

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA VIA JAK2/STAT3 E DE SEUS INIBIDORES EM
LINFOMAS MULTICÊNTRICOS DIFUSOS DE GRANDES
CÉLULAS B CANINOS**

Paulo César Jark

Médico Veterinário

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA VIA JAK2/STAT3 E DE SEUS INIBIDORES EM
LINFOMAS MULTICÊNTRICOS DIFUSOS DE GRANDES
CÉLULAS B CANINOS**

Paulo César Jark

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

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

2016

J37e Jark, Paulo César
Estudo da via JAK2/STAT3 e de seus inibidores em linfomas multicêntricos difusos de grandes células B caninos / Paulo César Jark. -- Jaboticabal, 2016
xx, 43 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientadora: Mirela Tinucci Costa

Banca examinadora: Andrigo Barboza de Nardi, Letícia Abrahão Anai, Felipe Augusto Ruiz Sueiro, Lucas Campos de Sá Rodrigues

Bibliografia

1. Oncologia. 2. Neoplasias hematopoiéticas. 3. Cães. 4. Terapia alvo. 5. Inibidores de JAK. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



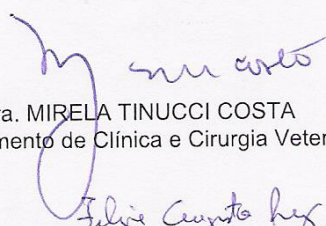
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: ESTUDO DA VIA JAK2/STAT3 E DE SEUS INIBIDORES EM LINFOMAS MULTICÊNTRICOS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B CANINOS

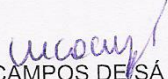
AUTOR: PAULO CÉSAR JARK

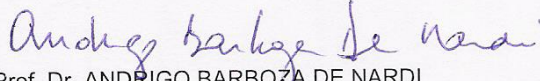
ORIENTADORA: MIRELA TINUCCI COSTA

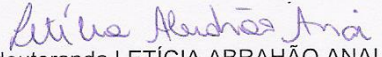
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO
VETPAT - Patologia e Biologia Molecular Veterinária / Campinas, SP


Pesquisador Dr. LUCAS CAMPOS DE SÁ RODRIGUES
Estima Hospital Veterinário - Taubate, SP


Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pós-doutoranda LETÍCIA ABRAHÃO ANAI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de novembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULO CÉSAR JARK - nascido no dia 22 de março de 1986, natural de Corupá, estado de Santa Catarina. Iniciou sua graduação, no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC, tendo concluído a graduação nesta instituição em dezembro de 2008. Desenvolveu projeto de iniciação científica, com bolsa PIBIC, sob a orientação da Prof. Dra. Márcia Regina Pfuetzenreiter. No período de 2009 a 2011 foi residente do Programa de Residência em Clínica Médica de Pequenos Animais da FMVZ/Unesp, Câmpus de Botucatu, sob orientação do Profa. Dra. Michiko Sakate. No ano de 2010, realizou estágio no *Animal Cancer Care Clinic, Michigan State University Center for Comparative Oncology*. Entre maio de 2009 a maio de 2011 fez o curso de Especialização em Oncologia Veterinária do Instituto Bioethicus, na cidade de Botucatu, sob orientação da Profa. Dra Sabryna Gouveia Calazans, sendo laureado com a melhor nota final do curso. Em março de 2011 foi aprovado no Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária, na FCAV Unesp – Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Durante o Programa de Pós-Graduação realizou também treinamento no setor de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Em outubro de 2012 foi aprovado em primeiro lugar no curso de Doutorado pelo mesmo Programa de Pós-Graduação, realizando Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), na University of Wisconsin – Madison – EUA, sob orientação da Prof Dra Xuan Pan. Neste período, publicou artigos em periódicos e resumos científicos em anais de congressos, participou da publicação de um capítulo no Livro Casos de Rotina e de dois capítulos no Livro “Oncologia em cães e gatos” segunda edição e desenvolveu projetos na área de oncologia Atualmente é professor de Clínica Médica de Pequenos Animais na Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO – Descalvado – SP e ministra aulas de Oncologia Veterinária no Instituto Qualittas de Pós Graduação.

“Aproveitem o dia”.

“Façam suas vidas serem extraordinárias”

(Sociedade dos Poetas Mortos)

DEDICATÓRIA

“A minha mãe, o alicerce mais forte da minha formação pessoal”

AGRADECIMENTOS

Já dizia Christopher McCandless “A felicidade só é verdadeira se for compartilhada” e eu tive a felicidade de dividir essa caminhada com diversas pessoas especiais e esse espaço é apenas uma pequena forma de expressar em palavras a minha gratidão a todos vocês.

Gostaria de começar esse agradecimento, exaltando a pessoa que é minha base, meu porto seguro e meu norte, a minha mãe **Adalice Jark**. Você que não apenas me ensinou os valores mais importantes, mas foi o também meu espelho e o exemplo mais fidedigno de amor ao próximo, de serenidade e doação. A você serei eternamente grato por ter lutado ao meu lado nos momentos difíceis, mas também por ter vibrado com as minhas conquistas, por ter me dado a base da minha formação pessoal e também profissional, por ter construído uma família linda que nos enche de orgulho e por ser você, essa pessoa única, ímpar, que transborda generosidade a todos que estão a sua volta. Obrigado pela vida, obrigado por fazer esse mundo algo melhor, obrigado por você existir.

Em segundo lugar, agradeço meu pai **Ademar Jark** que embora não esteja presente fisicamente nesse plano, tenho certeza que está orgulhoso e vibrando com mais essa conquista. Estaremos sempre juntos em pensamento e um dia no plano espiritual ou em vidas futuras ainda desfrutaremos de bons momentos juntos.

As minhas irmãs **Ana Paula Jark e Barbara Jark** por dividirem comigo os momentos de alegrias e dificuldades, por torcerem pelo meu sucesso, por participarem de cada etapa da minha vida, por me proporcionarem momentos únicos como o nascimento e a convivência com os meus sobrinhos **Juninho, Egon, Ana Júlia e Felipe** que são muito especiais para mim. Sou eternamente grato por ter vocês na minha vida.

Agradeço a **Profa. Mirela Tinucci Costa** por ser minha orientadora durante o mestrado e agora também no doutorado. Obrigado por aceitar esse desafio junto comigo, por ter sempre uma palavra acalentadora nos momentos de

dificuldade, obrigado por ser esse exemplo de pessoa e de profissional e por ser minha “mãe” em Jaboticabal.

Agradeço a minha orientadora de Madison **Dra. Xuan Pan**, por todo o ensinamento durante o meu ano nos EUA.

Agradeço a **CAPES** pela bolsa de pesquisa e pela bolsa do programa de doutorado no exterior

Agradeço aos meus amigos de Jaboticabal, que se tornaram minha família e que com certeza a amizade de vocês representa uma conquista maior do que qualquer título acadêmico. Em especial aos que dividiram bons momentos de diversão, conversas, festas, conselhos e desabafos: **Ana Paula Gering; Ana Paula Tristão; Ana Pascoli, Andressa Nogueira; Aninha Guerreiro, Bruno Rodrigues, Carlos Penner Belo, Cristiane Reis; Darcio Filho; Erika Maria Terra** (uma das grandes responsáveis por eu estar em Jaboticabal); **Evandro Zaché; Fábio Nelson Gava; Felipe Barros; Felipe Dias; Felipe Kunz Adans; Fernanda Martinato, Fernando Rosa; Gabriel Aquino; Guilherme Sembenelli, Helena Brito, Igor Luiz Salardani, Ivan Padua, Julielton Barata, Kalina Simplício; Leandro Crivelentti; Leandro Nassar, Letícia Abrahao Anai; Lívia Semolin; Luisa Gouvea, Marcelo Augusto Koury; Marcos Vinicius Guiducci; Mariana Rondelli; Mariana Tiai Kihara, Marina Brito, Michele Lopes Avante; Monica Chaves; Monica Wittmaack, Nazilton Reis Filho, Oscar Sierra; Paulo Vinicius Tertuliano Marinho; Pedro Teles; Raquel Chaves; Rosana Lino Salvador; Rozana Wendler Rocha, Sofia Borin Crivilentti; Talita Raposo; Tatiana Gorestein, Thiago Munhoz; Thuanny Lopes.**

Aos meus grandes amigos da “Rep a esclarecer” **Bruno Xambulância, Igor, Julielton e Tom** por todo companheirismo, pelos momentos de diversão, bebedeira, conversas e desabafos, por tornarem essa fase mais leve e por ocuparem um lugar especial nas minhas melhores lembranças.

Gostaria de agradecer ao meu companheiro de apartamento durante os anos iniciais do doutorado e meu irmão de coração **Oscar**. Saiba que tenho uma admiração muito grande por você, sua amizade é muito importante para mim e

esses anos de convivência foram especiais e tenho certeza que serão sempre marcados e lembrados.

Gostaria de agradecer em especial a **Letícia Abrahao Anai**, por ser uma pessoa muito especial, que me acompanhou desde a minha chegada em Jaboticabal, por ser a companheira em todos os momentos, por me ajudar em diversas vezes, pelas viagens sensacionais que realizamos juntos e pelas tantas outras que estão por vir, por me ensinar com seu exemplo a sempre ajudar ao próximo, sou eternamente grato por ter sua amizade.

Agradeço aos meus amigos de Madison, **Diego de Gasperi (Meninão)**, **Milena Kirinus (Instalena)**, **Lucas Rodrigues (Pakitão)**, **Tiago Barros (Portuga)**, **Julia Baldrighi**, **Joao Dorea**, **Renally Dorea**, **Pepo**, **Tiago Passafaro (Chubby)**, **Artur Fernandes (Anão)**, **Ana Facchetti**, **Renata Passafaro**, **Estela Araújo**, **Fabio Pinaffi**, **Leandro Teixeira**, **Tatiana Ferreira**, **Benédicte Coudé**, **Stefano Munaretto**, **Valter Winkel**, **Alexander Meirov**, **Rafael Barletta**, **Gabriel Barletta**, **Tia Jane**, **Luisa Soares**, **Gerson Mourão**, **Luciana Mourão**, **Fanny Delebecque**, **Luiz Lopes**, **Tassyanna e Didi**, obrigado por tornarem minha vida em Madison uma lembrança memorável e uma experiência fantástica. Obrigado pelos *brazilians barbecue* regados a Gritos de Liberdade e Balseiros do Rio Uruguai, pelas mateadas com a Imbecilena e o Diegota, pelos fins de tarde no Memorium Union, pelas caminhadas para ver o por do sol no Mendota ou em Shorewood, pelas várias Spotted Cow brindadas, pelas noitadas no Red Rock, no Gennas e até talvez as do Merchant, pelos concertos no Capitol, pelas tentativas desastrosas de esqui e pelas idas enganosas no Natatorium. Vocês estarão sempre na minha memória

Agradeço aos demais professores que fizeram parte da minha vida acadêmica, a **Prof Mere Erika Saito** minha eterna orientadora de graduação, meus professores da Residência **Luiz Henrique de Araujo Machado**, **Michiko Sakate e Maria Lucia Gomes Lourenço**, ao **Prof. Andrigo Braboza de Nardi** **Prof. Mirela** e demais professores que contribuíram para o meu conhecimento.

Agradeço a toda equipa do **SOV**, em especial ao **Prof. Andrigo Barboza de Nardi e a Prof. Mirela Tinucci Costa** e aos meus colegas de serviço **Erika Maria Terra; Letícia Abrahao Anai; Livia Maria Semolin; Rosana Lino**

Salvador; Giovanna Rossi Varallo; Marília Ferreira; Nazilton Reis; Ana Pascoli; Jorge; Alfredo Cápua; Adamas, Talita Mariana Morata Raposo; Sofia Borin Crivelentti; Rafael Ricardo Huppes; Leandro Crivelentti; Reinaldo Garrido; Thiago Munhoz; Oscar Sierra, Rafaela Bortoloti Viéra, por toda ajuda no acompanhamento dos casos, na coleta das amostras e nas discussões de caso.

Agradeço aos animais pelos exemplos diários de amor, por nos proporcionar a oportunidade de fazer do nosso trabalho algo tão especial, que são nossos estímulos para a busca do conhecimento.

Por fim, agradeço a Deus, a energia maior que nos move, aos meus guardiões espirituais por me acompanharem, me guiarem nas dificuldades e alegrias da vida contribuindo para minha evolução espiritual.

SUMÁRIO

COMITÊ DE ÉTICA	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	Xv
LISTA DE TABELAS	Xvi
LISTA DE FIGURAS	Xvii
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Linfoma multicêntrico canino	3
2.2. Via JAK2/STAT3	7
2.3. Inibidores da família JAK	10
3. HIPÓTESE	12
4. OBJETIVO	13
4.1. Objetivo Geral	13
4.2. Objetivos Específicos	13
5. MATERIAIS E MÉTODOS	13
5.1. Amostras de linfonodo	13
5.2 Análise imuno-histoquímica	14
5.3. Linhagens celulares e meios de cultivo	15
5.4. Tratamento das células e análise de viabilidade	15
5.5 . Citometria de fluxo e análise de apoptose	16
5.6. Análise estatística	17
6. RESULTADOS	18

6.1. Expressão de STAT 3 e pSTAT 3 em linfomas difusos de grandes células B, linfonodos normais e reativos em cães	18
6.2. Avaliações dos inibidores de JAK1/2 (AZD1480 e CYT387) sobre o crescimento de linhagem celular de linfoma difuso de grandes células B <i>in vitro</i>	22
6.3. AZD1480 e CYT387 inibem o crescimento da linhagem celular de linfomas difusos de grandes células B através do aumento da apoptose	25
7. DISCUSSÃO	30
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação da via JAK2/STAT3 em linfomas multicêntricos caninos e da eficácia *in vitro* dos inibidores de JAK-2 em linfomas difusos de grandes células B**" protocolo nº 11.737/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Mirela Tinucci Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	11/08/2016 a 10/02/2017
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	Não se aplica – Arquivos do laboratório de Patologia
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Arquivos do Serviço de Patologia da Universidade de Wisconsin - EUA.

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

ESTUDO DA VIA JAK2/STAT3 E DE SEUS INIBIDORES EM LINFOMAS MULTICÊNTRICOS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B CANINOS

A via Janus Kinase (JAK) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) desempenham papéis importantes na patogênese de neoplasias hematopoiéticas. A ativação da via JAK2/STAT3 promove o crescimento e sobrevivência celular em uma variedade de linfomas humanos. Há uma necessidade de compreender a participação da via JAK2/STAT3 em linfomas caninos difusos de grandes células B e do potencial terapêutico dos inibidores de JAK no tratamento dessa doença. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de JAK2-STAT3 em linfomas difusos de grandes células B e o impacto do uso de inibidores de JAK2 como AZD1480 e CYT387 no crescimento in vitro dessa linhagem tumoral. Foi realizada técnica de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-STAT3 e anti-STAT3 fosforilado (p-STAT3) em linfonodos acometidos por linfoma difuso de grandes células B e comparado à linfonodos normais e reativos. Para avaliação do efeito terapêutico dos inibidores de JAK2 (AZD1480 e CYT387) foi realizado ensaio de viabilidade celular pelo método de azul de tripan utilizando linhagens celulares de linfoma difuso de grandes células B (CLBL-1) e análise de apoptose por citometria de fluxo utilizando o sistema Annexin V. Houve aumento significativo na expressão de STAT3 e p-STAT3 em linfomas difusos de grandes células B em comparação com linfonodos normais. Ambos os fármacos inibiram o crescimento celular em proporções dependentes da dose administrada e houve um aumento significativo nas taxas de apoptose das células tratadas com inibidores de JAK-2 em comparação ao grupo controle tratado com DMSO. Este é o primeiro estudo a avaliar a via JAK2/STAT3 em linfomas difusos de grandes células B canino e esses dados permitem compreender e explorar o potencial terapêutico dos inibidores de JAK permitindo estudos futuros da eficácia clínica desses fármacos na oncologia veterinária

Palavras-chave: oncologia, neoplasias hematopoiéticas, cães, terapias alvo, inibidores de JAK

EVALUATION OF JAK2/STAT3 PATHWAY AND JAK2 INHIBITORS IN CANINE MULTICENTRIC DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA

The Janus Kinase (JAK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway play important roles in the pathogenesis of hematologic malignancies. Activated JAK2-STAT3 signaling pathway promotes the growth and survival of a variety of lymphomas in human. There is a great demand for understanding JAK-STAT pathway in canine diffuse large B cell lymphoma (DLBCLs) and evaluating the therapeutic potential of JAK inhibitors. Our study aims to evaluate the expression of JAK2-STAT3 pathway in canine DLBCLs and to assess the impact of AZD1480 and CYT387, two novel JAK inhibitors, on canine DLBCL cell growth. Immunohistochemistry was performed in canine DLBCLs, normal and reactive lymph nodes with primary antibodies against STAT3 and phosphorylated STAT3 (p-STAT3). To evaluate the therapeutic effect of novel JAK inhibitors, canine DLBCL cell line CLBL-1 was treated with either AZD1480 or CYT387 and trypan blue viability assay was performed post treatment. There was a significant increase in expression of STAT3 and pSTAT3 in canine DLBCLs compared with the normal lymph node. Both AZD1480 and CYT387 inhibited canine DLBCL cells in a dose dependent manner. This is the first study to evaluate the JAK2/STAT3 pathway in canine DLBCLs. The knowledge of JAK2-STAT3 activity in canine DLBCLs enables us to understand and explore the therapeutic potential of JAK inhibitors. The dose dependent cell growth inhibition by novel JAK inhibitors in this study will lead into the future studies of the underlying mechanism

Keywords: oncology, hematopoietic neoplasia, dogs, target therapy, JAK inhibitors

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Estadiamento clínico do linfoma segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS	4
Tabela 2: Marcados utilizados na citometria de fluxo para avaliação do perfil de apoptose das células	17
Tabela 3: Média de porcentagem de células positivas na reação imunohistoquímica de STAT3 e STAT-3 fosforilada (p-STAT3) em linfonodos normais, linfonodos reativos e linfonodos acometidos por linfoma difuso de grandes células B	20
Tabela 4: Porcentagem de células viáveis, em apoptose precoce, apoptose tardia e células em necrose nas linhagens celulares CLBL-1 e MDCK tratadas com AZD1480	26
Tabela 5: Porcentagem de células viáveis, em apoptose precoce, apoptose tardia e células em necrose nos grupos de linhagem CLBL-1 e MDCK tratados com CYT387.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Via de sinalização de JAK2/STAT3.....	8
Figura 2: Representação esquemática dos tratamentos realizados nos grupos controles e tratados com os inibidores de JAK2 (AZD1480 e CYT387).	16
Figura 3: Representação das médias e erro padrão de porcentagem de células positivas para marcação com STAT3 e p-STAT3 entre os três grupos analisados. Comparado aos linfonodos normais (n=10) houve aumento significativo da marcação de STAT3 e p-STAT3 com os linfonodos acometidos por linfoma difuso de grandes células B (n=42) (**p < 0.01). Linfonodos reativos (n=10) e linfonodos com linfoma difuso de grandes células B não diferiram.	19
Figura 4: Imunomarcações dos anticorpos STAT3 e STAT3 fosforilado (pSTAT3) em linfomas difusos de grandes células B, linfonodos reativos e normais. Fotomicrografia representativa da marcação citoplasmática de STAT 3 em linfonodo normal (A), reativo (B) e acometido por linfoma difuso de grandes células B (C). Fotomicrografia representativa da imunomarkação nuclear de p-STAT 3 em linfonodo normal (D) reativo (E) e linfonodo acometido por linfoma difuso de grandes células B (F). A escala de barras corresponde a 20µm. Reação imuno-histoquímica, Signal Stain®, DAB, 60x.	21
Figura 5: Análise de proliferação celular em microscopia da linhagem celular CLBL-1 no grupo controle tratado com DMSO (A) e tratado com AZD1480 na concentração de 2µM após 48 horas de tratamento (B)...	23
Figura 6: Inibidores de JAK2, AZD1480 e CYT387 inibem o crescimento de linhagem celular de linfoma difuso de grandes células B canino (CLBL-1) <i>in vitro</i> . Linhagens celulares de linfoma difuso de grandes células B e células renais caninas (MDCK) saudáveis foram tratadas com diferentes concentrações de AZD1480 (A e C) e CYT387 (B e D). Células tratadas com DMSO foram utilizadas como tratamento controle. Dia 1 representa o momento da incubação com os dois	

fármacos testados e os dias 2, 3 e 4 representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas após tratamento. A porcentagem de crescimento foi normalizada de acordo com o grupo controle tratado com DMSO. Os resultados estão apresentados de acordo com a média \pm média de erro padrão * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

24

Figura 7: Células de linfoma difuso de grandes células B (CLBL-1) foram mais sensíveis aos inibidores de JAK-2 (AZD1480 e CYT387), quando comparadas ao grupo de células controles renais caninas (MDCK). A redução no crescimento celular foi mais significativa após 48 (dia 3) e 72 horas (dia 4) pós-tratamento. A porcentagem de crescimento foi normalizada de acordo com o grupo controle de tratamento (DMSO) ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Os resultados estão apresentados de acordo com a média \pm média de erro padrão

25

Figura 8: Tratamento com inibidores de JAK2 induz maiores taxas de apoptose em linhagem de células de linfoma difuso de grandes células B (CLBL1) em comparação com células renais caninas (MDCK). Porcentagem de células em apoptose nos grupos tratados com AZD1480 **(A)** e CYT387 **(B)**, na análise por citometria de fluxo usando o sistema Annexin V/SYTOX Red. Células saudáveis (Annexin V⁻, SYTOX Red⁻), apoptose precoce (Annexin V⁺, SYTOX Red⁻) e apoptose tardia, Annexin-V (+), SYTOX Red (+). **(C)** A porcentagem de células saudáveis foi maior no grupo tratado com DMSO em comparação com os tratamentos com AZD nas concentrações 2 e 5 μ m. **(D)** A porcentagem de células saudáveis foi maior no grupo tratado com DMSO em comparação com os tratamentos com CYT387 nas concentrações de 5 μ M. As porcentagens de células em apoptose precoce foi significativamente maior nas concentrações de 5 μ M um para os dois inibidores de JAK-2 em comparação com o grupo DMSO **(E)** Não houve diferença significativa entre o tratamento com AZD1480 nas células MDCK. **(F)** Diminuição na porcentagem de células saudáveis e aumento das células em apoptose tardia foram verificadas nas concentrações de 5 μ M nas células tratadas com CYT387. Os resultados estão apresentados de acordo com a média \pm

média de erro padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 28

1. INTRODUÇÃO

Linfoma é um termo genérico empregado para descrever diversas neoplasias com origem comum que são as células linfoides. Os linfomas podem ser classificados de acordo com a localização anatômica, imunofenótipo e o tipo histológico. Nos cães, o linfoma multicêntrico difuso de grandes células B (LDGCB) é o mais frequente e embora seja uma neoplasia altamente responsiva a quimioterapia, as taxas de cura ainda são consideradas baixas, sendo comum a ocorrência de recidivas resistentes às modalidades quimioterápicas empregadas culminando com o óbito dos pacientes.

Novas opções terapêuticas visando o controle mais efetivo dessa neoplasia devem ser buscadas. Conhecer as vias de sinalização relacionadas ao crescimento e proliferação celular implicadas no desenvolvimento neoplásico é o primeiro passo para o desenvolvimento de terapias alvo moleculares.

A via Janus Kinase (JAK) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição - STAT participam de diversos processos de sinalização no desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas humanas, como proliferação e sobrevivência celular, angiogênese e metástase. Com vistas a estas informações, o estudo da participação destas vias no desenvolvimento do LDGCB multicêntrico canino e de fármacos capazes de inibir essa via quando alterada pode representar um avanço no tratamento do linfoma em cães.

O estudo em tela avaliou a expressão da via JAK2/STAT3 em LDGCB caninos através de imuno-histoquímica e através de ensaios *in vitro* verificou a eficácia de dois inibidores de JAK2 em linhagem celular de LDGCB estudando os mecanismos envolvidos na inibição da proliferação celular pelos fármacos testados principalmente nos processos de apoptose através de análise de citometria de fluxo.

Embora a via JAK2/STAT3 seja uma via amplamente estudada no desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas em humanos, até o momento não existem estudos avaliando essa via em LDGCB multicêntrico em cães, portanto essa pesquisa apresenta caráter inédito tanto no que se refere a participação da via JAK2/STAT3 no desenvolvimento de LDGCB quanto da

eficácia *in vitro* dos inibidores de JAK2 no tratamento dessa importante neoplasia em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Linfoma multicêntrico canino

O linfoma é uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação de células originárias do tecido linfoide, como os linfócitos e seus precursores, que acomete primariamente os linfonodos, fígado ou baço, porém devido ao caráter circulatório dessas células outros órgãos não linfoides podem ser acometidos (CONTRAN et al., 1994; VAIL & OGILVIE, 1998).

É uma neoplasia que ocorre com maior frequência em animais de meia-idade a idosos, (GREENLEE et al., 1990; MOULTON & HARVEY, 1990), sem predileção sexual (VAIL & OGILVIE, 1998) e corresponde a aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hematopoiético nos cães (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; MORRISON, 1998; FAN & LORIMIER, 2005).

A etiologia do linfoma canino é multifatorial, sendo principalmente incriminados fatores ambientais e genéticos. Em humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas a etiologia viral ficou comprovada, porém em cães a participação viral ainda não foi estabelecida (GREENLEE et al., 1990; VALLI, 1993; JONES et al., 1997, MORRISON, 2005).

A classificação do linfoma pode ser baseada nas características anatômicas, histopatológicas ou imunofenotípicas. Tradicionalmente, na classificação anatômica o linfoma canino pode ser dividido em multicêntrico, alimentar, mediastinal, cutâneo e extranodal (VAIL & OGILVIE, 1998). Vail et al. (2007) e Rodrigues et al. (2007) identificaram que os linfomas multicêntricos correspondem a 80 e 86,7%, respectivamente. Semelhantemente, Sequeira et al. (1999) relataram a ocorrência em 91,2% dos cães. Embora nos linfomas multicêntricos a apresentação mais comum seja o envolvimento generalizado dos linfonodos, o acometimento de apenas um linfonodo é possível. O aumento de um ou de todos os linfonodos nos cães pode ser indolor e em algumas situações a única manifestação presente. Outros sinais que podem estar associados são anorexia, apatia, emagrecimento progressivo, febre e edema de membros (DOBSON & GORMAN, 1993). Hepatomegalia e esplenomegalia decorrentes da infiltração neoplásica são achados frequentes (VAIL, 2000). Além disso, sinais clínicos de intolerância ao exercício, taquipneia, dispneia,

regurgitação também são descritos em decorrência da compressão provocada pela linfadenomegalia mediastínica (CARDOSO et al., 2003).

O linfoma, em cães, pode ser classificado em diferentes estádios clínicos, que servem como guia para o prognóstico clínico e tratamento (Tabela 1). Além dos estádios clínicos, outro fator importante é o subestádio, pois animais assintomáticos no momento do diagnóstico (subestádio a) apresentam melhores sobrevidas, quando comparados aos de subestádio b (presença de sinais clínicos) (Tabela 1). (CURRAN et al. 2015)

Tabela 1. Estadiamento clínico do linfoma segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS.

<i>Estádio I</i>	<i>Acometimento limitado a um linfonodo</i>
<i>Estádio II</i>	<i>Acometimento de linfonodos regionais</i>
<i>Estádio III</i>	<i>Aumento generalizado dos linfonodos</i>
<i>Estádio IV</i>	<i>Acometimento do fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia</i>
<i>Estádio V</i>	<i>Acometimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos</i>

a: sem sinais sistêmicos; b: com sinais sistêmicos

Extraído de Curran et al. 2016

O diagnóstico está fundamentado no exame físico e nas avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e exames de imagem. No entanto, o diagnóstico definitivo só poderá ser firmado pela avaliação citológica e/ou histológica do órgão afetado (FAN & KITCHELL, 2002; NELSON & COUTO, 2006).

Nos exames histopatológicos, os linfomas podem ser classificados como de alto, médio ou de baixo grau de malignidade. Embora existam diversas classificações histopatológicas de linfoma descritas, tais como a de Rappaport, Lukes-Collins, Kiel, Work Formulation, a classificação mais aceita e amplamente utilizada nos estudos envolvendo linfoma em cães é a da Organização Mundial da Saúde (OMS), uma vez que esta combina o tipo histológico com imunofenótipo do linfoma, além de estar em constante

atualização e permitir um comparativo com a oncologia humana (VEZALLI et al., 2009; VALLI et al., 2011; VALLI et al., 2013).

Aproximadamente 80% dos linfomas caninos são similares aos linfomas não-Hodgkin humanos de médio e alto grau (VALLI et al., 2011). Estudos utilizando a classificação da OMS apontam que o tipo histológico mais frequente nos linfomas multicêntricos caninos é LDGCB, correspondendo a aproximadamente 50% dos casos de linfoma nesta espécie. Corroborando com a literatura, um estudo brasileiro com 55 casos de linfoma em cães verificou a frequência de 56,3% de casos de LDGCB multicêntrico (SUEIRO et al., 2004). Nos EUA, Valli et al. (2011) avaliaram 300 casos de linfomas em cães e os LDGCB multicêntrico corresponderam a 48,33% dos casos. Anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisadores repetiu a investigação com 992 casos de linfomas e obtiveram resultado semelhante (VALLI et al., 2013).

Com relação à imunofenotipagem, os linfomas podem ser classificados em linfomas T, linfomas B e linfomas não T não B, bem como mistos (B/T) (JONEST et al., 1997; DE MOURA et al., 1999; SEQUEIRA et al., 1999; VAIL, 2000).

Um estudo com 1263 cães foi observado que 67,4% dos linfomas caninos eram B e 30,9% T (MODIANO et al., 2005). Estudos em países europeus como Alemanha e França demonstraram resultados similares em relação a incidência de linfomas B e T na população canina. Ponce et al. (2010), avaliaram 608 casos de linfoma multicêntrico canino na França e verificaram que 63,8% eram linfomas B, 35,4% T e 0,8% não B não T. O mesmo foi registrado na Alemanha com avaliação de 411 casos de linfoma multicêntrico canino, Ernst et al. (2016) também observaram predomínio de linfomas B (79,4%) em relação aos de fenótipo T (20,6%).

A determinação do imunofenótipo pode ser considerada um fator prognóstico independente nos linfomas de alto grau, uma vez que estudos sugerem que os linfomas de origem T apresentam menores taxas de sobrevivência quando comparados aos de imunofenótipo B (RUSLANDER et al. 1997). Ruslander et al. (1997) observaram que o tempo livre de doença e a sobrevivência média de pacientes com linfomas B foi, respectivamente, de 160 e 330 dias, enquanto que nos animais com linfomas T essas variáveis foram de 52 e 153 dias respectivamente.

A quimioterapia antineoplásica é o tratamento mais frequentemente adotado em cães diagnosticados com linfoma multicêntrico. (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; OGILVIE & MOORE, 1995). Segundo Macewen & Young (1996), sem o tratamento, muitos cães vem a óbito em quatro a seis semanas.

O protocolo quimioterápico mais utilizado no tratamento do linfoma multicêntrico canino é o CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona). Há pesquisas de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e o maior tempo de sobrevida nos cães com linfoma (MORRISON, 2005).

Além dos fatores prognósticos discutidos anteriormente, como tipo histológico, imunofenótipo e estadiamento e subestadiamento clínico, ainda se destacam como importantes marcadores prognósticos no linfoma multicêntrico a presença de alterações laboratoriais, como anemia e hipercalcemia, a resposta inicial a terapia empregada, os efeitos adversos durante a quimioterapia e o índice mitótico na avaliação histopatológica (BURTON et al., 2013.; MUTZ et al., 2015.; CURRAN et al., 2015).

Segundo Mutz et al., (2015) pacientes hipercalcêmicos no momento do diagnóstico apresentaram sobrevidas médias de 78 dias, enquanto que pacientes normocalcêmicos apresentaram sobrevidas de 321 dias. Em relação à resposta inicial a quimioterapia, Curran et al. (2016), observaram que pacientes submetidos ao CHOP de 15 semanas, que obtiveram remissão completa durante a quimioterapia, apresentaram sobrevidas médias de 331 dias, enquanto que pacientes que apresentaram apenas remissões parciais tiveram redução significativa na sobrevida média (110 dias).

Diversos autores verificaram que pacientes que sofreram efeitos adversos como neutropenia durante a quimioterapia e que necessitaram de redução de doses nas aplicações subsequentes apresentaram maiores sobrevidas em relação a pacientes que não apresentaram tais alterações. Os autores concluíram que a neutropenia grave pode ser um indicativo de alta exposição das células do linfoma ao quimioterápico administrado, pois os pacientes apresentam diferenças no metabolismo e *clearance* individual dos fármacos administrados (BURTON et al., 2013; CURRAN et al., 2015)

Como regra geral, as sobrevidas médias de cães linfomas de alto grau B são em torno de 10-14 meses, enquanto que as sobrevidas médias em

linfomas de imunofenótipo T são de 6-9 meses. Apenas 10% dos animais diagnosticados com essa doença apresentam sobrevidas superiores a 2 anos (MARCONATO et al., 2011)

2.2. Via JAK2/STAT3

A via Janus Kinase (JAK) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição – STAT apresentam atividade fundamental tanto na hematopoiese normal como no desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas (WU et al., 2011; JATIANI et al., 2011).

Em vertebrados, existem quatro membros da família tirosina kinase pertencentes a via JAK e estes são referidos como JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina kinase 2 (TIK2). Cada proteína JAK está constitutivamente associada a um receptor de citocina que não possui atividade tirosina quinase intrínseca em si, porém ativa um membro específico da família STAT como efetor (WU et al., 2011). No caso específico da via JAK2/STAT3, o receptor de JAK2 recebe um ligante que promove a autofosforilização do receptor, estimulando a ligação das proteínas STAT3 nesse receptor fosforilado. Após esse processo, o JAK2 promove a fosforilação de STAT3 que se combina em dímeros e há a translocação para o interior do núcleo para promover a transcrição de genes responsivos a STAT3, que participam de processos envolvidos na apoptose e ciclo celular (Figura 1) (WU et al., 2011)

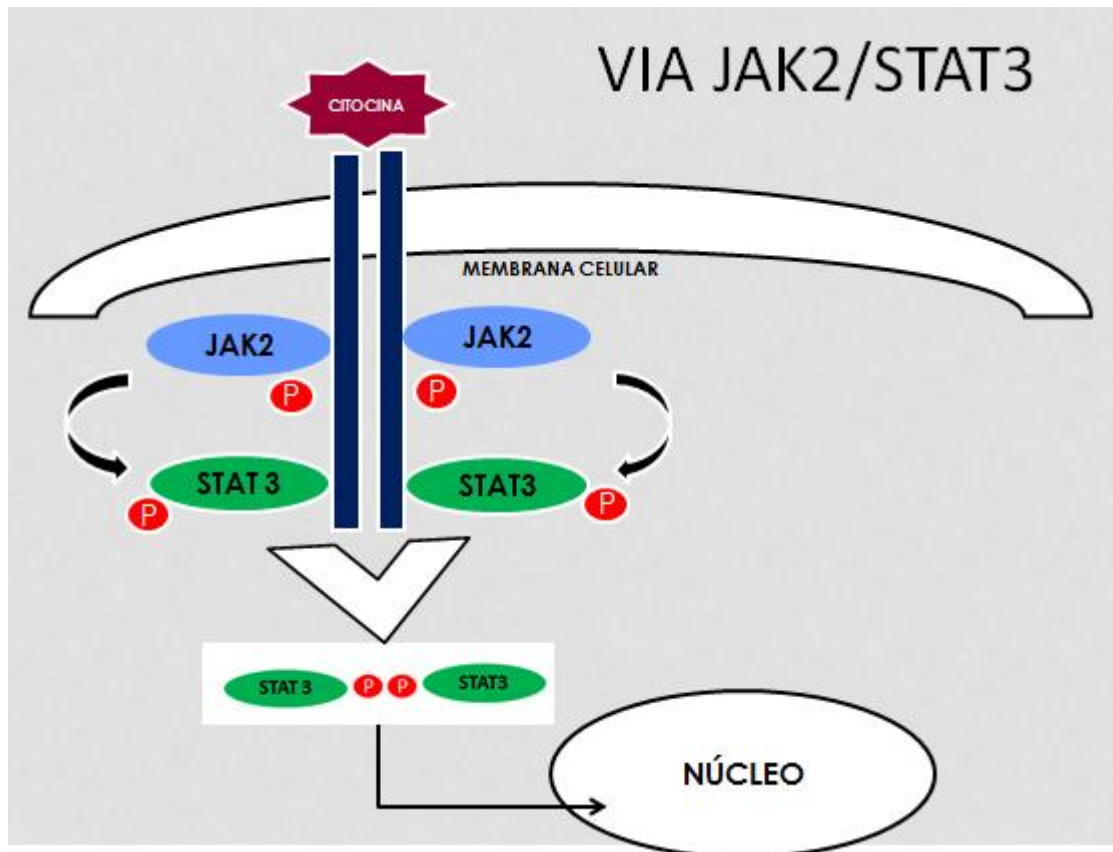


Figura 1. Via de sinalização de JAK2/STAT3. Extraído de QUINTAS-CARDAMA et al. 2013

Entre os membros da família de JAK quinases, JAK2 é o mais estudado devido a sua participação em processos neoplásicos. A ativação constitutiva de JAK-STAT promove a transformação maligna de células progenitoras hematopoiéticas. Mutações somáticas no exon 14 de JAK2 foram identificadas em mais da metade de todos os pacientes diagnosticados com distúrbios mieloproliferativos. Ademais, a ativação de STAT3 através da via de JAK2 promove o crescimento e a proliferação de vários tipos de linfócitos neoplásicos em humanos, além de participar em processos de angiogênese e inibição da apoptose. (ALAS et al., 2003; AMIN et al., 2004; DING et al., 2008).

A mutação no gene JAK2 está associada com rearranjos e superexpressão do receptor CRLF2 localizado no cromossomo X que codifica um receptor linfóide favorecendo o desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas. A mutação no gene JAK e a superexpressão de CRLF2 foi detectada em casos de leucemias linfoblásticas agudas em crianças (VAINCHENKER et al., 2013).

Evidências sugerem que além dos processos de sobrevivência celular, proliferação, diferenciação e oncogênese, o STAT3 participa ativamente dos processos de angiogênese tanto nos processos fisiológicos como neoplásicos (CHEN et al. 2007). Em um estudo com carcinomas pulmonares de pequenas células foi observado correlação positiva da expressão de p-STAT3 e fator de crescimento endotelial e fator de crescimento de fibroblastos. Além disso, a microdensidade vascular avaliada por morfologia e marcação para CD34 foi maior em amostras com alta expressão de p-JAK2 e p-STAT3 (ZHAO et al., 2011)

Em relação à participação nos processos de apoptose, a ativação de STAT3 foi relacionada a expressão de proteínas da família Bcl-2 (CATLETT-FALCONI et al., 1999; EPLING-BURNETTE et al., 2001). A inibição de STAT3 está associada ao aumento da apoptose e o decréscimo da expressão de Mcl-1 em leucemias de linfócitos granulares (EPLING-BURNETTE et al., 2001). Além disso, Aoki et al., (2003) demonstraram que a inibição de STAT3 induz apoptose através do decréscimo de survivina, uma proteína anti-apoptótica expressa em alguns linfomas em humanos (AOKI et al., 2003).

Embora essa a via JAK/STAT seja importante no desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas em humanos, poucos estudos avaliaram a expressão de STAT3 e p-STAT3 nas neoplasias caninas. Petterino et al. (2006) compararam a expressão de STAT3 entre hemangiomas e hemangiossarcomas e constataram que a variante maligna das neoplasias endoteliais apresentou número significativamente maior de células positivas na análise imuno-histoquímica quando comparada aos hemangiomas. Por sua vez, Krol et al. (2011) demonstraram que a expressão de p-STAT3 foi significativamente maior em neoplasias mamárias metastáticas, quando comparadas a carcinomas mamários não metastáticos. Também foi observado que a ativação de STAT3 contribuiu para a proliferação e sobrevivência de linhagens celulares de osteossarcoma canino *in vitro* (FOSSEY et al., 2011).

Embora essa seja uma via importante no desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas em humanos, até o momento não existem estudos avaliando a via do JAK/STAT em LDGCB multicêntrico em cães. Frente a possibilidade terapêutica da via JAK/STAT, o estudo da mesma e de seus inibidores em

linfomas multicêntricos caninos pode ser promissora no desenvolvimento de estratégias para controle da doença.

2.3. Inibidores da família JAK

Em 2013 foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) o primeiro inibidor de JAK1 e JAK2 para uso em medicina veterinária, no controle da dermatite atópica em cães (COSGROVE et al., 2013a). O oclacitinib (Apoquel®) foi desenvolvido após a observação da participação da via do JAK em processos alérgicos. Utilizando modelos celulares humanos e caninos foi verificada a eficácia e seletividade do oclacitinib em relação aos membros da família do JAK e citocinas relacionadas a ativação dessa via. Os resultados demonstraram que a molécula inibiu algumas proteínas, membros da família JAK, em ao menos 50% das células testadas em concentrações de 10-99 nm, e não inibiu um painel de 38 proteínas não pertencentes a família JAK (GONZALES et al., 2014).

O oclacitinib foi mais potente na inibição de JAK-1 em comparação aos outros membros da mesma família. Além disso, a molécula inibiu a função de citocinas dependentes de JAK-1 envolvidas em processos inflamatórios como IL-2, IL-4, IL-6 e IL-13, assim como as relacionadas ao prurido (IL-31). O oclacitinib apresentou mínimos efeitos em citocinas que não são ativadas pela via do JAK-1, como eritropoietina, estimulantes de colônia granulocítica/macrofágica, IL-12, IL-23. Os resultados demonstraram que o oclacitinib é um potente e seletivo inibidor de JAK-1 e das citocinas envolvidas na inflamação, alergia e prurido (GONZALES et al., 2014).

Avaliações do oclacitinib (Apoquel®) no tratamento da dermatite atópica em cães mostraram resultados satisfatórios (COSGROVE et al., 2013a; COSGROVE et al., 2013b; GADEYNE et al., 2014). Cosgrove et al. (2013a), compararam a eficácia do uso do oclacitinib em relação ao placebo em 436 cães com dermatites alérgicas. O escore de prurido dos pacientes diminuiu de 7,58 para 2,59 após o uso do inibidor da via de JAK. Os autores concluíram que esse fármaco é eficiente, rápido e seguro para o controle de prurido em cães com dermatites alérgicas. A eficácia do oclacitinib, em comparação a

prednisolona no controle de prurido em cães com dermatite alérgica foi investigada por Gadeyne et al. (2014). Os autores verificaram respostas semelhantes entre os dois grupos, com início de eficácia dada pela redução do prurido a partir de 4 horas da administração dos fármacos.

Mormente o uso dessa classe de fármacos foi destinado para problemas dermatológicos, até o presente momento não existem estudos que caracterizem a via do JAK/STAT e o potencial terapêutico dos inibidores dessa via no tratamento de linfomas caninos, portanto esse é o primeiro trabalho a avaliar os inibidores de JAK no tratamento *in vitro* de neoplasias, especificamente no linfoma difuso de grandes células B

Na medicina, a identificação da mutação da via do JAK2 em neoplasias mieloproliferativas conduziu ao desenvolvimento de fármacos inibidores específicos dessa via. Diversos compostos foram sintetizados e atualmente existem vários estudos clínicos sobre a atuação desses fármacos em neoplasias hematopoiéticas humanas (SCUTO et al., 2010; MONAGHAN et al., 2011; PLIMACK et al., 2013).

Trung et al. (2013) avaliaram a participação do bloqueio da via JAK2/STAT3 através de um inibidor (Resveratrol) em linhagens neoplásicas derivadas de linfócitos NK. O fármaco bloqueou o ciclo celular na fase G0/G1 além de induzir a apoptose através da diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como MCL1 e survivina. Além disso, o resveratrol induziu efeito sinérgico em induzir a apoptose e efeito antiproliferativo da L-asparaginase nos cultivos celulares de linfócitos NK neoplásicos.

Após a constatação que a via JAK/STAT participa ativamente do desenvolvimento de linfoma Hodgkin (LH) em humanos, Diaz et al. (2011) avaliaram a eficácia de um inibidor oral de de JAK/STAT (Lestaurtinib) em linhagens celulares de LH resistentes. O fármaco foi capaz de inibir o crescimento celular e induzir a apoptose. Os autores concluíram que a utilização de Lestaurtinib inibiu a fosforilação de STAT3 e reduziu a expressão de proteínas antiapoptóticas BCL-xL.

O AZD1480 (AstraZeneca, Inc) é uma pirazolopirimidina que funciona como inibidor competitivo do ATP nas vias de JAK1 e JAK2, com alguma atividade paralela contra JAK3, TYK2 e Aurora-A kinase em concentrações elevadas (SCUTO et al., 2010; PLIMACK et al., 2013). Este fármaco mostrou

atividade inibitória em leucemias mielóides agudas em humanos, e é possível que esse composto também possa atuar em neoplasias hematológicas de outras espécies (PLIMACK et al., 2013)

Outro potente inibidor de JAK1 e JAK2, o CYT387 (Momelotinib) foi desenvolvido para o tratamento de mielofibrose em humanos (PARDANANI et al., 2013). Estudos clínicos de fase I e II demonstraram eficácia desse fármaco no tratamento de humanos com mielofibrose (MONAGHAN et al. 2011). Pardanani et al. (2009) verificou a eficácia do CYT387 em linhagens celulares de policitemia vera que apresentavam a mutação no gene JAK2 (JAK2V617F) e os resultados foram promissores. Apesar dos inibidores de JAK2 normalmente melhorarem os sinais relacionados a inflamação crônica e hepatoesplenomegalia, a anemia é um efeito adverso importante em pacientes tratados com essa classe de fármacos porém curiosamente o momelotinib resultou em redução da anemia em pacientes com mielofibrose em estudos fase I/II. Estudos em fase III estão sendo desenvolvidos para entender o mecanismo pelo qual esse efeito positivo ocorre (WINTON et al. 2016).

A confirmada participação da via do JAK2/STAT3 em diversos processos celulares necessários para o desenvolvimento neoplásicos tais como proliferação, angiogênese em neoplasias hematopoiéticas faz do estudo dessa via e de seus inibidores um possível avanço no tratamento de cães com linfoma multicêntrico.

3. HIPÓTESE

A via JAK2/STAT3 está superexpressa em LDGCB multicêntrico em comparação aos linfonodos normais e reativos. Adicionalmente, a inibição dessa via através de fármacos inibidores de JAK2, tais como o AZD1480 e o CYT387 podem diminuir o crescimento *in vitro* de uma linhagem celular de linfoma difuso de grandes células B (CLBL-1).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar, através da técnica de imuno-histoquímica, a expressão de STAT3 e STAT3 fosforilada (p-STAT3) em LDGCB multicêntrico e analisar os efeitos terapêuticos *in vitro* do uso de inibidores de JAK2 (AZD1480 e CYT387) em cultivo celular dos mesmos.

4.2. Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica de imuno-histoquímica para os marcadores STAT3 e p-STAT3 em LDGCB multicêntrico

- Avaliar a expressão de STAT3 e p-STAT3 em LDGCB multicêntrico e comparar a expressão desses marcadores em linfonodos normais e reativos de cães;

- Avaliar a eficácia dos inibidores de JAK2 (AZD1480 e CYT387) em cultivos celulares de LDGCB multicêntrico (CLBL-1)

- Avaliar a atividade apoptótica como mecanismo de ação dos inibidores de JAK2 em LDGCB multicêntrico por meio da citometria de fluxo

- Avaliar se os inibidores de JAK2 (AZD1480 e CYT387) poderiam futuramente representar um potencial terapêutico para o tratamento de LDGCB multicêntrico canino.

5. Material e Métodos

5.1. Amostras de linfonodo

Amostras de 42 linfonodos tumorais de cães que receberam o diagnóstico de LDGCB foram selecionadas dos arquivos da Escola de Medicina Veterinária da University of Wisconsin – Madison, EUA. Os exames histopatológicos foram realizados no período entre 2008 e 2015 e como pré-requisito para a seleção, as amostras selecionadas foram àquelas provenientes de pacientes que não tivessem iniciado o tratamento quimioterápico. Para os grupos controle foram selecionados 10 amostras de linfonodos reativos e 10

amostras de linfonodos sem alterações diagnosticadas por histopatologia e provenientes do mesmo banco de dados.

5.2. Análise imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos pelo método indireto de coloração de imunoperoxidase. Inicialmente as lâminas passaram pelo processo de desparafinização em estufa a 65°C com posterior passagens em xilol (3 ciclos de 5 minutos) e concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80% e 50%), por fim em água destilada. Após este processo, a recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas para a imunomarcção de STAT3 e p-STAT3, respectivamente, em buffer de citrato pH 6 ou TRIS EDTA a pH 9, em banho Maria a 95°C por 25 minutos com resfriamento lento. O bloqueio da peroxidase endógena se deu através da imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio a 0,3% por 10 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado através da incubação com soro caprino a 10% por 60 minutos também a temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários de camundongo anti-STAT3 (1:600, Cell Signaling Technology, 124H6) e de coelho anti-p-STAT3 (1:400, Cell Signaling Technology, Y705 D3A7), diluídos em soro caprino a 1% em uma câmara úmida a 4°C *overnight*. Foram utilizados os anticorpos secundários Signal Stain® Boost IHC Reagents (HRP, Mouse ou rabbit) durante 30 minutos. Após a lavagem com PBS, as amostras foram coradas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Cell Signaling) a temperatura ambiente por 1 minuto para posterior lavagem com água destilada e contracoloração com hematoxilina de Mayer. Após esse processo as lâminas foram lavadas em concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e xilol, montadas com lamínula para posterior análise no microscópio.

Como controle positivo da reação foi usada amostra de carcinoma mamário canino e como controle negativo, as amostras foram incubadas com o soro caprino a 1% sem adição dos anticorpos primários.

A imunomarcção citoplasmática para STAT3 e nuclear p-STAT3 foi avaliada em microscopia para determinação da porcentagem de células

positivas. Foram selecionados 5 campos de grande aumento (60x) que continham o maior número de células positivas para serem fotografados para posterior contagem através do sistema ImageJ. A média da porcentagem de células positivas foi obtida contando o total de células positivas e negativas de cada um dos 5 campos selecionados.

5.3. Linhagens celulares e meios de cultivo

Linhagem celular comercial de linfoma difuso de grandes células B (CLBL-1) canino (RÜTGEN et al. 2010) foi cultivada em meio Dulbecco's modificado (IMDM) contendo 20% de soro fetal bovino, penicilina e L-gutamina. Como célula controle foi utilizada linhagem celular renal canina saudável (MDCK), que foram mantidas em Meio Dulbecco's Modified Eagle, contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina e solução de aminoácidos não essenciais. Ambas as linhagens celulares foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ com replicações a cada 48 horas.

5.4. Tratamento das células e análise de viabilidade

Células da linhagem CLBL-1 e MDCK foram semeadas nas concentrações de $0,1 \times 10^6$ /mL e $0,5 \times 10^6$ /mL, respectivamente. Após 24 horas (dia 1), foram realizadas contagens de viabilidade celular em todas as placas para verificação do crescimento uniforme em cada grupo. Após esse processo, ambos os grupos foram tratados com AZD1480 (Chemietek) ou CYT387 (Chemietek) nas doses de 1µM, 2µM e 5µM; DMSO (100%) sem adição de AZD1480 ou CYT387 foi usado como controle, uma vez que ambos os fármacos testados foram diluídos em DMSO. Cada linhagem celular foi semeada em triplicata em cada tratamento e todo o experimento foi repetido três vezes. Nos dias 2 (24h após o início do tratamento), 3 (48h após o início do tratamento) e 4 (72h após o início do tratamento) foram realizadas novas contagens celulares em todas as concentrações de fármacos testados em ambas as linhagens celulares (CLBL-1 e MDCK) (Figura 2)

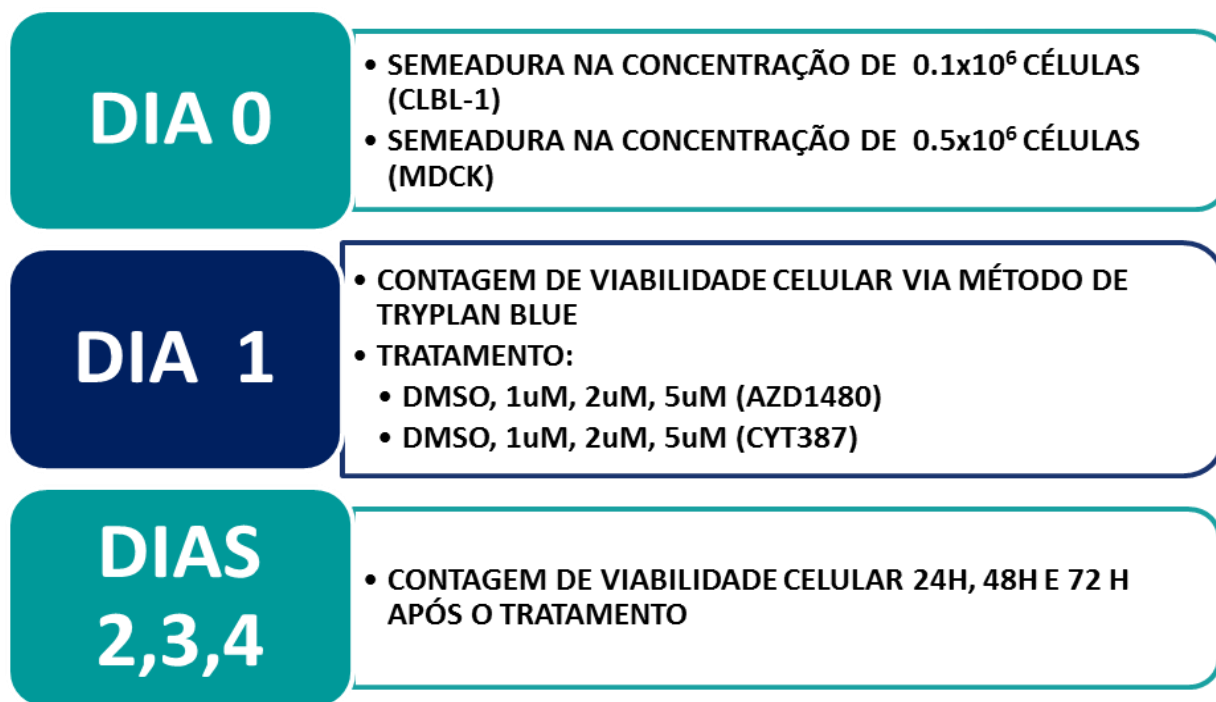


Figura 2. Representação esquemática dos tratamentos realizados nos grupos controles e tratados com os inibidores de JAK2 (AZD1480 e CYT387)

Diariamente as amostras celulares tratadas e controles foram homogeneizadas e analisadas em microscopia, sendo realizadas fotografias para análise subjetiva da proliferação celular. Para determinação mais exata da viabilidade celular foram realizadas contagens celulares utilizando o método de azul tripan na proporção de 1:1 e a viabilidade foi analisada utilizando uma câmara de Neubauer de acordo com o protocolo já estabelecido (STROBER, 2001).

5.5. Citometria de fluxo e análise de apoptose

As células de CLBL-1 e MDCK foram tratadas com AZD1480 e CYT387, conforme descrito anteriormente. A avaliação do efeito dos dois fármacos inibidores de JAK-2 em relação a apoptose das células foi realizada usando o sistema padrão de marcação Annexin V em citometria de fluxo (VAN ENGELAND et al. 1998). No dia 4, as células tratadas com DMSO, AZD1480 (concentrações 2 uM e 5 uM), ou CYT387 (concentrações 1 uM e 5 uM) foram coletadas e passaram pelo processo de lavagem com Dulbecco PBS e buffer de Annexin V [0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 5 mM CaCl₂]. A escolha pelas concentrações dos fármacos testados para análise na citometria

de fluxo foi baseada nos grupos que apresentavam maiores diferenças na análise de viabilidade celular. As células na concentração de 1×10^6 células/mL foram ressuspensas em buffer de Annexin V e coradas com FIT- conjugated Annexin V (eBioscience; 1:40). Para fazer a distinção entre as células viáveis, apoptose precoce e apoptose tardia foi utilizado solução de ThermoFisher Scientific; 1:1000 sendo as células viáveis (SYTOX Red⁻, Annexin V⁻), apoptose precoce (SYTOX Red⁻, Annexin V⁺), e apoptose tardia (SYTOX Red⁺, Annexin V⁺), células em necrose (SYTOX Red⁺ Annexin V⁻) (Tabela 2). As amostras foram analisadas usando o aparelho BD LSR II (BD Biosciences) e os resultados foram analisados usando o software FlowJo v10.0.7 (Tree Star).

Tabela 2. Marcados utilizados na citometria de fluxo para avaliação do perfil de apoptose das células

	ANNEXIN V-FITC	SYTOX RED
Células viáveis	Negativo	Negativo
Apoptose precoce	Positivo	Negativo
Apoptose tardia	Positivo	Positivo
Células em necrose	Negativa	Positiva

5.6. Análise estatística

Para comparar as expressões imuno-histoquímicas de STAT3 e p-STAT3 nos diferentes tecidos analisados (linfonodos normais, linfonodos reativos e LDGCB multicêntrico) foram utilizada Análise one-way de variância ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

Para avaliar o crescimento celular em relação a cada tratamento empregado, bem como o do grupo controle foram realizadas com o teste ANOVA, seguido pelas comparações múltiplas de Dunnett's. As alterações na proporção de células em apoptose por citometria de fluxo segundo o sistema Annexin V também foram comparadas segundo o teste ANOVA, seguido pelas

comparações múltiplas de Dunnett's. Após a normalização dos dados de viabilidade celular em relação ao controle, dois testes t-Student não pareados foram usados para determinar a significância entre as linhagens de célula de CLBL-1 e MDCK, de acordo com as diferentes concentrações de AZD1480 e CYT387. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa GraphPad Prism v6.05 (GraphPad Software).

6. Resultados

6.1 Expressão de STAT 3 e p-STAT 3 em linfomas difusos de grandes células B, linfonodos normais e reativos

Para determinar se a utilização de fármacos inibidores da via JAK/STAT é relevante no tratamento de linfomas difusos de grandes células B, foram analisadas inicialmente a expressão imuno-histoquímica de STAT3 e p-STAT3 em 42 linfonodos acometidos por LDGCB multicêntricos primários, sendo: 37 linfonodos poplíteos, dois submandibulares, dois cervicais superficiais e um linfonodo inguinal, sendo que cada linfonodo era proveniente de um animal diferente. Para efeito de comparação, também foi avaliada a expressão desses mesmos marcadores em dez linfonodos reativos e dez linfonodos normais.

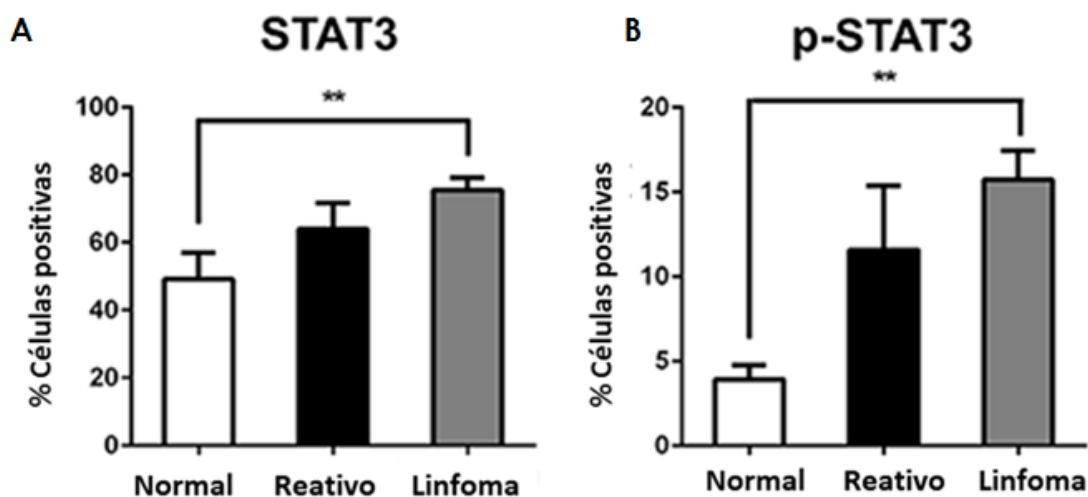
Foi detectada marcação positiva para ambos os anticorpos (STAT3 e p-STAT3) nos linfonodos normais, reativos e acometidos por LDGCB multicêntrico. Houve aumento significativo na porcentagem de células imunomarcadas para ambos anticorpos nos linfonodos neoplásicos comparados aos linfonodos normais ($p < 0,05$) e não houve diferença significativa para a expressão desses marcadores entre linfonodos reativos e neoplásicos. (Figura 3)

Na análise dos linfonodos neoplásicos, a média de células positivas para STAT3 foi de 76,31%, de 49,16% para linfonodos normais e 63,97% para linfonodos reativos (Tabela 3). Apesar de existir diferença significativa entre a marcação em linfomas difusos de grandes células B e linfonodos normais, não houve diferença significativa para a expressão desses marcadores entre linfonodos reativos e neoplásicos. (Figura 3)

A intensidade de marcação citoplasmática para STAT3 variou de fraco a fortemente positivo em todos os grupos. Exemplos de linfonodo normal e reativo com a maioria das células apresentando marcação citoplasmática de moderada a forte intensidade e de linfonodo acometido por LDGCB apresentando marcação citoplasmática com intensidade moderada podem ser vistos nas figuras 4A, 4B e 4C, respectivamente.

Quanto ao p-STAT3, a média da porcentagem de células positivas nos linfonodos acometidos por linfomas difusos de grandes células B foi de 15,42%, valor significativamente maior que a média de células positivas nos linfonodos normais (3,91%) (Tabela 3). Não houve diferença significativa para a expressão desse marcador entre linfonodos reativos e neoplásicos. (Figura 3).

A intensidade de marcação nuclear de p-STAT3 variou de fraca a fortemente positiva. Os linfonodos normais demonstraram marcação de fraca a moderada, enquanto que os linfonodos reativos e acometidos por LDGCB demonstraram marcação nuclear de moderada a fortemente positiva. Exemplos de marcação fraca em linfonodo normal e marcação de moderada a intensa em linfonodos reativos e com LDGCB podem ser vistas nas Figuras 4D, 4E e 4F, respectivamente.



Figuras 3. Representação das médias e erro padrão de porcentagem de células positivas para marcação com STAT3 e p-STAT3 entre os três grupos analisados. Comparado aos linfonodos normais (n=10) houve aumento significativo da marcação de STAT3 e p-STAT3 com os linfonodos acometidos por linfoma difuso de grandes células B caninos (n=42) (**p < 0.01). Linfonodos reativos (n=10) e linfonodos com linfoma difuso de grandes células B não diferiram.

Tabela 3. Média de porcentagem de células positivas na reação imuno-histoquímica de STAT3 e STAT-3 fosforilada (p-STAT3) em linfonodos normais caninos, linfonodos reativos e linfonodos acometidos por linfoma difuso de grandes células B.

Amostra	STAT 3	p-STAT 3
Linfonodo normal ($n=10$)	49,16 ^a %	3,91 ^a %
Linfonodo reativo ($n=10$)	63,97 ^{a,b} %	11,58 ^{a,b} %
Linfoma difuso de grandes células B ($n=42$)	76,31 ^b %	15,42 ^b %

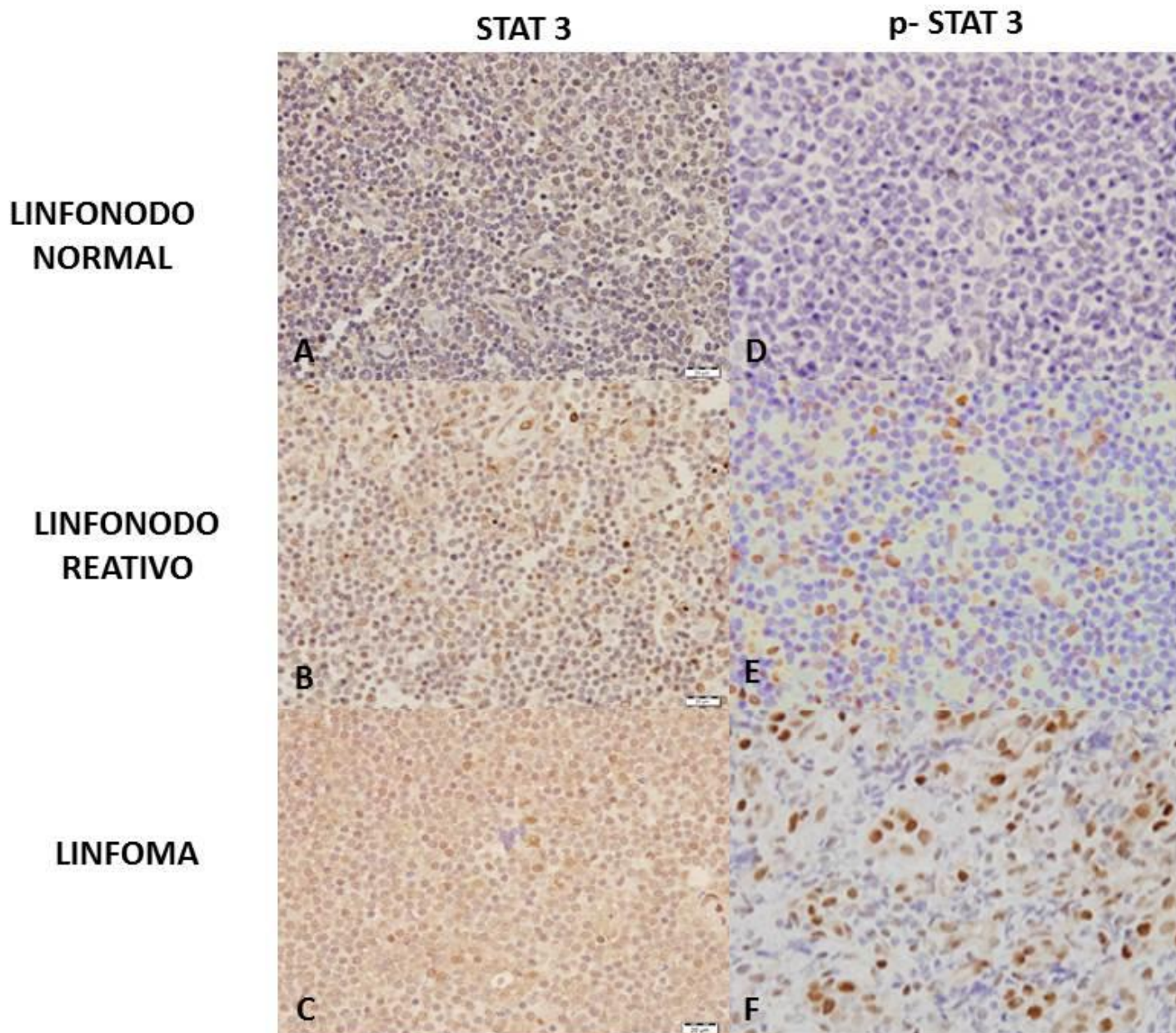


Figura 4. Imunomarcações dos anticorpos STAT3 e STAT3 fosforilado (pSTAT3) em linfomas difusos de grandes células B caninos, linfonodos reativos e normais. Fotomicrografia representativa da marcação citoplasmática de STAT 3 em linfonodo normal (A), reativo (B) e acometido por linfoma difuso de grandes células B (C). Fotomicrografia representativa da imunomarcação nuclear de p-STAT 3 em linfonodo normal (D) reativo (E) e linfonodo acometido por linfoma difuso de grandes células B (F). A escala de barras corresponde a 20 μ m. Reação imuno-histoquímica, Signal Stain®, DAB, 60x.

6.2 Avaliações dos inibidores de JAK1/2 (AZD1480 e CYT387) sobre o crescimento de linhagem celular de linfoma difuso de grandes células B *in vitro*.

Após a constatação que a via JAK2/STAT3 está superexpressa em linfomas difusos de grandes células B caninas, foi verificado o potencial terapêutico de dois inibidores de JAK2 (AZD1480 e CYT387) na linhagem de LDGCB (CLBL-1).

Foram realizados testes utilizando diferentes concentrações dos fármacos AZD1480 e CYT387 nas linhagens celulares CLBL-1 e MDCK, com o intuito de avaliar o efeito dessas moléculas no linfoma e também em células normais da mesma espécie.

Houve diminuição significativa na viabilidade celular da linhagem de CLBL-1 em ambos os tratamentos em proporções dose dependente na comparação com o grupo controle (DMSO), tanto na análise subjetiva de proliferação celular (Figura 5), como nos ensaios de viabilidade com azul tripan. O efeito inibitório dos fármacos nas células da linhagem CLBL-1 foi concentração-dependente, sendo que a quantidade de células viáveis foi menor nos grupos tratados com maiores concentrações dos fármacos (Figura 6). Em relação às células controles (MDCK), as moléculas de AZD1480 e CYT387 apresentaram moderado efeito inibitório, apenas em altas concentrações dos fármacos (Figura 6).

Com o intuito de investigar o efeito inibitório causado pelo AZD1480 e CYT387 nas células de linfoma canino em comparação com o grupo de células controle (MDCK), foi realizada a comparação da redução numérica das células da linhagem CLBL-1 em relação a MDCK (Figura 7). Após 48 e 72 horas de tratamento os dois inibidores de JAK2 testados promoveram redução significativa numérica na linhagem de CLBL-1 em comparação com MDCK-1, especialmente nas concentrações de 2 μ M e 5 μ M, sugerindo uma ação mais intensa nas células neoplásicas quando comparada a células renais caninas saudáveis (Figura 7).

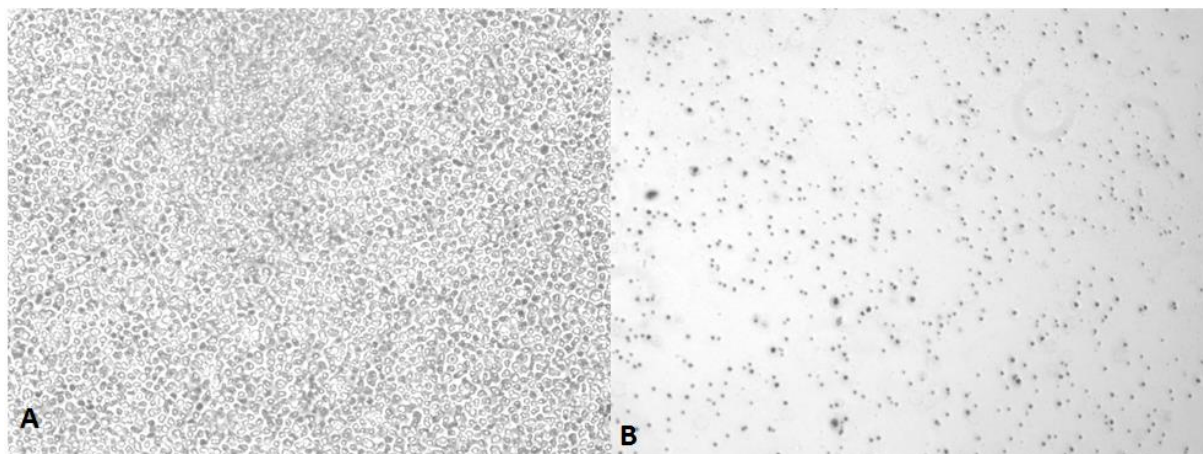


Figura 5. Análise de proliferação celular em microscopia da linhagem celular CLBL-1 no grupo controle tratado com DMSO (A) e tratado com AZD1480 na concentração de 2 μ M após 48 horas de tratamento (B).

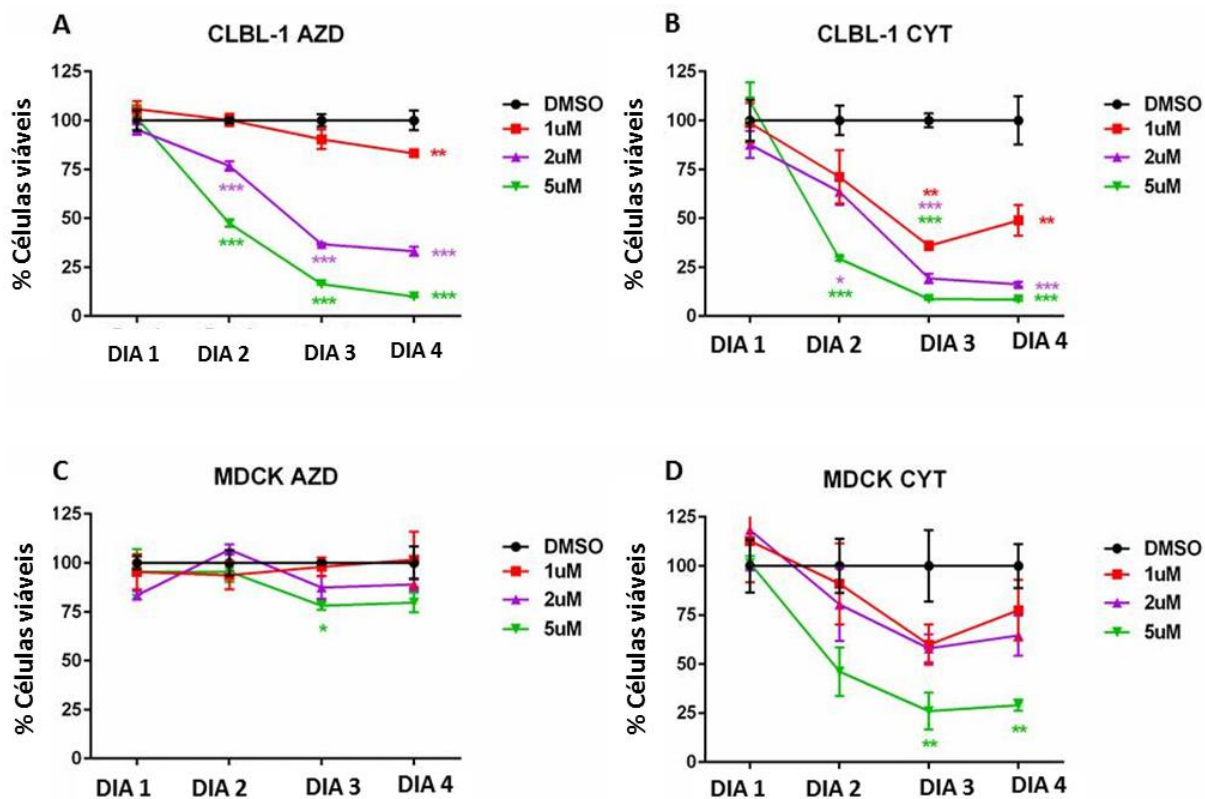


Figura 6. Inibidores de JAK2, AZD1480 e CYT387 inibem o crescimento de linhagem celular de linfoma difuso de grandes células B canino (CLBL-1) *in vitro*. Linhagens celulares de linfoma difuso de grandes células B e células renais caninas (MDCK) saudáveis foram tratadas com diferentes concentrações de AZD1480 (A e C) e CYT387 (B e D). Células tratadas com DMSO foram utilizadas como tratamento controle. Dia 1 representa o momento da incubação com os dois fármacos testados e os dias 2, 3 e 4 representam, respectivamente, 24, 48 e 72 horas após tratamento. A porcentagem de crescimento foi normalizada de acordo com o grupo controle tratado com DMSO. Os resultados estão apresentados de acordo com a média \pm média de erro padrão * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

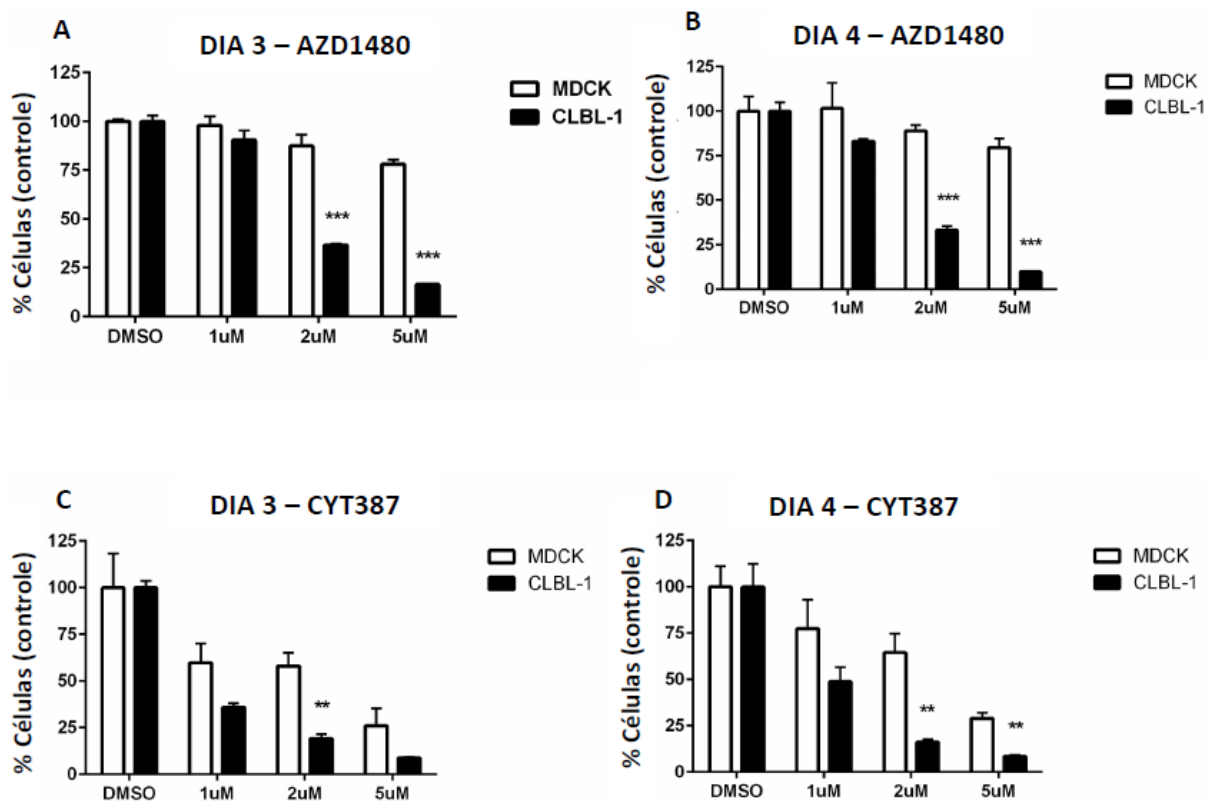


Figura 7. Células de linfoma difuso de grandes células B canino (CLBL-1) foram mais sensíveis aos inibidores de JAK-2 (AZD1480 e CYT387), quando comparadas ao grupo de células controles renais caninas (MDCK). A redução no crescimento celular foi mais significativa após 48 (dia 3) e 72 horas (dia 4) pós-tratamento. A porcentagem de crescimento foi normalizada de acordo com o grupo controle de tratamento (DMSO) ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Os resultados estão apresentados de acordo com a média \pm média de erro padrão

6.3. AZD1480 e CYT387 inibem o crescimento da linhagem celular de linfomas difusos de grandes células B através do aumento da apoptose

Para compreender o mecanismo pelo qual os inibidores de JAK2 AZD1480 e CYT387 reduzem o crescimento celular da linhagem CLBL-1, foi realizada citometria de fluxo para verificar se a redução do número de células viáveis decorria da indução de apoptose. No dia 4 do tratamento, as células CLBL-1 e MDCK foram imunomarcadas com Annexin V e Sytox Red e analisadas em citômetro de fluxo, conforme descrito anteriormente (Tabela 2).

Na comparação entre os fármacos testados e o DMSO, houve diminuição significativa das células viáveis na linhagem de CLBL-1 e aumento da apoptose

a medida que se aumentava a concentração dos fármacos (dose-dependente). As células MDCK tratadas com ambos os fármacos não apresentaram taxas significativas de apoptose (Tabela 4, Tabela 5 e Figura 8).

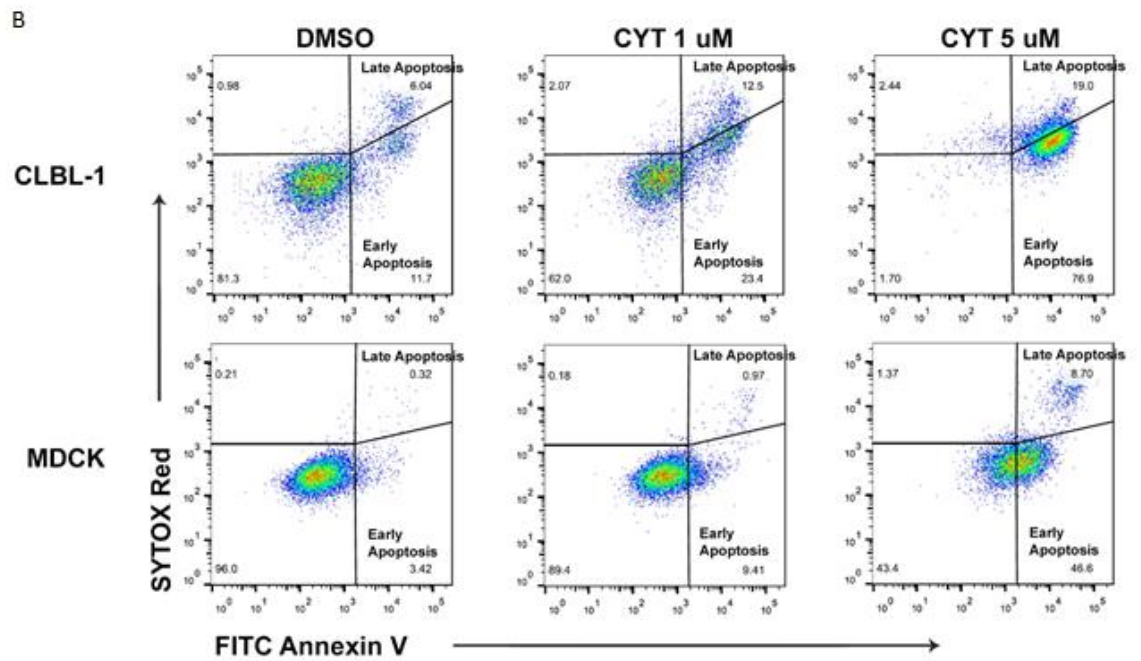
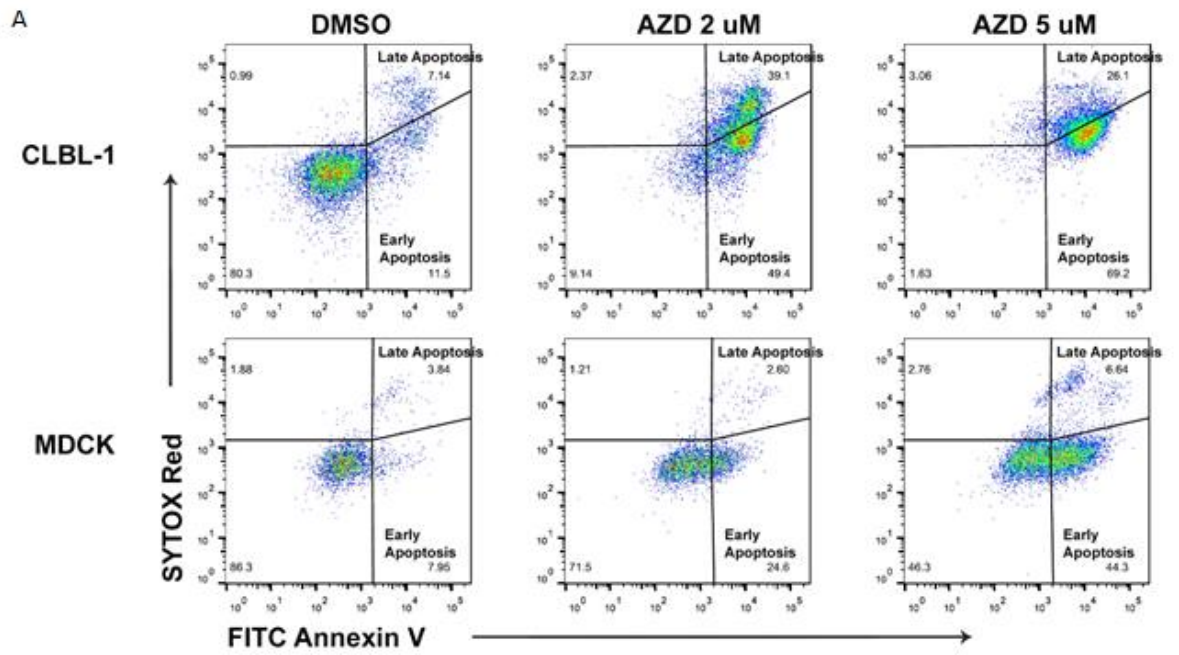
Os resultados sugerem que o efeito pró apoptótico dos inibidores de JAK-2 testados seja mais intenso na linhagem celular de linfoma do que na linhagem celular normal (MDCK). Esses resultados então em concordância com os resultados encontrados na análise de proliferação celular.

Tabela 4. Porcentagem de células viáveis, em apoptose precoce, apoptose tardia e células em necrose nas linhagens celulares CLBL-1 e MDCK tratadas com AZD1480.

Tratamento com AZD1480	Células viáveis	Apoptose precoce	Apoptose tardia	Células em necrose
CLBL-1 DMSO	72,7	16	7,64	3,61
CLBL-1 AZD1480 2 μ M	13,2	33,6	16,3	7,01
CLBL-1 AZD1480 5 μ M	1,63	69,2	26,1	3,06
MDCK DMSO	92,9	4,35	2,15	0,6
MDCK AZD1480 2 μ M	87,1	9,54	2,06	1,33
MDCK 5 AZD1480 5 μ M	77,2	16,6	3,57	2,64

Tabela 5. Porcentagem de células viáveis, em apoptose precoce, apoptose tardia e células em necrose nos grupos de linhagem CLBL-1 e MDCK tratados com CYT387

Tratamento com CYT387	Células viáveis	Apoptose precoce	Apoptose tardia	Células em necrose
CLBL-1 DMSO	65,1	19,9	7,11	7,84
CLBL-1 CYT387 1 μ M	73,9	14,1	8,72	3,3
CLBL-1 CYT387 5 μ M	2,83	74,3	19,5	3,33
MDCK DMSO	95,9	3,6	0,29	0,17
MDCK CYT387 1 μ M	88,6	10,3	0,9	0,18
MDCK 5 CYT387 5 μ M	55,8	39,3	4,37	0,56



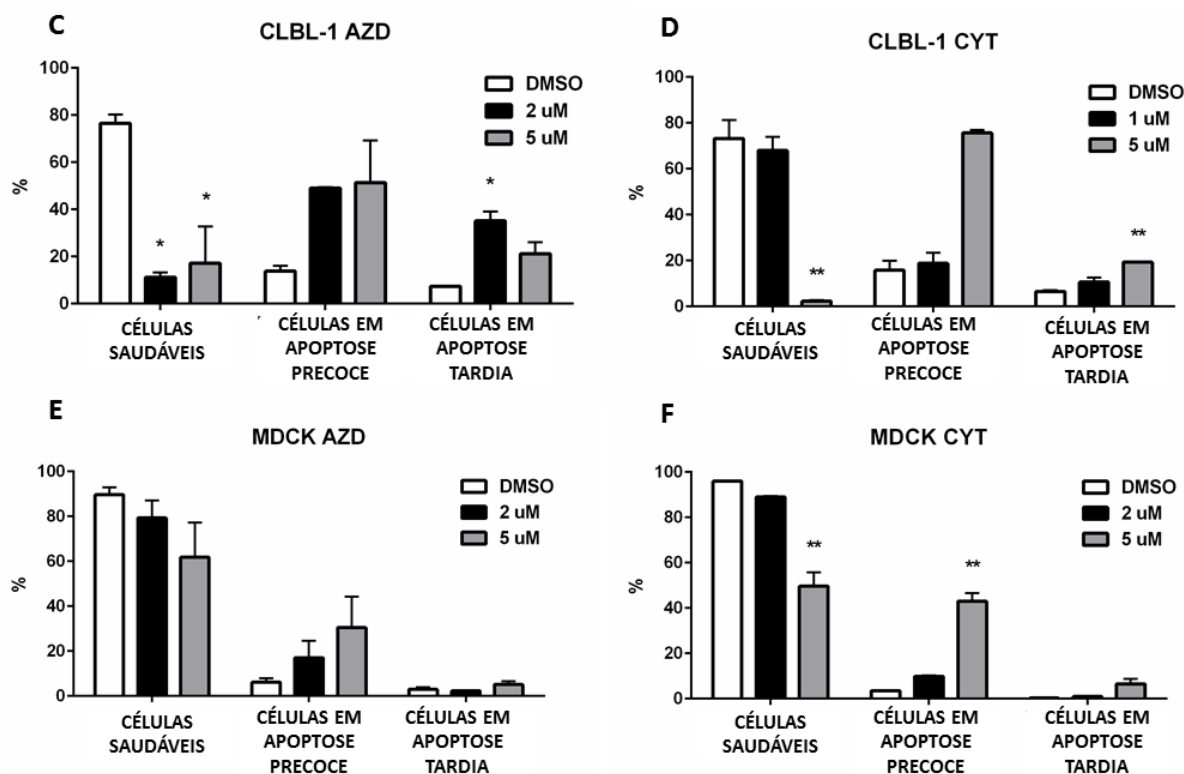


Figura 8. Tratamento com inibidores de JAK2 induz maiores taxas de apoptose em linhagem de células de linfoma difuso de grandes células B canino em comparação com células renais caninas (MDCK). Porcentagem de células em apoptose nos grupos tratados com AZD1480 (A) e CYT387 (B), na análise por citometria de fluxo usando o sistema Annexin V/SYTOX Red. Células saudáveis (Annexin V⁻, SYTOX Red⁻), apoptose precoce (Annexin V⁺, SYTOX Red⁻) e apoptose tardia, Annexin-V (+), SYTOX Red (+). (C) A porcentagem de células saudáveis foi maior no grupo tratado com DMSO em comparação com os tratamentos com AZD nas concentrações 2 e 5 uM. (D) A porcentagem de células saudáveis foi maior no grupo tratado com DMSO em comparação com os tratamentos com CYT387 nas concentrações de 5 uM. As porcentagens de células em apoptose precoce foi significativamente maior nas concentrações de 5 uM um para os dois inibidores de JAK-2 em comparação com o grupo DMSO (E) Não houve diferença significativa entre o tratamento com AZD1480 nas células MDCK. (F) Diminuição na porcentagem de células saudáveis e aumento das células em apoptose tardia foram verificadas nas concentrações de 5 uM nas células tratadas com CYT387. Os resultados estão apresentados de acordo com a média \pm média de erro padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7. DISCUSSÃO

A via JAK/STAT tem sido estudada em diversas neoplasias hematopoiéticas humanas e os resultados demonstram participação importante dessa via nos processos de carcinogênese, como ativação da proliferação celular, metástase, angiogênese. Apesar de bem documentada em oncologia humana, poucos estudos foram realizados a respeito da participação da via JAK/STAT em neoplasias em cães e gatos (PETTERINO et al., 2006; KROL et al., 2011; FOSSEY et al., 2011). Até o momento não existem dados avaliando a via do JAK/STAT em linfomas em cães, portanto essa pesquisa é a primeira a demonstrar que a via STAT3 está superexpressa em LDGCB multicêntrico.

A metodologia utilizada na avaliação da expressão imuno-histoquímica desses marcadores foi baseada na porcentagem de células positivas em relação ao número total de células analisadas em cinco campos de maior representação sem levar em consideração a intensidade de marcação, pois essa pode apresentar influência do protocolo utilizado e sofrer variações relacionadas à técnica e aos corantes sem necessariamente representar diferenças biológicas que estão acontecendo no tecido.

O presente estudo demonstrou que tanto a expressão de STAT3 como a sua forma fosforilada (p-STAT3) apresentaram aumento nos LDGCB multicentrico caninos. Estudos preliminares desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a sobrevida média de pacientes com alta expressão de STAT3 foi significativamente inferior à sobrevida de pacientes com baixa expressão de STAT3 (143 dias x 283 dias respectivamente). Não houve diferença na sobrevida de pacientes com baixa ou alta expressão de p-STAT3 (PAN et al., 2016). A limitação de estudos retrospectivos dessa natureza está no fato que os pacientes não foram submetidos a tratamentos quimioterápicos uniformes e essa variável pode influenciar nos resultados apresentados. Estes dados tornam interessante a realização de estudos futuros sobre a correlação entre a ativação da via STAT3 e o prognóstico dos cães com linfoma multicêntrico canino.

Em oncologia humana diversas pesquisas concluíram que a alta expressão de STAT3 e p-STAT3 em linfomas pode estar relacionada à diminuição na sobrevida dos pacientes e conseqüentemente pior prognóstico

(SUNG et al., 2010; OK et al., 2014). Este fato pode ser explicado pelo fato da participação da via JAK/STAT em processos celulares como diferenciação, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (WU et al., 2011).

Ding et al. (2008) documentaram que a ativação de STAT3 promoveu a proliferação celular em LDGCB subtipo células ativadas. Altas expressões de STAT 3 foram encontradas em linfomas B ativados e alguns linfomas de centro germinativo. A ativação de STAT3 avaliada por imuno-histoquímica foi associada à diminuição da sobrevivência em 185 pacientes com linfomas difusos de grandes células B tratados com R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) (HUANG et al., 2013).

Sung et al. (2010) observaram correlação entre a expressão de p-STAT3 e survivina (proteína anti apoptótica) em linfomas difusos de grandes células B humanos e ambas foram relacionadas a fator prognóstico negativo. No grupo de pacientes que foram negativos para p-STAT3, a média de sobrevivência dos pacientes foi de 163,5 meses comparado à sobrevivência média de 22,2 meses no grupo que apresentou positividade para p-STAT3 (SUNG et al., 2010). No estudo de Ok et al. (2014) a expressão de p-STAT3 foi mais comumente observada em LDGCB subtipo células ativadas em estágios avançados com envolvimento extranodal e prognóstico desfavorável. Embora ainda tenhamos apenas resultados preliminares em estudos retrospectivos não randomizados, a alta expressão de STAT3 foi correlacionada com menor sobrevivência dos pacientes na análise realizada pelo nosso grupo de pesquisa, tornando a avaliação da participação de STAT3 e p-STAT3 como fator prognóstico um assunto a ser investigado de forma mais detalhada em estudos futuros (PAN et al., 2016).

Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão de STAT3 e p-STAT3 entre os linfonodos reativos e os acometidos por linfoma. Este fato pode ser explicado avaliando a participação da via do STAT3 também em processos inflamatórios, infecciosos e imunomediados (YU et al., 2009, O'SHEA et al., 2013). A via STAT3 é fundamental no desenvolvimento de linfócitos T CD8 de memória e linfócitos T produtores de interleucina 17 (O'SHEA et al., 2013). A correlação entre inflamação, imunidade e desenvolvimento de neoplasias já é algo fundamentado (YU et al., 2009; HE et al., 2011). Além disso, estudos prévios mostraram que a ativação de STAT3

pode induzir o desenvolvimento de um microambiente inflamatório pró cancerígeno (YU et al., 2009).

Embora a quimioterapia padrão com o protocolo CHOP possa prolongar a sobrevivência dos cães com linfoma difuso de grandes células B, a cura ainda é rara, fazendo com que o tratamento desses pacientes ainda seja um desafio crescente na rotina oncológica e tornando necessária a busca por novas modalidades terapêuticas como as terapias alvos.

O estudo de vias como JAK/STAT que participam do processo de carcinogênese é de suma importância na tentativa de desenvolvimento de fármacos alvos específicos capazes de bloquear essas vias alteradas e contribuir para o controle neoplásico. Uma vez estabelecida a participação da via JAK2/STAT3 no desenvolvimento do LDGCB canino, foram realizados ensaios *in vitro* sobre a utilização de fármacos inibidores de JAK2 capazes de bloquear essa via na tentativa de inibir a proliferação celular de células de linfoma canino.

O presente estudo é o primeiro a avaliar os efeitos terapêuticos do AZD1480 e CYT387 em linhagens celulares de LDGCB multicêntrico canino e os resultados demonstraram que ambas as moléculas podem inibir a proliferação celular através da indução de apoptose em linfomas com resposta dependente das concentrações dos fármacos.

O ensaio para determinação da viabilidade celular após o tratamento como os inibidores de JAK2 avaliados utilizou o teste de azul tripan que é considerado um ensaio rápido, barato e de fácil aplicação uma vez que durante a execução do experimento diversas contagens celulares foram realizadas diariamente em um grande número de amostras, pois todos os tratamentos foram realizados em triplicata e o experimento realizado três vezes. O ensaio de azul tripan se baseia no princípio que células viáveis permanecem com as membranas celulares intactas após adição de corantes e que as células mortas não mantêm a membrana intacta, portanto absorvem o corante no citoplasma facilitando a distinção entre elas na análise de microscopia (STROBER et al., 2001).

Steven et al., (1993) comparou o teste de azul tripan com os ensaios de fluorescência na análise de viabilidade celular de mamíferos. Os autores concluíram que nas fases iniciais do crescimento celular não houve diferença

entre as duas técnicas, porém que nas fases mais avançadas do crescimento celular, o ensaio com azul tripan superestimou a viabilidade celular, sendo que o número de células viáveis na análise de fluorescência foi menor quando comparada ao azul tripan. Esses resultados podem inferir que a taxa de células viáveis foi ainda menor nos grupos testados, reforçando a eficácia *in vitro* dos tratamentos testados.

Uma limitação dos resultados apresentados, porém que está sendo retificada pelo nosso grupo de pesquisa é a realização da análise de fosforilação de STAT3 na linhagem celular testada. Estudos através da técnica de *western blot* estão sendo desenvolvidos para verificar o perfil de fosforilação antes e após o tratamento com AZD1480 e CYT387. O objetivo desses novos experimentos é provar que o mecanismo envolvido na inibição da proliferação celular está relacionado particularmente com a via JAK2/STAT3 e não através de outras vias de sinalização pelas quais essas moléculas podem participar.

Diversos inibidores competitivos de ATP tipo I de via JAK2 incluindo AZD1480 e CYT387 estão sendo estudados em *clinical trial* humanos para várias neoplasias sólidas e hematopoiéticas (VAINCHENKER et al., 2013).

Estudos em humanos revelaram resultados promissores do uso de inibidores de JAK2 em neoplasias sólidas e hematopoiéticas. Younes et al., (2012) em um estudo em fase I concluíram que o inibidor oral de JAK2 SB1518 demonstrou resultados satisfatórios em 34 pacientes com recidiva de linfomas Hodgkin e não Hodgkin refratários ao tratamento convencional. Nesse estudo 3 pacientes obtiveram resposta parcial e 15 pacientes tiveram doença estável.

O AZD1480 foi primeiramente descrito por Ioannidis et al., (2011) como um pirazol-3-ylpyrimidin-4-aminas, como um potente inibidor de JAK1 e JAK2. Hedvat et al., (2009) demonstraram que a molécula de AZD1480 pode inibir a fosforilação de STAT3 e a translocação nuclear bloqueando o crescimento tumoral em diferentes concentrações em estudos *in vitro*. Em um modelo experimental com cobaias, AZD1480 inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose em linhagens celulares de neuroblastoma pediátrico e sarcomas através da inibição da via STAT3 (YAN et al., 2013). Resultados semelhantes foram obtidos em linhagens celulares de mieloma múltiplo (SCUTO et al., 2011). Esses dados estão de acordo com os resultados apresentados no presente ensaio, uma vez que o AZD1480 foi capaz de inibir a proliferação

celular em dose dependente na linhagem células CLBL-1 confirmando sua atividade antineoplásica.

O CYT387 é um inibidor de JAK1 e JAK2 que foi primariamente desenvolvido para o tratamento de mielofibrose em seres humanos (SCUTO et al., 2011). Essa molécula foi bem tolerada em estudos clínicos não randomizados com benefício clínico em pacientes com mielofibrose de risco moderado a alto tendo respostas em relação aos quadros de anemia e sinais relacionados a esplenomegalia (PARDANANI et al., 2013). Resultados similares foram observados em linhagens humanas de mieloma múltiplo tanto de forma isolada quando combinada as terapias convencionais como melfalano. O CYT387 foi capaz de prevenir a fosforilação de STAT3 induzida por IL-6 e diminuir a proliferação celular em 6/8 linhagens de mileoma múltiplo em resposta dependente de dose através da indução da apoptose. (MONAGHAN et al., 2011).

Apesar de diversos estudos com AZD1480 e CYT387 em distúrbios mieloproliferativos humanos como mieloma múltiplo e mielofibrose, não há dados da eficácia deles em linhagens células de LDGCB multicentrico humano.

A inibição do via do JAK2/STAT3 no tratamento de neoplasias está fundamentada na participação dessas em diversos processos celulares, uma vez que a STAT3 é um ponto de convergência para diversas vias oncogênicas.

Embora vários processos possam estar relacionados à diminuição da proliferação celular na linhagem celular estudada, a indução da apoptose foi o mecanismo escolhido para estudo detalhado no presente ensaio e os resultados demonstraram que a utilização de inibidores de JAK2 promoveu a apoptose nas linhagem celular de LDGCB.

Estudos em oncologia humana também correlacionaram à utilização de inibidores de JAK2 e a indução de apoptose em neoplasias hematopoiéticas. A ativação de STAT3 foi relacionada a expressão de proteínas da família Bcl-2 (CATLETT-FALCONI et al., 1999; EPLING-BURNETTE et al., 2001). A inibição de STAT3 está associada ao aumento da apoptose e o decréscimo da expressão de Mcl-1 em leucemias de linfócitos granulares (EPLING-BURNETTE et al., 2001). Nas células de mieloma, a ativação de STAT3 e a translocação nuclear promoveram a expressão de genes relacionados a produção de IL-6 (CATLETT-FALCONI et al., 1999). Enquanto que a IL-6

promove a expressão de proteínas relacionadas a maior sobrevivência celular como a Bcl-xl, a inibição de JAK-2 pode inibir a expressão dessas proteínas (XIN et al. 2011). Além disso, Aoki et al., (2003) demonstraram que a inibição de STAT3 induz apoptose através do decréscimo de survivina, uma proteína anti-apoptótica expressa em alguns linfomas em humanos (AOKI et al., 2003).

Estudos futuros direcionados na regulação gênica das proteínas da família do Bcl-2 podem identificar os mecanismos envolvidos na indução de apoptose pelas moléculas de AZD1480 e CYT387 em LDGCB multicêntrico caninos.

Outros mecanismos além da apoptose podem estar relacionados a diminuição da proliferação celular na linhagem CLBL-1, uma vez que a inativação de STAT3 pela utilização de inibidores de JAK2 é associada com a diminuição de proteínas CyclynD1, é fundamental a avaliação dos efeitos do AZD1480 e CYT387 na proliferação e ciclo celular (GUO et al., 2014).

Perspectivas futuras incluem o impacto do AZD1480 e CYT387 nos processos de angiogênese e metástase, uma vez que o AZD1480 apresenta propriedades anti-angiogênicas e anti metastáticas através da inibição de VEGF e MMP9 (XIN et al., 2011). Alguns autores enfatizaram que a expressão de STAT3 contribui para angiogêneses através da correlação com o VEGF e que a supressão de STAT3 pode funcionar como terapia antiangiogênica (NIU et al., 2002). Esses resultados abrem um amplo campo de investigação a respeito dos mecanismos envolvidos na inibição da proliferação celular em estudos futuros com inibidores de JAK2 em linfomas caninos.

A observação que os inibidores de AZD1480 e CYT387 reduziram as taxas de proliferação celular e induziram a apoptose nas linhagens de CLBL-1 em proporções significativamente maiores que as células controles (MDCK), tornam esses fármacos promissores através da possibilidade de um efeito mais seletivo em células hematopoiéticas neoplásicas quando comparadas a células saudáveis. Tyner et al., (2009) analisando CYT387 em linhagens celulares hematopoiéticas neoplásicas verificaram resultados semelhantes, pois houve supressão do crescimento celular e indução de apoptose nas células hematopoiéticas neoplásicas nas concentrações de 0,5 e 1,5 μM sem interferência significativa nas linhagens celulares não hematopoiéticas

Uma das limitações desse estudo *in vitro* a respeito da seletividade dos fármacos é que apenas uma linhagem celular controle foi testada e a mesma apresentava origem renal, portanto diferente da origem celular da neoplasia estudada que foram as células linfoides neoplásicas. Estudos futuros são necessários sobre a influência do AZD1480 e CYT387 em precursores linfoides na medula óssea e em linfócitos maduros.

A toxicidade de determinados fármacos pode ser diferente entre as espécies, portanto existe a necessidade de estudos futuros sobre a segurança dos inibidores de JAK2 em cães. Em humanos, um estudo em 60 pacientes portadores de mielofibrose a respeito da eficácia e segurança do CYT387 verificou como efeitos adversos significativos (grau 3/4) trombocitopenia (32%), hiperlipasemia (5%), aumento das enzimas hepáticas (3%) e cefaleia (3%) (PARDANANI et al., 2013). Após a constatação de que a via de JAK-2/STAT3 está superexpressa em LDGCB caninos e que a utilização de fármacos inibidores de JAK2 podem ser promissores no tratamento dessa doença, a reprodução desses estudos em cobaias com posteriores estudos de segurança desses fármacos em pacientes caninos são necessários para o desenvolvimento de *clinical trials* sobre a eficácia do AZD1480 e CYT387 em cães portadores de LDGCB.

8. CONCLUSÃO

Há um aumento significativo na expressão de STAT3 e p-STAT3 em LDGCB multicêntrico em cães comparada a linfonodos normais, confirmando a hipótese que a via de STAT3 está superexpressa nessa doença.

Os inibidores de JAK1/2 como o AZD1480 e CYT387 inibiram o crescimento da linhagem celular de LDGCB multicentrico (CLBL-1) e promoveram apoptose dependente das concentrações de fármacos utilizados, reforçando a teoria do potencial benefício terapêutico da utilização de inibidores de JAK2 no tratamento do LDGCB multicentrico, possibilitando a realização de novos estudos na tentativa de buscar novas estratégias no tratamento dessa importante neoplasia hematopoiética em cães.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAS, S.; BONAVIDA, B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. **Clinical Cancer Research**. v.9, n.1, p.316-326, 2003.
- AMIN, H.M.; MCDONNELL, T.J.; MA, Y.; LIN, Q.; FUJIO, Y.; KUNISADA, K.; LEVENTAKI, V.; DAS, P.; RASSIDAKIS, G.Z.; CUTLER, C.; MEDEIROS, L.J.; LAI, R. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. **Oncogene**. v.23, n.32, p.5426-5434, 2004.
- BRODSKY, E.M.; MAUDLIN, G.N.; LACHOWICZ, J.L.; POST, G.S. Asparaginase and MOPP Treatment of Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V.23, n.3p. 578–584, 2009.
- BURTON, J.H.; GARRET-MAYER, E.; THAMM, D.H. Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.11, n.4, p.306-315, 2012.
- CARDOSO, M.J.L. et al. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. **Biosci. J.**, v. 19, n. 3, p. 131-142, 2003.
- BEAVER, L.M.; STROTTNER, G.; KLEIN, M.K. Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008). **J Am Vet Med Assoc**.v.237, .n.9, P.1052-1055, 2010.
- CARDOSO, M.J.L. et al. Linfoma canino-achados clínico-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.25-29, 2004.
- CHEN, Z.; HAN, Z. C. STAT3: A critical transcription activator in angiogenesis. **Medical Research Review**, v.28, n.2, p.185-200, 2008.
- CHUN R, GARRETT LD AND VAIL DM. Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V.14, p.120–124, 2000.
- CHUN. R. Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? **Topics in Companion Animal Medicine**., v. 24, n. 3, p. 157-62, 2009.
- COSGROVE S.B.; WREN J.A.; CLEAVER D.M.; WALSH K.F.; FOLLIS, S.I. FOLLIS, VICKIE I. KING V.I.; TENA J.K.S, STEGEMANN, M.R. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel_) in client-owned dogs with atopic dermatitis. **Vet Dermatol**. V.24, p. 587–e142, 2013^a.

COSGROVE, C.; WREN, J.A.; CLEAVER, D.M.; MARTIN, D.D.; WALSH, K.F.; HARFST, J.A.; FOLLIS, J.L.; KING, V.L.; BOUCHER, J.F.; STEGEMANN, M.R. Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. **Vet Dermatol**, v. 24, p.479–488, 2013.

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

CURRAN, K.; THAMM, D.M. Retrospective analysis for treatment of naïve canine multicentric lymphoma with 15 week maintenance-free CHOP protocol. **Veterinary Comparative Oncology**, v.14, p.147-155, 2016.

DÍAZ, T.; NAVARRO, A.; FERRER, G.; GEL, B.; GAYA, A.; ARTELLS, R.; BELLOSILLO, B.; GARCIA-GARCIA, M.; SERRANO, S.; MARTINEZ, A.; MONZO, M. Lestaurtinib inhibition of the JAK/STAT signaling pathway in Hodgkin lymphoma inhibits proliferation and induces apoptosis. **Plos One**, v.6, n.4, p. 18856, 2011.

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

DING BB, YU JJ, YU RY, MENDEZ LM, SHAKNOVICH R, ZHANG Y, CATTORETTI G, YE BH. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. **Blood**. v. 111, n.3, p.1515-1523, 2008.

ERNST, T.; KESSLER, M.; LAUTSCHAM, E.; WILLIMZIG, L.; NEIGER, R.; Multicentric lymphoma in 411 dogs - an epidemiological study. **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere**. v.44, n.3, p. 2016.

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

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

FOSSEY SL, BEAR MD, KISSEBERTH WC, PENNELL M, LONDON CA. Oncostatin M promotes STAT3 activation, VEGF production, and invasion in osteosarcoma cell lines. **BMC cancer**. V.11, P. 125-136, 2011.

GADEYNE, C.; LITTLE, P.; KING, V.L.; EDWARDS, N.; DAVIS, K.; STEGEMANN, M.R. Efficacy of oclacitinib (Apoquel_) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia . **Vet Dermatol**. V.25, P.512-521, 2014

GARRETT LD, THAMM DH, CHUN R, DUDLEY R AND VAIL DM. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V.16, p. 704–709, 2002.

GONZALES, J.A.; BOWMAN, J.W.; FICI, G.J; ZHANG,M.; MANN,D.W.; MITTON-FRY, M. Oclacitinib (APOQUEL[®]) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 37, n. 4, p.317-324, 2014.

GREENLEE, P.G. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer, Philadelphia**, v.66, p.480-490, 1990.

JATIANI SS, BAKER SJ, SILVERMAN LR AND REDDY EP. Jak/Stat pathway in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for target therapies. **Genes & Cancer** v.10, p.979-993, 2011.

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

KAISER CI, FIDEL JL, ROOS M AND KASER-HOTZ B. Reevaluation of the University ofWisconsin 2-year protocol for treating canine lymphosarcoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**. V.43, p.85–92, 2007.

KROL M, PAWLOWSKI KM, DOLKA I, MUSIELAK O, MAJCHRZAK K, MUCHA J, MOTYL T. Density of Gr1-positive myeloid precursor cells, p-STAT3 expression and gene expression pattern in canine mammary cancer metastasis. **Veterinary research communications**. V.37, n.7, p.409-423, 2011.

MACDONALD VS, THAMM DH, KURZMAN ID, TUREK MM AND VAIL DM. Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V.19, p. 732–736, 2005.

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

MARCONATO, L.; STEFANELLO, D.; VALENTI, P.; BONFANTI, U.; COMAZZI, S.; ROCCABIANCA, P.; CANIATTI, M.; ROMANELLI, G.; MASSARI, F.; ZINI, E. Predictors of long term survival in dogs with high grade multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 238, n.4, p.480-485, 2011.

MODIANO, JAIME F. MATTHEW BREEN, ROBERT C. BURNETT, HEIDI G. PARKER, SEIDU INUSAH, DISTINCT RACHAEL THOMAS, PAUL R. AVERY, KERSTIN LINDBLAD-TOH, ELAINE A. OSTRANDER, GARY C. CUTTER, AND ANNE C. AVERY. B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence . among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. **Cancer Res**. V.64, n.13. 2005

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

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

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

NIU, G.; WRIGHT, K.L.; HUANG, M.; SONG, L.; HAURA, E.; TURKSON, J.; ZHANG, S.; WANG, T.; SINIBALDI, D.; COPPOLA, D.; HELLER, R.; ELLIS, L.M.; KARRAS, J.; BROMBERG, J.; PARDOLL, D.; JOVE, R.; YU, J. Constitutive Stat3 activity upregulated VEGF expression and tumor angiogenesis. **Oncogene**, v. 21, p.2000–2008, 2002.

PAN, X.; JARK, P.C.; HONG, C.; RUETTEN, H.; BOLLIG, N.; PINKERTON, M. STAT3 Pathway is Upregulated in Canine Diffuse Large B Cell Lymphomas and is Associated with a Poor Prognosis. In: AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE, 2016, Denver, Anais, 2016. p.544.

PARDANANI A, LABORDE RR, LASHO TL, FINKE C, BEGNA K, AL-KALI A, HOGAN WJ, LITZOW MR, LEONTOVICH A, KOWALSKI M, TEFFERI A. Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. **Leukemia**. V.27,n.6, p.1322-1327, 2013.

PETTERINO C, ROSSETTI E, DRIGO M. Immunodetection of the signal transducer and activator of transcription-3 in canine haemangioma and haemangiosarcoma. **Research in Veterinary Science**.v.80, n.2, p.186-188, 2006.

PLIMACK ER, LORUSSO PM, MCCOON P, TANG W, KREBS AD, CURT G. A Phase I Study of a Novel JAK2 Inhibitor in Solid Tumors, AZD1480. **The Oncologist**. V.18, p.819-820, 2013.

PONCE, F.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P.; TURINELLI, V.; LEDIEU D, BONNEFONT, C.; PASTOR, M.; DELIGNETTE, M.L.; FOURNEL-FLEURY, C. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Vet Pathol**. V.47, n.3, p.414-433, 2010.

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

QUINTAS-CARDAMA, A.; VERSTOVSEK, S. Molecular pathways: JAK/STAT pathway: mutation, inhibitors and resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n.8, p.1933-1940, 2013.

REBHUN, R.B.; KENT, M.S.; BORROFKA, S.A.; FRAZIER, S.; SKORUPSKI K.; RODRIGUEZ, C.O. CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol*. V.9, n.1, p.38-44, 2011.

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

SUEIRO, FAR; ALESSI, AC.; VASSALO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **J Comp Pathol**. V.131, p.207-213, 2004.

RÜTGEN, B.C.; HAMMER, S.E; GERNER,W.; CHRISTIAN, M.; DE ARESPOCHAGA, A.G.; WILLMANN, M.; KLEITER, M.; SCHWENDENWEIN I.; SAALMÜLLER, A. Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. **Leuk Res**, v.34, n.7. p.932-938, 2010.

RUSLANDER, D.A.; GEBHARD, D.H.; TOMPKINS, M.B.; GRINDEM, C.B.; PAGE, R.L. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. **In Vivo**. V. 11, p. 169-172, 1997.

SCUTO A, KREJCI P, POPPLEWELL L, WU J, WANG Y, KUJAWSKI M, KOWOLIK C, XIN H, CHEN L, WANG Y, KRETZNER L, YU H, WILCOX WR, YEN Y, FORMAN S, JOVE R. The novel JAK inhibitor AZD1480 blocks STAT3 and FGFR3 signaling, resulting in suppression of human myeloma cell growth and survival. **Leukemia**. V.25,n.3, p.538-550, 2011.

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

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**. - John Wiley & Sons, Inc. 2001.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet. Q.*, v. 16, p. 209-19, 1994.

SORENMO K, OVERLEY B, KRICK E, FERRARA T, LABLANC A AND SHOFER F. Outcome and toxicity associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol in canine lymphoma: 130 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**. V.8. p. 196–208, 2010.

STEVEN, A.; ALTMAN, L.R.; GOVIND, R.A.O. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations **Biotechnol. Prog.** V.9,n.6, p. 671–674, 1993.

TYNER, J.W.; BUMM, T.G.; DEININGER, J.; WOOD, L.; AICHBERGER, K.J.; LORIAUX, M.M.; DRUKER, B.J.; BURNS, C.J.; FANTINO, E.; DEININGER, M.W. CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 115, P. 5232-5240, 2010.

TRUNG, L.Q.; ESPINOZA, J.L.; TAKAMI, A.; NAKAO, S. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in malignant NK cells via JAK2/STAT3 pathway inhibition **Plos One**, v.8, n.1, p.55183, 2013.

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

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

VAIL, D.M.; PINKERTON, M. E.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Small animal clinical oncology. 5. ed., Missouri: Saunders, 2013. p. 621-692.

VALLI, V.E.O. The hematopoietic system. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. (Ed) Pathology of domestic animals, 6.ed. New York: Academic, v.3, p.149-153, 1993.

VAN ENGELAND, M.; NIELAND L. J.W., FRANS C.S. RAMAEKERS, BERT SCHUTTE, AND CHRIS P.M. REUTELINGSPERGER Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. **Cytometry** v.31:p.1–9,1998.

VICTOR E.; VALLI M.; SAN MYINT A.; BARTHEL D.; BIENZLE J.; CASWELL F.; COLBATZKY, Y. JOHNSON, Y. et al. . Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. **Veterinary Pathology**, p. 1-14, 2010.

VALLI, V.E. et.al. Classification of canine malignant lymphoma according to the World Health Organization criteria. **Vet Pathol**, 48, p. 198-211, 2011.

VALLI, VE, KASS, PH,; MYINT, M,; SCOTT, F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. **Veterinary Pathology**. v.50, n.5, p.738-748, 2013.

VANG, T. et al. Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein Kinase A inhibits T cell receptor signaling. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 2003.

WU Z,L.; SONG, Y.Q.; SHI, Y.F; ZHU, J. High nuclear expression of STAT3 is associated with unfavorable prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of hematology & Oncology**.v.4, n.1, p.31-38, 2011.

YOUNES, A.; ROMAGUERA, J.; FANALEMET, A.L. Phase I study of a novel oral Janus kinase 2 inhibitor, SB1518, in patients with relapsed lymphoma: Evidence of clinical and biologic activity in multiple lymphoma subtypes. **Journal Clinical Oncology** v.30, p.4161-4167, 2012.

ZHAO, M.; GAO, F.; WANG, J.; LIU, F.; YUAN, H.; ZHANG, W.; BIN, J. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer. **Lung cancer**, v.73, n.3, p. 366-374, 2011.