

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RAS, 4E-BP1 E S6K1 EM
CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO OU CUTÂNEO E
SUA CORRELAÇÃO COM FATORES CLÍNICO-
PATOLÓGICOS**

Giovanna Gabrielle Cruvinel

Médica Veterinária

Jaboticabal/SP

2025

**Expressão das proteínas RAS, 4E-BP1 e S6K1 em Cães com
Linfoma Multicêntrico ou Cutâneo e sua Correlação com Fatores
Clínico-Patológicos**

Discente: Giovanna Gabrielle Cruvinel

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinária.

Jaboticabal/SP

2025

C957e

Cruvinel, Giovanna Gabrielle

Expressão das proteínas RAS, 4E-BP1 e S6K1 em Cães com Linfoma Multicêntrico ou Cutâneo e sua Correlação com Fatores Clínico-Patológicos
Giovanna Gabrielle Cruvinel -- Jaboticabal, 2025

63 p. : il., tabs., fotos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andriago Barboza de Nardi

Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

1. Imunohistoquímica. 2. mTORC1. 3. Neoplasias hematopoiéticas. 4.

Sinalização celular. I. Título.

REGISTRO DE IMPACTO

Este estudo representa um avanço significativo na oncologia veterinária ao destacar os marcadores 4E-BP1, S6K1 e RAS como potenciais alvos biológicos de relevância prognóstica e para a compreensão da biologia dos linfomas caninos. A validação desses achados em estudos futuros, com amostras ampliadas, análises funcionais e integração a abordagens moleculares avançadas, poderá consolidar seu papel como biomarcadores e abrir caminho para terapias mais precisas, com impacto direto não apenas na prática clínica veterinária, mas também na oncologia comparada.

IMPACT STATEMENT

This study represents a significant advance in veterinary oncology by highlighting 4E-BP1, S6K1, and RAS as potential biological targets of prognostic relevance and for understanding the biology of canine lymphomas. The validation of these findings in future studies, with larger sample sizes, functional analyses, and integration with advanced molecular approaches, may consolidate their role as biomarkers and pave the way for more precise therapies, with a direct impact not only on veterinary clinical practice but also on comparative oncology.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RAS, 4E-BP1, S6K1 EM CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO OU CUTÂNEO E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS

AUTORA: GIOVANNA GABRIELLE CRUVINEL

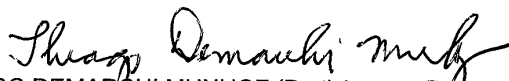
ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORIENTADOR: CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES (Participação Presencial)
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ UNESP Botucatu



Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ (Participação Presencial)
Departamento de Clínica Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP



Prof. Ass. Dr. IGOR LUZ SALARDANI SENHORELLO (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / FMVA UNESP Araçatuba

Jaboticabal, 28 de julho de 2025

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Giovanna Gabrielle Cruvinel, brasileira, nascida no município de São Carlos, Estado de São Paulo, em 19 de janeiro de 1996. Desde muito nova sonhava em contribuir com a ciência e a vida, especialmente retribuindo o amor aos animais. Em 2014 ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Central Paulista, sendo bolsista pelo programa Prouni. Neste período realizou estágio na Embrapa Pecuária Sudeste, com bolsa científica, onde no mesmo local concluiu duas iniciações científicas financiadas pela FAPESP e PIBIC, ambas com duração de um ano, tendo a oportunidade de realizar distintas publicações. Ainda, foi monitora voluntária da disciplina de Patologia Clínica Veterinária e monitora no Parque Ecológico de São Carlos, além de representante discente do Colegiado de Curso da referida instituição. Realizou cursos, estágios e participações em simpósios e congressos em áreas distintas. Além de estágio obrigatório curricular no Instituto Butantan em São Paulo, e na FCAV/UNESP. Em 23 de dezembro de 2018 obteve o grau de Médica Veterinária. Em 2020, ingressou no Programa de Residência em Área Profissional da Saúde, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, na subárea específica de Patologia Clínica Veterinária, sob orientação do Prof. Tit. Aureo Evangelista Santana. Em agosto de 2023 ingressou no Mestrado acadêmico do Programa de Ciências Veterinárias da FCAV/UNESP, orientada inicialmente pelo Prof. Tit. Aureo Evangelista Santana (*In memoriam*), e posteriormente pelo Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, além de ser coorientada pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves, colaborador pela FMVZ/UNESP.

**“Nada na vida deve ser temido,
apenas compreendido. Agora é hora
de compreender mais, para que
possamos temer menos.”**

— *Marie Curie*

Dedicatória

Ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana (*In memoriam*), gostaria de lhe agradecer por sua paixão pela FCAV/UNESP e pelo LPCV (Laboratório de Patologia Clínica Veterinária) e, acima de tudo, pela sua generosidade em compartilhar conhecimento por tantos anos, e para tantos. Obrigada por ter me recebido de tão bom grado desde a residência, até agora em meu retorno no mestrado. Obrigada por cada oportunidade, por acreditar em mim, e por sempre me incentivar. Talvez o senhor não soubesse, mas era o meu sonho estar aqui. Entendo a sua paixão por esse campus, ele é realmente belíssimo.

O professor Aureo não era apenas um mestre na pesquisa, ele acreditava no potencial de cada aluno, nos guiando e aconselhando com paciência e sabedoria, para àqueles que o procurava. Ele criou os seus filhos científicos livremente, algo que todos os que tiveram a oportunidade de trabalhar com ele sabem muito bem, nos dando independência para alcançarmos nossas metas. A porta de sua sala sempre se manteve semiaberta, de segunda a sexta, e muitas vezes até mesmo aos finais de semana. Para ele não tinha tempo ruim.

Gostaria que o meio acadêmico tivesse sido mais gentil com o senhor nos últimos tempos, por toda a sua trajetória. Que foi lindíssima! Quantas pessoas impactou e continuará ainda impactando, o senhor foi e sempre será pioneiro da Patologia Clínica Veterinária no Brasil.

Obrigada por tudo que nos deixou. Suas contribuições para a ciência e para a formação de tantos profissionais jamais serão esquecidas. Seguiremos em frente, com a sua memória nos guiando, honrando o seu exemplo e o seu compromisso com o conhecimento. Com eterna gratidão, de sua filha científica.

Encerro com um de seus trechos preferidos “*On ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux*” - O Pequeno Príncipe.

Agradecimentos

À minha família, especialmente meus pais, Eliana e Jorge, agradeço por todo o incentivo, apoio e amor incondicional. São eles a base de todas as minhas conquistas. Ao meu irmão Guilherme, que desde cedo me inspira e impulsiona na vida acadêmica, e à minha irmã Jhoyce, pelo apoio fraterno que sempre me fortaleceu. São eles que me lembram da força que há em acreditar em si mesma.

Ao meu namorado Henrique, que esteve ao meu lado em cada desafio enfrentado, oferecendo suporte, compreensão e fé inabalável de que tudo daria certo.

Aos amigos que a vida acadêmica me presenteou, em especial aos residentes do LPCV, Gabriel, Eliana e Mariana, sou muito grata por todos os momentos juntos, pela parceria e por tornarem essa caminhada mais leve e memorável.

Às minhas amigas de longa data de São Carlos, Carolina, Karine e Yara agradeço pela amizade sólida e pelo apoio em cada decisão importante, sempre presentes com afeto, ainda que distantes fisicamente.

Agradeço imensamente à Dra. Letícia Abraão Anai, Médica Veterinária do LPCV, pela amizade, orientação e apoio constante ao longo desta jornada. Este trabalho só foi possível graças à base sólida proporcionada por sua pesquisa de doutorado, que certamente continuará gerando frutos relevantes.

Ao Prof. Dr. Andriago Barbosa de Nardi, agradeço o acolhimento e por ter aceitado me orientar neste projeto com tanta receptividade.

Sou igualmente grata ao meu coorientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves, pelo suporte técnico, dedicação e valiosas orientações durante a execução prática deste trabalho.

À Prof.^a Dra. Ana Cláudia, registro minha profunda gratidão pela generosidade em colaborar com as análises estatísticas, mesmo sendo fora de sua linha de pesquisa. Sua disponibilidade reforça que a docência, muitas vezes, se traduz em um gesto altruísta de compartilhar conhecimento.

Ao laboratório de imunohistoquímica do departamento de Patologia Animal da FMVZ/UNESP de Botucatu/SP, agradeço em especial a doutoranda Fernanda pelo treinamento técnico.

À equipe do LPCV da FCAV/UNESP, registro minha eterna gratidão, especialmente à Prof.^a Dra. Márcia Sobreira, por sua incansável dedicação,

generosidade e pelos valiosos conselhos que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à todos os animais que fizeram parte deste estudo, e aos seus tutores.

Expresso minha sincera gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

	Página
1.1 Introdução e Revisão de Literatura.....	1
1.2 Linfoma Multicêntrico e Cutâneo.....	1
1.3 Fatores Epidemiológicos e Perspectivas em Oncologia Comparada.....	3
1.4 Apresentações clínicas e ferramentas diagnósticas laboratoriais.....	5
1.5 Alterações laboratoriais em cães com linfoma multicêntrico e cutâneo	7
1.6 Tratamento do linfoma multicêntrico e cutâneo canino	7
1.7 Via de sinalização mTOR.....	8
1.8 4E-BP1 (<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1</i>).....	11
1.9 S6K1 (<i>Ribosomal Protein S6 Kinase 1</i>)	12
1.10 Via de proliferação celular RAS	12
2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	13
3. REFERÊNCIAS.....	13
<i>O presente capítulo apresenta o artigo científico de acordo com as normas para submissão à revista Research in Veterinary Science.</i>	<i>18</i>
<i>Investigação e Correlação Clínica Preliminar para a Identificação dos Padrões de Expressão das Proteínas da Via mTORC1, 4E-BP1 e S6K1 e da Proteína RAS em Cães com Linfoma Multicêntrico ou Cutâneo.....</i>	<i>19</i>
1. Introdução	20
2. OBJETIVO	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Seleção dos animais.....	21
3.2 Análises	23
3.2.1 Exame histopatológico.....	23
3.2.2 Imunohistoquímica.....	23
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Linfoma multicêntrico	27
5.1.2 Expressão proteica	27
5.2 Linfoma cutâneo	29
5.2.1 Expressão proteica	30
5.3 Comparação da expressão dos anticorpos no LM e LC canino.....	32

5.4 Análise de sobrevida associada à expressão dos anticorpos 4E-BP1, S6K1 e RAS.	33
6. <i>DISCUSSÃO</i>	34
7. <i>CONCLUSÃO</i>	38
8. <i>REFERÊNCIAS</i>	38

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RAS, 4E-BP1, S6K1 EM CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO OU CUTÂNEO E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS

RESUMO - O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum em cães e gatos, possuindo como apresentações clínicas as formas multicêntricas (LM) e cutânea (LC), entre outras. Pode acometer uma ampla variedade de órgãos como linfonodos, pele, fígado, baço, pulmões, medula óssea, do trato gastrointestinal e do sistema nervoso central. Essa distribuição sistêmica favorece o desenvolvimento de complicações, estando frequentemente associada a prognósticos desfavoráveis. Apesar de sua relevância clínica, ainda há carência de marcadores prognósticos específicos para o linfoma em animais domésticos. Estudos referem o uso de moléculas reguladoras da proliferação celular como possíveis marcadores prognósticos tumorais. A via mTORC1 tem papel central na regulação da proliferação celular e pode estar envolvida na patogênese dos linfomas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas RAS, 4E-BP1 e S6K1 em cães com LM ou LC, através da técnica de imunohistoquímica, visando identificar potenciais alvos terapêuticos e prognósticos. Os resultados demonstraram que houve elevada expressão da proteína 4E-BP1 no grupo dos cães com LM (média de 11%) e naquele de cães com LC (média de 9%). Esses achados sugerem participação relevante dessa proteína e semelhante a da via mTORC1 na patogênese de ambas as formas. Já a proteína S6K1 apresentou expressão mais baixa, com médias de 6% no LM e 5% no LC, indicando ativação modesta da via, com discreta tendência de aumento no LM. A principal diferença foi observada na expressão de RAS, significativamente maior no LM (12%) em comparação ao LC (4%), sugerindo envolvimento diferencial dessa via na progressão do LM. Esses achados contribuem para a compreensão das vias moleculares associadas aos linfomas caninos e fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais direcionadas na oncologia veterinária.

Palavras-chave: imunohistoquímica, mTORC1, neoplasias hematopoiéticas, sinalização celular

Expression of RAS, 4E-BP1, S6K1 proteins in dogs with multicentric or cutaneous lymphoma and its correlation with clinicopathological factors

ABSTRACT: Lymphoma is the most common hematopoietic neoplasm in dogs and cats, presenting in various clinical forms, among which the multicentric (ML) and cutaneous (CL) subtypes are the most recognized. It can affect a wide range of organs, including lymph nodes, skin, liver, spleen, lungs, bone marrow, gastrointestinal tract, and central nervous system. This systemic distribution favors the development of complications and is frequently associated with poor prognoses. Despite its clinical relevance, there is still a lack of specific prognostic markers for lymphoma in companion animals. Some studies have proposed that molecules involved in the regulation of cell proliferation may serve as potential prognostic markers in neoplasms. The mTORC1 signaling pathway plays a central role in cell proliferation control and may be implicated in the pathogenesis of lymphomas. Therefore, this study aimed to evaluate the expression of the proteins RAS, 4E-BP1, and S6K1 in dogs diagnosed with ML or CL, using the immunohistochemistry technique, in order to identify potential prognostic and therapeutic targets. The results demonstrated high expression of 4E-BP1 in both groups, with an average of 11% in ML and 9% in CL. These findings suggest a relevant involvement of this protein and indicate a comparable activation of the mTORC1 pathway in the pathogenesis of both subtypes. In contrast, S6K1 expression was lower, with averages of 6% in ML and 5% in CL, indicating modest pathway activation, with a slight tendency toward increased expression in ML. The most prominent difference was observed in RAS expression, which was significantly higher in ML (12%) compared to CL (4%), suggesting a differential involvement of this pathway in ML progression. These findings contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying canine lymphomas and support the development of more targeted therapeutic strategies in veterinary oncology.

Keywords: Immunohistochemistry, mTORC1, hematopoietic neoplasms, signaling pathway

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Punção por Agulha Fina (PAF) de linfonodo poplíteo.....	6
Figura 2 - Protocolo CHOP de 19 semanas para tratamento de linfoma multicêntrico em cães.....	8
Figura 3 - Esquema das vias de sinalização celular mTORC1.....	20
Figura 4 - Imunohistoquímica de linfoma multicêntrico canino.....	25
Figura 5 - Análise de coloração imunohistoquímica utilizando o software Image J...	25
Figura 6 - Correlação entre os anticorpos analisados e parâmetros hematológicos em cães com linfoma cutâneo.....	28
Figura 7 - Gráfico de dispersão comparando a expressão de três marcadores imunohistoquímicos (4E-BP1, S6K1 e RAS) em casos de linfoma multicêntrico canino.....	29
Figura 8 - Correlação entre a expressão dos anticorpos S6K1 e RAS no LM canino.....	31
Figura 9 - Gráfico de dispersão comparando a expressão de três marcadores imunohistoquímicos (4E-BP1, S6K1 e RAS) em casos de linfoma cutâneo canino.....	32
Figura 10 - Expressão de três marcadores imunohistoquímicos (4E-BP1, P-AKT S6K1 e RAS) em casos de linfoma multicêntrico e linfoma cutâneo canino.....	33
Figura 11 - Curvas de Kaplan-Meier para análise de sobrevida em cães com linfoma multicêntrico e cutâneo, de acordo com os níveis de expressão dos marcadores 4E-BP1, S6K1 e RAS.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento do linfoma canino, de acordo com o proposto pela OMS.....	2
Tabela 2 - Imunofenótipo dos Linfomas Multicêntrico e Cutâneo Canino.....	3
Tabela 3 – Principais fármacos em estudo experimental na medicina veterinária que atuam na via mTOR.....	11
Tabela 4 – Anticorpos monoclonais, 4E-BP1, P-AKT S6K1 e RAS.....	23
Tabela 5 - Expressão dos marcadores 4E-BP1, S6K1 e RAS em cães com linfoma multicêntrico.....	28
Tabela 6 - Expressão dos marcadores 4E-BP1, S6K1 e RAS em cães com linfoma cutâneo.....	30
Tabela 7 - Expressão dos anticorpos anti-4E-BP1, anti-S6K1 e anti- RAS, em cães com linfoma multicêntrico (LM) ou cutâneo (LC). Jaboticabal (SP), 2025.....	41
Tabela 8 - Características epidemiológicas de 20 cães com linfoma multicêntrico. Jaboticabal (SP), 2025.....	42
Tabela 9 – Características hematológicas e bioquímico-séricas de 12 cães com linfoma multicêntrico. Jaboticabal (SP), 2025.....	43
Tabela 10 - Características epidemiológicas de 15 cães com linfoma cutâneo. Jaboticabal (SP), 2025.....	44
Tabela 11 – Características hematológicas e bioquímico-séricas de 15 cães com linfoma cutâneo. Jaboticabal (SP), 2025.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT - Quinase de Proteína B

ALT – Alanina aminotransferase

Creat – Creatinina

4E-BP1 – Proteína de ligação ao eIF4E-1 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1*)

EOS – Eosinófilos

ERK – Quinase Regulada por Sinal Extracelular

FA – Fosfatase alcalina

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

Hb – Hemoglobina

Ht – Hematócrito

LT – Leucócitos totais

LCE – Linfoma cutâneo epiteliotrópico

LCNE – Linfoma cutâneo não-epiteliotrópico

LF – Linfócitos

MEK – Quinase Quinase Ativada por Proteína de Sinal Mitogênico

MON – Monócitos

mTOR – Alvo mecanicista da rapamicina (*Mechanistic Target of Rapamycin*)

NS – Neutrófilos Segmentados

PARR – PCR para Rearranjo do Receptor de Antígeno

PI3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase

RAF – Fibrossarcoma de Aceleração Rápida

RAS – Família de proteínas G ligadas ao GTP

S6K1 – Quinase ribossomal S6

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

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado “**Avaliação da Expressão de Caspase-6, Caspase-7 e da proteína BAX, em pacientes com linfoma multicêntrico e linfoma cutâneo**”, sob orientação do Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA e Certificado CEUA protocolo nº 1625/2024, aprovado em reunião ordinária em 17 de abril de 2024, teve alteração em seu título para: “**Expressão das proteínas RAS, 4E-BP1 e S6K1 em cães com linfoma multicêntrico ou cutâneo e sua correlação com fatores clínico-patológicos**”, assim como, alteração na orientação do referido projeto, que passou a ser conduzido pelo Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI, com aprovação das alterações em reunião ordinária de 20 de agosto de 2025.

Jaboticabal, 20 de agosto de 2025.



Assinado de forma digital por
HELENA CRISTINA DELGADO
BRITO:10199881774
Dados: 2025.08.22 13:38:37 -03'00'

Helena Cristina Delgado Brito

Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP

(16) 3209-7100 www.fcav.unesp.br

1. CAPÍTULO - Considerações gerais

1.1 Introdução e Revisão de Literatura

O linfoma multicêntrico e cutâneo configura-se como uma das neoplasias hematopoiéticas mais frequentes na medicina veterinária, caracterizando-se por ampla heterogeneidade clínica, histopatológica e prognóstica (Dobson et al., 2002; Ponce et al., 2010; Azuma et al., 2022). Apesar da ampla utilização de métodos diagnósticos convencionais, como a citologia, histopatologia, e a imunofenotipagem, o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos em sua patogênese permanece limitado (Ruiz et al., 2005; Cora et al., 2017).

Nesse cenário, destaca-se a importância da investigação de vias de sinalização celular, como PI3K/AKT/mTOR e RAS/MAPK, as quais regulam processos fundamentais à biologia tumoral, como crescimento celular, proliferação, apoptose e resistência terapêutica (Laplanche; Sabatini, 2012; Xu; Liu; Wei, 2014).

A identificação de biomarcadores moleculares representa um potencial avanço para o diagnóstico, prognóstico, e o desenvolvimento de terapias-alvo, favorecendo uma abordagem terapêutica mais precisa e individualizada (Aresu et al., 2014; Zhang et al., 2022;). A literatura evidencia a elevada aplicabilidade científica dos estudos na área, destacando-se a utilidade do modelo canino em investigações direcionadas à oncologia comparada (Kol et al., 2015; Zandvliet, 2016).

1.2 Linfoma Multicêntrico e Cutâneo

Os linfomas podem ser classificados de formas distintas, de acordo com o seu estágio, incluindo a sua localização anatômica, características histológicas e imunofenóticas (Matutes et al., 2008; Zhang et al., 2022).

O linfoma multicêntrico (LM) canino caracteriza-se pelo aumento generalizado de múltiplos linfonodos, incluindo os periféricos palpáveis, como os submandibulares, pré-escapulares, axilares, inguinais e poplíteos. Além disso, com base na sua classificação imunofenotípica, pode ser classificado em linfoma de células B, células T ou linfoma de células Natural Killer (Zandvliet, 2016; Zhang et

al., 2022). Dentre estes subtipos, o linfoma de células B demonstra uma prevalência clínica significativa (Ponce et al., 2010; Zhang et al., 2022), quando comparado ao linfoma de células T.

A classificação histológica proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) contempla diversos subtipos de linfoma, incluindo: linfoma pouco diferenciado, linfoma linfoblástico, linfoma linfocítico e prolinfocítico, além dos subtipos histiocítico, histioblástico e histiolinfocítico (Rallis et al., 1992; Anai et al., 2014).

A definição do estágio clínico no LM é essencial para determinar o prognóstico e a extensão da doença nesses pacientes. Para isto, recomenda-se adotar o modelo (Tabela 1) proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS), conforme descrito por Flory et al., (2007).

Tabela 1. Estadiamento do linfoma canino, de acordo com o proposto pela Organização Mundial da Saúde.

Estágio	Características do estadiamento
Estágio I	Envolvimento de apenas um linfonodo
Estágio II	Envolvimento de linfonodos regionais
Estágio III	Linfadenomegalia generalizada
Estágio IV	Envolvimento de baço e/ou fígado com ou sem estágio III
Estágio V	Envolvimento da medula óssea com ou sem estágio I-IV ou de órgãos não linfoides
Subestádio a	Sem sinais clínicos sistêmicos
Subestádio b	Com sinais clínicos sistêmicos

Fonte: Flory et al., 2007; adaptado de Zandvliet, 2016.

Já o linfoma cutâneo (LC) canino, representa uma manifestação clínica relevante para a espécie. Sendo categorizado em duas principais classificações: linfomas cutâneos epiteliotrópicos (LCE) e não epiteliotrópicos (LCNE), cada uma delas subdividida em diversos subtipos histológicos (Azuma et al., 2022).

O LC caracteriza-se pela infiltração de linfócitos T ou B, na derme, epiderme ou tecidos anexos (Gonçalves et al., 2018). Sendo mais prevalente aos linfócitos T

(Azuma et al., 2022) caracterizado por uma elevada expressão da molécula CD3+ (Tabela 2 - Citometria de fluxo) e pelo fenótipo CD8+ (Jark et al., 2022).

O linfoma canino epiteliotrópico (LCE) de células T exibe um prognóstico geralmente altamente desfavorável; contudo, em contraste com o linfoma multicêntrico canino (LMC), os fatores prognósticos que influenciam a sobrevida, com ou sem intervenção terapêutica, não são ainda plenamente compreendidos (Azuma et al., 2022).

O LC Não Epiteliotrópico (LCNE) é descrito com menos frequência que o LCE e histologicamente se caracteriza por uma infiltração dérmica e subcutânea difusa, geralmente por linfócitos B, mas podendo ser por linfócitos T (Jark et al., 2022).

Tabela 2. Imunofenótipos dos linfomas multicêntrico e cutâneo canino identificados por citometria de fluxo.

Linfoma	Subtipo Celular	Imunofenótipo Positivo	Imunofenótipo Negativo
Multicêntrico	B	CD79a+, CD20+, PAX5+, CD21+, CD45+	CD3
Multicêntrico	T	CD3+, CD4+ ou CD8+, CD5+, CD45+	CD79a, CD20
Cutâneo	T	CD3+, CD4+ (mais comum), CD8+, CD45+	CD79a, CD20
Cutâneo	B/T	CD79a+/CD20+ (linhagem B) ou CD3+ (linhagem T)	Variável

Fonte: Adaptado de Jark et al., 2022.

1.3 Fatores Epidemiológicos e Perspectivas em Oncologia Comparada

No contexto de oncologia comparada, os linfomas caninos, em especial as formas multicêntrica e cutânea, representam importantes modelos para o estudo da oncogênese (Kol; Walker; Nordon, 2015). A similaridade biológica, clínica e molecular entre os linfomas de cães e humanos tem incentivado o uso do modelo canino como ferramenta translacional em pesquisas oncológicas, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e individualizadas (Marconato; Gelain; Comazzi, 2013).

A etiologia dos linfomas é reconhecida como multifatorial, envolvendo componentes genéticos, imunológicos e ambientais. A exposição a herbicidas, pesticidas, fumaça de cigarro e poluentes industriais tem sido associada ao aumento

do risco de câncer tanto em cães quanto em humanos. Essa suscetibilidade ambiental compartilhada reforça a relevância do linfoma canino espontâneo como modelo translacional em oncologia comparada, especialmente em estudos que utilizam técnicas avançadas de imagem para investigar a biologia tumoral e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos (Vail et al., 2020).

O linfoma multicêntrico, do ponto de vista epidemiológico, acomete com maior frequência cães de meia-idade a idosos, com média entre 6 e 9 anos, com algumas raças demonstrando predisposição genética, como Boxer, Golden Retriever, Rottweiler e Labrador Retriever (Zandvliet, 2016).

Já o linfoma cutâneo, por sua vez, é menos frequente tanto na sua manifestação epitelotrópica quanto a não epitelotrópica (Azuma et al., 2022). A forma epitelotrópica, comumente relacionado ao linfoma de células T, apresenta semelhanças imunopatológicas com o linfoma cutâneo de células T humano, ou popularmente conhecido como Micose Fungoide, inclusive na expressão de marcadores moleculares, comportamento clínico e resposta a terapias tópicas e sistêmicas (Moore et al., 2009).

Em cães, o linfoma cutâneo (LC) acomete predominantemente animais idosos, com idade média entre 8 e 10 anos. Raças como Setter Irlandês, Cocker Spaniel e Boxer são mencionadas na literatura como possivelmente predispostas a essa neoplasia (Fontaine et al., 2009).

Ainda no contexto da oncologia comparada, os linfomas caninos compartilham não apenas aspectos clínico-patológicos com os linfomas humanos, mas também vias moleculares envolvidas na tumorigênese, como alterações em genes reguladores do ciclo celular e da apoptose. Além disso, os cães vivem em ambientes semelhantes aos de seus tutores, o que os expõe a fatores ambientais comuns, reforçando a relevância dos modelos caninos espontâneos para a investigação dos efeitos de carcinógenos ambientais em ambas as espécies (Marconato; Gelain; Comazzi, 2013).

De acordo com um estudo realizado por Zanini et al. (2013) onde foram investigados fatores de risco ambientais associados ao desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin (LNH) em cães, por meio de questionário epidemiológico aplicado a tutores de 83 cães com LNH e 84 cães saudáveis. Os resultados indicaram que os cães que viviam permanentemente ao ar livre e a até 100 metros de ruas ou avenidas

movimentadas (com mais de 50 veículos por minuto) apresentavam risco significativamente maior de desenvolver LNH (razão de chances — OR: 3,1; intervalo de confiança 95%: 1,4–6,9; $P = 0,005$), sugerindo uma possível associação entre a poluição do ar por tráfego veicular e o surgimento dessa neoplasia em cães (Zanini et al, 2013).

Sendo assim, a investigação dos fatores epidemiológicos dos linfomas caninos, aliada às suas semelhanças com os linfomas humanos, posiciona o cão como modelo translacional de grande valor, ampliando as possibilidades de descoberta de novos biomarcadores, terapias-alvo e estratégias de prevenção com benefícios mútuos para a medicina veterinária e humana (Marconato; Gelain; Comazzi, 2013).

1.4 Apresentações clínicas e ferramentas diagnósticas laboratoriais.

Os sinais clínicos do linfoma em cães frequentemente apresentam baixa especificidade, variando conforme o local de acometimento. No entanto, o linfoma multicêntrico costuma manifestar-se de forma mais característica, com aumento indolor dos linfonodos periféricos, podendo ainda estar associado a anorexia, dispneia e febre (Gavazza et al., 2018; Zhang et al., 2022).

O linfoma cutâneo (LC) em cães manifesta-se clinicamente de forma heterogênea, frequentemente simulando dermatopatias inflamatórias crônicas, como dermatites ou infecções cutâneas, o que pode atrasar o diagnóstico (Jark; Rodrigues, 2022). As lesões iniciais incluem eritema, descamação, pápulas e prurido, podendo evoluir para placas ou nódulos ulcerados (Fontaine et al., 2009). Lesões nodulares, firmes, não pruriginosas e ulceradas são comuns, caracterizando-se por progressão rápida, resposta terapêutica limitada e baixa taxa de sobrevida (Moore; Olivry, 1994; Gonçalves et al., 2018).

Para a obtenção de um diagnóstico definitivo, é imprescindível a realização de uma avaliação física minuciosa, acompanhada de uma série abrangente de exames laboratoriais de triagem.

A citologia por agulha fina (CAF), cuja celularidade pode ser observada na Figura 1, desempenha um papel fundamental no diagnóstico do linfoma e na exclusão de outras enfermidades. Recomenda-se evitar a técnica de punção

aspirativa convencional, a fim de preservar a integridade celular e otimizar a análise citológica. A técnica desempenha um papel fundamental no diagnóstico do linfoma, destacando-se por sua simplicidade operacional e elevada eficácia (Zandvliet, 2016), sendo imprescindível que sua realização seja conduzida por profissionais devidamente qualificados.

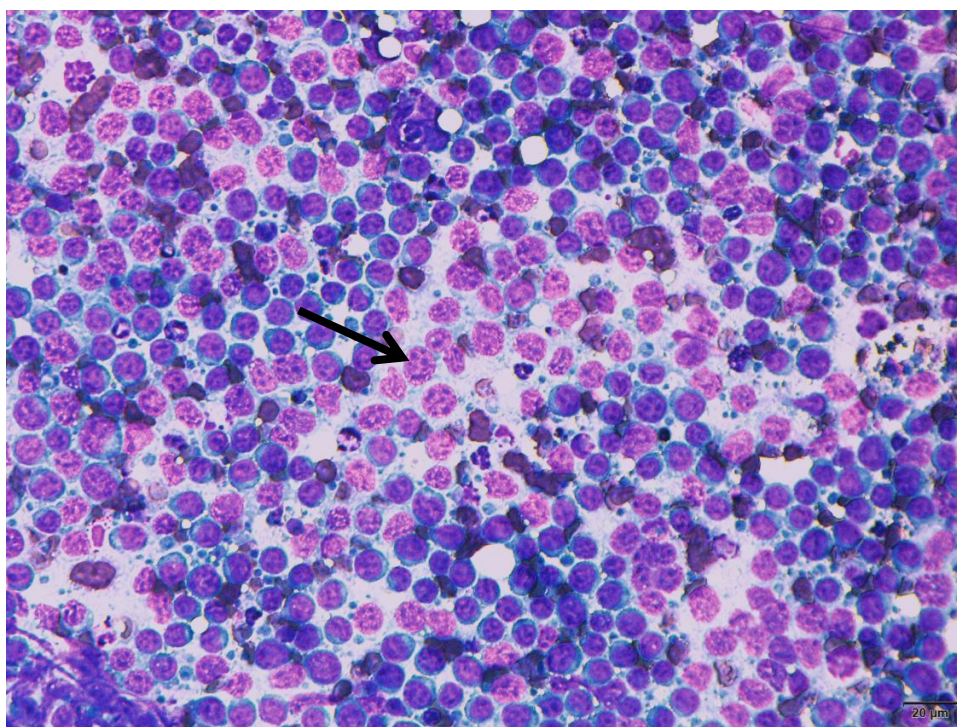


Figura 1. Punção por Agulha Fina (CAF) de linfonodo poplíteo direito de cão diagnosticado com LM. As preparações revelaram intensa presença de população linfóide homogênea com predomínio de médios a grandes linfócitos (indicado na seta), em permeio raras figuras de mitose. Ao fundo, discreta presença de corpúsculos linfoglandulares, além de material proteináceo amorfo. Coloração em Panótico. Foto realizada em microscópio óptico Olympus BX 53, em objetiva de 400X.

Nos últimos anos, também foram introduzidas técnicas moleculares para fins de diagnóstico (Burnett et al., 2003; Aresu, 2014). A técnica de PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangements) é uma abordagem molecular amplamente empregada para diagnosticar e caracterizar neoplasias linfoides, tais como linfomas e leucemias. Por meio dessa técnica, é possível determinar a clonalidade de células de origem linfóide mediante a amplificação do DNA que codifica as regiões variáveis dos receptores de células B e T (Thalheim et al., 2013).

As técnicas de imunohistoquímica (IH) e citometria de fluxo (CF) desempenham um papel fundamental na confirmação diagnóstica, no estadiamento

e na definição do prognóstico da doença, apesar de ainda apresentarem limitações na prática clínica, seja pela necessidade de biópsias para a IH ou pelos elevados custos da CF (Zandvliet, 2016; Zhang et al., 2022). Ressalta-se, contudo, que o diagnóstico por biópsia associado à IH é considerado o padrão-ouro.

1.5 Alterações laboratoriais em cães com linfoma multicêntrico e cutâneo

Dentre as alterações hematológicas identificadas em cães com linfoma, a anemia é a mais comumente relatada, geralmente do tipo normocítica, normocrômica e arregenerativa. Essa condição pode resultar tanto da infiltração neoplásica nos órgãos hematopoiéticos quanto da presença de síndromes paraneoplásicas associadas à neoplasia (Cápua et al., 2011).

Durante a proliferação neoplásica, a anemia pode estar acompanhada de trombocitopenia e leucopenia, possivelmente em virtude da perda da capacidade imunorregulatória das células neoplásicas. Essa disfunção pode favorecer a ocorrência de doenças autoimunes, resultando na destruição imunomediada das células sanguíneas e, conseqüentemente, no desenvolvimento de citopenias (Proença, 2009, Ribeiro; Aleixo; Andrade, 2015).

Quanto à linfopenia, suas causas no contexto do linfoma incluem a lise generalizada dos linfócitos, a destruição de linfócitos neoplásicos, a supressão da maturação linfocitária ou alterações na dinâmica circulatória dos linfócitos. Em alguns casos, a linfocitose também pode estar presente (Proença, 2009).

A trombocitopenia, por sua vez, pode decorrer da diminuição da produção plaquetária, relacionada ao comprometimento da medula óssea pelo tumor, à redução da capacidade de formação de megacariócitos, ou ainda ao aumento do consumo e sequestro de plaquetas (Bergman, 2007).

1.6 Tratamento do linfoma multicêntrico e cutâneo canino

O tratamento para o linfoma canino é estabelecido pelo uso de protocolos quimioterápicos, sendo a forma de tratamento que tem demonstrado maior eficácia frente às doenças linfoproliferativas em geral (Ogilvie e Moore, 1995; ANAI, 2014).

O protocolo quimioterápico mais comumente utilizado no tratamento do linfoma multicêntrico canino é o Protocolo de CHOP – 19 semanas (Figura 2), que consiste na combinação das drogas, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e

doxorrubicina. Relatos indicam que este protocolo específico é capaz de proporcionar remissões mais duradouras e aumentar o tempo de sobrevida para cães diagnosticados com linfoma (Morrison, 2004; ANAI, 2014).

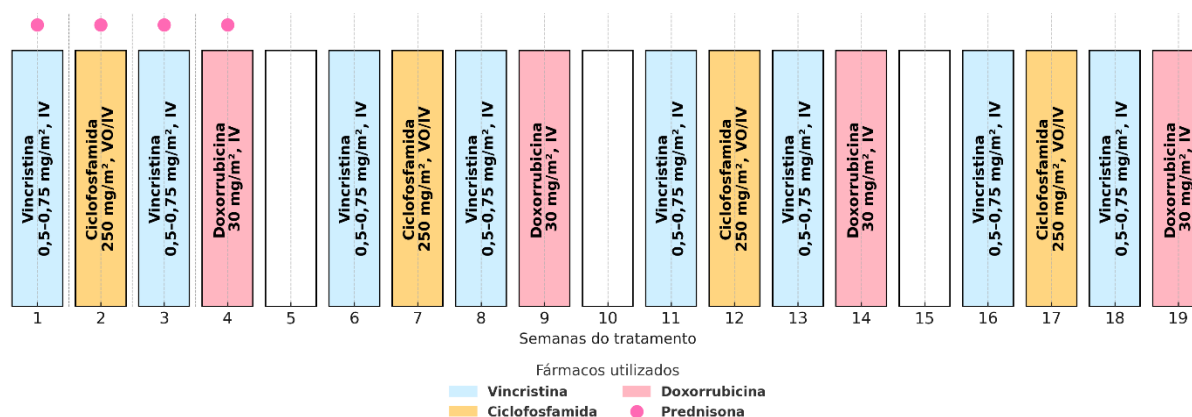


Figura 2. Protocolo CHOP de 19 semanas para tratamento de linfoma multicêntrico em cães. Prednisona 2 mg/kg (semana 1), 1,5 mg/kg (semana 2), 1,0 mg/kg (semana 3), e 0,5 mg/kg (semana 4).

Já para o LC, dentre os protocolos quimioterápicos empregados em seu tratamento, destaca-se atualmente a utilização da lomustina (CCNU) na dose de 60 a 80 mg/m², por via oral, a cada 21 dias, associada à prednisona (0,5–2 mg/kg, VO, SID). Este protocolo é amplamente considerado como terapia de primeira linha, devido à sua eficácia clínica, facilidade de administração e baixo custo. Em contrapartida, protocolos baseados em poliquimioterapia, como o COP e o COAP — derivados do protocolo CHOP (acima descrito), com exclusão da doxorrubicina ou substituição por citarabina — são geralmente indicados para casos refratários à terapia inicial. Sendo esses protocolos administrados em ciclos de quatro semanas (Matiz; Jark; Grandi, 2022).

1.7 Via de sinalização mTOR

Na década de 1970, uma amostra de solo coletada na Ilha de Páscoa (denominada “Rapa Nui” na língua local) revelou a presença de uma linhagem bacteriana, *Streptomyces hygroscopicus*, capaz de sintetizar um metabólito com forte atividade antifúngica. Após sua purificação, esse metabólito foi identificado como uma lactona macrocíclica, posteriormente denominada rapamicina, em

referência ao local de isolamento. Estudos subsequentes demonstraram que a rapamicina não apenas inibia a proliferação celular em células de mamíferos, como também apresentava propriedades imunossupressoras significativas. Esses achados impulsionaram investigações aprofundadas com o objetivo de elucidar o mecanismo molecular subjacente à sua ação (Wullschleger, 2006), a via mTOR.

A mTOR (Mechanistic Target Of Rapamycin) é uma quinase na qual atua detectando e integrando diversos sinais ambientais, desempenhando um papel central na regulação do crescimento e na manutenção da homeostase do organismo. Essa via controla vários processos celulares essenciais e está associada a um número crescente de condições patológicas, como câncer, obesidade, diabetes tipo 2, e doenças neurodegenerativas (Laplane e Sabatini, 2012).

De acordo com Mathieu Laplane e David Sabatini (2012), as alterações nessa via podem levar a uma atividade celular descontrolada, contribuindo para a oncogênese. Sendo a via mTOR subdividida em mTORC1 contendo seis e mTORC2 sete componentes proteicos conhecidos (Laplane e Sabatini, 2012).

Especificamente, a via mTORC1 regula amplamente a tradução de proteínas e o metabolismo celular por meio da detecção de estímulos intracelulares e extracelulares, como estresse, nutrientes, energia, níveis de oxigênio e fatores de crescimento (Wullschleger, 2006; Xu; Liu; Wei, 2014). Além disso, o complexo mTORC1 também fosforila diretamente diversos alvos a jusante na via de sinalização, incluindo a proteína 4E-BP1 (ligadora do fator de iniciação da tradução eIF4E), a quinase S6 (S6K), a proteína SREBP (ligadora do elemento regulador de esterol) e componentes relacionados à autofagia. A ativação desses alvos promove a síntese de proteínas e lipídios, a biogênese de lisossomos e o metabolismo energético, além de inibir o processo autofágico (Laplane; Sabatini, 2012; Xu; Liu; Wei, 2014).

Por outro lado, o complexo mTORC2 apresenta menor sensibilidade a nutrientes, sendo predominantemente responsivo a fatores extracelulares de crescimento (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004). Entretanto, o mecanismo molecular exato pelo qual o mTORC2 detecta a estimulação por esses fatores extracelulares permanece amplamente desconhecido. Atualmente, o único aspecto esclarecido é que a associação do mTORC2 ao ribossomo é essencial para sua ativação (Laplane; Sabatini, 2012; Xu; Liu; Wei, 2014). Uma vez ativado, o mTORC2

fosforila proteínas-alvo fundamentais a jusante, especialmente as quinases da família AGC, incluindo Akt, SGK e PKC (proteína cinase C), promovendo a amplificação subsequente da cascata de sinalização necessária para executar suas funções celulares (Pearce et al., 2010).

As vias mTORC1 e mTORC2 atuam como efetores centrais das principais vias oncogênicas, como MAPK e PI3K–AKT, frequentemente ativadas por RAS (Gremke et al., 2020). A sinalização sustentada de mTOR tem sido associada à resistência a terapias alvo-dirigidas em diversos tumores, incluindo câncer de pulmão, mama e melanoma (Ilagan; Manning, 2016; Gremke et al., 2020).

De acordo com Hoxhaj e Manning (2020) eventos genéticos que levam à ativação independente do fator de crescimento da via PI3K–AKT estão entre os fatores mais frequentes que causam câncer humano (Hoxhaj e Manning, 2020).

A sinalização desregulada da via PI3K–AKT–mTOR está envolvida na patogênese da maioria dos cânceres e representa um alvo terapêutico amplamente explorado. Apesar da disponibilidade de diversos fármacos inibidores dessa via, os resultados clínicos ainda são limitados, com exceções observadas em determinados tipos de neoplasias. No entanto, o avanço no entendimento da complexidade dessa cascata e de suas interações com outras vias de sinalização tem favorecido o desenvolvimento de inibidores mais seletivos, capazes de melhorar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos adversos associados ao tratamento (Janku; Yap; Meric-Bernstam, 2018).

Na medicina veterinária, os fármacos que atuam sobre a via de sinalização mTOR ainda são empregados de forma experimental (Tabela 3), mas vêm ganhando destaque, sobretudo na oncologia comparada. Entre eles, os rapalogs — como o sirolimo, everolimo e o temsirolimo — além de fármacos de 2ª geração como RV1001 (Droit-Volet, et al. 2018), são os mais investigados em cães, principalmente no tratamento de linfomas e de alguns tumores sólidos, aproveitando-se das marcantes semelhanças biológicas entre esses modelos e a oncologia humana.

Na medicina humana os rapalogs, como inibidores da via mTOR, têm demonstrado relevância clínica tanto no controle de respostas imunes anormais observadas em doenças hematológicas benignas quanto no tratamento de neoplasias hematológicas (Feng, et al. 2021).

Ensaios clínicos preliminares demonstram que esses agentes são capazes de modular a proliferação celular e a angiogênese tumoral, além de potencializar a resposta a protocolos quimioterápicos convencionais (Ali, et al. 2022). Nesse contexto, os inibidores da mTOR configuram-se como uma promissora estratégia terapêutica translacional, com potencial para expandir o arsenal oncológico veterinário nos próximos anos.

Tabela 3. Principais fármacos em estudo experimental na medicina veterinária que atuam na via mTOR.

Geração	Fármaco	Principal alvo	Principais aplicações clínicas
1ª geração (rapalogs)	Sirolimo (Rapamicina)	mTORC1 (via FKBP12)	Imunossupressor em transplantes, doenças proliferativas, esclerose tuberosa
	Everolimo	mTORC1	Câncer renal, câncer de mama, tumores neuroendócrinos, epilepsias da esclerose tuberosa
	Temsirolimo	mTORC1	Carcinoma renal avançado, linfoma de células B
2ª geração	RV1001	PI3Kδ	Experimental para linfoma não-Hodgkin canino, potencial para linfoma e leucemia de células B humano

1.8 4E-BP1 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1*)

A 4E-BP1 é uma proteína reguladora da tradução que, em sua forma não fosforilada, inibe o fator de iniciação eIF4E. A ativação da via mTORC1, estimulada por nutrientes, fatores de crescimento ou energia celular, promove sua fosforilação e consequente liberação do eIF4E, permitindo a formação do complexo eIF4F e o início da síntese proteica — processo frequentemente exacerbado em células tumorais (Lapante; Sabatini, 2012).

A desregulação da 4E-BP1, frequentemente resultante da ativação exacerbada da mTORC1, pode promover a síntese excessiva de proteínas com potencial oncogênico, favorecendo o crescimento celular descontrolado e a sobrevivência de células neoplásicas. Nesse contexto, a fosforilação de 4E-BP1 tem sido amplamente utilizada como marcador funcional da ativação da via mTORC1 em

diferentes tipos de câncer, incluindo o linfoma (Laplane; Sabatini, 2012; Xu; Liu; Wei, 2014).

1.9 S6K1 (*Ribosomal Protein S6 Kinase 1*)

A S6K1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1), também conhecida como p70S6K, é uma serina/treonina quinase que atua como alvo direto e regulador-chave via mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). É ativada por estímulos mitogênicos e metabólicos, desempenhando papel fundamental na regulação da síntese proteica, crescimento e proliferação celular (Sridharan; Basu, 2020).

A hiperativação da S6K1 está implicada em diversas patologias, como câncer, diabetes tipo 2 e doenças neurodegenerativas. No contexto oncológico, sua atividade exacerbada contribui para o crescimento celular descontrolado, aumento da sobrevivência das células tumorais e desenvolvimento de resistência às terapias antineoplásicas (Laplane; Sabatini, 2012; Xu; Liu; Wei, 2014; Pearce et al., 2010).

1.10 Via de proliferação celular RAS

A cascata de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK é uma via-chave envolvida na regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (McCubrey et al., 2007). Cooperando intensamente com a via de sinalização PI3K-Akt-mTOR, estabelecendo mecanismos de regulação recíproca positiva e negativa, por meio dos quais ambas influenciam uma ampla gama de funções celulares centrais (Mendoza; Blenis, 2011; Liu, F. et al, 2018; Nepstad et al., 2020). Diversos mecanismos de interação entre essas vias já foram identificados, incluindo inibição e ativação cruzadas, ciclos de retroalimentação negativa e convergência em substratos comuns (Nepstad et al., 2020).

A proteína RAS, uma GTPase, desempenha papel central na ativação de diversas cascatas de sinalização intracelular (Smith et al., 2020), com a qual colabora indiretamente para a ativação da via mTORC1. Dessa forma, mesmo diante de mecanismos de resistência à ativação da mTORC1 por estímulos intracelulares ou extracelulares, a sinalização mediada por RAS pode sustentar, de maneira indireta, a funcionalidade dessa via (Panwar et al., 2023). Por meio da ativação da

cascata PI3K-AKT, RAS inibe reguladores negativos do mTORC1, favorecendo sua ativação, ainda que em condições fisiológicas adversas (Glaviano et al., 2023).

Apesar de demonstrarem eficácia em modelos humanos de câncer, os fármacos que atuam na via RAS/MAPK — incluindo inibidores de KRAS, BRAF, MEK e ERK — ainda não têm aplicações clínicas estabelecidas na medicina veterinária. Estudos pré-clínicos em tumores caninos sugerem potencial antitumoral, mas seu uso permanece restrito à pesquisa translacional, demandando avaliações adicionais de segurança e eficácia antes de integrar protocolos terapêuticos em cães e gatos (Takada, et al. 2018).

2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os marcadores 4E-BP1, S6K1 e RAS demonstram potenciais alvos como ferramentas auxiliares no prognóstico e na compreensão da biologia dos linfomas caninos. Futuras pesquisas com amostras ampliadas, análise funcional desses alvos e integração com abordagens moleculares avançadas poderão validar seu papel como biomarcadores e favorecer o desenvolvimento de terapias mais precisas, com possíveis aplicações também na oncologia comparada.

3. REFERÊNCIAS

ALAYEV, A.; HOLZ, M. K. mTOR signaling for biological control and cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 228, n. 8, p. 1658-1664, 2013.

ALI, Eunus S. et al. Recent advances and limitations of mTOR inhibitors in the treatment of cancer. **Cancer cell international**, v. 22, n. 1, p. 284, 2022.

ANAI, L. A. *Quantificação imunofenotípica de células T reguladoras em cães acometidos por linfoma multicêntrico submetidos ao protocolo quimioterápico CHOP associado ou não a um firocoxib*. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ARESU, L. Canine lymphoma, more than a morphological diagnosis: what we have learned about diffuse large B-cell lymphoma. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 3, p. 77, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00077>.

ARESU, L. et al. Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with

diffuse large B-cell lymphoma. **The Veterinary Journal**, [S.l.], v. 200, n. 2, p. 318-324, 2014.

AZUMA, K. et al. Outcomes and prognostic factors in canine epitheliotropic and nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphomas. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 118-126, 2022.

BERGMAN, P. J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (ed.). **Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 77-94.

BURNETT, R. C. et al. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. **Veterinary Pathology**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 32-41, 2003.

CÁPUA, M. L. B. de et al. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1245-1251, 2011.

CORA, R. et al. **Immunohistochemical characterization of canine lymphomas**. [S.l.: s.n.], 2017.

DA CRUZ CARDOSO, M. M. *Fatores de risco para o desenvolvimento de linfoma canino: estudo retrospectivo do tipo caso-controlo de 100 casos clínicos*. 2022. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2022.

DOBSON, J. M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices**, [S.l.], v. 2013, n. 1, p. 941275, 2013.

DOBSON, J. M. et al. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **Journal of Small Animal Practice**, [S.l.], v. 43, n. 6, p. 240-246, 2002.

DROIT-VOLET, Sylvie et al. The explicit judgment of long durations of several minutes in everyday life: Conscious retrospective memory judgment and the role of affects?. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195397, 2018.

FENG, Yimei et al. The role of mTOR inhibitors in hematologic disease: from bench to bedside. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 611690, 2021.

FONTAINE, J. et al. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 1-14, 2009.

FLORY, A. B. et al. Stage migration in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S.l.], v. 21, n. 5, p. 1041–1047, set. 2007.

GAVAZZA, A. et al. Faecal microbiota in dogs with multicentric lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. E169-E175, 2018.

GLAVIANO, A. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. **Molecular Cancer**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 138, 2023.

GREMKE, N. et al. mTOR-mediated cancer drug resistance suppresses autophagy and generates a druggable metabolic vulnerability. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 4684, 2020.

GONÇALVES, S. R. F. et al. Linfoma cutâneo não-epiteliotrópico em cão. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v. 12, n. 1, p. 22-27, 2018.

HOXHAJ, G.; MANNING, B. D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 2, p. 74-88, 2020.

ILAGAN, E.; MANNING, B. D. Emerging role of mTOR in the response to cancer therapeutics. **Trends in cancer**, v. 2, n. 5, p. 241-251, 2016.

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biology**, [S.l.], v. 6, n. 11, p. 1122-1128, 2004.

JANKU, F.; YAP, T. A.; MERIC-BERNSTAM, F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 273-291, 2018.

JARK, P. C. et al. Histopathological and immunophenotypical characterization of canine multicentric lymphoma in Brazil: a study of 203 cases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 72, p. 787-793, 2020.

JARK, P. C.; RODRIGUES, L. C. S. **Neoplasias hematopoiéticas em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2021. 800 p. ISBN 9786587442143.

KOL, A. et al. Serial haemostatic monitoring of dogs with multicentric lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 255-266, 2015.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, [S.l.], v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012.

LIU, Feifei et al. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. **Acta pharmaceutica sinica B**, v. 8, n. 4, p. 552-562, 2018.

MARCONATO, L.; GELAIN, M. E.; COMAZZI, S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. **Hematological Oncology**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 1-9, 2013.

MATIZ, O. R. S.; JARK, P. C.; GRANDI, F. Linfoma cutâneo. In: FONSECA, C. S.; TOGNI, M.; GRAVENA, R. M. (Org.). **Neoplasias hematopoiéticas em cães e gatos**. São Paulo: Medvet, 2022. cap. 18, p. 465–486.

MATUTES, E. et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. **Leukemia**, [S.I.], v. 22, n. 3, p. 487-495, 2008.

MCCUBREY, J. A. et al. Papéis da via Raf/MEK/ERK no crescimento celular, transformação maligna e resistência a medicamentos. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S.I.], v. 1773, n. 8, p. 1263-1284, 2007.

MENDOZA, Michelle C.; ER, E. Emrah; BLENIS, John. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 6, p. 320-328, 2011.

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

MOORE, P. F. et al. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: an investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. **Veterinary Dermatology**, [S.I.], v. 20, n. 5-6, p. 569-576, 2009.

MORRISON, W. B. **Lymphoma in dogs and cats**. Boca Raton: CRC Press, 2004.

NEPSTAD, Ina et al. The PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 8, p. 2907, 2020.

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

PANWAR, V. et al. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S.I.], v. 8, n. 1, p. 375, 2023.

PEARCE, L. R.; KOMANDER, D.; ALESSI, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.I.], v. 11, n. 1, p. 9-22, 2010.

PONCE, F. et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Veterinary Pathology**, [S.I.], v. 47, n. 3, p. 414-433, 2010.

PROENÇA, A. R. S. G. *Linfoma maligno multicêntrico canino*. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.

RALLIS, T. et al. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma), in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, [S.I.], v. 33, p. 590-596, 1992.

RIBEIRO, R. C. S.; ALEIXO, G. A. S.; ANDRADE, L. S. S. Linfoma canino: revisão de literatura. **Medicina Veterinária**, [S.I.], v. 9, n. 1-4, p. 10-19, 2015.

RUIZ, F. S. et al. Imuno-histoquímica na patologia veterinária diagnóstica: uma revisão crítica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], v. 41, p. 263-270, 2005.

SARBASSOV, D. D. et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Current Biology**, [S.l.], v. 14, n. 14, p. 1296-1302, 2004.

SMITH, S. F.; COLLINS, S. E.; CHAREST, P. G. Ras, PI3K and mTORC2—three's a crowd?. **Journal of Cell Science**, [S.l.], v. 133, n. 19, p. jcs234930, 2020.

SRIDHARAN, Savitha; BASU, Alakananda. Distinct roles of mTOR targets S6K1 and S6K2 in breast cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1199, 2020.

TAKADA, Marilia et al. Targeting MEK in a translational model of histiocytic sarcoma. **Molecular cancer therapeutics**, v. 17, n. 11, p. 2439-2450, 2018.

THALHEIM, L. et al. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S.l.], v. 27, n. 6, p. 1509-1516, 2013.

TORRES NETO, R.; WERNER, J.; SEQUEIRA, J. L.; LAUFER AMORIM, R. Linfoma cutâneo de células t canino: estudo anatomoclínico de 57 casos (2013-2015). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 3, p. 59-60, 18 jan. 2016.

VAIL, D. M.; LEBLANC, A. K.; JERAJ, R. Advanced cancer imaging applied in the comparative setting. **Frontiers in Oncology**, [S.l.], v. 10, p. 84, 2020.

XU, K.; LIU, P.; WEI, W. mTOR signaling in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S.l.], v. 1846, n. 2, p. 638-654, 2014.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, [S.l.], v. 124, n. 3, p. 471-484, 2006.

ZANDVLIET, M. Canine lymphoma: a review. **Veterinary Quarterly**, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 76–104, 2016.

ZHANG, Y. et al. Diagnosis of Canine Multicentric Lymphoma in Dog. **Pakistan Journal of Zoology**, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 957-960, 2022.

ZANINI, D. A. et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1302-1308, 2013.

2. CAPÍTULO – Expressão das proteínas RAS, 4E-BP1, S6K1 em Cães com Linfoma Multicêntrico ou Cutâneo e sua Correlação com Fatores Clínico-Patológicos

O presente capítulo apresenta o artigo científico de acordo com as normas para
submissão à revista *Research in Veterinary Science*.

Guide for authors - Research in Veterinary Science - ISSN 0034-5288 |

ScienceDirect.com by Elsevier

Investigação e Correlação Clínica Preliminar para a Identificação dos Padrões de Expressão das Proteínas da Via mTORC1, 4E-BP1 e S6K1 e da Proteína RAS em Cães com Linfoma Multicêntrico ou Cutâneo

Giovanna Gabrielle Cruvinel^{1*}, Letícia Abrahão Anai¹, Fernanda Barthelson Carvalho de Moura², Ana Cláudia Alexandre de Albuquerque³, Andriago Barbosa de Nardi¹, Carlos Eduardo Fonseca Alves², Aureo Evangelista Santana^{1†}.

¹*Department of Veterinary Clinical and Surgery, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil*

²*Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil*

³*Department of Pathology, Reproduction and One Health, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil*

Resumo

O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais frequente em cães e gatos, acometendo órgãos como linfonodos, pele, trato gastrointestinal, fígado, baço, pulmões, sistema nervoso central e medula óssea. Entre suas formas clínicas, o linfoma cutâneo (LC) ocorre principalmente em cães adultos a idosos, enquanto o linfoma multicêntrico (LM), caracterizado por linfadenomegalia generalizada, é a forma mais prevalente. Apesar da relevância clínica, ainda há escassez de marcadores prognósticos específicos na medicina veterinária. As vias mTORC1 e MAPK, centrais na regulação da proliferação celular, têm sido associadas à patogênese de linfomas. Este estudo avaliou, por imunohistoquímica, a expressão das proteínas 4E-BP1, S6K1 e RAS em cães com LC (N = 15) e LM (N = 20). No LC, as médias de expressão foram 9% para 4E-BP1, 5% para S6K1 e 4% para RAS, sem correlação significativa com parâmetros hematológicos. Animais com alta expressão de 4E-BP1 ($p = 0,0297$) e S6K1 ($p = 0,0297$) apresentaram maior sobrevida, enquanto RAS não se associou ao prognóstico. No LM, a expressão média foi de RAS 12%, 4E-BP1 11% e S6K1 6%, com RAS e 4E-BP1 significativamente superiores a S6K1. Observou-se correlação positiva significativa entre RAS e S6K1 ($r = 0,639$; $p = 0,0024$; $R^2 = 0,316$), e 4E-BP1 se associou positivamente com idade ($r = 0,454$; $p = 0,0445$) e estadiamento clínico ($r = 0,469$; $p = 0,0431$), embora sem significância na regressão linear. Nenhum marcador influenciou parâmetros hematológicos ou sobrevida no LM. Esses resultados indicam que RAS e S6K1 apresentam associação positiva, enquanto 4E-BP1 se relaciona com idade e estadiamento, e que 4E-BP1 e S6K1 podem ser potenciais marcadores prognósticos no LC, reforçando a importância da caracterização molecular para diagnóstico, prognóstico e desenvolvimento de terapias direcionadas na oncologia veterinária.

1. Introdução

O linfoma multicêntrico (LM) e cutâneo (LC) representam uma das principais neoplasias hematopoiéticas mais comuns em cães, com ampla heterogeneidade clínica, histológica e prognóstica [1, 2, 3]. Apesar do uso consolidado de métodos como citologia, histopatologia e imunofenotipagem, os mecanismos moleculares subjacentes à sua patogênese ainda são pouco compreendidos [4, 5]. Nesse contexto, cresce o interesse pela investigação das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e RAS/MAPK, responsáveis por regular proliferação, crescimento, apoptose e resistência terapêutica [6, 7].

A caracterização dessas vias tem relevância na identificação de biomarcadores moleculares com potencial aplicação diagnóstica, prognóstica e terapêutica, favorecendo estratégias mais personalizadas [8, 9]. A espécie canina desponta como modelo promissor na oncologia comparada, dada sua similaridade clínica e molecular com o câncer humano [10, 11].

O LM é caracterizado por linfadenomegalia generalizada e, imunofenotipicamente, divide-se em linfomas de células B, T ou Natural Killer, com predomínio da linhagem B [11, 8]. Já o LC, embora menos prevalente, manifesta-se como infiltrado de linfócitos na pele e apresenta comportamento clínico agressivo, especialmente na variante T epiteliotrópica [3, 12].

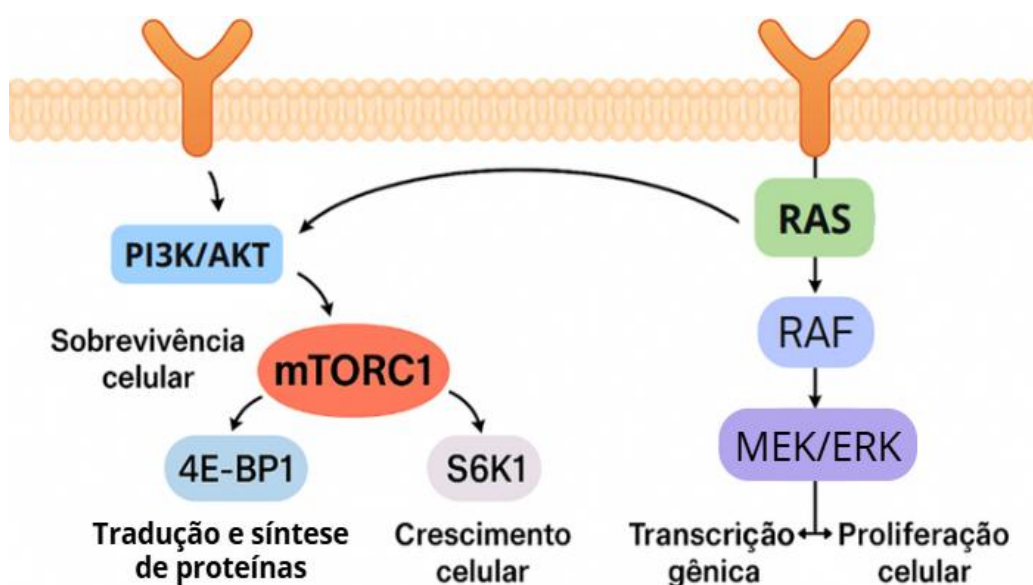


Figura 3. Esquema das vias de sinalização celular mTORC1. Principais cascatas intracelulares ativadas por receptores tirosina-quinase localizados na membrana

plasmática. À esquerda, a via PI3K/mTORC1, envolvendo proteínas-chave como 4E-BP1 e S6K1, regula processos como crescimento, tradução proteica e sobrevivência celular. À direita, a via RAS, mediada por RAS, RAF, MEK, controlando a proliferação celular e a ativação de fatores de transcrição, com ação conjunta na PI3K (via mTORC1). As setas indicam a direção dos eventos.

Estudos apontam o envolvimento das vias mTOR e RAS (Figura 3) na patogênese de diversos tumores, inclusive os linfomas, com destaque para proteínas como 4E-BP1 e S6K1 — alvos da mTORC1 — e a proteína RAS, associada à ativação de cascatas como PI3K-AKT e MAPK [6, 13, 14]. A análise da expressão dessas proteínas em cães com LM e LC pode contribuir para a compreensão da biologia tumoral e abrir caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de expressão das proteínas 4E-BP1, S6K1 e RAS em cães diagnosticados com linfoma multicêntrico e cutâneo, estabelecendo sua relação com variáveis clínicas e patológicas, a fim de identificar potenciais biomarcadores prognósticos e alvos moleculares para futuras terapias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos animais

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP/Jaboticabal-SP (número 027665/10).

Foram selecionados 35 cães provenientes do atendimento no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal-SP. Estes foram divididos em 2 grupos: Linfoma multicêntrico (N= 20); e linfoma cutâneo (N=15).

Pacientes diagnosticados com tumores benignos ou com doenças crônicas concomitantes ao diagnóstico de linfoma que pudessem influenciar os resultados, foram excluídos do estudo, bem como animais submetidos ao tratamento com

quimioterápicos e o uso de anti-inflamatórios não esteroidais dentro dos últimos 15 dias previamente às análises.

Os tutores dos animais que foram utilizados no experimento receberam um termo de consentimento livre e esclarecido para o uso dos animais.

Dentre os 20 cães diagnosticados com linfoma multicêntrico (Tabelas 8 e 9) apresentaram idade entre quatro e 13 anos, com uma média de 7,2 anos ($\pm 2,48$ anos). Quatro pacientes apresentaram recidiva da doença, com um tempo médio de 8,25 semanas ($\pm 6,89$ semanas) até a recorrência. O intervalo de recidiva variou de duas a 19 semanas, demonstrando uma considerável heterogeneidade entre os casos estando estas variações relacionadas a fatores como subtipo histológico, estadiamento inicial da doença e resposta ao tratamento instituído (CHOP de 19 semanas).

A análise da sobrevida dos pacientes diagnosticados com LM demonstrou uma ampla variação, com valores compreendidos entre 21 e 973 dias. A média de sobrevida observada foi de 290 dias (± 248 dias), evidenciando uma grande dispersão dos dados. Os cães acometidos pertenciam a diferentes raças, sendo a distribuição observada a seguinte: Rottweiler (seis casos; 30%), cães sem raça definida - SRD (três casos; 15%), Poodle (dois casos; 10%), PitBull (dois casos; 10%), e as demais raças com um caso cada – Dog Alemão, Basset, Basset Hound, Bull Terrier, Fox Terrier, Boxer e Maltês – totalizando sete casos (35%).

Ademais, foi observada uma maior frequência da doença em fêmeas (15 casos; 75%) em relação aos machos (cinco casos; 25%). Quanto ao estadiamento clínico no momento do diagnóstico, verificou-se uma predominância do estágio IV da doença (12/20). Desses, 50% (6/12) pertenciam ao subestádio "b", e os casos remanescente eram o subestádio "a", de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde para os casos de LM.

Os 15 cães diagnosticados com linfoma cutâneo (Tabela 8) apresentou uma predominância de animais sem raça definida (SRD) acometidos, correspondendo a nove casos do total avaliado (60%). Outras raças identificadas foram Golden Retriever (13,3%) e Teckel (13,3%), ambas com dois casos cada, além de Labrador (6,67%) e Poodle (6,67%), apresentando um caso cada. Quanto à distribuição por sexo, as fêmeas foram mais frequentes, representando nove casos (60%) contra

seis casos (40%) observados em machos. A idade média foi de 8,4 anos ($\pm 2,9$ anos), com valores que variaram entre quatro e 14 anos.

3.2 Análises

3.2.1 Exame histopatológico

Os animais com diagnóstico positivo para linfoma em exame citológico foram submetidos a exame histopatológico, sendo padronizada a remoção unilateral do linfonodo poplíteo nos casos de linfoma multicêntrico, e biópsia de pele nos casos de linfoma cutâneo, processados por laboratório privado. Sendo a classificação histopatológica de acordo com o proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

3.2.2 Imunohistoquímica

Para seleção dos anticorpos, foi levado em consideração a reatividade do mesmo com o tecido canino, com os anticorpos monoclonais anti-BP1, anti-S6K1, e anti-RAS (Tabela 4). A técnica seguiu o protocolo do Laboratório de Imunohistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP.

O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com o reagente comercial Protein block (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA). A diluição inicial do anticorpo seguiu as recomendações de cada fabricante. As modificações necessárias em cada protocolo foram levadas em consideração de acordo com cada marcação. O tecido controle positivo selecionado foi o linfonodo de cão sem linfoma, de acordo com a indicação do *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) e para controle negativo, a imunoglobulina da espécie do anticorpo primário foi utilizada.

Para avaliação da marcação, foi levado em consideração a literatura prévia e as particularidades de cada marcador, como imunolocalização e padrão de marcação.

Tabela 4. Anticorpos monoclonais, 4E-BP1, P-AKT S6K1 e RAS.

Anticorpo	Espécie	Clones	Distribuidor
Anti-4E-BP1	Camundongo	Clone D9E	Cell Signaling
Anti- P-AKT S6K1	Camundongo	Clone T3746	Cell Signaling
Anti-RAS	Camundongo	Clone AB16795	Abcam

A classificação do imunofenótipo nos casos de linfoma multicêntrico (LM) foi realizada por meio da técnica de imunohistoquímica, utilizando os anticorpos CD79a e CD3, com reagentes comerciais (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA).

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, os casos selecionados foram cortados em micrótomo com espessura de 3 µm e distendidos em lâminas próprias para imunohistoquímica (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda do material durante o processamento. Posteriormente, as lâminas foram estocadas em estufa a temperatura de 57°C por 24 horas, e transferidas para cubas de vidro vertical a fim de realizar a técnica de imunohistoquímica.

Após a desparafinização, as lâminas foram lavadas em água deionizada de 3 a 5 vezes, de maneira delicada para evitar o descolamento do tecido. Para a recuperação antigênica, utilizou-se uma solução de citrato (pH 6,0), diluída na cuba histológica.

Em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) por 15', seguida de um resfriamento inicial por 30' dentro da própria panela e por mais 20' em temperatura ambiente. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas novamente para remoção da solução de citrato, realizando-se de 3 a 5 lavagens com água deionizada.

Para o bloqueio de proteínas utilizou-se uma solução de leite desnatado a 8%, mantendo as lâminas imersas na cuba histológica por 40'. Em casos de temperatura ambiente reduzida, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas três vezes com água deionizada. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio a 8% por 15' (37°C). As lâminas foram lavadas novamente com solução tampão e água deionizada, utilizando uma piceta para auxiliar na remoção do excesso de reagentes.

O tecido foi delimitado utilizando-se uma caneta hidrofóbica e incubado com o anticorpo primário overnight em 4°C, utilizando as seguintes diluições: 4E-BP1 (1:500), S6K1 (1:500) e RAS (1:100). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com solução tampão e incubadas com o anticorpo secundário (Envision Flex/HRP - DAKO) por 1 hora. Após a incubação, realizaram-se novas lavagens com solução tampão, seguido da aplicação da solução de Magenta (100 µL por lâmina) por 5'.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas novamente com água deionizada e submetidas à contracoloração com Hematoxilina de Harris por 1' desidratadas em álcool e xilol para consequente montagem da lâmina com verniz Acrilex.

Para a avaliação da expressão dos anticorpos foram realizadas captura de cinco imagens aleatórias por lâmina (Figura 4) utilizando o microscópio óptico Olympus BX 53. As imagens foram obtidas com o programa *cellSens Standard*, empregando uma objetiva de 400x. Para a análise de coloração e quantificação da porcentagem de expressão por imunohistoquímica, foi utilizado o software ImageJ, empregando a ferramenta de limiar de cor (Threshold Color) para destacar as áreas positivas em amarelo (Figura 5). Os parâmetros de segmentação foram ajustados conforme as seguintes faixas: matiz (hue: 160-210), saturação (0-185) e brilho (175-180 a 200). Esses ajustes permitiram a identificação e quantificação precisa da coloração, possibilitando uma análise padronizada da expressão dos marcadores imunohistoquímicos. Sendo excluídos as áreas “mortas” das contagens.

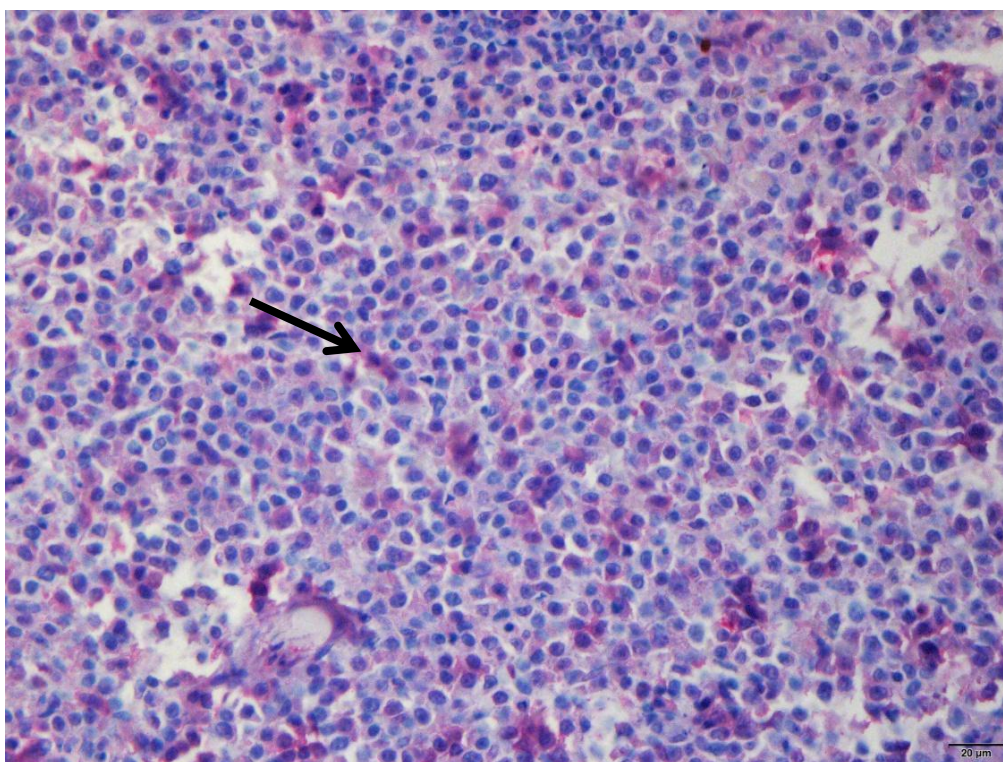


Figura 4. Imunohistoquímica de linfoma multicêntrico canino, evidenciando marcação rósea para o anticorpo 4E-BP1 em linfócitos (seta). Objetiva de 400X.

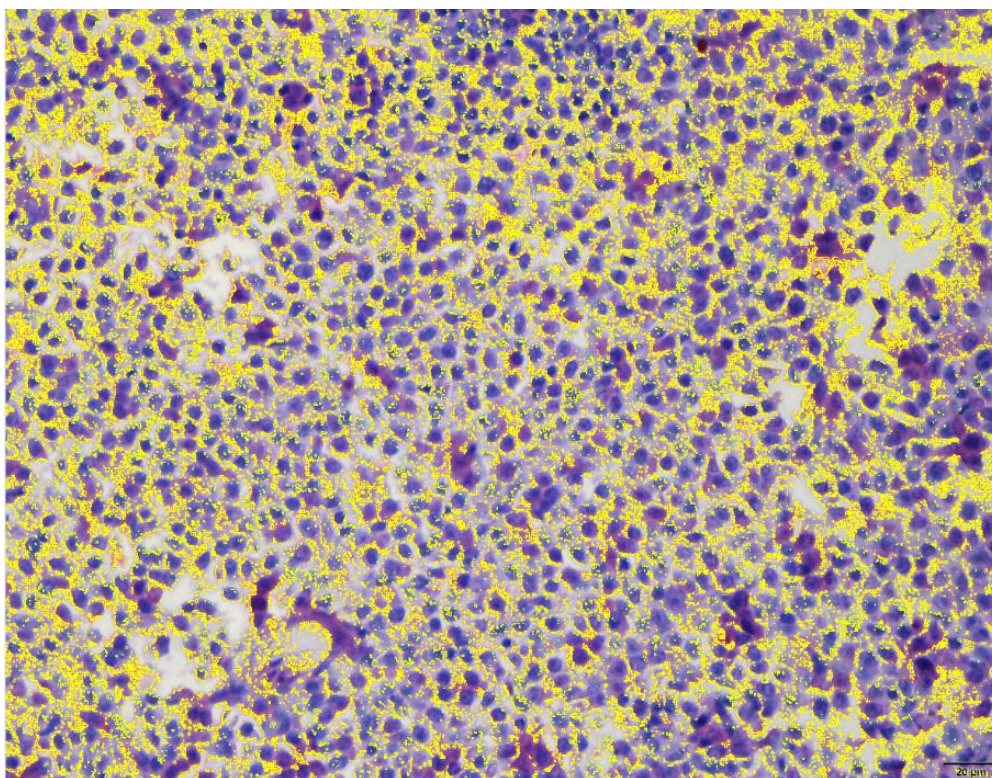


Figura 5. Análise de coloração imunohistoquímica utilizando o software Image J. A imagem apresenta um campo histológico processado para quantificação de marcação por imunohistoquímica, onde as áreas positivas foram destacadas em amarelo por meio da ferramenta de limiar de cor (Threshold Color). Os ajustes de matiz (hue), saturação e brilho foram aplicados para segmentação da coloração.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da porcentagem da expressão foram avaliados quanto a média e desvio padrão, e para fins estatísticos, as amostras foram categorizadas em baixa ou alta expressão com base na mediana dos marcadores. Amostras com valores iguais ou inferiores à mediana foram consideradas com “baixa expressão” e amostras acima da mediana “alta expressão”.

As amostras foram agrupadas de acordo com os critérios clínico-patológicos e as análises foram realizadas separadamente para os pacientes com LM e LC. Foi conferido a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk.

Para as variáveis com distribuição paramétrica no linfoma cutâneo, utilizou-se o teste One-way ANOVA para comparar a expressão entre os anticorpos 4E-BP1, S6K1 e RAS, e o teste de correlação de Pearson para avaliar associações entre a expressão dos marcadores e os parâmetros clínico-patológicos.

No caso do linfoma multicêntrico, cujos dados apresentaram distribuição não paramétrica, foram aplicados o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as medianas de expressão dos anticorpos e a correlação de Spearman para análise de associação com variáveis clínicas e patológicas com posterior análise de regressão linear.

Para a realização da análise de sobrevida os resultados de expressão proteica de cada anticorpo, foi realizado a correlação entre todas as variáveis (raça, sexo, idade, sobrevida, estadiamento, sinais clínicos, histopatológico, imunofenótipo, parâmetros hematológicos e bioquímicos) através da matriz de correlação múltipla. A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism v.8.1.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Linfoma multicêntrico

A análise histológica revelou que o linfoma difuso de grandes células foi a variante predominante, sendo identificado em 15 casos (75%). Outras variantes histológicas menos comuns corresponderam a cinco casos (25%), sendo, linfoma linfoblástico: 2 casos (10%), linfoma de grandes células imunoblástico: 1 caso (5%), linfoma Burkitt-like: 1 caso (5%), e linfoma linfoplasmocítico x zona marginal: 1 caso (5%).

A caracterização imunofenotípica revelou uma predominância do fenótipo B, com 17 casos (85%) de linfoma de células B e apenas três casos (15%) de linfoma de células T.

5.1.2 Expressão proteica

Para os marcadores avaliados, considerou-se a imunolocalização citoplasmática com base no Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). As medianas de expressão observadas foram de 8,9% (intervalo: 0 – 32,3) para 4E-BP1, 3,9% (0 – 22,06) para S6K1 e 10,34% (1,41 – 26,34) para RAS (Figura 6).

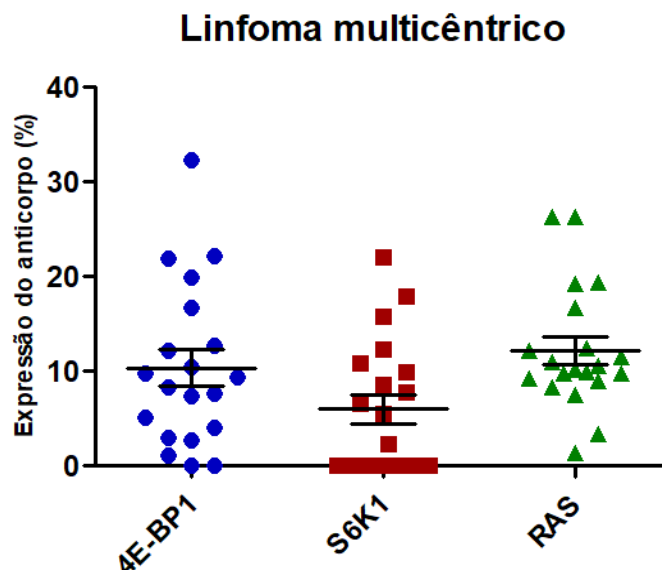


Figura 6. Gráfico boxplot comparando a expressão de três marcadores imunohistoquímicos (4E-BP1, S6K1 e RAS) em casos de linfoma multicêntrico canino. Cada símbolo representa um caso positivo, e as barras de erro indicam o erro padrão da média para cada grupo.

Foi observado diferenças significativas na expressão dos anticorpos 4E-BP1, S6K1 e RAS ($p = 0,0128$). O anticorpo RAS apresentou a maior média de expressão ($12,2 \pm 6,5\%$), seguido por 4E-BP1 ($10,3 \pm 8,6\%$) e S6K1 ($6,0 \pm 7,0\%$). Observou-se que RAS e 4E-BP1 diferiram estatisticamente de S6K1, enquanto este apresenta expressão intermediária em relação aos demais.

Tabela 5. Expressão dos marcadores 4E-BP1, S6K1 e RAS em cães com linfoma multicêntrico.

Anticorpo	Média $\pm$ EP (%)	Mediana (min-máx)	Valor de P
4E-BP1	$10,3 \pm (8,6)$ a	8,9 (0 – 32,3)	0,0128
S6K1	$6,0 \pm (7,0)$ bc	3,9 (0 – 22,06)	
RAS	$12,2 \pm (6,5)$ a	10,34 (1,41 – 26,34)	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Adicionalmente, observou-se uma correlação positiva significativa entre os valores de expressão dos marcadores RAS e S6K1 ($r = 0,6387$; $p = 0,0024$), conforme ilustrado na Figura 7 para regressão linear ($R^2 = 0,3158$, $p = 0,0099$). A linha de tendência reforça essa associação, indicando que o aumento na expressão

de RAS tende a ser acompanhado por um aumento proporcional na expressão de S6K1.

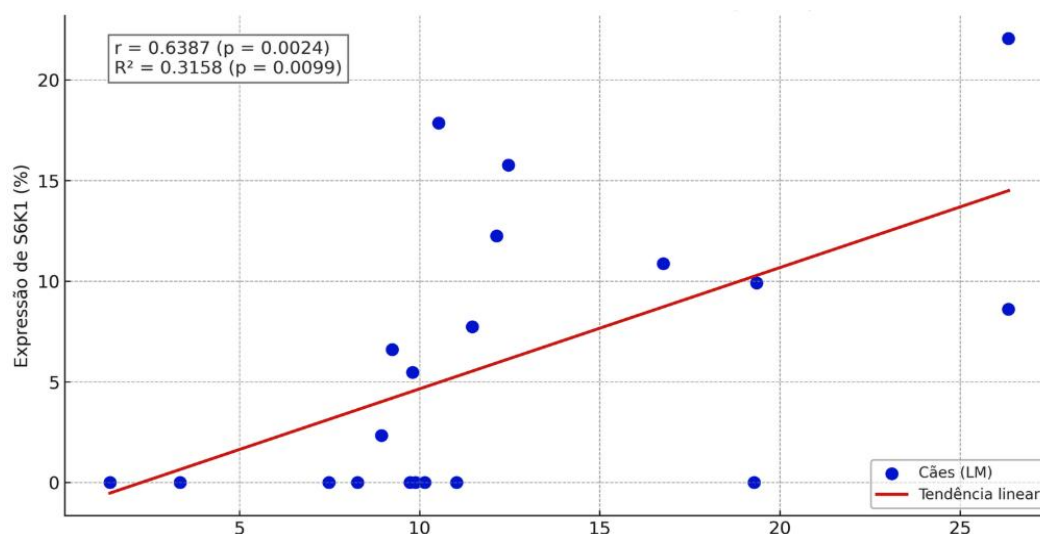


Figura 7. Correlação entre a expressão de S6K1 e RAS no linfoma multicêntrico canino.

Dentre os parâmetros analisados — incluindo raça, idade, sexo, estadiamento clínico, sinais clínicos, características histopatológicas e imunofenótipo — a expressão do anticorpo 4E-BP1 apresentou correlação positiva com as variáveis idade e estadiamento clínico. Especificamente, observou-se que a expressão de 4E-BP1 tende a aumentar proporcionalmente com a idade dos animais ($r = 0,4538$; $p = 0,0445$) e com o avanço do estadiamento ($r = 0,4685$; $p = 0,0431$). No entanto, a análise por regressão linear não demonstrou significância estatística. As análises estatísticas não demonstraram correlações com os principais parâmetros hematológicos avaliados (Ht, He, WBC e neutrófilos).

5.2 Linfoma cutâneo

A sobrevida média dos cães diagnosticados com linfoma cutâneo foi de 72,6 dias (± 118 dias), variando amplamente de um a 426 dias, destacando significativa heterogeneidade na evolução clínica. Linfoma epiteliotrópico (tipo T) foi o mais frequente, representando 73,34% dos casos, seguido pelo linfoma não epiteliotrópico (tipo B) com 26,67%.

5.2.1 Expressão proteica

Para os marcadores avaliados, considerou-se a imunolocalização citoplasmática assim como no LM com base no Human Protein Atlas. As medianas de expressão observadas foram de 7,7 % (1,01 – 19,7) para 4E-BP1, 4,08 % (0 – 9,77) para S6K1 e 2,98 % (1,16 – 14,9) para RAS (Tabela 6).

Os dados referentes aos animais diagnosticados com LC apresentaram distribuição normal, optando-se pela utilização de teste paramétricos.

Tabela 6 – Expressão dos marcadores 4E-BP1, S6K1 e RAS em cães com linfoma cutâneo.

Anticorpo	Média ± EP (%)	Mediana (min–máx)	Valor de P
4E-BP1	8,41 ± (5,67)a	7,7 (1,01 – 19,7)	0,0167
S6K1	5,08 ± (3,38)ab	4,08 (0 – 9,77)	
RAS	3,84 ± (3,47)b	2,98 (1,16 – 14,9)	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os valores de expressão dos anticorpos 4E-BP1, S6K1 e RAS em cães diagnosticados com linfoma cutâneo (Figura 8) revelaram que o anticorpo 4E-BP1 apresentou os maiores valores médios entre os marcadores avaliados. As variações individuais oscilaram aproximadamente entre 1% e 20%, com média aproximadamente em torno de 8%. Observou-se ampla dispersão dos dados, evidenciando heterogeneidade na expressão de 4E-BP1 entre os indivíduos da amostra.

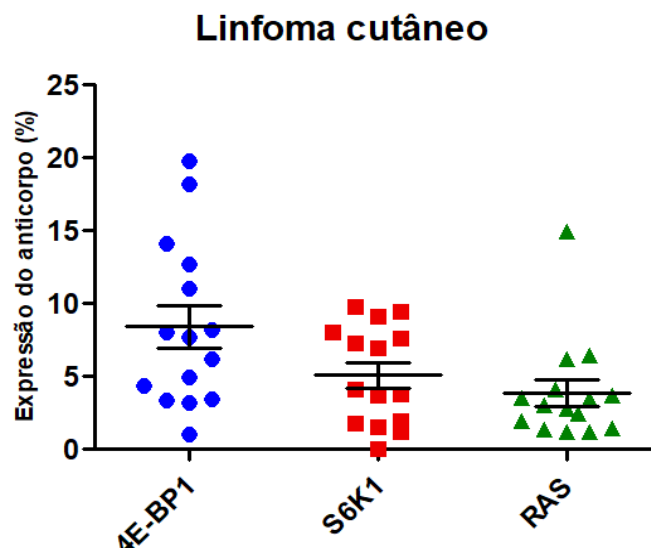


Figura 8. Gráfico de dispersão comparando a expressão de três marcadores imunohistoquímicos (4E-BP1, P-AKT S6K1 e RAS) em casos de linfoma cutâneo canino. Cada ponto representa um caso positivo, e as barras de erro indicam o erro padrão da média para cada grupo.

A análise de correlação entre os marcadores moleculares e os parâmetros hematológicos (Figura 9) permitiu avaliar possíveis associações biológicas entre a expressão das proteínas S6K1 e 4E-BP1 e os componentes celulares do sangue periférico em cães com linfoma cutâneo (N = 15).

Houve correlação entre S6K1 e hematócrito (Ht), porém, apresentando-se fraca e negativa ($r = -0,17$; $p > 0,05$), com coeficiente de determinação (R^2) inferior a 0,03, indicando que menos de 3% da variação nos valores de Ht pôde ser explicada pela expressão da S6K1. De modo semelhante, a relação entre S6K1 e a contagem de hemácias (He) apresentou resultado similar ($r = -0,14$; $p > 0,05$), com distribuição dos dados sem tendência linear clara.

Assim como na proteína 4E-BP1, os resultados também não revelaram correlação estatisticamente significativa com os parâmetros hematológicos avaliados. A análise entre 4E-BP1 e leucócitos (WBC) apresentou correlação positiva muito fraca ($r = 0,18$; $p > 0,05$), e entre BP1 e neutrófilos, a correlação foi ligeiramente superior, mas ainda assim considerada fraca ($r = 0,30$; $p > 0,05$). Apesar da discreta tendência de elevação dos neutrófilos com maiores níveis de 4E-BP1, os valores de R^2 permaneceram baixos, indicando capacidade preditiva limitada.

Esses resultados sugerem que as expressões das proteínas S6K1 e 4E-BP1 não se correlacionam de forma significativa com os principais parâmetros hematológicos avaliados (Ht, He, WBC e neutrófilos – Tabela 9) em cães com LC.

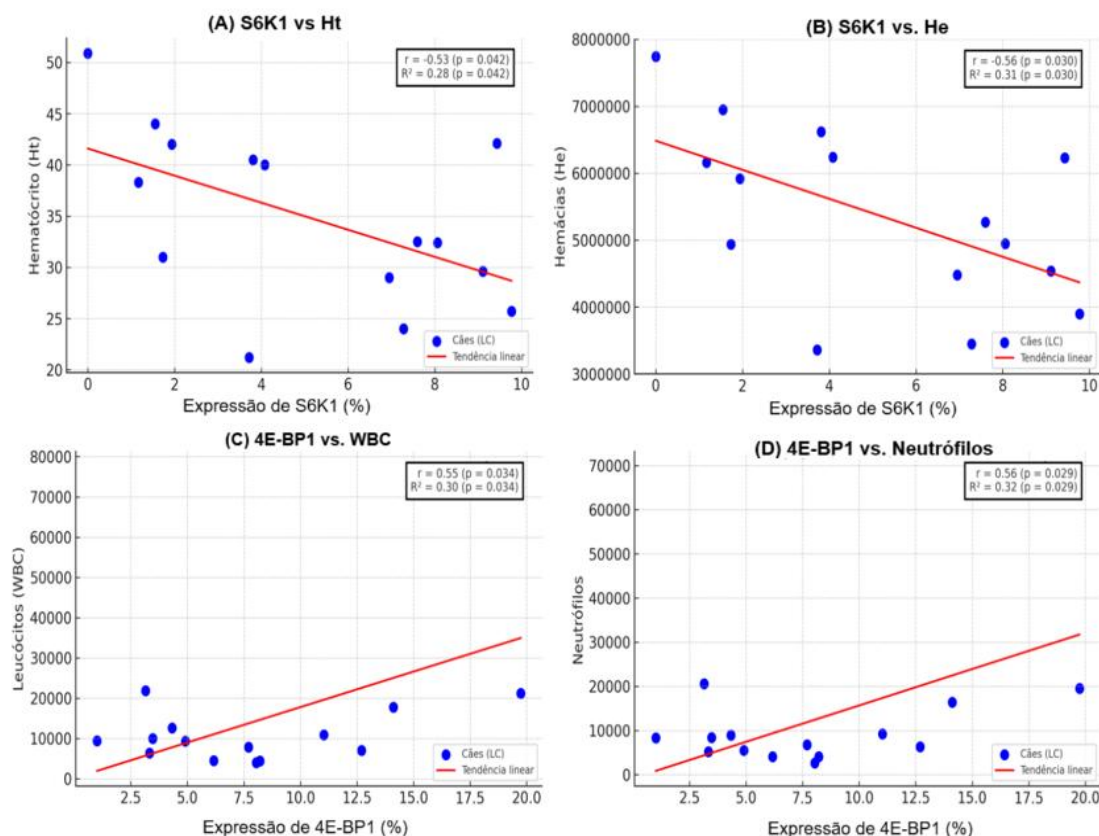


Figura 9. Correlação entre os anticorpos analisados e parâmetros hematológicos em cães com linfoma cutâneo: (A) expressão de S6K1 e valores de hematócrito (Ht); (B) expressão de S6K1 e contagem de hemácias (He); (C) expressão de BP1 e contagem de leucócitos (WBC); (D) expressão de BP1 e contagem de neutrófilos.

5.3 Comparação da expressão dos anticorpos no LM e LC canino

No presente estudo, observou-se que os níveis de expressão de 4E-BP1 (alvo direto do mTORC1) - responsável por modular a tradução proteica - foram semelhantes entre os casos de linfoma cutâneo e linfoma multicêntrico (Gráfico 4), com valores relativamente elevados próximos a 10%, sugerindo que essa via de sinalização pode desempenhar papel comparável na patogênese de ambos os subtipos de linfoma.

Já o anticorpo S6K1 apresentou expressão mais baixa em ambos os tipos, porém com uma tendência de maior expressão nos casos de LM em comparação ao LC (Figura 10).

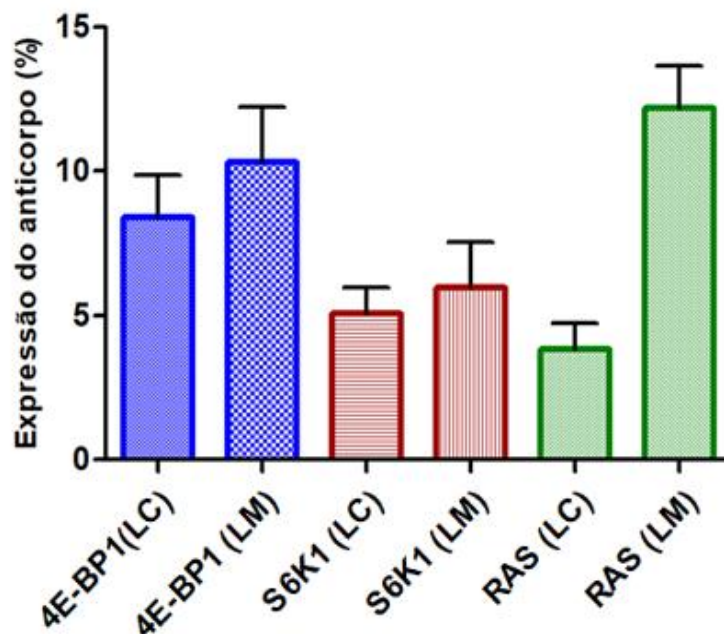


Figura 10. Expressão de três marcadores imunohistoquímicos (4E-BP1, P-AKT S6K1 e RAS) em casos de linfoma multicêntrico (LM) e linfoma cutâneo (LC) canino. Sendo: 4E-BP1 (barras azuis), S6K1 (barras vermelhas) e RAS (barras verdes).

5.4 Análise de sobrevida associada à expressão dos anticorpos 4E-BP1, S6K1 e RAS.

Não foi observada diferença de sobrevida entre as amostras com expressão alta versus baixa de 4E-BP1 ($p = 0,9394$), S6K1 ($p = 0,5360$) e RAS ($p = 0,5360$) no linfoma multicêntrico (LM).

Em contrapartida, no LC foi observado uma maior sobrevida para os pacientes com alta expressão de 4E-BP1 ($p = 0,0297$) em comparação àqueles com baixa expressão. Não houve diferença estatística em relação à sobrevida e expressão de S6K1 ($p = 0,0297$) e RAS ($p = 0,3824$) (Figura 11).

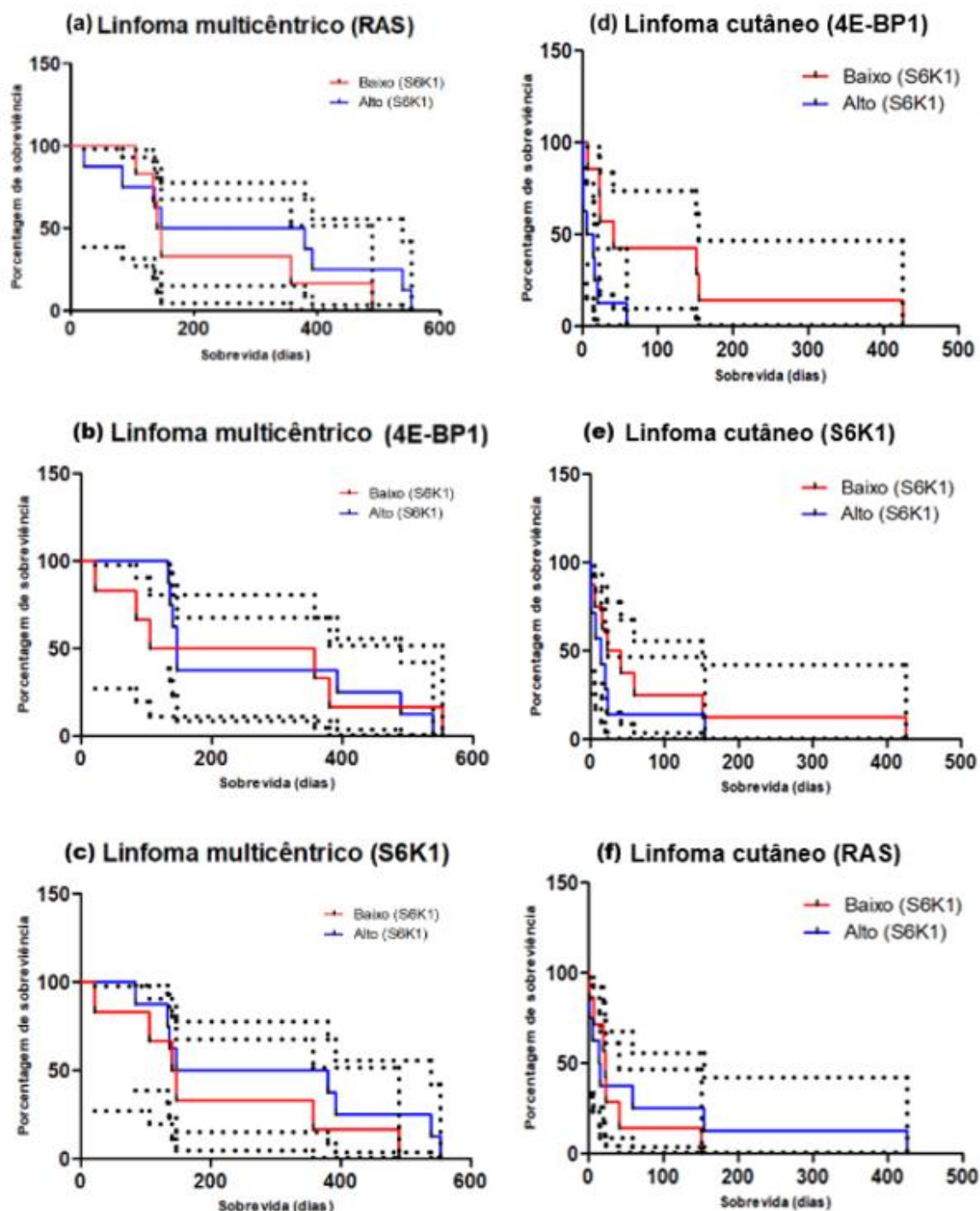


Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier para análise de sobrevida em cães com linfoma multicêntrico e cutâneo, de acordo com os níveis de expressão dos marcadores (A e D) 4E-BP1, (B e E) S6K1 e (C e F) RAS, nos casos de LM e LC, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

A análise de correlação entre os marcadores moleculares e os parâmetros hematológicos não revelou associações estatisticamente significativas em cães com

LC. A expressão de S6K1 apresentou correlação negativa muito fraca tanto com o valor de hematócrito (%) quanto com o valor de hemácias, demonstrando menos de 3% da variabilidade observada. De modo semelhante, a proteína 4E-BP1 não demonstrou relação robusta com os parâmetros hematológicos, embora tenha sido identificada uma correlação fraca e positiva com leucócitos e neutrófilos, porém sem relevância estatística. Esses achados sugerem que a expressão de S6K1 e 4E-BP1 não exercem influência mensurável sobre hematopoiese ou resposta inflamatória sistêmica, reforçando a hipótese de que seu papel está mais diretamente relacionado a processos intracelulares da biologia tumoral do que a alterações detectáveis em parâmetros hematológicos convencionais [15].

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR tem papel central na regulação do crescimento celular, metabolismo e proliferação, sendo frequentemente ativada em neoplasias hematopoiéticas [16]. Neste estudo, observamos diferenças significativas na expressão dos marcadores RAS, 4E-BP1 e S6K1 em linfoma multicêntrico canino ($p = 0,0015$), com destaque para a maior média de expressão do anticorpo RAS. Os resultados deste estudo evidenciaram variações significativas na expressão das proteínas anti-4E-BP1, anti-S6K1, e anti-RAS entre os subtipos de linfoma multicêntrico e linfoma cutâneo em cães, sugerindo que tais marcadores moleculares podem exercer papel relevante na biologia tumoral dessas neoplasias hematopoiéticas. A análise de correlação com parâmetros clínico-patológicos, ainda que em alguns casos sem significância estatística, reforça o potencial dessas proteínas como candidatas a biomarcadores de valor prognóstico e alvo-terapêutico.

A menor expressão foi observada para S6K1 ($6,0 \pm 7,0\%$), embora ainda significativa. S6K1 é um substrato clássico da mTORC1, e sua ativação promove síntese proteica e crescimento celular. Apesar de sua função crítica, a menor expressão relativa pode refletir a complexidade da regulação desta via em tumores linfoproliferativos, com feedbacks negativos e contextos dependentes do microambiente tumoral. No estudo de Elvers et al. (2019), S6K1 foi avaliado em linfomas caninos com expressão variável, sugerindo heterogeneidade na ativação da via mTOR [17]. De forma complementar, a proteína S6K1, também alvo direto da via mTORC1, - responsável pela regulação do crescimento celular e da síntese proteica – apresentou uma expressão semelhante de S6K1 entre os casos de linfoma cutâneo e multicêntrico, embora com variabilidade individual entre os

animais. Esses achados podem sugerir que a participação da via mTOR-S6K1 pode ser heterogênea entre diferentes subtipos de linfoma, refletindo possíveis distinções no grau de ativação da sinalização envolvida na proliferação tumoral.

A proteína RAS apresentou a maior média de expressão, sugerindo ativação upstream das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR, ambos relevantes na linfomagenese. Em cães, a expressão de RAS ainda é pouco descrita em linfomas, mas estudos em humanos demonstram que mutações ou ativação da via RAS estão associadas a fenótipos mais agressivos de linfomas não Hodgkin [18]. Embora mutações em RAS sejam menos frequentes em cães, a ativação proteica por vias alternativas pode justificar sua expressão elevada. Em medicina veterinária, Carvalho et al. (2021) já haviam sugerido a participação de proteínas relacionadas à via RAS/MAPK na progressão de linfomas de alto grau [19]. A proteína RAS - reguladora chave da sinalização intracelular, envolvida em processos fundamentais como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular – apresentou no presente estudo, uma expressão significativamente aumentada nos casos de LM em comparação ao LC. Esses achados sugerem um possível envolvimento diferencial da via RAS na patogênese dos dois subtipos de linfoma, destacando sua maior relevância funcional no LM. Tal resultado pode ainda indicar o potencial da expressão de RAS como um marcador molecular diferencial entre os subtipos cutâneo e multicêntrico.

O fator de ligação à proteína eucariótica 4E-BP1 apresentou expressão intermediária ($10,3 \pm 8,6\%$). Este marcador atua como regulador negativo da tradução de mRNAs e é diretamente fosforilado por mTORC1. A hiperfosforilação de 4E-BP1 resulta em liberação da eIF4E e aumento da tradução de proteínas associadas à proliferação e sobrevivência celular. Em linfomas humanos, níveis elevados de 4E-BP1 fosforilado têm sido associados a resistência ao tratamento [20]. Em cães, a literatura ainda é incipiente, dados sugerem que a via mTOR está ativada em linfomas B caninos, especialmente em formas de alto grau [21].

A correlação observada entre RAS e S6K1 pode indicar ativação simultânea dessas vias, associada a maior potencial proliferativo e resistência terapêutica. Tal cenário reforça a relevância de se considerar múltiplos alvos moleculares (RAS e mTORC1) no desenvolvimento de terapias direcionadas para o LM canino.

A diferença de expressão entre os marcadores sugere que, no LM e LC canino, há ativação preferencial da via RAS-MAPK, com envolvimento secundário, porém relevante, da via mTOR por meio de 4E-BP1. A menor ativação de S6K1 pode indicar uma via mTOR funcionalmente parcial ou compensada por outras cascatas. Estes achados reforçam a relevância do estudo de vias de sinalização em oncologia veterinária, com potenciais implicações no desenvolvimento de terapias-alvo, como inibidores de mTOR (ex: rapamicina) ou da via RAS/MAPK.

Um estudo realizado por Kobayashi, et al. (2025) identificou a ativação da via PI3K/AKT/mTOR em células de carcinoma prostático canino, com 3.242 genes diferencialmente expressos associados à regulação positiva dessa via. O tratamento com rapamicina reduziu a viabilidade celular de forma dose-dependente, com aumento compensatório da expressão de AKT e redução de mTOR e 4E-BP1, indicando ativação cruzada e possível resistência terapêutica. Esses achados reforçam o papel central da via PI3K/AKT/mTOR na progressão tumoral e sua relevância como alvo terapêutico [22].

De acordo com Rivera-Calderon et al. (2019) estudo do qual avaliou a expressão de marcadores da via mTOR/4E-BP1/eIF4E em 17 amostras de carcinoma prostático canino, sendo 13 normais e 5 metastáticos, por imunohistoquímica e qPCR. Observou-se que a via mTOR e eIF4E estavam significativamente elevados, mostrando correlação positiva entre si, e que eIF4E também se elevou em metástases em comparação ao tecido normal. Já a proteína 4E-BP1 apresentou duplicação ocasional com eIF4E em tumores de alto escore, sem mutações no domínio quinase do gene mTOR. Esses achados confirmam que a ativação da via translacional mTOR→4E-BP1→eIF4E está associada à agressividade e progressão do câncer prostático em cães, reforçando seu potencial como alvo terapêutico [23].

Em estudo clínico randomizado com 324 cães acometidos por osteossarcoma apendicular, a adição de sirolimus — inibidor da via mTORC1 — ao tratamento padrão (amputação e quimioterapia com carboplatina) não resultou em aumento significativo no intervalo livre de doença ou na sobrevida global. Embora o fármaco tenha apresentado boa tolerabilidade e níveis plasmáticos adequados, a ausência de estratificação prévia dos pacientes quanto à ativação da via mTOR pode ter

limitado a eficácia observada. Os resultados indicam que a inibição isolada da via mTORC1 pode não ser suficiente em populações heterogêneas, ressaltando a necessidade de biomarcadores preditivos ou terapias combinadas mais direcionadas [24].

7. CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou diferenças significativas na expressão de RAS, 4E-BP1 e S6K1 entre linfomas multicêntricos e cutâneos caninos, indicando ativação preferencial da via RAS-MAPK e envolvimento secundário, porém relevante, da via PI3K/AKT/mTOR. A ausência de correlações consistentes com parâmetros hematológicos sugere que esses marcadores atuam principalmente em processos intracelulares da biologia tumoral. A elevada expressão de RAS, associada à heterogeneidade de 4E-BP1 e à baixa ativação de S6K1, reforça seu potencial como biomarcadores diferenciais e alvos terapêuticos em cães com linfoma.

Tais achados ampliam a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dos linfomas caninos e ressaltam a importância da integração da caracterização molecular ao diagnóstico e à definição prognóstica. Além disso, apontam para a possibilidade de desenvolver terapias mais direcionadas, baseadas no perfil individual de expressão tumoral. Espera-se que, com o avanço das pesquisas em oncologia veterinária, essas informações possam ser traduzidas em aplicações clínicas práticas, contribuindo para desfechos terapêuticos mais favoráveis, monitoramento mais preciso da resposta ao tratamento e melhor qualidade de vida aos pacientes acometidos.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Dobson, J. M. et al. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **Journal of Small Animal Practice**, [S.l.], v. 43, n. 6, p. 240-246, 2002.

- [2] Ponce, F. et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Veterinary Pathology**, [S.l.], v. 47, n. 3, p. 414-433, 2010.
- [3] Azuma, K. et al. Outcomes and prognostic factors in canine epitheliotropic and nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphomas. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 118-126, 2022.
- [4] Cora, R. et al. **Immunohistochemical characterization of canine lymphomas**. [S.l.: s.n.], 2017.
- [5] Ruiz, FS. et al. Imuno-histoquímica na patologia veterinária diagnóstica: uma revisão crítica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], v. 41, p. 263-270, 2005.
- [6] Laplante, M.; Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, [S.l.], v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012.
- [7] Xu, K.; Liu, P.; Wei, W. mTOR signaling in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S.l.], v. 1846, n. 2, p. 638-654, 2014.
- [8] Zhang, Y. et al. Diagnosis of Canine Multicentric Lymphoma in Dog. **Pakistan Journal of Zoology**, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 957-960, 2022.
- [9] Aresu, L. et al. Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. **The Veterinary Journal**, [S.l.], v. 200, n. 2, p. 318-324, 2014.
- [10] Kol, A. et al. Serial haemostatic monitoring of dogs with multicentric lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 255-266, 2015.
- [11] Zandvliet, M. Canine lymphoma: a review. **Veterinary Quarterly**, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 76–104, 2016.
- [12] Jark, P. C.; Rodrigues, L. C. S. **Neoplasias hematopoiéticas em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2021. 800 p. ISBN 9786587442143.

- [13] Pearce, L. R.; Komander, D.; Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 9-22, 2010.
- [14] Panwar, V. et al. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 375, 2023.
- [15] Torres Neto, R. et al. Linfoma cutâneo de células t canino: estudo anatomoclínico de 57 casos (2013-2015). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 3, p. 59-60, 18 jan. 2016.
- [16] Nepstad I. et al. The PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2907.
- [17] Elvers I. et al. Gene expression profiling in canine B-cell lymphoma. *PLoS One.* 2019;14(4):e0214713.
- [18] Allegra A. et al. RAS mutations and their role in lymphoid malignancies. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(5):383–392.
- [19] Carvalho MI. et al. Molecular markers of the MAPK pathway in canine lymphomas. *Vet Comp Oncol.* 2021;19(3):375–382.
- [20] Witzig TE. et al. The mTOR pathway in lymphoma: biologic and therapeutic implications. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(4):472–479.
- [21] Gordon I. et al. The role of mTOR pathway in canine B-cell lymphoma. *Vet Pathol.* 2009;46(6):1190–1198.
- [22] Kobayashi PE. et al. Canine prostate cancer cell transcriptome reveals important dysregulation in PI3K/AKT/mTOR pathway. *J Comp Pathol.* 2025;219:52–58.
- [23] Rivera-Calderon LG. et al. p-mTOR, p-4EBP-1 and eIF4E expression in canine prostatic carcinoma. *Res Vet Sci.* 2019;122:86–92.
- [24] LeBlanc, A. K. et al. Adjuvant sirolimus does not improve outcome in pet dogs receiving standard-of-care therapy for appendicular osteosarcoma: a prospective, randomized trial of 324 dogs. *Clin Cancer Res.* 2021;27(11):3005–3016.

Tabela 7 - Expressão dos anticorpos anti-4E-BP1, anti-S6K1 e anti- RAS, em cães com linfoma multicêntrico (LM) ou cutâneo (LC). Jaboticabal (SP), 2025.

LM				LC			
Animais	BP1	S6K1	RAS	Animais	BP1	S6K1	RAS
LM1	1,15	9,92	19,35	LC1	4,91	8,06	1,46
LM2	32,30	10,88	16,76	LC2	18,22	3,72	2,45
LM3	2,93	0,00	10,14	LC3	4,33	3,81	3,67
LM4	8,34	0,00	1,41	LC4	19,74	1,73	1,16
LM5	9,72	15,77	12,47	LC5	12,70	4,08	2,73
LM6	7,38	7,73	11,46	LC6	6,17	7,60	6,22
LM7	22,10	0,00	7,48	LC7	8,04	9,43	2,98
LM8	19,87	5,47	9,81	LC8	7,70	9,77	1,17
LM9	5,11	17,85	10,53	LC9	8,21	0,00	1,97
LM10	21,85	22,06	26,34	LC10	11,03	9,11	14,90
LM11	12,68	0,00	9,89	LC11	3,15	1,17	3,43
LM12	9,36	0,00	3,36	LC12	1,01	1,94	4,10
LM13	12,11	0,00	19,28	LC13	3,47	7,28	3,54
LM14	0,00	0,00	11,03	LC14	14,11	6,95	6,47
LM15	7,67	0,00	9,74	LC15	3,33	1,55	1,37
LM16	10,44	2,33	8,94	-	-	-	-
LM17	16,71	12,24	12,14	-	-	-	-
LM18	0,00	6,60	9,24	-	-	-	-
LM19	4,04	0,00	8,28	-	-	-	-
LM20	2,76	8,60	26,34	-	-	-	-

Tabela 8 - Características epidemiológicas de 20 cães com linfoma multicêntrico. Jaboticabal (SP), 2025.

Animal	Raça	Sexo	Idade (anos)	Estádio	Histopatológico	Imuno	Recidiva	Sobrevida (dias)
LM1	Rottweiler	M	5	III b	Grandes cél..imunoblástico	B	19ª semana	189
LM2	Poodle	F	9	V b	Linfoma BurkittLike	B	Ausente	644
LM3	Dog Alemão	F	7	I a	Difuso de Grandes Células	T	Ausente	973
LM4	Rottweiler	F	5	III b	Difuso de Grandes Células	B	5ª semana de quimio	147
LM5	Rottweiler	M	6	IVb	Linfoma Linfoblástico	B	Ausente	259
LM6	SRD	M	5	IV a	Difuso de Grandes Células	B	Ausente	490
LM7	SRD	M	7	IVa	Difuso de grandes células	B	-	553
LM8	Basset	F	5	IVb	Difuso de grandes células	B	-	21
LM9	BullTerrier	F	7	IVa	Difuso de grandes células	B	-	140
LM10	Rottweiler	F	11	IVb	Difuso de grandes células	B	-	357
LM11	SRD	F	12	IVb	Difuso de grandes células	B	-	380
LM12	PitBull	F	13	IVa	Difuso de grandes células	B	-	539
LM13	Poodle	F	7	IVa	linfomalinfoblástico	T	7 semanas	84
LM14	BassetHoun	F	6	IVb	Difuso de grande células	B	-	133
LM15	Rottweiler	F	6	-	Difuso de grandes células	B	Parou a quimio	136
LM16	Fox Terrier	F	7	IVb	Difuso de grandes células	B	-	84
LM17	PitBull	F	9	IVa	Difuso de grandes células	B	-	105
LM18	Boxer	F	8	IIIb	Linfoplasmocítico x zona marginal	T	2ª ou 3ª semana	28
LM19	Rottweiler	F	5	Va	Difuso de grandes células	B	-	392
LM20	Maltês	M	4	IVa	Difuso de grande células	B	-	147

Observações: “a” sem sinais clínicos, e “b” com sinais clínicos inespecíficos.

Tabela 9 – Características hematológicas e bioquímico-séricas de 12 cães com linfoma multicêntrico. Jaboticabal (SP), 2025.

Animais	HE (X10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Plaquetas (X10 ³ /μL)	WBC (/μL)	NS (/μL)	LF (/μL)	EOS (/μL)	MON (/μL)	Creat (mg/dL)	ALT (U/L)
LM1	6,58	14,2	45	414.000	25.600*	16.640	2560	768	512	1,8	105
LM2	3,13	8	23	116.000	32.900	16.121	16450	0	329	-	-
LM3	5,93	14,2	43	171.000	6.900	6.072	345	276	207	3	2,21
LM4	6,24	12,8	44	200.000	17.700	8.673	9027	885	531	0,8	37
LM5	5,65	13,5	38	94.000	11.900	9.282	2142	238	238	1,4	36
LM6	5,54	12,5	36	208.000	11.600	8.120	1740	696	928	1,9	26
LM7	5,67	12	38	214.000	8.700	7.569	783	87	261	1,6	57
LM8	5,97	14,1	41	198.000	10.100	7.070	1414	808	808	26	-
LM9	5,69	13,8	40	91.000	6.600	4.554	1320	264	396	1,9	20
LM10	4,28	10,2	30	536.000	4.400	2.992	880	0	528	1	94
LM11	5,45	12,2	39	385.000	16.300	14.344	652	163	1.141	1,5	168
LM12	6,12	14,8	44	157.000	4.900	2.793	1568	392	147	1,1	62

* Neutrófilos bastonete: 5120.

Tabela 10 - Características epidemiológicas de 15 cães com linfoma cutâneo. Jaboticabal (SP), 2025.

Animais	Raça	Sexo	Idade	Histopatológico	Imuno	Sobrevida (dias)
LC1	Labrador	M	9 anos	Linfoma Não-Epiteliotropico	B	155
LC2	SRD	F	9 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	6
LC3	SRD	F	5 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	41
LC4	SRD	M	10 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	1
LC5	Golden R.	M	4 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	16
LC6	SRD	M	4 anos	Linfoma Não-Epiteliotropico	B	24
LC7	SRD	F	7 anos	Linfoma Não-Epiteliotropico	B	15
LC8	Teckel	F	14 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	1
LC9	Teckel	F	12 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	59
LC10	Poodle	F	7 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	20
LC11	Golden R.	F	8 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	23
LC12	SRD	F	11 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	151
LC13	SRD	F	8 anos	Linfoma Não-Epiteliotropico	B	7
LC14	SRD	M	7 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	1
LC15	SRD	M	11 anos	Linfoma Epiteliotropico	T	426

Tabela 11 – Características hematológicas e bioquímico-séricas de 15 cães com linfoma cutâneo. Jaboticabal (SP), 2025.

Animais	Hemácias (X10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Plaquetas (X10 ³ /μL)	WBC (/μL)	NS (/μL)	LF (/μL)	EOS (/μL)	MON (/μL)	Creat (mg/dL)	ALT (U/L)
LC1	4,95	11,4	32,4	188	9.300	5.487	3.348	186	279	1,2	31
LC2	3,36	7,6	21,2	620	77.500	69.750	2.325	1.550	3.100	3,2	324
LC3	6,62	13,7	40,5	337	12.600	8.946	2.520	0	1134	1,2	99
LC4	4,94	10,7	31	251	21.200	19.504	1.060	0	636	0,9	31
LC5	6,24	13,8	40	156	7.000	6.300	140	420	70	1	26
LC6	5,27	12	32,5	65	4.500	4.050	180	180	90	1,6	20
LC7	6,23	15,5	42,1	109	4.000	2.680	800	280	160	1,2	89
LC8	3,90	8,6	25,7	299	7.900	6.794	632	158	316	0,8	26
LC9	7,74	18,5	50,9	471	4.400	4.048	264	0	88	1	62
LC10	4,54	10,8	29,6	153	10.900	9.202	856	214	321	0,7	57
LC11	6,16	13	38,3	252	21.900	20.586	438	0	876	1	1,79
LC12	5,92	14	42	256	9.400	8.300	400	400	400	1	56
LC13	3,45	7,8	24	Fibrina	10.000	8.400	400	100	1.100	0,6	21
LC14	4,48	9,3	29	40	17.800	16.400	200	200	1.100	0,6	33
LC15	6,95	15	44	191	6.400	5.200	200	200	800	0,87	49