. 125–132, 2008.

GHERNATI, I.; AUGER, C.; CHABANNE, L.; CORBIN, A.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.; FOURNEL, C.; RIVOIRE, A.; MONIER, J.; RIGAL, D. Characterization of a canine long-term T cell line (DLC 01) established from a dog with Sézary syndrome and producing retroviral particles. **Leukemia**, v. 13, n. September 1998, p. 1281–1290, 1999. Disponível em: <<http://www.stockton-press.co.uk/leu>>.

GINN, P. E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 5, p. 533–541, 1996.

GREAVES, W.; XIAO, L.; SANCHEZ-ESPIRIDION, B.; KUNKALLA, K.; DAVE, K. S.; LIANG, C. S.; SINGH, R. R.; YOUNES, A.; MEDEIROS, L. J.; VEGA, F. Detection of ABCC1 expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with increased risk of treatment failure using standard chemotherapy protocols. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 5, n. 1, p. 47, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3470996&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Lymphocytic Tumors. In: GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. (Ed.). **Skin diseases of dog and cat: Clinical and histopathologic diagnosis**. second ed. Oxford: Blackwell Science, 2005. p. 866–894.

HERNANDEZ, G. V. **Linfomas cutâneos em cães: estudo epidemiológico, morfológico, imunofenotípico e seroproteico**. 2017. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2017.

HIFUMI, T.; MIYOSHI, N.; KAWAGUCHI, H.; NOMURA, K.; YASUDA, N. Immunohistochemical detection of proteins associated with multidrug resistance to anti-cancer drugs in canine and feline primary pulmonary carcinoma. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 5, p. 665–668, 2010.

HUANG, W.; MAO, Y.; ZHAN, Y.; HUANG, J.; WANG, X.; LUO, P.; LI, L.; MO, D.; LIU, Q.; XU, H.; HUANG, C. Prognostic implications of survivin and lung resistance protein in advanced non-small cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. **Oncology Letters**, v. 11, n. 1, p. 723–730, 2016.

ITO, D.; FRANTZ, A. M.; MODIANO, J. F. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: Recent progress and applications. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 159, n. 3–4, p. 192–201, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.016>>.

IZQUIERDO, M. A.; SCHEFFER, G. L.; FLENS, M. J.; GIACCONE, G.; BROXTERMAN, H. J.; MEIJER, C. J.; VAN DER VALK, P.; SCHEPER, R. J. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. **The American Journal of Pathology**, v. 148, n. 3, p. 877–887, 1996a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774142>>.

IZQUIERDO, M. A.; SCHEFFER, G. L.; FLENS, M. J.; SHOEMAKER, R. H.; ROME, L. H.; SCHEPER, R. J. Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. **Cytotechnology**, v. 19, n. 3, p. 191–197, 1996b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8862006>>.

JIANG, Q.; LIU, S.; YANG, Y.; TAN, X.; PENG, J.; XIONG, Z.; LI, Z. CD20-positive NK/T-cell lymphoma with indolent clinical course: report of case and review of literature. **Diagnostic Pathology**, v. 7, p. 133, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3502398&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

JILLELLA, A. P.; MURREN, J. R.; HAMID, K. K.; LONGLEY, B. J.; EDELSON, R. L.; COOPER, D. L. P-glycoprotein expression and multidrug resistance in cutaneous T-cell lymphoma. **Cancer Investigation**, v. 18, n. 7, p. 609–613, 2000.

JOHNSON, J. A.; PATTERSON, J. M. Canine epidermotropic lymphoproliferative disease resembling pagetoid reticulosis in man. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 4, p. 487–493, 1981.

JOHNSON, Z. L.; CHEN, J. Structural basis of substrate recognition by the multidrug resistance protein MRP1. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1075–1085.e9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.041>>.

KAMBAYASHI, S.; MINAMI, K.; OGAWA, Y.; HAMAJI, T.; HWANG, C. C.; IGASE, M.; HIRAOKA, H.; MIYAMA, T. S.; NOGUCHI, S.; BABA, K.; MIZUNO, T.; OKUDA, M. Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase causes lomustine resistance in canine lymphoma cells. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 3, p. 201–209, 2015.

KO, C. J. The new World Health Organization-European Organization for Research and Treatment of Cancer classification of cutaneous lymphomas. **Advances in Dermatology**, v. 22, n. 2006, p. 259–277, 2006.

KOHNKEN, R.; FABBRO, S.; HASTINGS, J.; PORCU, P.; MISHRA, A. Sézary Syndrome: Clinical and biological aspects. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 11, n. 6, p. 468–479, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11899-016-0351-0>>.

KRISHNA, R.; MAYER, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 265–283, 2000.

KUNJACHAN, S.; RYCHLIK, B.; STORM, G.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1852–1865, 2013.

LANSIGAN, F.; CHOI, J.; FOSS, F. M. Cutaneous T-cell Lymphoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 22, n. 5, p. 979–996, 2008.

LAPRAIS, A.; OLIVRY, T. Is CCNU (lomustine) valuable for treatment of cutaneous epitheliotropic lymphoma in dogs? A critically appraised topic. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 61, 2017. Disponível em: <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-017-0978-7>>.

LAUTIER, D.; CANITROT, Y.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, n. 7, p. 967–977, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8831715>>.

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

LEE, J. Y.; TANABE, S.; SHIMOHIRA, H.; KOBAYASHI, Y.; OOMACHI, T.; AZUMA, S.; OGIHARA, K.; INOKUMA, H. Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. **Research in Veterinary Science**, v. 83, n. 2, p. 210–216, 2007.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 216–237, 2005.

LEVI, M.; BRUNETTI, B.; SARLI, G.; BENAZZI, C. Immunohistochemical expression of p-glycoprotein and breast cancer resistance protein in canine mammary hyperplasia, neoplasia and supporting stroma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 4, p. 277–285, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.07.008>>.

LUQMANNI, Y. A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v. 14, n. 1, p. 35–48, 2008. Disponível em: <<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000086183>>.

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, n. 14, p. 1335–42, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516967>>.

MARTIN, B.; STEFANATO, C.; WHITTAKER, S.; ROBSON, A. Primary cutaneous cd20-positive t-cell lymphoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, n. 8, p. 663–669, 2011.

MARTINEZ, M.; MODRIC, S.; SHARKEY, M.; TROUTMAN, L.; WALKER, L.; MEALEY, K. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 4, p. 285–300, 2008.

MAXWELL, S. A.; MOUSAVI-FARD, S. Non-Hodgkin's B-cell lymphoma: Advances in molecular strategies targeting drug resistance. **Experimental Biology and Medicine**, v. 238, n. 9, p. 971–990, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370213498985>>.

MEALEY, K. L. ABCG2 transporter: Therapeutic and physiologic implications in veterinary species. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 2, p. 105–112, 2012.

MEALEY, K. L.; BENTJEN, S. a; GAY, J. M.; HOSICK, H. L. Dexamethasone treatment of a canine, but not human, tumour cell line increases chemoresistance independent of P-glycoprotein and multidrug resistance-related protein expression. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 2, p. 67–75, 2003.

MEALEY, K. L.; FIDEL, J.; GAY, J. M.; IMPELLIZERI, J. A.; CLIFFORD, C. A.; BERGMAN, P. J. ABCB1-1 polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 996–1000, 2008.

MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: MILLER, W. H.; GRIFFIN, CRAIG, E.; CAMPBELL, K. L. (Ed.). **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**. seventh ed. St Louis, Missouri: Elsevier Inc., 2013. p. 774–843.

MIYOSHI, N.; TOJO, E.; OISHI, A.; FUJIKI, M.; MISUMI, K.; SAKAMOTO, H.; KAMEYAMA, K.; SHIMIZU, T.; YASUDA, N. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 6, p. 531–3, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130841>>.

MOORE, A. S.; LONDON, C. A.; WOOD, C. A.; WILLIAMS, L. E.; COTTER, S. M.; L'HEUREUX, D. A.; FRIMBERGER, A. E. Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 395–8, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499719>>.

MOORE, P. F.; AFFOLTER, V. K.; GRAHAM, P. S.; HIRT, B. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: An investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 569–576, 2009.

MOORE, P. F.; AFFOLTER, V. K.; KELLER, S. M. Canine inflamed nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: A diagnostic conundrum. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T. Cutaneous lymphomas in companion animals. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 499–505, 1994.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T.; NAYDANT, D. Canine cutaneous cpitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. **American Journal of Pathology**, v. 144, n. 2, p. 421–429, 1994.

MORGES, M. A.; BURTON, J. H.; SABA, C. F.; VAIL, D. M.; BURGESS, K. E.; THAMM, D. H. Phase II Evaluation of VDC-1101 in Canine Cutaneous T-Cell Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 5, p. 1569–1574, 2014.

MORICZ, C. Z. M. De; SANCHES JÚNIOR, J. A. Processos linfoproliferativos da pele: Parte 1 - Linfomas cutâneos de células B. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 5, p. 461–471, 2005.

MOSSINK, M. H.; VAN ZON, A.; SCHEPER, R. J.; SONNEVELD, P.; WIEMER, E. A. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7458–7467, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1206947>>.

NIERO, E.; ROCHA-SALES, B.; LAUAND, C.; CORTEZ, B.; DE SOUZA, M.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; URABAYASHI, M.; MARTENS, A.; NEVES, J.; MACHADO-SANTELLI, G. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 1, p. 37, 2014. Disponível em: <<http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-33-37>>.

NOGUCHI, K.; KATAYAMA, K.; SUGIMOTO, Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: Basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 7, n. 1, p. 53–64, 2014.

NOWAK, M.; MADEJ, J. A.; DZIEGIEL, P. Expression of breast cancer resistance protein (BCRP-1) in canine mammary adenocarcinomas and adenomas. **In Vivo**, v. 23, p. 705–710, 2009.

OHSAWA, M.; IKURA, Y.; FUKUSHIMA, H.; SHIRAI, N.; SUGAMA, Y.; SUEKANE, T.; HIRAYAMA, M.; HINO, M.; UEDA, M. Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma. **Oncology**, v. 68, n. 4–6, p. 422–431, 2005.

OLSEN, E. A. Evaluation, Diagnosis, and Staging of Cutaneous Lymphoma. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 643–654, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.06.001>>.

PAWŁOWSKI, K. M.; MUCHA, J.; MAJCHRZAK, K.; MOTYL, T.; KRÓL, M. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of

canine mammary cancer cells. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 119, 2013. Disponível em: <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-9-119>>.

PÉREZ-TOMÁS, R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1859–76, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842198>>.

QIANG, F.; GUANGGUO, R.; YONGTAO, H.; DANDAN, D.; HONG, Y. Multidrug resistance in primary tumors and metastases in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Pathology Oncology Research**, v. 19, n. 4, p. 641–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508648>>.

QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; PREFFER, F.; RUBIN, D.; FERRY, J. A.; HARRIS, N. L. CD20+ T-cell lymphoma: Neoplastic transformation of a normal T-cell subset. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 102, n. 4, p. 483–489, 1994.

RAHEMTULLAH, A.; LONGTINE, J. a.; HARRIS, N. L.; DORN, M.; ZEMBOWICZ, A.; QUINTANILLA-FEND, L.; PREFFER, F. I.; FERRY, J. a. CD20+ T-cell lymphoma: clinicopathologic analysis of 9 cases and a review of the literature. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 32, n. 11, p. 1593–1607, 2008.

REZENDE, B. C. G. **Estudo da resistência a múltiplas drogas no linfoma cutâneo**. 2005. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RISBON, R. E.; DE LORIMIER, L. P.; SKORUPSKI, K.; BURGESS, K. E.; BERGMAN, P. J.; CARRERAS, J.; HAHN, K.; LEBLANC, A.; TUREK, M.; IMPELLIZERI, J.; FRED, R.; WOJCIESZYN, J. W.; DROBATZ, K.; CLIFFORD, C. a. Response of canine cutaneous epitheliotropic lymphoma to lomustine (CCNU): a retrospective study of 46 cases (1999-2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1389–97, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186855>>.

RODRIGUES, L. C. de 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**. 2010. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RÜTGEN, B. C.; FLICKINGER, I.; WOLFESBERGER, B.; LITSCHAUER, B.; FUCHS-BAUMGARTINGER, A.; HAMMER, S. E.; SAALMÜLLER, A.; SCHWENDENWEIN, I. Cutaneous T-cell lymphoma - Sézary syndrome in a Boxer. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 172–178, 2016.

SAGLAM, A.; HAYRAN, M.; UNER, A. H. Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins in mature T/NK-cell lymphomas. **APMIS**, v. 116, n. 9, p. 791–800, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19024599>>.

SANCHES JÚNIOR, J. A.; MORICZ, C. Z. M. De; FESTA NETO, C. Processos linfoproliferativos da pele: part 2 - cutaneous T-cell and NK-cell lymphomas. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 81, n. 1, p. 7–25, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962006000100002>.

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

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 138–153, 2003.

SHADDUCK, J. a.; REEDY, L.; LAWTON, G.; FREEMAN, R. A Canine cutaneous lymphoproliferative disease resembling mycosis fungoides in man. **Veterinary Pathology**, v. 15, n. 6, p. 716–724, 1978. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/030098587801500603>>.

SOKOŁOWSKA-WOJDYŁO, M.; OLEK-HRAB, K.; RUCKEMANN-DZIURDZIŃSKA, K. Primary cutaneous lymphomas: Diagnosis and treatment. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 32, n. 5, p. 368–383, 2015.

SOKOŁOWSKA, J.; MICUN, J.; MALICKA, E.; LECHOWSKI, R. Proliferation activity in canine lymphomas. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 4, n. 4, p. 727–734, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23390763>>.

SOKOŁOWSKA, J.; URBAŃSKA, K.; GIZIŃSKI, S.; ZABIELSKA, K.; LECHOWSKI, R. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in various subtypes of canine lymphomas. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 1, p. 123–130, 2015.
SONNEVELD, P. Multidrug resistance in haematological malignancies. **Journal of Internal Medicine**, v. 247, n. 5, p. 521–534, 2000.

SZCZURASZEK, K.; MATERNA, V.; HALON, A.; MAZUR, G.; WRÓBEL, T.; KULICZKOWSKI, K.; MACIEJCZIK, A.; ZABEL, M.; DRAG, M.; DIETEL, M.; LAGE, H.; SUROWIAK, P. Positive correlation between cyclooxygenase-2 and ABC-transporter expression in non-Hodgkin's lymphomas. **Oncology Reports**, v. 22, p. 1315–1322, 2009.

TAKAMI, A.; SAITO, M.; NAKAO, S.; ASAKURA, H.; NOZUE, T.; ONOE, Y.; YACHIE, A.; SHIOBARA, S.; MATSUDA, T. CD20-positive T-cell chronic lymphocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 102, p. 1327–1329, 1998.

TANDIA, M.; MHIRI, A.; PAULE, B.; SAFFROY, R.; CAILLIEZ, V.; NO, G.; FARINOTTI, R.; BONHOMME-FAIVRE, L. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-

glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 4, p. 759–766, 2017.

THALHEIM, L.; WILLIAMS, L. E.; BORST, L. B.; FOGLE, J. E.; SUTER, S. E. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1509–1516, 2013.

THRALL, M. A.; MACY, D. W.; SNYDER, S. P.; HALL, R. L. Cutaneous lymphosarcoma and leukemia in a dog resembling sezary syndrome in man. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 182–186, 1984.

TOMASZOWSKI, K. H.; SCHIRRMACHER, R.; KAINA, B. Multidrug efflux pumps attenuate the effect of MGMT inhibitors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 3924–3934, 2015.

TOMIYASU, H.; GOTO-KOSHINO, Y.; TAKAHASHI, M.; FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Quantitative analysis of mrna for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 9, p. 1165–1172, 2010. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/09-0575?from=CrossRef>>.

TSUJI, K.; WANG, Y.-H.; TAKANASHI, M.; ODAJIMA, T.; LEE, G. A.; SUGIMORI, H.; MOTOJI, T. Overexpression of lung resistance-related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia. **Hematology Reports**, v. 4, n. 3, p. 9–12, 2012. Disponível em: <<http://www.pagepress.org/journals/index.php/hr/article/view/4117>>.

UENO, H.; ISOMURA, H.; TANABE, S.; TABUCHI, H.; YAMADA, K.; SATO, M. Solitary nonepitheliotropic T-cell lymphoma in a dog. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 4, p. 437–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133275>>.

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: WITHROW, S.; VAIL, D. M. (Ed.). **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. fourth ed. [s.l.] Elsevier Inc, 2007. p. 699–733.

VAN HASELEN, C. W.; FLENS, M. J.; SCHEPER, R. J.; VAN DER VALK, P.; SCHEFFER, G. L.; TOONSTRA, J.; VAN VLOTEN, W. A. Multidrug resistance related proteins in primary cutaneous lymphomas. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 457, p. 119–131, 1999.

VAN ZON, A.; MOSSINK, M. H.; SCHEPER, R. J.; SONNEVELD, P.; WIEMER, E. A. C. The vault complex. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 9, p. 1828–1837, 2003.

VESEL, M.; RAPP, J.; FELLER, D.; KISS, E.; JAROMI, L.; MEGGYES, M.; MISKEI, G.; DUGA, B.; SMUK, G.; LASZLO, T.; KARNER, I.; PONGRACZ, J. E. ABCB1 and

ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling. **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, p. 52, 2017. Disponível em: <<http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-017-0537-6>>.

WANG, H.; LUO, F.; ZHU, Z.; XU, Z.; HUANG, X.; MA, R.; HE, H.; ZHU, Y.; SHAO, K.; ZHAO, J. ABCG2 is a potential prognostic marker of overall survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 222, 2017. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3224-6>>.

WEISS, R. B.; ISSEL, B. F. The nitrosoureas : carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). **Cancer Treatment Reviews**, v. 4, n. 9, p. 313–330, 1982.

WILLEMZE, R.; JAFFE, E. S.; CERRONI, L.; BERTI, E.; SWERDLOW, S. H.; RALFKIAER, E.; CHIMENTI, S.; DUNCAN, L. M.; GRANGE, F.; HARRIS, N. L.; KEMPF, W.; KERL, H.; KURRER, M.; KNOBLER, R.; PIMPINELLI, N.; SANDER, C.; SANTUCCI, M.; STERRY, W.; VERMEER, M. H.; WECHSLER, J.; WHITTAKER, S.; MEIJER, C. J. L. M. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. **Hematology**, v. 105, n. 10, p. 3768–3785, 2005.

WILLIAMS, L. E.; RASSNICK, K. M.; POWER, H. T.; LANA, S. E.; MORRISON-COLLISTER, K. E.; HANSEN, K.; JOHNSON, J. L. CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 136–143, 2006. Disponível em: <papers2://publication/uuid/93CC39BF-E30D-4F76-8ED1-B9653421D4BC>.

WONG, K.; MA, J.; ROTHNIE, A.; BIGGIN, P. C.; KERR, I. D. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 8–16, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.11.002>>.

YASUNO, K.; SATO, M.; KARIYA, K.; OGIHARA, K.; SHIROTA, K. A case of canine vasotropic and vasoinvasive nonepitheliotropic lymphoma with unusual tumor cells and extensive dermal necrosis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 1, p. 109–12, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194086>>.

ZANDVLIET, M. Canine lymphoma: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 2, p. 76–104, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01652176.2016.1152633>>.

ZANDVLIET, M.; TESKE, E.; SCHRICKX, J. A. Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 8, p. 1498–1506, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.004>>.

ZANDVLIET, M.; TESKE, E.; SCHRICKX, J. A.; MOL, J. A. A longitudinal study of ABC transporter expression in canine multicentric lymphoma. **Veterinary Journal**, v. 205, n. 2, p. 263–271, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.11.002>>.

Apêndice 1 - Número e tipo de lesões encontradas nos cães com linfoma cutâneo.

Animal	Tipo Histológico	Imunofenótipo	Número de lesões	Tipo de lesões
1	epiteliotrópico	T		
2	epiteliotrópico	B	generalizada	nódulos ulcerados
3	epiteliotrópico	T/B	generalizada	nódulos ulcerados
4	epiteliotrópico	T	generalizada	pápulas eritematosas
5	epiteliotrópico	T	generalizada	pápulas, crostas, tumores/nódulos ulcerados
6	epiteliotrópico	T	generalizada	nódulos ulcerados
7	epiteliotrópico	T	generalizada	nódulos ulcerados
8	epiteliotrópico	T	generalizada	hematomas, alopecia circular, eritema, despigmentação
9	não epiteliotrópico	T		
10	não epiteliotrópico	T/B		
11	não epiteliotrópico	T		
12	não epiteliotrópico	T		
13	não epiteliotrópico	T	um	nódulo ulcerado
14	não epiteliotrópico	T	generalizada	pápulas, crostas, tumores/nódulos ulcerados
15	não epiteliotrópico	T	generalizada	nódulos ulcerados
16	não epiteliotrópico	T	generalizada	nódulos eritematosos
17	não epiteliotrópico	T		
18	não epiteliotrópico	B	generalizada	nódulos
19	não epiteliotrópico	T	generalizada	nódulos ulcerados
20	linfoma	T	generalizada	nódulos ulcerados
21	neoplasia de células redondas	B	generalizada	nódulos ulcerados

Fonte: (ALVES, 2017)

Apêndice 2 - Dados laboratoriais (eritograma, leucograma e contagem de plaquetas) dos animais com linfoma cutâneo.

Animal	Tipo Histológico	Imunofenótipo	Hemoglobina (g%)	Hemácia (milhões/mm3)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Reticulócitos	Leucócitos (/mm3)	Neutrófilos (/mm3)	Linfócitos (/mm3)	Plaquetas (/mm3)
1	epiteliotrópico	T											
2	epiteliotrópico	B	14	6,1	40	65,57	22,95	35	0	23400	19656	1404	462000
3	epiteliotrópico	T/B	9,7	4,1	29	71	24	33	37700	8100	5346	2268	575000
4	epiteliotrópico	T	8,4	3,8	26	68,42	22,11	32,31	91200	13800	12696	552	504000
5	epiteliotrópico	T	15,3	6,4	45	71	24	34	0	7600			441000
6	epiteliotrópico	T	13,6	6,22	41	65,92	21,86	33,17	0	10300	9476	412	357000
7	epiteliotrópico	T	13,7	6,1	43	70,49		31,86	0	21500	18275	2580	386000
8	epiteliotrópico	T	15,8	6,97	44					8900	7565	979	191000
9	não epiteliotrópico	T											
10	não epiteliotrópico	T/B											
11	não epiteliotrópico	T											
12	não epiteliotrópico	T											
13	não epiteliotrópico	T											
14	não epiteliotrópico	T	14,4	6,2	42	67	23	34	0	10800	7748	216	235000
15	não epiteliotrópico	T	15,9	6,9	48	70	23	33	0	18600	9486	7068	
16	não epiteliotrópico	T	15,3	7	47	67	22	32	0	5600	4480	560	365000
17	não epiteliotrópico	T											
18	não epiteliotrópico	B	11,7	5,2	37	72	23	32		15390	11300	3020	493000
19	não epiteliotrópico	T	8,7	3,9	29	76	22	29	275400	18400	14904	2024	502000
20	linfoma	T	13,1	6,2	40	65	21	33	0	7000	5110	840	64000
21	neoplasia de células redondas	B	11	4,3	33	76	25	33	0	35000	26950	4550	300000

Fonte: (ALVES, 2017)

Apêndice 3 - Dados bioquímicos (proteína, albumina, perfil hepático e função renal) dos animais com linfoma cutâneo.

Animal	Tipo Histológico	Imunofenótipo	Proteínas (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
1	epiteliotrópico	T						
2	epiteliotrópico	B	7,1	3,5	73	194,9	56,5	0,46
3	epiteliotrópico	T/B						
4	epiteliotrópico	T	7	2,2	33,2	268,7	83,2	1,2
5	epiteliotrópico	T	6,5	2,9	45,7	354	30,4	0,63
6	epiteliotrópico	T	7		167	439	27	1
7	epiteliotrópico	T	7		52	170	15,3	1,03
8	epiteliotrópico	T	7,6	2,85	52	44	28	1
9	não epiteliotrópico	T						
10	não epiteliotrópico	T/B						
11	não epiteliotrópico	T						
12	não epiteliotrópico	T						
13	não epiteliotrópico	T						
14	não epiteliotrópico	T	5,55	2,98	15	69,3	42,7	1,11
15	não epiteliotrópico	T	6,8	2,2	18,5	36,1	41,9	1,3
16	não epiteliotrópico	T	5,9	3	66,1	54,5	30,9	0,91
17	não epiteliotrópico	T						
18	não epiteliotrópico	B	7,15	3,68	19,3	46,7	122,9	0,96
19	não epiteliotrópico	T	6,52	2,64	17	32	52,8	1
20	linfoma	T	7,9	2,3	10,7	18,9	42,7	0,76
21	neoplasia de células redondas	B	8,2	2,9	15	44	29	0,5

Fonte: (ALVES, 2017)