

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DOS LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES
CÉLULAS B CANINOS UTILIZANDO-SE O MÉTODO DE
MICROARRANJO DE TECIDO (TMA)

MARIA CLAUDIA LOPES DA SILVA

BOTUCATU - SP

Maio de 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DOS LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES
CÉLULAS B CANINOS UTILIZANDO-SE O MÉTODO DE MICROARRANJO DE
TECIDO (TMA)

MARIA CLAUDIA LOPES DA SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Patologia Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Maria Claudia Lopes da.

Perfil imunoistoquímico dos Linfomas Difusos de Grandes Células B caninos utilizando-se o método de microarranjo de tecido (TMA) / Maria Claudia Lopes da Silva. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Capes: 50503006

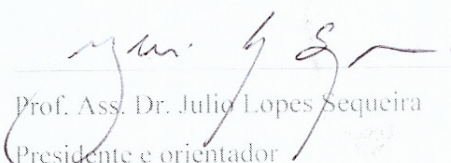
1. Cão - Doenças. 2. Linfoma. 3. Imuno-histoquímica. 4. Patologia veterinária. 5. Análise de microarranjo.

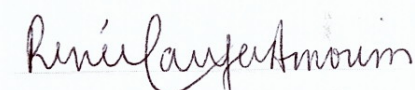
Palavras-chave: Cão; DLBCL; Imunoistoquímica; Linfoma; TMA.


Maria Claudia Lopes da Silva

Título: PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DOS LINFOMAS DIFUSOS DE GRANDES CÉLULAS B CANINOS UTILIZANDO-SE O MÉTODO DE MICROARRANJO DE TECIDO (TMA)

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira
Presidente e orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu


Prof. Adj. Dra. Renée Laufer Amorim
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu


Prof. Dra. Sara Maria de Carvalho e Suzano
Membro
Universidade Castelo Branco – Rio de Janeiro

Data da defesa: 27 de maio de 2015.

ESTA PESQUISA FOI FINANCIADA PELAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

DEDICO...

À minha mãe **Maria Lucia Cordioli da Silva** e pai **Francisco Lopes da Silva** pelo apoio e confiança incondicionais, sempre acreditando que tenho capacidade de realizar qualquer coisa a que me proponho. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADEÇO

Ao meu estimado orientador **Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira**, por todo seu apoio, paciência e ensinamentos durante, não somente o desenvolvimento deste projeto, mas também nos dois anos de residência. Obrigada por ser essa pessoa excelente e profissional admirável.

À **Profa. Dra. Renée Laufer Amorim** pelos conselhos inestimáveis, amizade e oportunidades que me proporcionou durante estes quatro anos que estou em Botucatu. Sem dúvida é uma das pesquisadoras mais competentes que já conheci.

À **Maria Valéria Morales Dalanezi** pela pronta ajuda na parte técnica do projeto e nos momentos de dificuldade. É sempre bom saber que temos alguém com quem contar.

Ao **Carlos Eduardo Fonseca Alves** pela amizade, constantes dicas e conselhos. A pós-graduação certamente teria sido muito mais difícil sem você.

A todos meus **familiares** que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À minha querida amiga **Juliana Bombardelli**. Mesmo fisicamente distante, seu apoio foi fundamental nessa jornada.

À **Raquel Beneton Ferioli** pela amizade, paciência, conselhos e conhecimentos adquiridos nesses anos.

A todos os meus **amigos em Botucatu**, em especial **Gabriela Nascimento Dantas**. Sem vocês certamente o trajeto teria sido mais difícil.

À **Thaís Rosalen Fernandes** por todo o auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao **Prof. Dr. Hélio Amante Miot** pela assistência na análise estatística do projeto, além da disponibilidade e simpatia.

Aos residentes do Serviço de Patologia da FMVZ UNESP Botucatu, **Leonardo Fabricio Pavan**, **Juliano Nóbrega** e **Maíra Bonanim Martins** pela ajuda na obtenção de parte das amostras e é claro, pela amizade. A disseminação do conhecimento é parte essencial de nossas vidas.

Ao **Maury Raul** e **Claudinei Domingues** por todo o auxílio desde os tempos da residência.

À **Rafael Torres Neto** pela ajuda na padronização das reações imunoistoquímicas.

À **FAPESP** pela bolsa concedida, a qual viabilizou a realização desse projeto.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Correspondências entre as classificações da Kiel (LENNERT; FELLER, 1992), WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (VALLI et al., 2002) e WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (SWERDLOW et al., 2008) em relação ao DLBCL.....	09
TABELA 2: Anticorpos primários utilizados na caracterização do perfil imunoistoquímico dos Linfomas Difusos de Grandes Células B caninos.....	25
TABELA 3: Número de casos e percentual de DLBCL de acordo com a raça.....	27
TABELA 4: Número de casos e percentual de DLBCL de acordo com o sexo.....	28
TABELA 5: Número de casos e percentual de DLBCL de acordo com a forma anatômica.....	29
TABELA 6: Número de casos e percentual de DLBCL de acordo com o estadiamento clínico.....	30
TABELA 7: Distribuição da raça, sexo, idade e estadiamento clínico dos DLBCLs de acordo com a forma anatômica.....	31
TABELA 8: Subtipos de DLBCL de acordo com a classificação de Kiel atualizada (LENNERT; FELLER, 1992).....	33
TABELA 9: Subtipos de DLBCL de acordo com a classificação da WHO de 2008 (SWERDLOW et al., 2008).....	34
TABELA 10: Subtipos de DLBCL de acordo com a classificação da WHO veterinária (VALLI et al., 2002).....	35
TABELA 11: Distribuição das classificações de Kiel, WHO veterinária e humana dos DLBCLs de acordo com a forma anatômica.....	35
TABELA 12: Perfil de marcação do imunofenótipo dos DLBCLs.....	37
TABELA 13: Porcentagem de marcação dos anticorpos nos DLBCLs de acordo com a classificação da Kiel atualizada (LENNERT; FELLER, 1992).....	37
TABELA 14: Porcentagem de marcação dos anticorpos nos DLBCLs de acordo com a classificação da WHO de 2008 (SWERDLOW et al., 2008).....	38
TABELA 15: Porcentagem de marcação dos anticorpos nos DLBCLs de acordo com a classificação da WHO veterinária (VALLI et al., 2002).....	38

TABELA 16: Valores da mediana, percentil 25 e percentil 75 para o anticorpo caspase-3 nos DLBCLs.....	39
TABELA 17: Valores das medianas da porcentagem de marcação dos tumores pelo anticorpo caspase-3 e Ki67 entre as diferentes classificações e subtipos do DLBCL.....	40
TABELA 18: Valores das medianas da porcentagem de marcação dos tumores pelo anticorpo Ki67 entre os diferentes subtipos e classificações do DLBCL.....	41
TABELA 19: Mediana da razão Ki67/Caspase nos diferentes subtipos e classificações do DLBCL.....	41
TABELA 20: Porcentagem de marcação dos tumores pelo anticorpo p53 entre os diferentes subtipos e classificações do DLBCL.....	43
TABELA 21: Perfil imunoistoquímico dos DLBCLs de acordo com a forma anatômica.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com a raça.....	28
FIGURA 2: Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com o sexo.....	29
FIGURA 3: Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com a forma anatômica....	30
FIGURA 4: Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com estadiamento clínico.....	31
FIGURA 5: Linfoma centroblástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Notar os nucléolos múltiplos periféricos. HE.....	32
FIGURA 6: Linfoma imunoblástico de células B. Observar nucléolos únicos centrais proeminentes e comparação entre o tamanho do núcleo das células em relação à hemácea (seta). HE.....	33
FIGURA 7: Linfoma centroblástico polimórfico (classificação de Kiel atualizada). Observar combinação entre células com morfologia imunoblástica (nucléolos únicos centrais proeminentes) e centroblástica (dois a quatro nucléolos periféricos). HE.....	34
FIGURA 8: Painel imunoistoquímico de um linfoma B centroblástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). A. Coloração de HE. B. Imunomarcção negativa nas células neoplásicas para o anticorpo CD3. C. Imunomarcção membranar do anticorpo CD20. D. Imunomarcção citoplasmática do anticorpo CD79. E. Imunomarcção nuclear do anticorpo PAX-5. F. Imunomarcção nuclear do anticorpo Ki67. G. Imunomarcção citoplasmática do anticorpo Caspase-3. H. Imunomarcção nuclear do anticorpo p53. Nvolink, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Barra = 20 µm.....	36
FIGURA 9: Linfoma centroblástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Imunomarcção citoplasmática do anticorpo Caspase-3. DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	39
FIGURA 10: Linfoma centroblástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Imunomarcção nuclear do anticorpo Ki67. DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	40
FIGURA 11: Linfoma centroblástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Imunomarcção nuclear do anticorpo p53. DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.....	42

FIGURA 12: Gráfico de Bland Altman da concordância entre os valores de caspase nos DLBCLs, comparando-se o bloco com o TMA.....	44
FIGURA 13: Gráfico de Bland Altman da concordância entre os valores de Ki67 nos DLBCLs, comparando-se o bloco com o TMA.....	45

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivos gerais.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Amostras.....	22
4.2 Exame histopatológico.....	22
4.3 Análise microscópica.....	23
4.4 Microarranjo de tecido (TMA)	23
4.5 Utilização da imunistoquímica.....	24
4.6 Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS	27
5.1 Dados clínicos	27
5.2 Subtipos morfológicos.....	32
5.3 Imunofenotipagem.....	37
5.4 Determinação do Índice Apoptótico Pela Expressão de Caspase-3.....	38
5.5 Determinação do Índice Proliferativo pela expressão de Ki67.....	40
5.6. Razão entre Ki67 e caspase	41
5.7 Expressão de p53.....	42
5.8 Técnica de Microarranjo de Tecido (TMA).....	44
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	52
8. BIBLIOGRAFIA.....	53
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	69

RESUMO

SILVA, M. C. L. Perfil imunoistoquímico dos Linfomas Difusos de Grandes Células B caninos utilizando-se o método de microarranjo de tecido (TMA). Botucatu, 2015. 91 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os linfomas não Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães, sendo o Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL) o subtipo mais frequente. Os DLBCLs são neoplasias formadas por células linfoides B com padrão de crescimento difuso e podem apresentar pelo menos cinco variantes. O presente trabalho teve como objetivos traçar o perfil imunoistoquímico dos DLBCLs dos cães, classificá-los de acordo com os critérios estabelecidos pela WHO (2008), WHO veterinária (2002) e Classificação de Kiel e efetuar a avaliação dos anticorpos utilizados pelo método de microarranjo de tecido (TMA), comparando-o com o corte convencional. Foi avaliada a expressão imunoistoquímica de marcadores pan B (CD79a, CD20 e PAX-5); a determinação dos índices proliferativo (Ki-67) e apoptótico (caspase-3) e também da expressão de p53 mutante. Foram observados 24 linfomas centroblasticos monomórficos, 4 imunoblásticos B e 1 centroblastico polimórfico de acordo com a classificação de Kiel. Este perfil é de 25 Linfomas de Grandes Células B Difusos/ DLBCL, NOS variante centroblastica e 4 Imunoblásticos de Grandes Células /DLBCL, NOS variante imunoblástica, pela WHO de 2002 e 2008, respectivamente. Houve marcação em 100%, 75,8% e 58,6% dos casos para o CD79a, CD20 e PAX-5, respectivamente. A mediana de porcentagem de marcação para o Ki-67 e para a caspase-3 foi de 45,9% e 10%, respectivamente. Já a expressão da proteína p53 mutante foi verificada em 16 tumores (55,1%). A análise destes marcadores utilizando-se o TMA resultou em perfil imunofenotípico idêntico e medianas de caspase-3, Ki67 e p53 significativamente semelhantes quando comparadas com o corte convencional. Concluiu-se que em nossas amostras não houve diferença estatística entre os diferentes subtipos histológicos em relação aos índices proliferativo e apoptótico e expressão da p53. Ainda, o TMA é uma técnica adequada para avaliação do imunofenótipo, índices proliferativos, apoptóticos e presença da p53 mutante.

Palavras-chave: linfoma, cão, DLBCL, imunoistoquímica, TMA

ABSTRACT

SILVA, M. C. L. Canine Diffuse Large B Cell Lymphoma imunohistochemical profile using Tissue Microarray (TMA). Botucatu, 2015. 91 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Non Hodgkin lymphomas (LNHs) are the most common hematopoietic tumors of dogs, among which Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is the most frequent subtype. DLBCLs are tumors composed of lymphoid B cell with a diffuse growth pattern and may present at least five variants. The present work intended to delineate the immunohistochemical profile of canine DLBCL, classify them according to the criteria proposed by WHO (2008); veterinary WHO (2002) and Updated Kiel Classification and also perform the evaluation of the used antibodies on tissue microarray (TMA) method in comparison to conventional histological sections. The immunohistochemical expression of pan B markers (anti CD79a, anti CD20 and PAX-5) was assessed; as well as the determination of proliferation index (Ki-67) and apoptosis (caspase 3) and also the expression of the mutant p53. There were 24 monomorphic centroblastic lymphomas, 4 immunoblastic B and 1 polymorphic centroblastic according to Kiel. That profile is 25 Diffuse Large B Cell Lymphoma/ DLBCL, NOS centroblastic variant and 4 Large Cell Immunoblastic/ DLBCL, NOS immunoblastic variant according to WHO 2002 and 2008 respectively. Immunolabeling was seen in 100%, 75.8% and 58.6% of the cases for CD79a, CD20 and PAX-5 respectively. The immunolabeling median percentage of Ki67 was 45.9% and for caspase-3 it was 10%. The expression of mutant p53 was observed in 16 tumors (55.1%). The analysis of those markers using TMA resulted in identical immunophenotype and significantly similar medians of caspase-3, Ki67 e p53 when compared to conventional sections. In conclusion there was no statistical difference among the histological subtypes regarding proliferation and apoptotic indexes and p53 expression in our samples. Also, TMA is an adequate technique for evaluating immunophenotype, proliferation and apoptotic indexes as well as presence of mutant p53.

Key words: lymphoma, dog, DLBCL, immunohistochemistry, TMA

1. INTRODUÇÃO

Os linfomas não-Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães e estes tem sido propostos como modelo de ocorrência espontânea para o estudo da etiologia e protocolos de tratamento dos LNHs humanos (PONCE et al., 2010; COMAZZI et al., 2014; ITO et al., 2014; RICHARDS; SUTER, 2014). Já há algum tempo a classificação morfológica dos LNHs caninos têm se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHs humanos (VALLI et al., 2002; VALLI et al., 2011)

No homem, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são linfomas difusos de grandes células B (DLBCL – diffuse large B cell lymphoma), que também é o tipo de LNH mais frequente nos cães (VALLI et al., 2011; ITO et al., 2014)

Nas classificações de LNHs humanas, principalmente as propostas pela WHO (JAFFE et al., 2001; SWERDLOW et al. 2008), os subtipos são caracterizados por dados epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que permitem a identificação de entidades morfológicas (PONCE et al., 2010; ITO et al., 2014). Esta também tem sido a tendência para a classificação atual dos linfomas caninos, visto que cada vez mais há trabalhos que focam em alterações genéticas similares as encontradas no homem, as quais podem permitir uma maior acurácia na classificação e potencialmente desenvolvimento de terapia mais eficaz para determinados tipos de linfoma (FRANTZ et al., 2013; MUDALIAR et al, 2013; RICHARDS et al., 2013; ITO et al., 2014;).

Atualmente, a imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas de classificação dos linfomas caninos, assim como a determinação da expressão de marcadores biológicos como Ki-67, caspase-3 e p53 (SUZANO, 2007). A determinação do índice proliferativo, utilizando-se o Ki67, pode aumentar a acurácia da classificação dos linfomas e facilitar a diferenciação entre determinados subtipos que são morfolologicamente semelhantes como o linfoma de zona marginal, utilizando-se os índices proliferativos e apoptóticos maiores apresentados pelos DLBCLs (VALLI et al., 2007).

Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem maior índice de positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento (DONOGHUE et al., 1999). Este tipo de avaliação ainda é pouco comum nas neoplasias caninas, porém nos linfomas caninos empregando-se as classificações de Kiel e Working Formulation observou-se grande variação no percentual de

células positivas, não sendo constatada diferença entre os linfomas de alto e baixo grau e entre os diferentes imunofenótipos (SUZANO, 2007). A determinação do percentual de células positivas para caspase-3 e a aplicação de classificações mais atuais, como as propostas para os animais domésticos (VALLI et al., 2002) e para os seres humanos (SWERDLOW et al., 2008) nos linfomas caninos, mais especificamente os DLBCLs, podem auxiliar no estabelecimento de um perfil mais detalhado destas neoplasias.

Na literatura a expressão do p53 alterado no linfoma varia de 22 a 60% dos casos (INAMURA et al., 1994; SUEIRO et al., 2004; SUZANO, 2007; DHALIWAL et al., 2013). SUEIRO et. al (2004) não detectaram correlação da expressão do p53 com imunofenótipo e grau de malignidade das neoplasias. Em estudo recente não foi constatada diferença nos níveis de expressão e frequência da mutação do TP53 entre os grupos de animais portadores de linfomas sensíveis e resistentes à quimioterapia (TOMIYASU et al., 2010). Em outro estudo foi observado que a expressão do p53 teria impacto negativo na sobrevida total do animal, mas não influenciaria no tempo de recorrência da doença (DHALIWAL et al., 2013). Assim, na Medicina Veterinária, o papel desempenhado pelo p53 é controverso (SUEIRO et al., 2004; SUZANO, 2007; CALAZANS, 2010).

Neste contexto, percebe-se a necessidade da utilização de painéis de anticorpos mais amplos. Assim, técnicas como o microarranjo de tecido (TMA), que consiste em remover pequenos cilindros de tecido de vários blocos doadores e agrupá-los em um único bloco receptor, (BUBENDORF et al. 2001) facilitam a avaliação de um número grande de amostras sob as mesmas condições, além de poupar reagentes, tempo e custo, ainda com aumento substancial da eficácia (MILANES-YEARSLEY et al., 2002). Uma desvantagem da técnica é que a quantidade limitada de tecido analisado pode não ser representativa. Estudos de validação com amostras humanas demonstraram graus variáveis de concordância entre o TMA e o corte inteiro. Esta variação se deve a diversos fatores, entre eles, avaliação de diferentes tipos tumorais e marcadores, distribuição desigual de um determinado marcador, método de avaliação aplicado e número de *cores* para cada tumor (ZU et al., 2005). Diante do exposto, se faz necessário um estudo comparativo entre o corte convencional e o TMA englobando marcadores de imunofenótipo, proliferação e apoptose, verificando a adequação de sua utilização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os linfomas não Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães (DOBSON et al., 2001; RUTLEY; MACDONALD, 2007), com incidência variando de 13 a 33 casos por 100.000 cães, o que os torna mais comuns nesta espécie do que nos homens (SÖZMEN et al., 2005). Quando se leva em conta apenas cães idosos a prevalência pode chegar a 84 por 100.000, já para cães com menos de um ano cai para 1,5 por 100.000 cães (VAIL et al., 2001). Existem trabalhos que apontam números ainda mais altos, como é o caso de um estudo da população de Golden retrievers na Alemanha onde se observou o valor de 116 por 100.000 cães. (BOERKAMP et al., 2014).

Ainda não está bem estabelecida uma causa para o linfoma, mas há fatores que devem contribuir para o desenvolvimento da doença. Aberrações no sistema imune foram observadas em cães com linfoma, além de aumento da ocorrência em cães com doenças autoimune. Não foi comprovada, no entanto, uma relação de causa efeito. Em humanos o risco de desenvolver câncer no sistema linforreticular é maior em pessoas com imunossupressão. Acredita-se que isso seja devido a superexpressão de alguns oncogenes em linfócitos destes pacientes, o que eventualmente levaria ao desenvolvimento da neoplasia (TESKE, 1994).

Outra possível causa para o linfoma seria infecção viral, sendo esta ainda não comprovada em cães, mas observada em alguns tipos de leucemia e linfoma em humanos (RICHARDS; SUTER, 2014). A exposição a produtos químicos, provavelmente devido ao seu efeito imunossupressor, já foi citada (TESKE, 1994). Em estudo realizado na cidade de São Paulo, foi observada associação positiva entre cães que residem fora da residência perto de ruas e avenidas movimentadas e aumento no risco de desenvolvimento de linfoma, sugerindo que a poluição ambiental advinda do trânsito de veículos pode estar associada com a doença (ZANINI et al., 2013).

Além destas causas estão aumentando os estudos com relação a anormalidades cromossômicas, já tendo sido observadas alterações numéricas (TESKE, 1994) e translocações cromossômicas (RÜTGEN et al, 2012). Recentemente foi observada uma deleção do cromossomo 14 exclusivamente, mas não em todos os DLBCLs. Nos cães da raça golden retriever, no entanto, foi observada em todos os animais avaliados, ressaltando o potencial do cão

como modelo para o estudo do linfoma, em especial em determinadas raças que apresentam menor variabilidade genética (DOBSON, 2013).

Alterações epigenéticas são eventos precoces durante a carcinogênese e a hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes supressores de tumor é um mecanismo bem conhecido de silenciamento gênico que contribui para o desenvolvimento e progressão tumoral. Inibidor de Via do Fator Tecidual 2 (TFPI-2) é um supressor de tumor envolvido na inibição de invasão. O silenciamento do TFPI-2 é amplamente relatado em vários distúrbios de caráter maligno em humanos, mas pouco avaliado no linfoma (FERRARESSO et al., 2014).

Em 2014 Ferraresso et al investigaram a expressão do TFPI-2 no Linfoma Difuso de Grandes Células B canino comparando com linfonodo normal e observaram hipermetilação em 77% das amostras tumorais. Verificaram ainda que o nível de metilação estava significativamente aumentado comparado ao controle e a análise identificou 82% dos loci com hipermetilação, com aumento médio de 2 a 120 vezes. A análise de expressão gênica confirmou diminuição da expressão do TFPI-2 nos DLBCLs comparado a linfonodo normal, sugerindo que a sua hipermetilação regula negativamente a transcrição. Foi encontrada ainda correlação positiva entre nível de metilação e idade do animal, provendo a primeira indicação de modificações epigenéticas no DLBCL associadas com a idade. No futuro este achado pode ser considerado em associação para o prognóstico e terapia (FERRARESSO et al., 2014).

Os linfomas dos cães exibem biologia tumoral, influência ambiental, comportamento biológico tumoral e aberrações genéticas, assim como influências ambientais, semelhantes aos do homem. A incidência de linfoma em humanos e cães é semelhante, o tipo mais comum de LNH é o mesmo em humanos e no cão – linfoma de células B difuso –, os mesmos agentes quimioterápicos são utilizados e por isso a doença na espécie canina tem sido proposta como modelo de ocorrência natural para o estudo da etiologia e de protocolos de tratamento dos LNHs humanos (PONCE et al., 2010; ROWELL et al, 2011;COMAZZI et al., 2014; ITO et al., 2014).

Anatomicamente, os linfomas caninos podem ser classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário (JACOBS et al., 2002). De acordo com a World Health Organization (WHO) podem ser classificados em cinco estágios clínicos (OWEN, 1980) e dois subestágios (GREENLEE et al., 1990), os quais refletem o grau de envolvimento dos órgãos afetados e sinais clínicos apresentados pelo animal, respectivamente (VAIL; YONG, 2007). Assim a extensão da

doença pode ser descrita e a maioria dos linfomas caninos se apresenta em estágios avançados, III, IV ou V, no momento do diagnóstico (TESKE, 1994; CARDOSO et al., 2003; GAVAZZA et al., 2008; MORENO e BRACARENSE, 2007; CÁPUA et al., 2011; NEUWALD et al., 2014). Os sinais clínicos associados são variáveis e dependem entre outros fatores da localização do tumor. (VAIL; YONG, 2007)

Na forma multicêntrica, que é a mais comumente encontrada (SEQUEIRA et al., 1999; CARDOSO et al., 2003; MORENO; BRACARENSE, 2007; PONCE et al., 2010; ZANINI et al., 2013; NEUWALD et al., 2014) o achado mais consistente é a linfadenopatia indolor generalizada, com possível hepatoesplenomegalia e envolvimento da medula óssea. A forma mediastinal é relatada como a segunda apresentação mais comum (SEQUEIRA et al. 1999, CARDOSO et al. 2003). É caracterizada pelo aumento dos linfonodos mediastínicos craniais e/ou timo, e os sinais clínicos incluem dispneia, tosse, intolerância ao exercício e regurgitação (TESKE, 1994; CARDOSO et al., 2003).

Cães com a forma alimentar ou digestiva comumente apresentam sinais gastroentéricos inespecíficos como êmese, diarreia e perda de peso. Linfonodos mesentéricos, fígado e baço também podem estar envolvidos. (TESKE, 1994; FIGHERA et al., 2002). O linfoma cutâneo no cão pode ser generalizado ou multifocal e histologicamente pode ser dividido em epiteliotrópico (geralmente de origem T) e não epiteliotrópico (geralmente de origem B). Os tumores podem se apresentar na forma de nódulos, placas, úlceras, eritroderma e dermatite esfoliativa (VAIL; YOUNG, 2007). A forma extranodal ou isolada é mais incomum e pode afetar qualquer tecido do corpo, sendo sítios comuns o tecido ocular e neural (FIGHERA et al., 2002; CARDOSO et al., 2003).

Os linfomas podem ser divididos ainda de acordo com sua origem em linfomas de células B e T, sendo que o T é apontado como de pior prognóstico (KIUPEL et al., 1999; DOBSON, 2001) Na literatura internacional tem-se o linfoma B como o de maior ocorrência nos cães (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; ARESPACOHAGA et al., 2007; PASTOR et al., 2009; VEZZALI et al., 2010; PONCE et al., 2010), já na literatura brasileira foi observado tanto predominância de linfomas T (MORENO; BRACARENSE 2007; FERNANDES, 2014), quanto de linfoma B (NEUWALD et al., 2014). Foi levantada a hipótese que essa variação se deva ao

número limitado de indivíduos avaliados, assim, um estudo mais amplo poderia eliminar uma possível variação regional em relação ao imunofenótipo da neoplasia (NEUWALD et al., 2014).

Não há predisposição sexual para o desenvolvimento de linfoma, mas já foi observada em alguns estudos uma tendência de maior ocorrência em machos (CARDOSO et al, 2003; FIGUEIRA et al. 2006; MORENO; BRACARENSE, 2007; PASTOR et al., 2009, VALLI et al., 2013; FERNANDES, 2014)

O linfoma pode ocorrer em qualquer idade, mas afeta predominantemente animais de meia idade a idosos. (TESKE, 1994) Estudos relatam médias variando de 5,9 a 9,5 anos (SEQUEIRA et al. 1999, DOBSON et al. 2001; MODIANO et al., 2005; MORENO; BRACARENSE, 2007; PASTOR et al., 2009; ZANINI et al., 2013; NEUWALD et al., 2014).

A predisposição racial para o desenvolvimento do linfoma na espécie canina tem sido descrita (PONCE et al., 2010). Raças com risco aumentado de linfoma incluem Bouvier des Flandres, Rottweiler, Doberman, Pastor Alemão, São Bernardo, Labrador, Golden retriever, Scottish terrier, Setter e Bull Mastiff (TESKE, 1994; DOBSON et al. 2001; EDWARDS et al., 2003; PASTOR et al., 2009). Algumas raças de pequeno porte frequentemente acometidas pelo linfoma incluem o Poodle e o Scottish Terrier (DOBSON et al. 2001). Raças com menor acometimento incluem Dachshund, Poodle toy, Yorkshire terrier e Pomeranians (TESKE, 1994; VAIL; YOUNG, 2007; JACOBS et al. 2002).

No Brasil a presença de animais sem raça definida é sempre expressiva e, portanto, isto se reflete nos resultados das casuísticas que têm sido publicadas. Dentre as raças mais observadas, a ocorrência é maior em animais de grande porte como Pastor Alemão, Boxer, Dobbermann e Rottweiler (SEQUEIRA et al., 1999; MORENO; BRACARENSE, 2007).

Foi observada uma maior probabilidade de desenvolver determinado imunofenótipo do linfoma de acordo com a raça. Os Boxers tem risco aumentado de desenvolver neoplasias T (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; DOBSON, 2013), assim como Bullmastiff (ONIONS, 1984), raças Spitz e cães asiáticos de “colo”, enquanto que Border Collie, Baset Hound, Cocker Spaniel, Doberman, Pastor Alemão e provavelmente Rottweiler são afetados principalmente por neoplasias B (MODIANO et al., 2005; DOBSON, 2013). Devido à ocorrência em grupos de raças que possuem origem em comum, acredita-se que o risco aumentado de desenvolvimento de doenças linfoproliferativas de origem T pode ter surgido em algum ancestral, enquanto que o

risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias B pode surgir de diferentes fatores de risco ou combinações que tiveram origem durante o processo de seleção da raça (DOBSON, 2013).

Já há algum tempo a classificação morfológica dos LNHS caninos têm se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHS humanos – classificação atualizada de Kiel, Working Formulation for Clinical Usage (WF), Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL) e mais recentemente a classificação da World Health Organization (WHO) – levando em conta caracteres epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que no homem permitem a identificação de entidades morfológicas (PONCE et al., 2010)

Na Medicina Veterinária todos estes sistemas propostos foram aplicados na medida em que eram desenvolvidos (CARTER et al., 1986; GREENLLE et al., 1990; TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; VALLI et al., 2002; PONCE et al., 2010). Mesmo que sem concordância entre os especialistas veterinários sobre qual seria o mais adequado, os resultados foram animadores (VALLI et al., 2002). Independentemente da classificação utilizada a principal diferença identificada entre seres humanos e cães foi a predominância dos linfomas mais agressivos nesta última espécie, sendo os linfomas foliculares pouco frequentes (BIENZLE; VERNAU, 2011). No entanto, o valor do cão como modelo da doença humana depende da possibilidade de distinção dos principais subgrupos de linfoma em ambas as espécies com uma classificação confiável dos LNHS caninos seguindo esquemas atualmente utilizados para os LNHS humano (PONCE et al., 2010)

No homem, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são Linfomas Difusos de Grandes Células B (Diffuse Large B Cell Lymphoma – DLBCL), que é considerada a forma mais comum de linfoma não Hodgkin no mundo ocidental. O DLBCL está associado a um histórico agressivo, com média de sobrevida de menos de um ano em pacientes não tratados (FLOWERS et al., 2010). Segundo os autores que utilizaram a classificação da WHO, o subtipo de LNH mais frequente nos cães é o DLBCL (VALLI et al., 2011; ITO et al., 2014).

Nas classificações mais antigas o DLBCL é correspondente aos subtipos histiocítico difuso e misto histiocítico-linfocítico difuso na Rappaport; célula de centro de folículo grande clivada e não clivada e imunoblástico B na Lukes Collins; difuso de grandes células, imunoblástico de

grandes células, difuso misto de pequenas e grandes células na Working Formulation e linfoma difuso de grandes células B na REAL. (GATTER; WARNKE, 2008)

A proposta da Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da World Health Organization (WHO) é baseada na classificação REAL/WHO utilizada nos linfomas humanos (VALLI et al., 2002; VALLI et al., 2013). Ela tem sido aplicada por vários autores em diferentes espécies, porém sem que haja consenso na sua adequação para os LNHS caninos. Grupos importantes no estudo deste tipo de neoplasia ainda consideram que a classificação de Kiel atualizada (LENNERT; FELLER, 1992) não deve ser descartada (PONCE et al., 2010).

Na classificação atualizada de Kiel os subtipos correspondentes aos DLBCL são os linfomas centrolásticos monomórficos e polimórficos, os imunoblásticos de células B e os anaplásicos de grandes células B (LENNERT; FELLER, 1992), que correspondem também ao maior percentual dos casos encontrados, mais de 50%, quando se aplica esta classificação aos linfomas caninos (PONCE et al., 2010).

Os autores que utilizaram a Classificação de Kiel já demonstraram a importância dessa classificação para os linfomas caninos (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; PONCE et al., 2004), sendo esta classificação utilizada ainda em trabalhos de pesquisa recentes (MARCONATO, 2010; PONCE et al., 2010). O aspecto comparativo ou a correspondência entre as duas classificações – WHO e Kiel – torna-se importante na avaliação dos Linfomas de Grandes Células B (Tabela 1), na medida em que a classificação de Kiel serve como parâmetro para o estabelecimento do prognóstico nos cães (TESKE, 1994).

TABELA 1. Correspondências entre as classificações da Kiel (LENNERT; FELLER, 1992), WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (VALLI et al., 2002) e WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (SWERDLOW et al., 2008) em relação ao DLBCL.

KIEL	WHO (2002)	WHO (2008)
Centroblásticos monomórficos e polimórficos	Linfoma de Grandes Células B difuso (não clivadas e clivadas)	DLBCL, NOS variante centroblástica
Imunoblásticos de células B	Imunoblástico de Grandes Células	DLBCL, NOS variante imunoblástica
Anaplásicos de grandes células B	-	DLBCL, NOS variante anaplásica
Linfomas de células B com alta quantidade de células T	Linfoma B ricos em células T	DLBCL, NOS rico em células T/histiócitos
-	-	DLBCL, NOS variantes raras
Linfoma esclerosante de grandes células B do mediastino	Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B)	Linfoma de grandes células B mediastinal (tímico)
Linfoma angio endoteliótrópico (intravascular)	Linfoma Intravascular de Grandes Células B	Linfoma Intravascular de Grandes Células B
-	-	DLBCL primário do SNC
-	-	DLBCL cutâneo primário, tipo perna
-	-	DLBCL EBV+ dos idosos
-	-	Linfoma de grandes células B ALK+
-	-	DLBCL associado à inflamação crônica

TABELA 1. Continuação

-	-	Linfoma plasmoblástico
-	-	Linfoma de efusão primária
-	-	Granulomatose linfomatosa
-	-	Linfoma de grandes células B, surgindo em doença de Castleman multicêntrica associada à HHV8.
-	-	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre DLBCL e linfoma de Burkitt.
-	-	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre DLBCL e linfoma de Hodgkin clássico.

Os DLBCLs são neoplasias de padrão de crescimento difuso formadas por células linfóides B que possuem núcleo de tamanho igual ou que excede o tamanho do núcleo de um macrófago normal ou que corresponde a mais de duas vezes o tamanho de um linfócito normal (SWERDLOW et al., 2008). A classificação da WHO propõe que os patologistas utilizem somente o termo Linfoma Difuso de Grandes Células B como diagnóstico final (JAFFE et al., 2001). Esta recomendação acompanha a proposta contida na classificação REAL (HARRIS et al., 1994; HARRIS et al., 2000), pois a identificação de subtipos de DLBCL seria de difícil reprodução entre os patologistas e alguns subtipos seriam ainda controversos (FELLER; DIEBOLD, 2004). No entanto, a Classificação da WHO também propõe que estes subtipos sejam considerados nos trabalhos de pesquisa com o intuito de demonstrar as diferenças no comportamento biológico das diversas variantes procurando estabelecer novas entidades (SWERDLOW et al., 2008).

Segundo a Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da WHO (VALLI et al., 2002), os DLBCLs podem apresentar pelo menos cinco variantes que estão relacionadas a comportamentos biológicos diversos - o Linfoma de Células B Rico em Células T, o Linfoma Imunoblástico de Grandes Células, o Linfoma Difuso de Grandes Células B (não clivadas e clivadas), o Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B) e o Linfoma Intravascular de Grandes Células B – descritos nas espécies domésticas, inclusive nos cães (VALLI et al., 2002). Porém, estes tumores geralmente são incluídos entre os DLBCLs sem que sejam descritas em detalhe suas características morfológicas, seu perfil imunoistoquímico e seu índice proliferativo.

O Linfoma de Células B Rico em Células T é caracterizado por progressão lenta, composto por uma população mista de células T pequenas clivadas e células B neoplásicas grandes, sendo que esta última população pode compor 5% ou menos do total da população celular. As lesões geralmente envolvem os linfonodos e podem aparecer como aumento de apenas um linfonodo periférico. Este subtipo tem sido comparado à lesão pulmonar conhecida como granulomatose linfomatosa em humanos (VALLI et al., 2002).

O Linfoma Imunoblástico de Grandes Células exibe agressividade moderada, com arquitetura difusa composta por células grandes com núcleo redondo a oval ou clivado, mitoses frequentes, quantidade variável de citoplasma, que se cora fortemente, membrana nuclear

espessa, cromatina reticular e periférica, e normalmente nucléolo único central. Macrófagos de corpos tangíveis são presentes e numerosos (VALLI et al., 2002).

O Linfoma Difuso de Grandes Células B (não clivadas e clivadas) possui agressividade moderada, composto por população de células linfoides grandes relativamente uniforme, núcleo vesiculoso, cromatina reticular e dois a três nucléolos proeminentes periféricos. Macrófagos com corpos apoptóticos e figuras de mitose são frequentes (VALLI et al., 2002).

Um tipo raro que acomete o mediastino é o Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B), mais frequentemente observado em cães jovens de raças de grande porte. As lesões têm desenvolvimento lento e os animais normalmente apresentam êmese após alimentação aparentemente devido à compressão esofágica. As lesões são tipicamente bem encapsuladas, exibem bandas de colágeno evidentes dando uma aparência macroscópica de timoma. Citologicamente as células tumorais são grandes, com núcleo vesicular, nucléolo proeminente, podendo ser altamente indentados e ocasionalmente muito grande e multilobulado (VALLI et al., 2002).

O Linfoma Intravascular de Grandes Células B é uma doença sistêmica caracterizada pela proliferação de clusters de células linfoides dentro do lúmen de pequenas veias e, em menor grau, artérias do coração, pulmão e sistema nervoso central. É uma doença rara que pode ter um aparecimento repentino de síncope e morte em um animal sem nenhuma manifestação clínica (VALLI et al., 2002).

De acordo com a classificação da WHO mais atualizada (2008) os subtipos correspondentes ao DLBCL são o DLBCL, sem outras especificações; o linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos; DLBCL primário do SNC; DLBCL cutâneo primário, tipo perna e DLBCL EBV positivo dos idosos (SWERDLOW et al., 2008).

As características citomorfológicas do DLBCL, sem outras especificações são diversas e podem ser divididas em variantes morfológicas comum e rara. As variantes morfológicas comuns compreendem a centroblástica, imunoblástica e anaplásica. As variantes raras podem apresentar estroma mixóide ou matriz fibrilar, alguns casos podem exibir formação de pseudorosetas, formato celular fusiforme ou mostrar características de células em anel de sinete. Grânulos citoplasmáticos, projeções de microvilos e junções intercelulares também podem ser vistos. Ele representa 25 a 30% dos LNH de adultos nos países ocidentais, sendo sua etiologia

desconhecida. Normalmente se apresenta como uma neoplasia dita primária ou como progressão de outro tipo neoplásico menos agressivo como, por exemplo, linfoma folicular e linfoma de zona marginal (SWERDLOW et al., 2008).

Em humanos foram identificados dois subgrupos de DLBCL através de perfil de expressão gênica – tipo células B de centro germinativo (CGB) que exibe perfil de células de centro germinativo e tipo células B ativadas (ABC) que tem perfil de células B periféricas ativadas, os quais têm significância prognóstica. Há ainda um tipo 3 que não se encaixa em nenhuma das duas categorias. (ALIZADEH et al., 2000; ROSENWALD et al., 2002). Entretanto, a realização do perfil de expressão gênica não é algo prático para ser realizado na rotina. Foram desenvolvidos então algoritmos para uma classificação equivalente, utilizando-se a imunistoquímica. No entanto, a classificação imunistoquímica é controversa. Há autores que afirmam que ela possui correlação com a expressão gênica e a sobrevida do paciente (HAARER et al., 2006) enquanto outros afirmam que até hoje não foi provada a importância prognóstica dessa classificação (HWANG et al., 2013).

Em cães, já foi realizada tentativa de desenvolver uma classificação nos moldes da humana (RICHARDS et al., 2013). Recentemente pesquisadores japoneses afirmaram que não é possível a subdivisão em dois grupos moleculares semelhantes ao DLBCL GCB e ABC em humanos (ITO et al., 2014). Além disso, não é claro se no cão é possível realizar uma classificação através da imunistoquímica, dividindo o DLBCL em GB e não GC (COMAZZI et al., 2014)

Diante de uma suspeita de linfoma devem ser realizados exame físico completo, hemograma, bioquímico e urinálise, sendo o diagnóstico definitivo através de exame citológico ou histopatológico (VAIL; YOUNG, 2007). O diagnóstico e classificação do linfoma podem ser realizados de forma simples, eficaz e com baixo custo utilizando-se o exame citológico (COMAZZI et al., 2014), sendo que a classificação de Kiel exibe melhor adequação por se basear em características morfológicas (SUZANO et al., 2010). No entanto, há algumas limitações. Devido à ausência de arquitetura tecidual não é possível observar a desorganização da arquitetura normal ou a invasão da cápsula, podendo dificultar a diferenciação entre um linfoma e uma hiperplasia reacional acentuada, já que esta última é caracterizada por grande número de células linfóides grandes. Mais ainda, o exame citopatológico não permite a adequada avaliação necessária para o diagnóstico dos linfomas de células pequenas, que podem exibir

poucos indícios de suas características de malignidade. Além disso, a classificação em graus baixo, moderado e alto, que depende da identificação de características citológicas e da determinação do imunofenótipo, pode ser feita com maior acurácia no exame histopatológico (VAIL; YOUNG, 2007).

Além da histo e citoquímica, imunoisto e imunocitoquímica, o diagnóstico pode ser realizado através de técnicas moleculares tanto para o diagnóstico em si quanto para caracterizar melhor o tumor, como por exemplo, a citometria de fluxo e o PCR (TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; THALHEIM et al., 2013).

Ocasionalmente pode ser difícil a diferenciação entre uma proliferação maligna e benigna, situação a qual pode ser resolvida através da avaliação da clonalidade, uma vez que a monoclonalidade é um marco de malignidade, ou seja, é suposto que o tumor origine-se de um único clone (VAIL; YOUNG, 2007).

Atualmente, a imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas de classificação dos linfomas e a técnica de imunoistoquímica é o padrão ouro para essa determinação (THALHEIM et al., 2013). Dessa maneira, o estabelecimento da origem T ou B das células neoplásicas associado a sua morfologia permite o reconhecimento dos diferentes tipos de neoplasias linfoides (SWERDLOW et al., 2008).

Para a determinação do imunofenótipo são utilizados marcadores linfocitários como os anticorpos policlonal anti CD3 e monoclonal anti CD79a, como marcadores pan T e pan B, respectivamente, tanto para o homem (JAFFE et al., 2001; SWERDLOW et al., 2008) quanto para os animais domésticos (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; VALLI et al., 2002; PONCE et al., 2010; VALLI et al., 2011; BIENZLE; VERNAU, 2011). Entretanto, esta determinação pode ser obtida com maior acurácia ampliando-se o painel de anticorpos (ALVES et al., 1999). Nos seres humanos, os DLBCLs normalmente expressam vários marcadores pan B, porém a expressão de um ou mais destes marcadores pode estar ausente, impedindo ou dificultando a determinação do imunofenótipo quando se utiliza apenas um marcador (JAFFE et al., 2001; O'MAHONY; RILEY, 2012).

Para os linfomas B os mais utilizados nos linfomas humanos, além do anti CD79a, são o anti CD20 (O'MAHONY; RILEY, 2012) e o PAX-5 (anti- BSAP) (KRENACS et al., 1998; TORLAKOVIC et al., 2002) entre outros. Deve-se ressaltar que a pouca reação cruzada entre os

anticorpos específicos humanos e caninos restringe o painel utilizado nos linfomas dos cães, tanto para o diagnóstico quanto para o estadiamento (MARCONATO et al., 2012). Nos cães, embora o marcador pan B mais amplamente utilizado seja o anti CD79a (VALLI et al., 2002; VALLI et al., 2007; VEZZALI et al., 2010), o anti CD20 também tem sido utilizado em menor escala com o mesmo fim (JUBALA et al., 2005; MARCONATO et al., 2012). Mais recentemente, a expressão da PAX-5 (anti BSAP) foi empregada como marcador imunistoquímico pan pré B e pan B em amostras de linfomas de cães incluídas em parafina (WILLMANN et al., 2009; FERNANDES, 2014).

O CD79 é um heterodímero sinalizador que é expresso apenas pelas células B e em vários tipos de linfoma (OLEJNICZAK et al., 2006; CABEZUDO et al., 1999). A molécula é um heterodímero covalente que contém CD79a (Ig α , mb 1) e CD79b (Ig β , B29), ambas subunidades contém um único domínio Ig extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular. O BCR (receptor de antígeno de células B) é um complexo entre CD79 e o Ig de superfície, todos estes componentes são necessários para a expressão do BCR na superfície celular (MATSUUCHI; GOLD, 2001). A ligação cruzada do BCR aciona o mecanismo de sinalização o que pode levar a apoptose ou na presença de sinal de resgate de células T pode levar a ativação e divisão celular, o que torna o CD79a, além de marcador para linfoma B, um alvo de terapia anticâncer com anticorpos (POLSON et al., 2007).

Já o CD20 é uma molécula de superfície celular específica de linfócitos B e sua ligação com anticorpo altera a progressão no ciclo celular e a diferenciação indicando que esta molécula é essencial na função dos linfócitos B (BUBIEN et al., 1993). Ela é expressa em células pré B na medula óssea, principalmente após o rearranjo da cadeia pesada de Ig e sua expressão persiste até a diferenciação para plasmócitos (UCHIDA et al., 2004). Os complexos multiméricos de CD20 podem formar canais de íons para condução de Ca^{2+} na membrana plasmática de células linfoides B (BUBIEN et al., 1993). Pressupõe-se que o CD20 canino contenha domínios de sequências de aminoácidos consistindo de dois domínios extracelulares, quatro domínios transmembrana e três domínios intracelulares, sendo expresso por células mononucleares do sangue periférico, linfonodos e linfomas de células B, mas não em linfomas de células T ou linfomas não T - não B, assim como o CD20 humano (KANO et al., 2005)

A proteína ativadora específica de células B (BSAP) é um fator de transcrição de 52kD originalmente identificado como homólogo da proteína ativadora tecidual específica do ouriço do mar. A BSAP é codificada pelo gene PAX-5, um membro altamente conservado da família de genes de fatores de transcrição “paired Box” (PAX). Dentre as células hematopoiéticas a expressão do gene PAX5 é restrita a linhagem de células B. A transcrição do gene PAX5 é iniciada em células pró B e é abundante nos estágios de maturação pré B e células B madura, mas é ausente em plasmócitos diferenciados (KRENACS et al., 1998). O PAX5 é um fator de transcrição essencial ao comprometimento da célula com a linhagem de linfócitos B, induzindo a expressão de vários genes e ao mesmo tempo reprimindo vias alternativas de diferenciação hematopoiética, o que torna possível a sua utilização como um marcador pan B (TORLAKOVIC et al., 2006)

A importância da detecção destes antígenos não reside somente na determinação do imunofenótipo. O CD20 tem sido utilizado amplamente como alvo de procedimentos terapêuticos nos linfomas B humanos que empregam anticorpos monoclonais como o Rituximab, que é um anticorpo quimérico monoclonal IgG1 anti CD20 humano produzido por engenharia genética em camundongo (COIFFIER et al., 2002). Acredita-se que o Rituximab aja sobre as células do linfoma induzindo a lise celular mediada por complemento, a citotoxicidade celular dependente de anticorpo e a indução direta de apoptose, atuando simultaneamente com a quimioterapia (FLOWERS et al., 2010; TAYLOR; LINDORFER, 2014).

O uso de anticorpos monoclonais anti - CD20 para o tratamento de linfomas B aumentou significativamente a sobrevida dos pacientes, porém há pacientes refratários à terapia ou os que apresentam recorrência da doença (MÖSSNER et al., 2010). Linhagens celulares de linfoma B submetidas a tratamento in vitro por anticorpos anti CD20 mostraram que células de maior expressão de CD20 são mais sensíveis ao tratamento (FRANKE et., 2011).

Especial atenção deve ser dada a dose utilizada para o tratamento, uma vez que com o uso de doses altas da droga os mecanismos efetores necessários para a atividade do medicamento podem ser saturados comprometendo a eficácia da terapia. Sob essas condições uma reação chamada trogocitose predomina. Ela consiste na remoção do complexo CD20 – anticorpo monoclonal das células alvo por células efectoras que expressam receptores Fcγ permitindo que

estas células malignas escapem sem danos e promovam a progressão do tumor (TAYLOR; LINDORFER, 2014).

Em cães ainda não está bem estabelecido o uso e eficácia deste tipo de drogas, mas existem estudos promissores que apontam uma maior efetividade do tratamento quando associada quimioterapia tradicional a imunoterapia. (COMAZZI et al., 2014). Este ano pesquisadores japoneses publicaram o desenvolvimento de um novo anticorpo monoclonal anti CD20 canino, que além de poder ser utilizado como ferramenta diagnóstica para a imunofenotipagem de células B, tem ainda o potencial de utilização como agente imunoterápico no tratamento de doenças de células B (ITO et al., 2015).

Assim sendo, a determinação do perfil imunofenotípico dos linfomas não só torna o diagnóstico mais acurado, mas também abre novas perspectivas para se estabelecer protocolos de tratamento mais específicos.

Nos estudos sobre neoplasias, inclusive linfomas, pode-se observar a necessidade de avaliar além do imunofenótipo, o índice de proliferação celular e a taxa de apoptose das células neoplásicas (KIUPEL et al., 1999). Quando se trata especificamente dos linfomas, além do imunofenótipo, há a necessidade de se estabelecer os índices proliferativos, já que estes podem aumentar a acurácia da classificação deste tipo de neoplasia (FOURNEL-FLEURY et al, 1997a, COMAZZI et al., 2014). No que diz respeito aos DLBCLs, pode-se eliminar a dificuldade na diferenciação entre estes e determinados subtipos morfológicamente similares, como o linfoma de zona marginal, utilizando-se os índices proliferativos e apoptóticos maiores apresentados pelos DLBCLs (VALLI et al., 2007).

Além disso, a correlação positiva entre o índice proliferativo, a morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade já foi constatada (FOURNEL-FLEURY et al, 1997a; SUZANO et al., 2008). Um estudo recente verificou que há uma variação significativa do tempo de sobrevivência de cães com diferentes índices mitóticos. Em cães apresentando tumores com índices mitóticos menores que 20 mitoses por campo de grande aumento (400 X) e maiores que 21 mitoses por campo de grande aumento foi observada uma sobrevivência média de 188 e 31 dias respectivamente (VALLI et al., 2013).

O marcador mais confiável para avaliação da proliferação celular é o antígeno Ki-67 (MIB-1) (FOURNEL-FLEURY et al, 1997a). Este antígeno é uma proteína de 345 kD que é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto nas células em G0 e que pode ser detectada utilizando-se métodos imunistoquímicos (ZACCHETTI et al, 2003).

Como foi mencionado anteriormente, outro índice relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é o índice apoptótico, pois o crescimento tumoral não é determinado somente pela porcentagem de células em proliferação e pelo tempo do ciclo celular (PHILLIPS et al., 2000). Um dos métodos empregados para este tipo de avaliação é a detecção imunistoquímica da expressão da caspase-3 (SUZANO, 2007). Estas enzimas estão presentes no citoplasma da maioria das células, na forma inativa como uma cadeia única de polipeptídeos e são ativadas quando esta cadeia é quebrada (ROBERT; FRIEDLANDER, 2003).

A expressão de caspase-3 é utilizada em muitos distúrbios hematopoiéticos na espécie humana, inclusive nas leucemias e nos linfomas. Os linfomas de alto grau de malignidade apresentam uma expressão maior de caspase-3 que aqueles de baixo grau (DUKES et al., 2002). Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem maior índice de positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento (DONOGHUE et al., 1999). Este tipo de avaliação ainda é pouco comum nas neoplasias caninas, porém nos linfomas caninos empregando-se as classificações de Kiel e Working Formulation observou-se grande variação no percentual de células positivas, não sendo constatada diferença entre os linfomas de alto e baixo grau e entre os diferentes imunofenótipo (SUZANO, 2007).

Nos seres humanos esta variação na expressão de caspase-3 nos DLBCLs já foi observada (DUKERS et al., 2002). Deve-se ainda ressaltar, no entanto, que entre os DLBCLs humanos, já foi constatado que os tumores de alto grau apresentam índices apoptóticos maiores que os linfomas de baixo grau de malignidade (DONOGHUE et al., 1999; DUKERS et al., 2002). A determinação do percentual de células positivas para caspase-3 e a aplicação de classificações mais atuais, como as propostas para os animais domésticos (VALLI et al., 2002) e para os seres humanos (SWERDLOW et al., 2008) nos linfomas caninos, mais especificamente os DLBCLs, podem auxiliar no estabelecimento de um perfil mais detalhado destas neoplasias.

Outro marcador imunistoquímico relacionado com a apoptose é a expressão da proteína p53 mutante nas células neoplásicas (ALVES et al, 1999). A proteína p53 selvagem se localiza no núcleo celular, sendo que após dano ao DNA e outros insultos à célula tem um papel importante no reparo do DNA e transcrição celular. Células com mutação nessa proteína não respondem a terapias que induzem lesão ao DNA, como quimioterapia e radioterapia. A p53 selvagem tem meia vida curta de forma que não pode ser detectada por métodos rotineiros de imunistoquímica, já a mutada se acumula no núcleo devido ao aumento de sua estabilidade e pode ser detectada (DHALIWAL et al, 2013).

As mutações no P53 são as lesões gênicas mais frequentes nas neoplasias da espécie humana, sendo um importante indicador da resposta terapêutica dos LNHS humanos (SOKOLOWSKA et al., 2005). A expressão do p53 alterado é superior a 30% nos linfomas de alto grau de malignidade de origem B (INAMURA et al., 1994). De acordo com SUEIRO et. al (2004) nos LNHS caninos cerca de 60% dos casos são positivos para a expressão do p53, porém, não foi detectada a correlação deste achado com os imunofenótipos e os graus de malignidade das neoplasias (SUEIRO et al., 2004; SUZANO, 2007).

Outros estudos sugerem que essa taxa de positividade pode ser menor, chegando a até 22% dos LNHS, sendo que a expressão do p53 teria impacto negativo na sobrevida total do animal, mas não influenciaria no tempo de recorrência da doença (DHALIWAL et al., 2013). Por outro lado, existe relato sobre número maior de células p53+ em linfomas T do que em linfomas B caninos (SOKOLOWSKA et al., 2005). Em estudo recente não foi constatada diferença dos níveis de expressão e da frequência da mutação do gene p53 entre os grupos de animais portadores de linfomas sensíveis e resistentes à quimioterapia (TOMIYASU et al., 2010).

Assim, na Medicina Veterinária, o papel desempenhado pelo p53 nas diferentes neoplasias é controverso, sendo ainda escassos os estudos que apresentam este tipo de abordagem. Quando se trata dos linfomas caninos as diferentes classificações utilizadas e a comparação entre grandes grupos que consideram apenas os imunofenótipos, sem considerar muitas vezes os subtipos de LNHS, podem explicar, pelo menos parcialmente, a discrepância dos resultados.

Pelo que foi apresentado, pode-se notar a importância da imunistoquímica para a classificação e determinação do comportamento biológico dos linfomas caninos. Assim sendo, técnicas como a do microarranjo de tecido (TMA), permitem a avaliação de um grande número

de amostras de um tumor em condições idênticas (MILANES-YEARSLEY et al., 2002). O TMA consiste em um arranjo de amostras para estudo morfológico e imunoistoquímico (KONONEN et al., 1998), que foi, ao longo da última década, aprimorada e difundida (BUBENDORF et al., 2001) pela economia de reagentes, amostras teciduais e tempo, reduzindo custos e aumentando a eficiência do método (MILANES-YEARSLEY et al., 2002).

Este método tem sido utilizado para avaliar a associação entre os biomarcadores e os achados clinicopatológicos dos tumores, a recuperação do paciente e a resposta ao tratamento (ECKEL-PASSOW et al., 2010). Sua utilização na determinação do imunofenótipo dos linfomas pode aumentar a confiabilidade desta determinação e reduzir os gastos com reagentes. Uma grande desvantagem do TMA é a quantidade limitada do tecido analisado, que pode comprometer a representatividade da amostra (KELLER et al., 2007).

Em 2014 Fernandes comparou o corte convencional com o TMA, utilizando *core* de 1,0 e 1,5 mm, para o Ki67, Caspase 3 e p53 e observou concordância dos valores de Ki-67 e Caspase3 para ambos os *cores* em relação ao corte convencional. Já para o p53 houve fraca concordância entre o corte inteiro e o TMA. Ainda sim, poucos dados estão disponíveis sobre a concordância entre a análise de todo corte e o TMA (KELLER et al., 2007). O TMA pode não ser apropriado para avaliar a expressão de alguns biomarcadores e, portanto, se faz necessária uma análise comparativa (ECKEL-PASSOW et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Traçar o perfil imunoistoquímico dos Linfomas Difusos de Grandes Células B dos cães, segundo as classificações da World Health Organization (WHO, 2008), dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos (WHO, 2002) e Kiel Atualizada (LENNERT; FELLER, 1992), comparando os resultados obtidos no corte convencional com aqueles gerados pela avaliação através do método de TMA.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão imunoistoquímica de diferentes tipos de marcadores pan B, como anti CD79a, anti CD20 e PAX-5 pelos subtipos de DLBCL.
- Determinar o índice proliferativo e apoptótico dos subtipos de DLBCL utilizando a expressão imunoistoquímica de Ki-67 e caspase-3, respectivamente.
- Detectar a expressão de p53 pelos diferentes subtipos de DLBCL.
- Efetuar estes tipos de avaliação citados utilizando a técnica de TMA (Tissue microarray), comparando-a com cortes convencionais a fim de verificar a adequação da técnica para os marcadores utilizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram selecionados 29 casos de Linfoma Difuso de Grandes Células B canino, provenientes do arquivo de tecidos parafinados do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, a partir de 2000 e dos casos diagnosticados pelo serviço até julho de 2014. As amostras de dois destes casos foram gentilmente cedidas pelo Serviço de Patologia da Universidade de Marília. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10%, em temperatura ambiente por 24 a 48 horas e rotineiramente processadas e incluídas em parafina segundo protocolo padrão adotado pelo serviço. Deve-se resaltar que em casos mais antigos ainda não havia o estabelecimento destes protocolos e dessa forma não há informações referentes ao processamento. Foram levantados dados a partir dos prontuários dos animais como raça, sexo, idade, classificação anatômica, estadiamento e peso corporal. A classificação anatômica foi estabelecida segundo JACOBS et al., (2002) e o estadiamento clínico de acordo com o modelo proposto pela WHO (OWEN, 1980). O projeto foi aprovado pelo conselho de ética e experimentação animal da FMVZ/UNESP – Campus Botucatu/SP sob o número 129/2014.

4.2 Exame histopatológico

Com o objetivo de classificar os linfomas, foram realizados novos cortes histológicos com três micrômetros (μm) de espessura, em micrótomo automático (Leica 2155), colocados em estufa, desparafinados e posteriormente corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e examinadas em microscópio de luz. As amostras foram reavaliadas e classificadas de acordo com os critérios propostos pela World Health Organization (WHO, 2008), dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos (WHO, 2002) e Kiel Atualizada (LENNERT; FELLER, 1992). Deve-se ressaltar que a classificação só foi estabelecida após a imunofenotipagem das neoplasias.

4.3 Análise microscópica

Foi utilizado um microscópio de luz modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), dispendo de câmera digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) acoplada ao um microcomputador. As imagens foram processadas pelo programa computacional de análise de imagem Axiovision 4.6.3 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

4.4 Microarranjo de tecido (TMA)

Após a instituição do diagnóstico de DLBCL, foi definida a área do corte histológico a ser amostrada para a confecção do microarranjo de tecido (TMA) para avaliação e comparação das imunomarcações. A área foi escolhida utilizando-se a coloração de HE e o critério utilizado foi maior concentração tumoral, ou seja, evitando áreas com necrose, hemorragia, vasos sanguíneos e outros tecidos que não a neoplasia. O TMA foi confeccionado no Setor de Patologia do Hospital A.C. Camargo em São Paulo. As áreas identificadas nos blocos doadores foram retiradas e transferidas para o bloco receptor, com 29 *cores* de tecidos de 1 mm de diâmetro, em triplicata. Os *cores* foram dipostos de maneira aleatória e esta distribuição foi idêntica nas três repetições. Em cada sequência de *cores* foram incluídas também, ao início uma amostra de tecido placentário normal para orientação do bloco e ao final amostra de linfonodo normal de cão como controle.

Para a construção do TMA foi utilizado uma estação de trabalho TMA (TMA builder, Histopathology Inc., Hungary). Após a construção, cortes de 3 μ m foram obtidos e aderidos as lâminas histológicas carregadas positivamente (Positive charged adhesion slides, Amitel), e congeladas a -20°C para posterior utilização nas reações imunoistoquímicas. Do bloco receptor foi obtido um corte ao início e ao final das amostras para coloração de HE e revisão com o intuito de confirmar a presença de áreas morfológicamente representativas das lesões originais.

4. 5 Utilização da Imunoistoquímica

Para a padronização das reações imunoistoquímicas foram utilizadas amostras de linfonodo normal de cão, de um ano de idade, para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79a, anti-CD20, anti-PAX-5, anti-caspase-3 e anti-Ki67 e ainda carcinoma de células escamosas de cão sabidamente positivo para o anticorpo p53, isto devido ao elevado índice de apoptose apresentado por estes tumores. As especificações referentes a cada anticorpo, diluições, fabricante e clones estão apresentadas a seguir (Tabela 2).

Os cortes histológicos foram feitos com três micrometros de espessura, aderidos a lâminas histológicas carregadas positivamente (Positive charged adhesion slides, Amitel®, Brasil), colocados em estufa a 58°C por 12 horas, desparafinados através de imersão em dois banhos de xilol por 10 minutos cada, reidratação em álcool etílico em concentrações decrescentes e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato pH 6,0 em panela de pressão microprocessada Pascal (Dako Denmark A/S), durante 30 segundos a 125°C. O anticorpo CD20 não requer esta etapa de recuperação antigênica. A seguir, as lâminas foram resfriadas até a temperatura ambiente e lavadas em água destilada, seguindo-se de incubação em câmara úmida a 27°C com solução de peróxido de hidrogênio pronta para uso (Spring Bioscience, cód.: DHP-125), por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena.

As lâminas foram submetidas a bloqueio da proteína utilizando-se a solução do kit Novolink durante 20 minutos a 27°C, incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) a 27°C por 2 horas, no caso dos anticorpos anti-CD79a, anti-CD3, anti-PAX-5, anti-caspase-3 e anti-Ki67, e durante 1 hora para o anticorpo anti-p53. Já para o anti-CD20 a incubação foi durante 18 horas a 4°C (*overnight*). Em seguida, lavadas em solução tampão de TRIS ph 7,4, por três vezes e incubadas a 27°C com o anticorpo pós primário do Kit Novolink (Leica Biosystems) durante 30 minutos. Em seguida, foram realizadas três lavagens com a solução tampão e incubação a 27°C com o polímero do kit Novolink por 30 minutos e após, novas três lavagens com a solução tampão.

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB) do kit Novolink por 4 minutos e posteriormente lavadas em água destilada. Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris e posteriormente lavados em

água corrente por 3 minutos, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, xilol e finalmente montadas com resina (ERV-Mount, Easypath) e lamínula.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas utilizando-se microscopia de luz. Para os anticorpos CD3, CD79a, CD20 e PAX-5 a avaliação é referente a presença ou ausência de marcação pelas células neoplásicas e a análise da expressão dos marcadores Ki-67 e Caspase-3 em objetiva de 40X, contando-se as células positivas e todas as células presentes em cinco campos aleatórios, sendo estes resultados transformados em percentual de células positivas. No caso do TMA, devido a seu tamanho, foram contados quatro campos em objetiva de 40X. Para o marcador biológico p53 foi avaliada a presença ou ausência de marcação, sendo considerada a amostra positiva quando pelos menos 10% das células exibiu marcação imunoistoquímica, de acordo com SUEIRO, et al., 2004. As lâminas foram avaliadas com auxílio de um analisador de imagens automático ZEISS com programa de morfometria KS300-3.0.

TABELA 2. Anticorpos primários utilizados na caracterização do perfil imunoistoquímico dos Linfomas Difusos de Grandes Células B caninos.

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Clone	Recuperação antigênica	Tempo de incubação
CD3	1:500	Dako	Policlonal	Pascal, citrato ph 6,0	2 horas
CD20	1:1000	SpringBioscience	Policlonal	-	18 horas
CD79a	1:300	Dako	HM57	Pascal, citrato ph 6,0	2 horas
PAX 5	1:1000	BDBiosciences	24/Pax-5	Pascal, citrato ph 6,0	2 horas
Ki-67	1:100	Dako	MIB-1	Pascal, citrato ph 6,0	2 horas
Caspase-3	1:200	Cell Signiling	Policlonal	Pascal, citrato ph 6,0	2 horas
p53	1:50	Novocastra	Policlonal	Pascal, citrato ph 6,0	1 hora

4.6 Análise estatística

Com intuito de verificar se há diferença nas imunomarcações entre os subtipos de DLBCL empregou-se o teste de Kruskal-Wallis para as médias de porcentagem da caspase-3 e Ki67 e o teste exato de Fisher para os marcadores anti-CD3, anti-CD79a, anti-PAX5, anti-CD20 e anti-p53. Na comparação do TMA com o corte convencional foi utilizado o teste kappa para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79a, anti-PAX5, anti-CD20 e anti-p53 e o coeficiente de correlação intraclass (intraclass correlation coefficient - ICC) para caspase-3 e Ki67. Foi avaliado ainda se os três *cores* utilizados eram equivalentes entre si e para tal comparação também foi realizado o ICC. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p forem inferiores a 0,05. Para tal, foi utilizado o programa SPSS 22.0.

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

O perfil racial dos animais avaliados teve a seguinte distribuição: 13 cães sem raça definida (SRD), 3 Boxers, 2 Pastores Alemães e um representante de cada uma das seguintes raças – Akita, Border Collie, Cocker, Dachshund, Doberman, Dogue Alemão, Fila Brasileiro, Golden retriever, Lhasa Apso, Pastor Belga e Pit Bull (Tabela 3, Figura 1).

TABELA 3. Número de casos e percentual de DLBCL de acordo com a raça

RAÇA	Nº DE CASOS	%
SRD	13	44,8
Outras	11	38,0
Boxer	3	10,3
PA	2	6,9
TOTAL	29	100

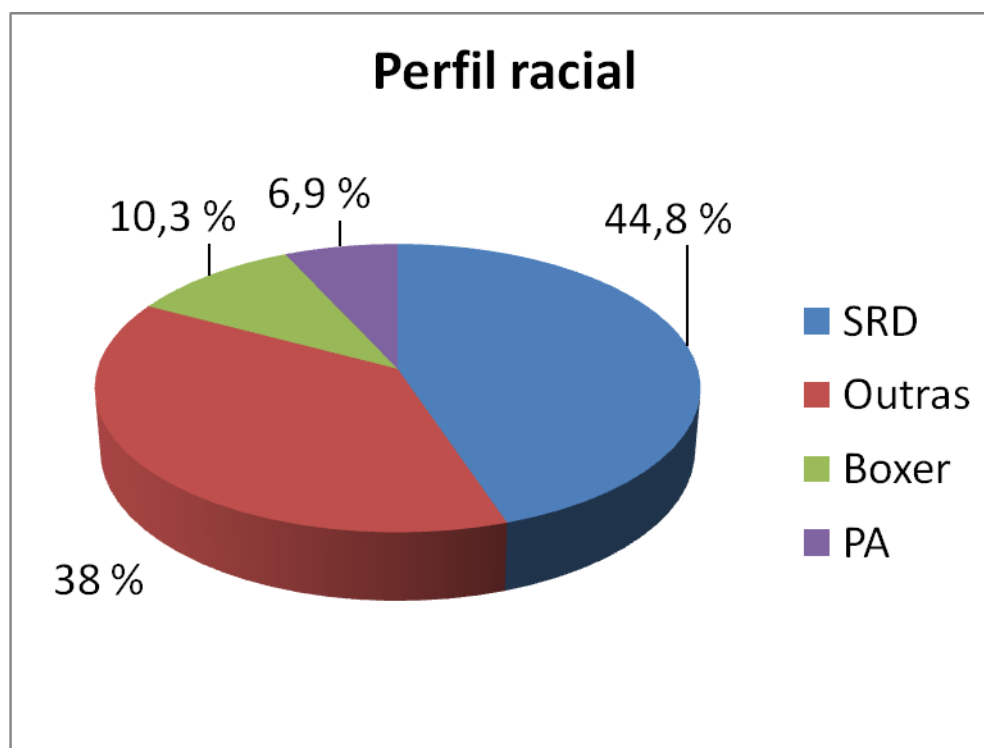


FIGURA 1. Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com a raça

Em relação ao sexo dos cães, 15 eram machos e 14 fêmeas (Tabela 4, Figura 2). A idade variou entre 3 e 13 anos, com média de 8,4 anos e desvio padrão (DP) de 3,3. Para os tumores centroblásticos monomórficos, polimórficos e imunoblásticos, os valores de médias de idade foram de 8,6; 8,0 e 7,33 anos respectivamente. Foram observadas 3 formas anatômicas diferentes, sendo elas multicêntrica, tímica e cutânea, com 23, 4 e 2 animais respectivamente. (Tabela 5, Figura 3).

TABELA 4. Número de Casos e Percentual de DLBCL de acordo com o sexo.

SEXO	Nº DE CASOS	%
Masculino	15	51,7
Feminino	14	48,3
TOTAL	29	100

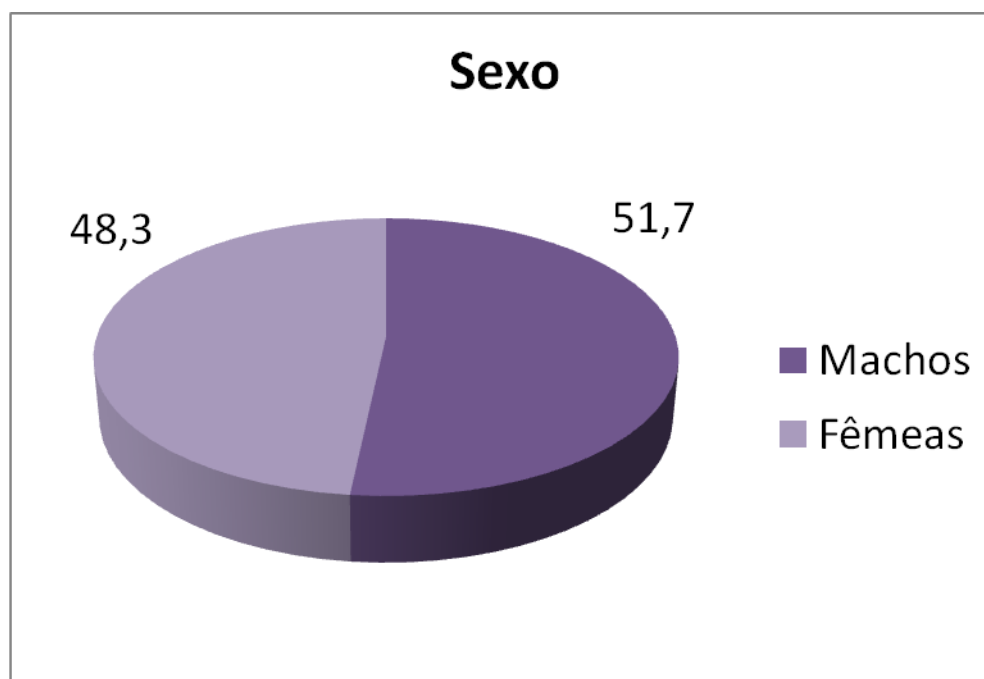


FIGURA 2: Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com o sexo.

TABELA 5. Número de casos e percentual de DLBCL de acordo com a forma anatômica.

FORMA ANATÔMICA	Nº DE CASOS	%
Multicêntrica	23	79,3
Mediastinal	4	13,8
Cutânea	2	6,9
TOTAL	29	100

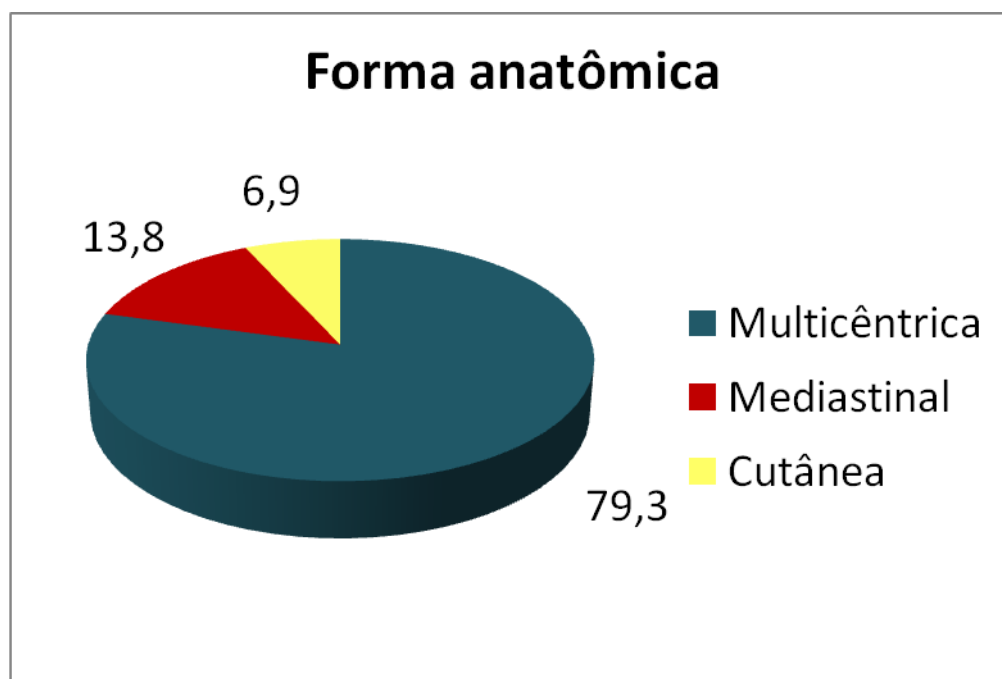


FIGURA 3. Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com a forma anatômica.

As informações disponíveis no prontuário permitiram o estadiamento clínico de 19 indivíduos, sendo que 5 animais se apresentam no estágio V, 11 animais no estágio IV e 3 no estágio III (Tabela 6, Figura 4). Em 14 cães foi obtido também o peso, com média de 21,1 kg e DP de 10,9 kg. A tabela 7 expõe os dados clínicos dos animais de acordo com a forma anatômica.

TABELA 6. Número de Casos e Percentual de DLBCL de acordo com o estadiamento clínico

ESTADIAMENTO CLÍNICO	Nº DE CASOS	%
Estadio III	3	15,8
Estadio IV	11	57,9
Estadio V	5	26,3
TOTAL	19	100

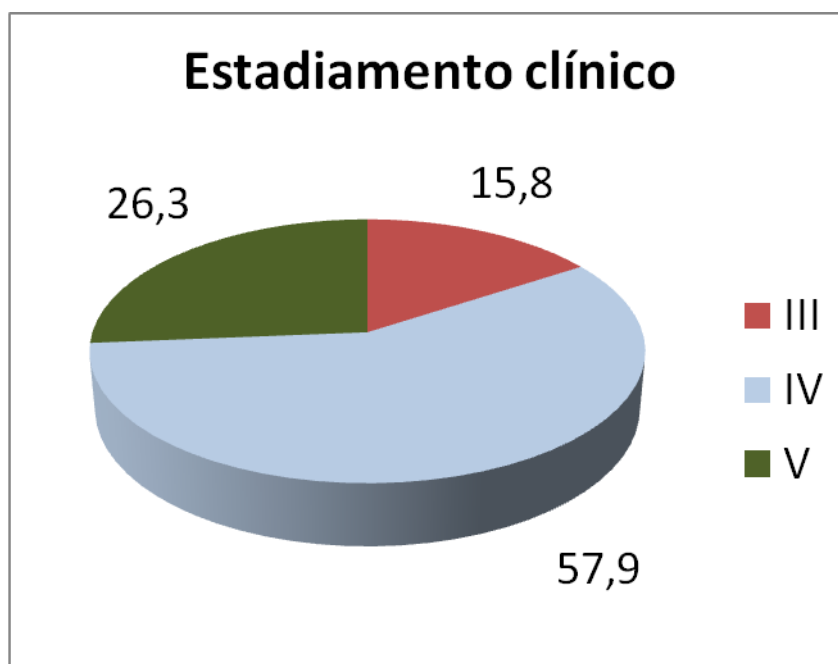


FIGURA 4. Distribuição dos cães portadores de DLBCL de acordo com estadiamento clínico

TABELA 7. Distribuição da raça, sexo, idade e estadiamento clínico dos DLBCLs de acordo com a forma anatômica.

Forma anatômica	Raça	Sexo	Idade (mediana)	Estadiamento clínico
Mediastinal	SRD (75%)	F (75%)	10,5	IV (50%)
	Boxer (25%)	M (25%)		III (25%)
				V (25%)
Cutânea	SRD (50%)	M (50%)	5,5	-
	Boxer (50%)	F (50%)		
Multicêntrica	SRD (39,1%)	F (47,8)	9,0	V (26,7)
	PA (8,7%)	M (52,2)		IV (60)
	Outras (52,2%)			III (13,3)

5.2 Subtipos morfológicos

Utilizando-se a classificação de Kiel atualizada (LENNERT; FELLER, 1992) foram observados três subtipos, sendo que vinte e quatro tumores foram classificados como Centroblástico Monomórfico (Figura 5), quatro como Imunoblástico de células B (Figura 6) e um como Centroblástico Polimórfico (Tabela 8, Figura 7). Pela WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (SWERDLOW et al., 2008) vinte e cinco tumores são Linfoma Difuso de Grandes Células B, sem outras especificações (DLBCL, NOS) variante centroblástica e quatro DLBCL, NOS variante imunoblástica (Tabela 9). Finalmente, quando avaliados através da classificação dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos (VALLI et al., 2002), vinte e cinco tumores são Linfoma de Grandes Células B Difuso e quatro Imunoblástico de Grandes Células (Tabela 10). A tabela 11 mostra a classificação histológica de acordo com a forma anatômica. O subtipo centroblástico é o de maior incidência em qualquer das classificações utilizadas. A figura 8 retrata um exemplo de painel do perfil imunoistoquímico de um linfoma B centroblástico.

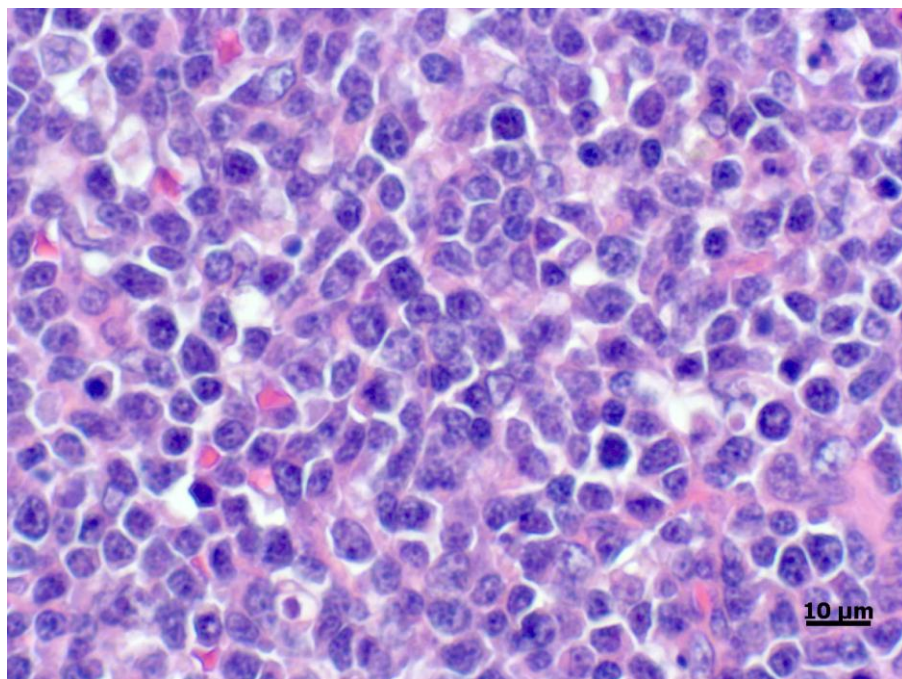


FIGURA 5. Linfoma centroblástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Notar os nucléolos múltiplos periféricos. HE.

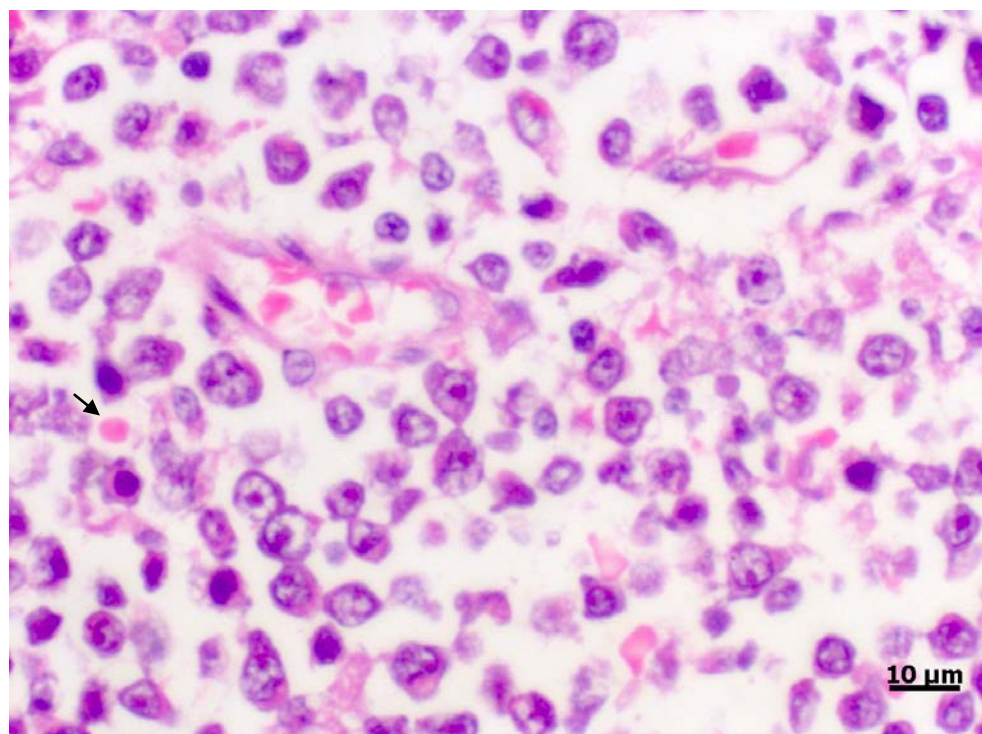


FIGURA 6. Linfoma imunoblástico de células B. Observar nucléolos únicos centrais proeminentes e comparação entre o tamanho do núcleo das células em relação à hemácia (seta). HE.

TABELA 8. Subtipos de DLBCL de acordo com a classificação de Kiel atualizada (LENNERT; FELLER, 1992).

CLASSIFICAÇÃO	Nº DE CASOS	%
Centroblástico Monomórfico	24	82,8
Centroblástico Polimórfico	1	3,4
Imunoblástico de células B	4	13,8
TOTAL	29	100

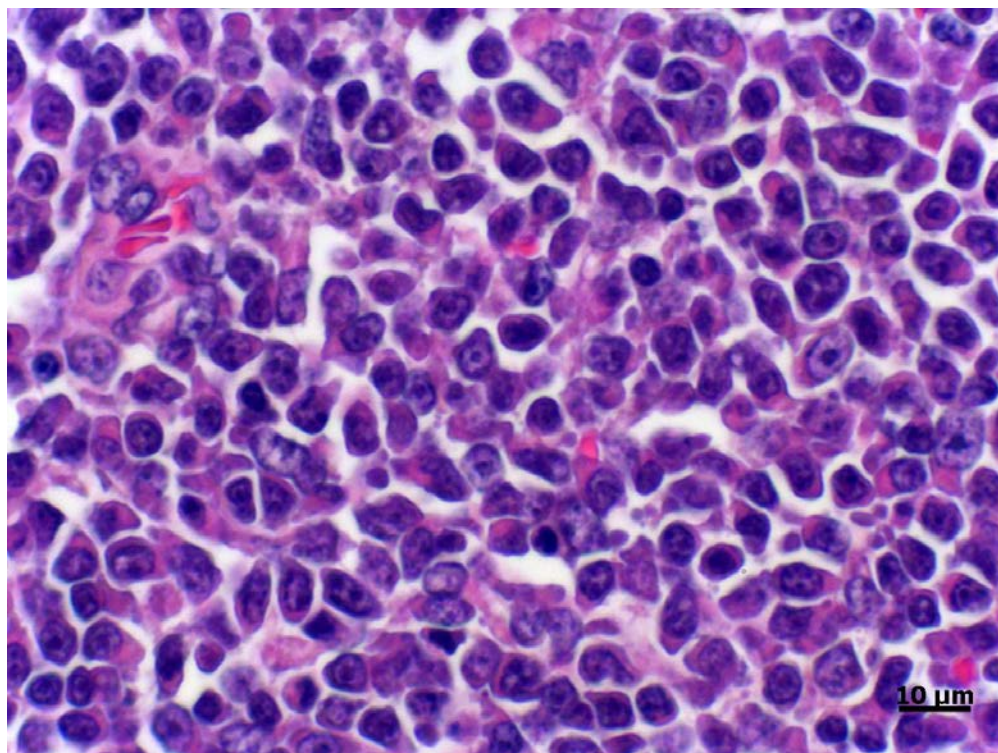


FIGURA 7. Linfoma centroblástico polimórfico (classificação de Kiel atualizada). Observar combinação entre células com morfologia imunoblástica (nucléolos únicos centrais proeminentes) e centroblástica (dois a quatro nucléolos periféricos). HE.

TABELA 9. Subtipos de DLBCL de acordo com a classificação da WHO de 2008 (SWERDLOW et al., 2008)

CLASSIFICAÇÃO	Nº DE CASOS	%
DLBCL, NOS variante centroblástica	25	86,2
DLBCL, NOS variante imunoblástica	4	13,8
TOTAL	29	100

TABELA 10. Subtipos de DLBCL de acordo com a classificação da WHO veterinária (VALLI et al., 2002)

CLASSIFICAÇÃO	Nº DE CASOS	%
Linfoma Difuso de Grandes Células B	25	86,2
Imunoblástico de Grandes Células	4	13,8
TOTAL	29	100

TABELA 11. Distribuição das classificações de Kiel, WHO veterinária e humana dos DLBCLs de acordo com a forma anatômica.

Forma anatômica	Classificação		
	Kiel	WHO v	WHO h
Tímica	centroblástico monomórfico	Linfoma de Grandes Células B	DLBCL, NOS variante centroblástica
Cutânea	centroblástico monomórfico	Linfoma de Grandes Células B	DLBCL, NOS variante centroblástica
Multicêntrica	monomórfico (78,2%)	Linfoma de Grandes Células B (82,6%)	DLBCL, NOS variante centroblástica (82,6%)
	imunoblástico (17,4%)	Imunoblástico de Grandes Células (17,4%)	DLBCL, NOS variante imunoblástica (17,4%)
	polimórfico (4,34%)		

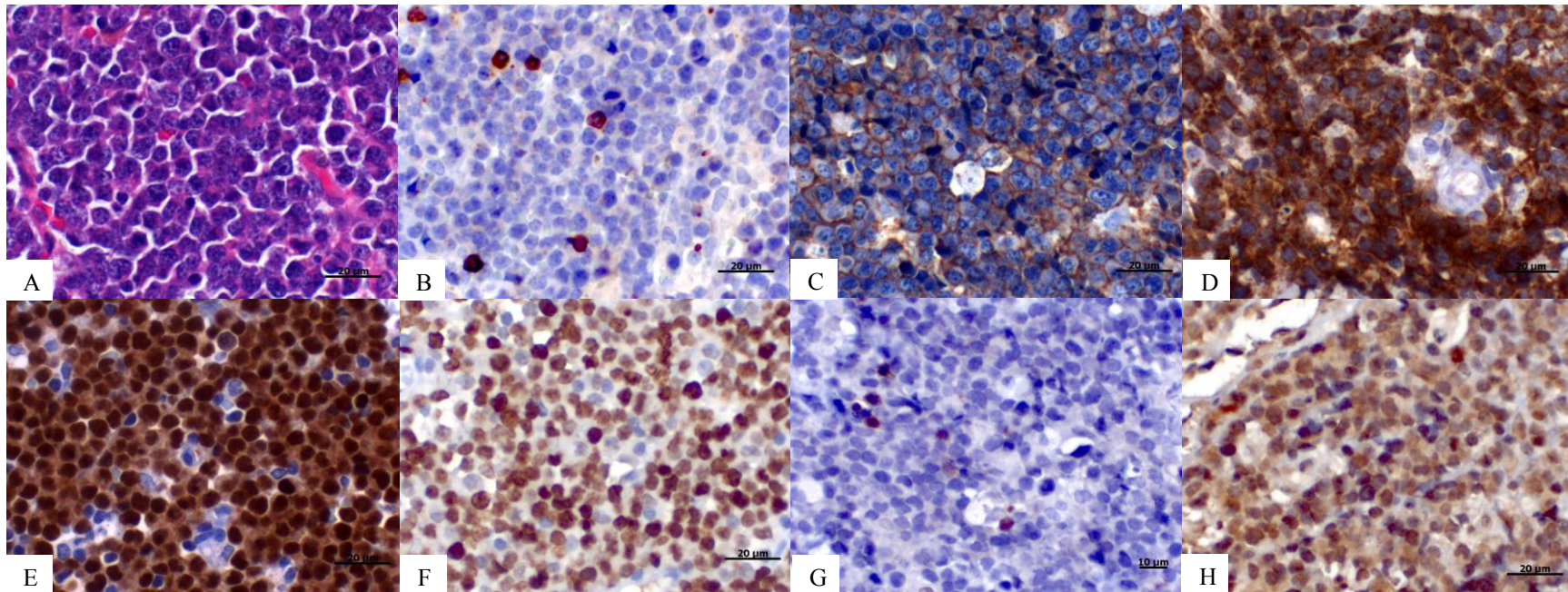


FIGURA 8. Painel imunoistoquímico de um linfoma B centrobástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). A. Coloração de HE. B. Imunomarcção negativa nas células neoplásicas para o anticorpo CD3. C. Imunomarcção membranar do anticorpo CD20. D. Imunomarcção citoplasmática do anticorpo CD79a. E. Imunomarcção nuclear do anticorpo PAX-5. F. Imunomarcção nuclear do anticorpo Ki67. G. Imunomarcção citoplasmática do anticorpo Caspase-3. H. Imunomarcção nuclear do anticorpo p53. Novolink, DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris. Barra = 20 µm.

5.3 Imunofenotipagem

Dos 29 tumores estudados nenhum exibiu marcação para o CD3, todos marcaram para o CD79a (100%), 22 para o CD20 (75,8%) e 17 para o PAX-5 (58,6%) (Tabela 12). Avaliando os mesmos anticorpos entre os diferentes subtipos do DLBCL não foi observada diferença estatística em nenhuma das três classificações - $p > 0,05$ (Kiel atualizada, WHO 2008 e WHO 2002) (Tabelas 13 a 15). Apesar de não ter sido demonstrada diferença estatística dentre os diferentes subtipos é possível observar uma porcentagem de marcação menor do PAX-5 nos tumores centroblástico monomórfico (e seus equivalentes nas outras classificações).

TABELA 12. Perfil de marcação do imunofenótipo dos DLBCLs

ANTICORPO	Nº DE CASOS	%
CD3	0	0
CD79a	29	100
CD20	22	75,8
PAX-5	17	58,6

TABELA 13. Porcentagem de marcação dos anticorpos nos DLBCLs de acordo com a classificação da Kiel atualizada (LENNERT; FELLER, 1992).

	CENTROBLÁSTICO MONOMÓRFICO	CENTROBLÁSTICO POLIMÓRFICO	IMUNOBLÁSTICO DE CÉLULAS B
CD3	0	0	0
CD79a	100	100	100
CD20	75	100	75
PAX-5	54,1	100	75

TABELA 14. Porcentagem de marcação dos anticorpos nos DLBCLs de acordo com a classificação da WHO de 2008 (SWERDLOW et al., 2008)

	DLBCL, NOS CENTROBLÁSTICA	VARIANTE	DLBCL, NOS IMUNOBLÁSTICA	VARIANTE
CD3	0		0	
CD79a	100		100	
CD20	76		75	
PAX-5	56		75	

TABELA 15. Porcentagem de marcação dos anticorpos nos DLBCLs de acordo com a classificação da WHO veterinária (VALLI et al., 2002).

	LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B	IMUNOBLÁSTICO DE GRANDES CÉLULAS
CD3	0	0
CD79a	100	100
CD20	76	75
PAX-5	56	75

5.4 Determinação do Índice Apoptótico Pela Expressão de Caspase-3

Os valores de porcentagem de marcação para este anticorpo (Figura 9) variaram de 0 a 54,21%; com mediana de 10,06% (Tabela 17). As medianas dos diferentes subtipos em cada classificação estão demonstradas na tabela 16. Não foi encontrada diferença estatística nas médias de porcentagem entre os diferentes subtipos em nenhuma das três classificações utilizadas ($p > 0,05$). Ainda sim, é possível notar uma menor marcação nos tumores centroblástico monomórfico (e seus equivalentes nas outras classificações).

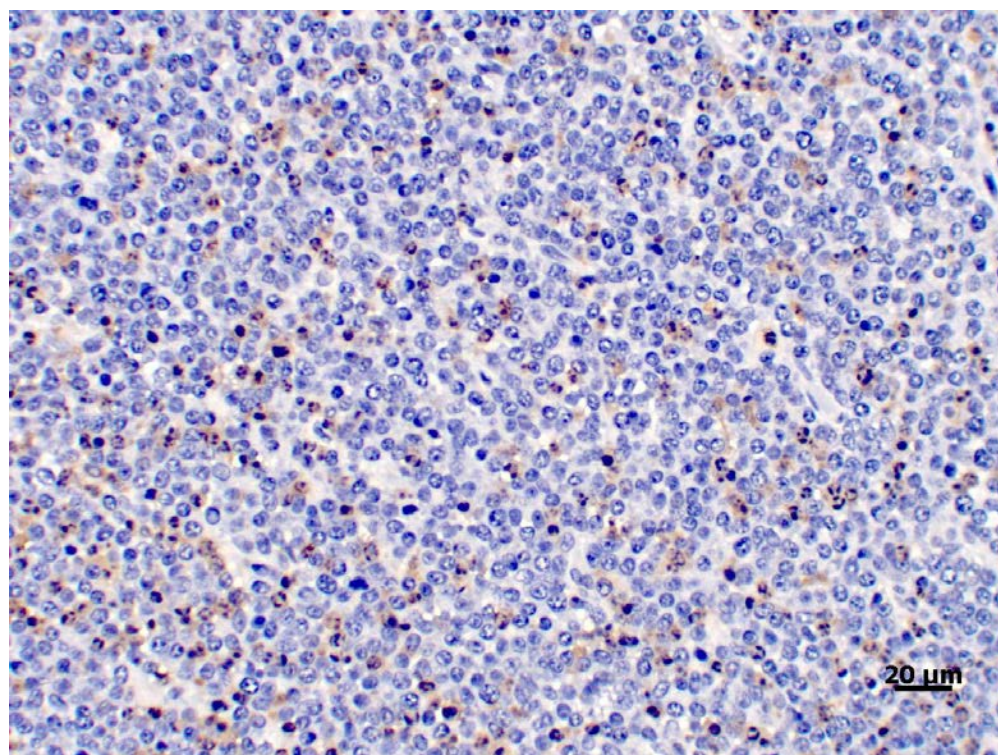


FIGURA 9. Linfoma centrolástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Imunomarcção citoplasmática do anticorpo Caspase-3. DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

TABELA 16. Valores das medianas da porcentagem de marcação dos tumores pelo anticorpo caspase-3 entre as diferentes classificações e subtipos do DLBCL.

	CLASSIFICAÇÃO	MEDIANA
Kiel atualizada	Centrolástico Monomórfico	10
	Centrolástico Polimórfico	44,84
	Imunoblástico de células B	16,36
WHO 2002	Linfoma de Grandes Células B Difuso	10,06
	Imunoblástico de Grandes Células	16,36
WHO 2008	DLBCL, NOS variante centrolástica	10,06
	DLBCL, NOS variante imunoblástica	16,36

5.5 Determinação do Índice Proliferativo pela expressão de Ki67

Os valores de porcentagem de marcação para este anticorpo (Figura 10) variaram de 9,67 a 97,01, com mediana de 45,93 (Tabela 17). Em dez tumores não houve qualquer indicio de reação imunohistoquímica e por isso estes foram excluídos da contagem. Assim como para a caspase-3, não foi encontrada diferença estatística nas médias de porcentagem entre os diferentes subtipos em nenhuma das três classificações utilizadas $p > 0,05$ (Tabela 18).

TABELA 17. Valores da mediana, percentil 25 e percentil 75 para o anticorpo caspase-3 e Ki67 nos DLBCLs.

Anticorpo	MEDIANA	PERCENTIL 25	PERCENTIL 75
Caspase-3	10,06	5,99	23,78
Ki67	45,93	31,56	81,08

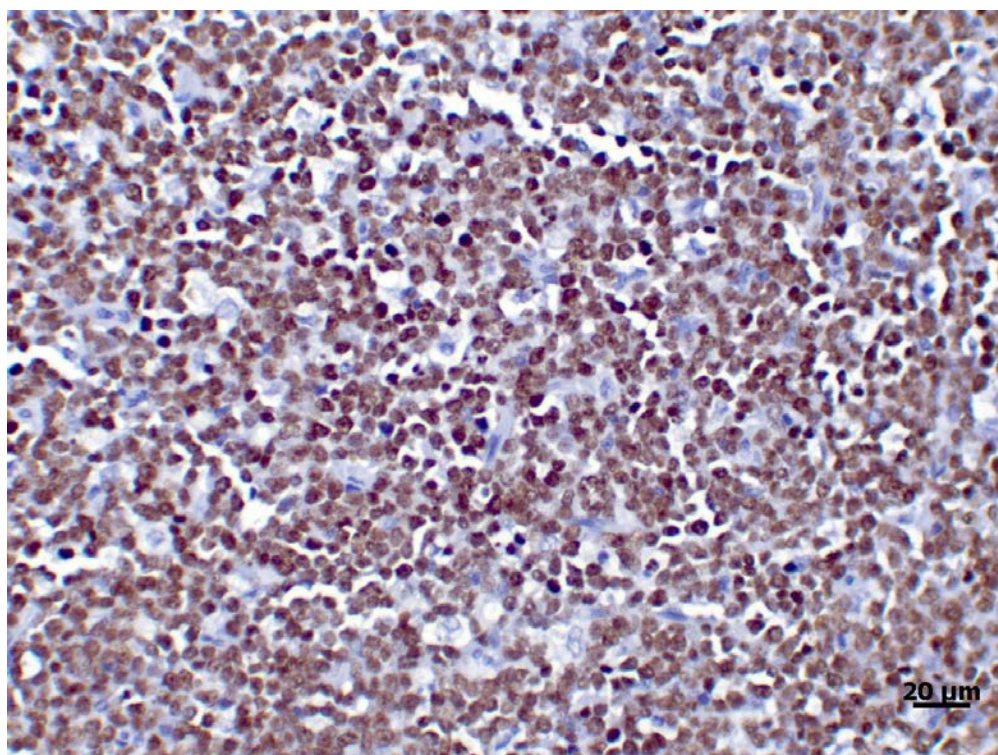


FIGURA 10. Linfoma centrobástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Imunomarcção nuclear do anticorpo Ki67. DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

TABELA 18. Valores das medianas da porcentagem de marcação dos tumores pelo anticorpo Ki67 entre os diferentes subtipos e classificações do DLBCL.

	CLASSIFICAÇÃO	MEDIANA
Kiel	Centroblástico Monomórfico	47,91
	Centroblástico Polimórfico	26,58
	Imunoblástico de células B	44,69
WHO 2002	Linfoma de Grandes Células B Difuso	46,92
	Imunoblástico de Grandes Células	44,69
WHO 2008	DLBCL, NOS variante centroblástica	46,92
	DLBCL, NOS variante imunoblástica	44,69

5.6. Razão entre Ki67 e caspase

Foi realizada a razão entre os índices de Ki67 e de caspase-3 e posteriormente a mediana destes valores entre os diferentes subtipos morfológicos (Tabela 19). Não foi encontrada, no entanto, diferença estatística, apesar dos valores para os tumores centroblásticos serem maiores do que para os imunoblásticos. Deve-se resaltar que há apenas um caso de centroblástico polimórfico, assim não seria apropriado apontar a sua mediana, sendo o valor apenas colocado para demonstração da diferença entre os subtipos.

TABELA 19. Mediana da razão Ki67/Caspase nos diferentes subtipos e classificações do DLBCL.

	CLASSIFICAÇÃO	RAZÃO KI67/CASPASE
Kiel	Centroblástico Monomórfico	8,91
	Centroblástico Polimórfico	0,59
	Imunoblástico de células B	2,03
WHO 2002	Linfoma de Grandes Células B Difuso	6,07
	Imunoblástico de Grandes Células	2,03
WHO 2008	DLBCL, NOS variante centroblástica	6,07
	DLBCL, NOS variante imunoblástica	2,03

5.7 Expressão de p53

A expressão da proteína p53 mutante (Figura 11) foi verificada em 55,17% dos tumores. A tabela 20 demonstra a porcentagem de casos positivos em cada subtipo. Na tabela 21 é possível observar o painel imunohistoquímico dos DLBCLs de acordo com a forma anatômica.

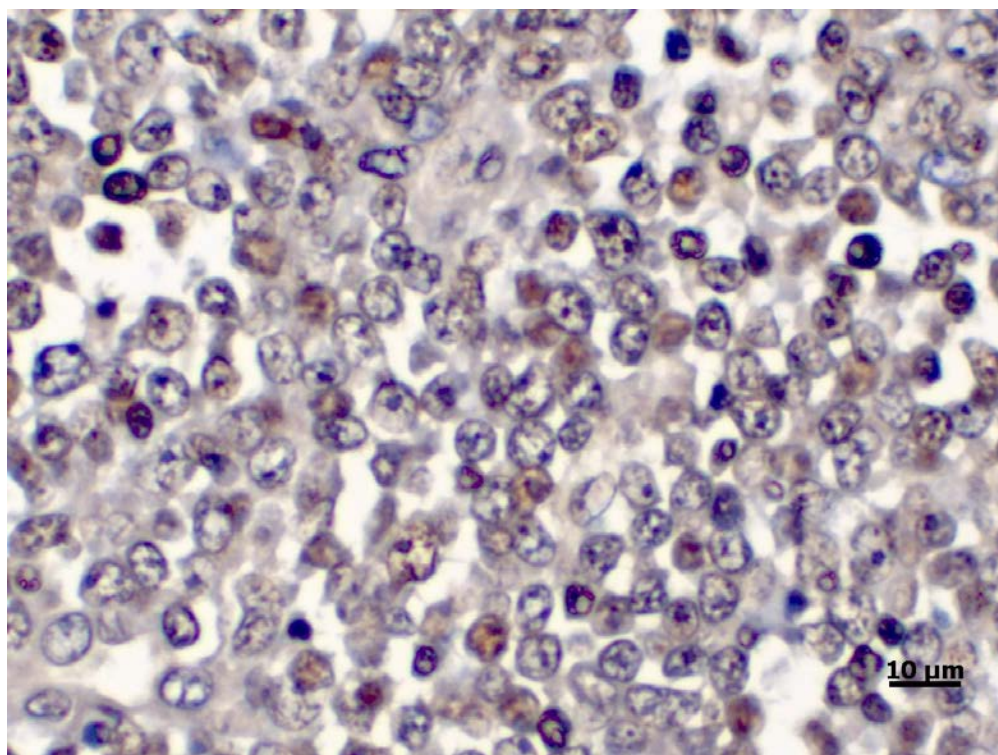


FIGURA 11. Linfoma centrobástico monomórfico (classificação de Kiel atualizada). Imunomarcção nuclear do anticorpo p53. DAB, contracoloração com hematoxilina de Harris.

TABELA 20. Porcentagem de marcação dos tumores pelo anticorpo p53 entre os diferentes subtipos e classificações do DLBCL.

CLASSIFICAÇÃO		% de positividade
Kiel	Centroblástico Monomórfico	54,16
	Centroblástico Polimórfico	100
	Imunoblástico de Células B	50
WHO 2002	Linfoma de Grandes Células B Difuso	56
	Imunoblástico de Grandes Células	50
WHO 2008	DLBCL, NOS variante centroblástica	56
	DLBCL, NOS variante imunoblástica	50

TABELA 21. Perfil imunoistoquímico dos DLBCLs de acordo com a forma anatômica.

Forma anatômica	Painel imunoistoquímico					
	CD3	CD20	PAX-5	CD79a	Caspase	Ki67
Tímica	0%	75%	75%	100%	14,76%	31,79%
Cutânea	0%	50%	0%	100%	30,1%	34,88%
Multicêntrica	0%	78,2%	60,8%	100%	9,94%	66,48%

5.8 Técnica de Microarranjo de Tecido (TMA)

A avaliação dos *cores* no TMA revelou marcação para o imunofenótipo idêntico quando comparado ao corte convencional, havendo 100% de concordância entre todos os anticorpos avaliados, com o valor de kappa = 1,0 e $p < 0,01$. Em relação à caspase-3, a concordância entre o corte convencional e o TMA foi excelente (ICC= 0,822), assim como para o Ki67, com valor de ICC de 0,935. Já a avaliação do p53 resultou em valor de kappa de 0,593, ou seja, concordância satisfatória.

Quando comparados os *cores* entre si para avaliar sua homogeneidade, foi observado que estes exibem alto grau de concordância, com ICC de 0,866 para a caspase (Figura 12) e ICC de 0,945 para o Ki67 (Figura 13). É necessário resaltar que em quatro casos o resultado do p53 não foi idêntico nos três *cores*, o que talvez faça dele menos adequado para a avaliação pelo TMA com um ou dois *cores*.

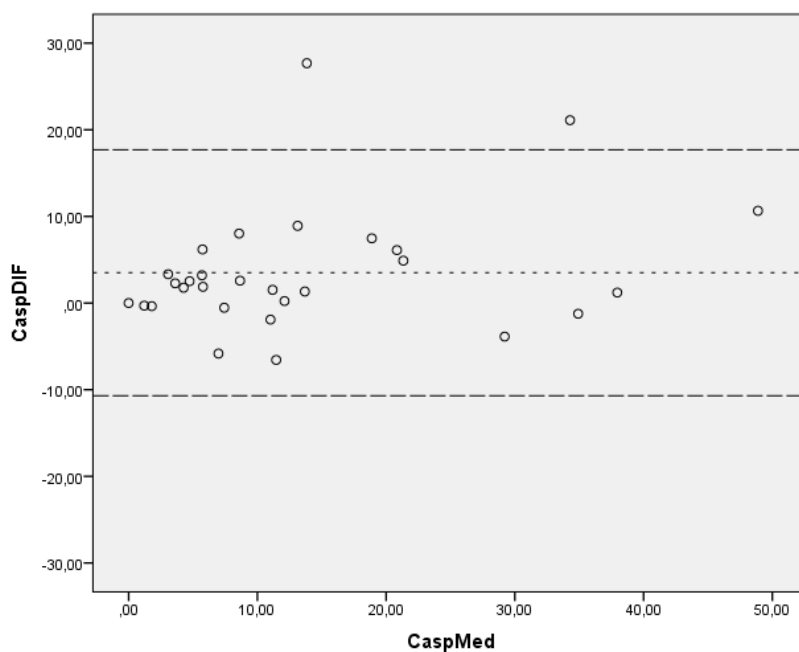


FIGURA 12. Gráfico de Bland Altman da concordância entre os valores de caspase nos DLBCLs, comparando-se o bloco com o TMA.

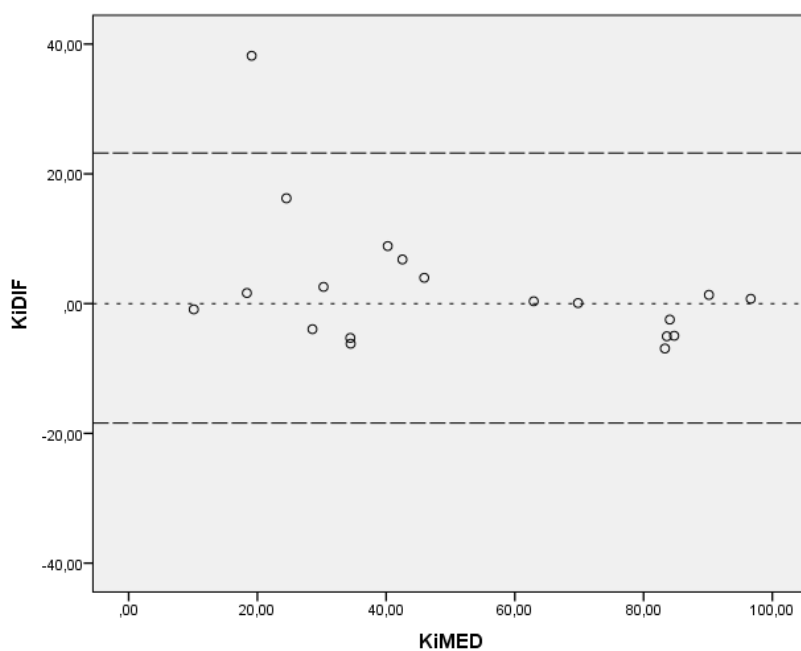


FIGURA 13. Gráfico de Bland Altman da concordância entre os valores de Ki67 nos DLBCLs, comparando-se o bloco com o TMA.

6. DISCUSSÃO

O linfoma não-Hodgkin é a neoplasia hematopoiética mais comum nos cães e é hoje a segunda neoplasia mais frequente, superada apenas pelo câncer de mama. Ela é semelhante ao linfoma humano em muitos aspectos importantes, incluindo translocações e anormalidades moleculares características e resposta terapêutica semelhante em relação à quimioterapia, radiação e terapias mais modernas. Dado ao grande número de cães domiciliados (*pet*) e a alta incidência de linfoma, particularmente em raças suscetíveis, o cão representa um recurso pouco aproveitado para o avanço no entendimento e tratamento do linfoma humano, o que acaba levando também a melhora no diagnóstico e tratamento do próprio cão (RICHARDS; SUTER, 2014).

No Brasil a presença dos animais sem raça definida é muito expressiva e isso se reflete na casuística. No estudo em questão houve maior destaque aos animais SRD com 44,8% dos cães, seguido de Boxer com 10,3% e PA com 6,9%. Esse perfil também foi observado por outros autores (SEQUEIRA et al., 1999; CARDOSO et al., 2003). Deve-se resaltar que apesar de abranger um grupo e tempo distintos (todos os linfomas diagnosticados entre 1986 e 1995 e de 1997 a 1999, respectivamente *versus* DLBCL entre 2000 a 2014), os estudos foram conduzidos na mesma instituição, o que pode refletir o perfil dos animais atendidos no Hospital Veterinário. Outros autores brasileiros também verificaram grande participação de animais SRD e Boxer (MORENO; BRACARENSE, 2007; FERNANDES, 2014; NEUWALD et al., 2014).

Na literatura internacional o Boxer é apontado como de risco aumentado, podendo chegar a 178 por 100.00 cães (TESKE, 1994; EDWARDS et al., 2003; PASTOR et al., 2009; PONCE et al., 2010). No entanto, a presença significativa dessa raça no estudo em questão é um dado um tanto controverso uma vez que já foi constatada que a raça exibe significativa predisposição a apresentar neoplasias T (MODIANO et al., 2005; PASTOR et al., 2009; PONCE et al., 2009). Por outro lado o Pastor Alemão, que obteve 3ª colocação, exibe mais frequentemente neoplasias B (PASTOR et al., 2009).

Em relação à idade, os cães tinham entre 3 e 13 anos, com média de 8,4 anos e desvio padrão (DP) de 3,3. Estudos relatam médias variando de 5,9 a 9,5 anos, assim, nossos dados estão dentro do que é descrito na literatura (SEQUEIRA et al. 1999, DOBSON et al. 2001;

EDWARDS et al., 2003; SUEIRO et al., 2004; MODIANO et al., 2005; MORENO; BRACARENSE, 2007; PASTOR et al., 2009; FRANTZ et al., 2013; ZANINI et al., 2013; NEUWALD et al., 2014).

Quando se leva em consideração apenas os casos de DLBCL foram observados valores entre 3 a 14 anos, com mediana de 7,5 anos (FERRARESO et al., 2014). Um estudo que observou os subtipos de DLBCL utilizando a classificação da WHO mostrou média discretamente maior entre os DLBCLs centroblasticos do que entre os imunoblasticos - 8,4 e 8,1 anos respectivamente (VALLI et al., 2013). Já outro levantamento obteve médias maiores para os linfomas imunoblasticos, seguido dos centroblasticos polimórficos e monomórficos, sendo os valores 9,05; 7,81 e 7,25 anos respectivamente (PONCE et al., 2010). Nós encontramos valores de médias de idade de 8,6; 8,0 e 7,33 anos para os centroblasticos monomórficos, polimórficos e imunoblasticos respectivamente, o que se aproxima mais com o observado pelos pesquisadores americanos (VALLI et al., 2013).

Não foi constatada diferença estatística entre o sexo dos cães no DLBCL, conforme o que é pressuposto na literatura em relação ao linfoma (TESKE,1994; CARDOSO et al., 2003; PASTOR et al., 2009; PONCE et al., 2010; FERNANDES, 2014). Concordando com o que diz a literatura, a forma multicêntrica foi a mais comum (TESKE, 1994; SUEIRO et al., 2004; SEQUEIRA et al., 1999; CARDOSO et al., 2003; MORENO; BRACARENSE, 2007; PONCE et al., 2010; ZANINI et al., 2013; FERNANDES, 2014; NEUWALD et al., 2014), com a mediastinal em segundo lugar (SEQUEIRA et al. 1999, CARDOSO et al. 2003). Na literatura a forma cutânea exibe maior variação em relação a sua ocorrência, com valores entre 2 a 12,9% dos casos (SUEIRO et al., 2004; CARDOSO et al., 2013; PONCE et al., 2010; FERNANDES, 2014; NEUWALD et al., 2014). Neuwald encontrou porcentagem semelhante (7%) a nossa (6,9%), no entanto nenhum dos estudos levou em consideração apenas DLBCL. O estágio IV foi o que abrigou o maior número de cães, com 57,9% dos casos, o que já foi observado por outros autores (CARDOSO et al., 2003; MORENO; BRACARENSE; et al., 2007; FERNANDES, 2014; NEUWALD et al., 2014).

Há poucos dados disponíveis referentes ao peso dos animais. Nos nossos cães foram obtidos valores de 6,5 a 40,8 kg com média de 21,1 kg e DP de 10,9 kg. Há um estudo que refere que o peso dos animais variou de 2 a 48 kg, com média de 19,5 kg, ou seja, semelhante aos nossos

valores (NEUWALD et al., 2014). Ainda, Zanini e colaboradores (2013) observaram um maior risco de desenvolvimento de linfoma nos animais com mais de 10 kg. Em outro estudo foi correlacionado peso corpóreo maior do que 18 kg com pior sobrevida (GARRETT et al., 2002).

Referente aos subtipos morfológicos, utilizando-se a classificação de Kiel atualizada o mais comum foi o centroblástico monomórfico, seguido de imunoblástico de células B e centroblástico polimórfico. Pela classificação da WHO, tanto humana quanto veterinária, o subtipo mais comum foi o centroblástico seguido pelo imunoblástico. Outros autores também observaram esta distribuição (GRENLEE et al., 1990; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; VALLI et al., 2011; SOKOLOWSKA et al., 2012). No entanto, quando atentado para a diferença entre centroblásticos monomórficos e polimórficos, o último é relatado como de maior ocorrência (PONCE et al., 2010; FERNANDES, 2014). Há, no entanto, um trabalho que cita o imunoblástico como de maior ocorrência (SUZANO et al., 2008).

O imunofenótipo do linfoma em humanos é realizado através de um painel amplo de anticorpos, uma vez que a expressão de um ou mais marcadores pode estar ausente dificultando o diagnóstico. O CD79a foi o único marcador capaz de detectar 100% dos tumores. Já o PAX-5 detectou 58,6% dos tumores o que difere de outros autores que verificaram 100% de marcação para o PAX-5 (WILMAN et al., 2009; FERNANDES, 2014). Quando se leva em consideração apenas o DLBCL outros estudos apontaram porcentagens menores de marcação de 96% e 79% para o PAX-5. (KRENACS et al., 1998; TORLAKOVIC et al., 2002). DONG e colaboradores (2008), no entanto, obtiveram 100% de marcação para o PAX-5 nos DLBCL, mesmo quando o CD20 foi negativo, sendo ainda mais sensível que o CD79a que exibiu 86% de positividade nos casos. Afirmam ainda que o PAX-5 só é negativo nos casos que exibem diferenciação plasmocitária.

No presente estudo, o CD20 teve desempenho melhor com 75,8% de positividade nos tumores. Um trabalho em humanos atingiu 97% de positividade para o CD20 no DLBCL. É importante resaltar que de fato nem todos os linfomas B são positivos para CD20 (O'MAHONY RILEY, 2012; GARG et al., 2015).

Em relação aos marcadores biológicos, a mediana da porcentagem de marcação para a caspase-3 foi de 10,06 com valores que variaram de 0 a 54,1%. Este valor difere consideravelmente quando comparado ao encontrado por Fernandes (2014) que relatou mediana

de 2,4% para as neoplasias de alto grau de malignidade e 1,33% quando levado em conta apenas os tumores B, mas está dentro do intervalo encontrado por Keller e colaboradores (2007) para o linfoma canino (6 a 25%). Quando considerados apenas os DLBCLs, em humanos, foram observados valores de 3,5% e de 8,8% (intervalo de 1,0% a 29%), sendo o segundo valor mais próximo ao observado neste estudo (DUKERS, et al., 2002; MURIS et al., 2005). Não foram encontrados dados na literatura que individualizem os subtipos com relação à caspase-3. Foram observadas médias de porcentagem de marcação maiores para o centroblástico polimórfico (44,84%), seguido do imunoblástico (16,36%) e centroblástico (10,6%)/centroblástico monomórfico (10%). Não foi observada diferença estatística entre as medianas dos diferentes subtipos provavelmente devido ao baixo número de amostras, apenas um centroblástico polimórfico e quatro imunoblásticos, assim não foi possível o estabelecimento de um perfil diferenciado para cada subtipo, mas foi constatada uma tendência que deveria ser analisada em estudos futuros, com grupos maiores e possivelmente colaborações interinstitucionais.

O Ki-67 é um marcador biológico muito relevante, que tem valor prognóstico e sua marcação pode variar de zero a cem por cento nos linfomas caninos em geral (KELLER et al., 2007). Os linfomas de alto grau de malignidade costumam exibir marcação maior pelo Ki67 com médias que variam de 31,5 a 51,35 % (PHILLIPS et al., 2000; SUZANO et al., 2008; FERNANDES, 2014). Quando a avaliação é em relação ao DLBCL, em humanos, foram apontados 65,7% de casos com alta expressão de Ki67 (>40%) e 34,3% de amostras com baixa expressão (<40%). (KÜÇÜKZEYBEK et al., 2013) No nosso trabalho a média geral foi de 45,93%, sendo a média discretamente maior nos linfomas centroblásticos (46,92%) do que nos imunoblásticos (44,69%). Avaliando-se os diferentes subtipos, nos cães SOKOLOWSKA e colaboradores (2012) observaram grande variação no índice proliferativo dos linfomas centroblásticos. O linfoma imunoblástico mostrou expressão relativamente baixa de Ki67, contrastando com o verificado por Fournel-Fleury e colaboradores (1997b) que observaram os maiores índices nesse subtipo. Outro pesquisador verificou média maior de proliferação nos centroblásticos (65%) do que nos imunoblásticos (46%), compatível com o que nos observamos. (DZIMIRA, 2007)

A expressão da p53 mutada é bem variável e controversa em relação a seu prognóstico. Calazans (2010) não achou correlação com nenhuma característica clínico-patológica ou tempo de sobrevida. Já Xu-Monette e colaboradores (2013) correlacionaram com pior sobrevida no DLBCL humano. No homem, a incidência de mutação de p53 nos LNHS é de cerca de 30% (INAMURA et al., 1994). Quando se avalia o linfoma canino, essa porcentagem não era significativa em trabalhos mais antigos, mas recentemente encontraram-se valores entre 22% e 90% de positividade dos linfomas (GAMBLIN et al., 1997; SOKOLOWSKA et al., 2005; SUEIRO et al., 2004 ; DZIMIRA, 2007; SUZANO, 2007 ; GERARDI, 2008; CALAZANS, 2010; DHALIWAL et al., 2013; FERNANDES, 2014).

Mais especificamente no linfoma B, em diferentes estudos, foi observado reatividade em 32,7% e 60% dos tumores (SUEIRO et al., 2004; DZIMIRA, 2007). Existe na literatura associação maior entre linfomas T e marcação do p53, mas há também marcação maior em neoplasias de alto grau independente do imunofenótipo (SUEIRO, 2004). Além disso, a média de idade é significativamente maior em casos positivos para p53, o que não foi observado por nós, sendo as médias de idade 9,0 e 7,9 anos para os casos negativos e positivos, respectivamente. Em nosso estudo foi verificada ainda porcentagem discretamente maior para os tumores centroblasticos (56%) em relação aos imunoblasticos (50%). Deve-se resaltar que o polimórfico obteve 100% de marcação, mas se trata de um caso apenas, assim não é possível realizar qualquer tipo de dedução a partir desse dado. No DLBCL em humanos já foram constatados valores de 50,8% e de 61,1% de marcação, índices que se aproximam do nosso (KÜÇÜKZEYBEK et al., 2013; PASANEN et al., 2013)

Para a avaliação dos marcadores acima citados, O TMA é uma técnica que possui muitas vantagens, mas um aspecto fundamental é a representatividade em relação ao corte convencional. A associação entre a expressão de um biomarcador no TMA com apenas uma característica clinicopatológica do câncer é tida como evidencia de que o TMA foi validado e assim é uma tecnologia que pode ser utilizada no estudo de outros biomarcadores na mesma neoplasia ou do mesmo biomarcador em outras neoplasias. Assim, antes da preparação de um TMA o número de *cores* necessário para acuradamente representar a expressão de um biomarcador no tecido deve ser estabelecido de acordo com biomarcador e a neoplasia

específica. No carcinoma renal, por exemplo, foi observado que são necessários de 2 a 3 *cores* para a adequada avaliação do Ki67 (ECKEL-PASSOW et al., 2010).

Em estudos de linfoma canino foram observados índices de concordância excelente entre o TMA e corte convencional tanto para o Ki67, quanto para a Caspase utilizando-se o mesmo tamanho do *core* que o nosso trabalho (1,0 mm). Já em relação ao p53, diferentemente do nosso trabalho que encontrou concordância adequada, foi observada concordância fraca. Isso pode ser explicado pelo fato que o trabalho mencionado avaliou todos os tipos de linfoma (FERNANDES, 2014). No DLBCL devido a sua característica difusa era esperada uma concordância maior. É preciso destacar, no entanto, que em quatro casos, houve diferença de positividade entre os 3 *cores*, uma vez que a amostra é considerada positiva quando há 10% ou mais de marcação, e esta avaliação é feita em mais de um campo, sendo que não é absolutamente homogênea no tecido, assim o *core* utilizado pode ter representado uma área com marcação discretamente acima ou abaixo da observada no corte inteiro.

Em relação ao número de *cores* necessários para corresponder ao corte inteiro, nossas amostras foram avaliadas em 3 *cores* de 1,0 mm, sendo que foi observada concordância excelente entre os três, assim, um *core* de 1,0 mm é suficiente para representar a amostra tumoral como um todo. Levando em consideração Ki67 e caspase-3, além do imunofenótipo foi relatado que quatro *cores* de 0,6 mm ou 2 de 1,2 mm representam adequadamente o tecido todo (KELLER, 2007). Mais uma vez o autor levou em consideração todos os linfomas, os quais exibem heterogeneidade muito superior ao DLBCL.

7. CONCLUSÕES

- O CD79a foi o marcador mais eficiente para os DLBCLs sendo expresso por todos os tumores. CD20 foi menos eficiente do o CD79a, porém superior ao PAX-5.
- Não houve diferença nos índices de proliferação e apoptótico entre os diferentes tipos de DLBCL.
- Foi detectada a expressão de p53 mutante nos DLBCLs, sendo semelhante o percentual de tumores positivos entre os subtipos estudados.
- O TMA quando utilizado em *core* de 1 mm de diâmetro no DLBCL é um método confiável para a avaliação do imunofenótipo (CD3, CD20, PAX-5, CD79a) e dos índices de proliferação (Ki67) e apoptose (Caspase-3), além da observação da expressão da proteína p53 mutante.

8. BIBLIOGRAFIA

ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIS RE, MA C, LOSSOS IS, ROSENWALD A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**. v. 403, p.503–511, 2000.

ALVES, V. A. C. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica**. São Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

ARESPACOCCHAGA, A. G.; SCHWENDENWEIN, I.; WEISSENBÖCKY, H. Retrospective Study of 82 Cases of Canine Lymphoma in Austria based on the Working Formulation and Immunophenotyping. **J Comp Pathol**. v. 136, p. 186-192, 2007.

BIENZLE, D.; VERNAU, W. The diagnostic assessment of canine lymphoma: implications for treatment. **Clin Lab Med**. v. 31 n.1, p.21-39, 2011.

BOERKAMP, K. M.; TESKE, E.; BOON, L. R.; GRINWIS G. C. M.; VAN DEN BOSSCHE, L.; RUTTEMAN, G. R. Estimated incidence rate and distribution of tumours in 4,653 cases of archival submissions derived from the Dutch golden retriever population. **BMC Vet Res**. v. 10, n. 34, p. 1-10, 2014.

BUBENDORF, L.; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol**. v.195, p.72-79, 2001.

BUBIEN, J. K.; ZHOU, L.; BELL P. D.; FRIZZELL R. A.; TEDDER T. E. Transfection of the CD20 Cell Surface Molecule into Ectopic Cell Types Generates a Ca Conductance Found Constitutively in B Lymphocytes. **J Cell Biol**. v. 121, n. 5, p. 1121-1132, 1993.

CABEZUDO, E.; CARRARA, P.; MORILLA, R.; MATUTES, E. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B-cell lymphoproliferative disorders. **Haematologica**. v. 84, n. 5, p. 413-418, 1999.

CALAZANS, S. G.; RODIGHIERI, S. M.; FERNANDES, S. C.; AMORIM R. L.; SEQUEIRA, J. L.; SENA, J. A. D.; DALECK, C. R.. Imunorreatividade da p53 associada à ausência de mutações no gene TP53 em linfomas caninos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.6, p.1444-1447, 2010.

CÁPUA, M.L.B.; COLETA, F. E. D.; CANESIN, A. P. M. N.; GODOY, A. V.; CALAZANS, S. G.; MIOTTO, M. R.; DALECK, C. R.; SANTANA, A. E. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. **Ciênc Rural**. v.41, n.7, p.1245-1251, 2011.

CARDOSO, M. J. L.; MACHADO, L. H. A.; ROCHA, N. S.; MOUTINHO, F. Q.; CIAMPOLINI, P. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. **Biosci. J.** v.19, n.13, p. 131-142, 2003.

CARTER, R. F.; VALLI, V. E. O.; LUMSDEN, J. H. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to National Cancer Institute Working Formulation. **Can J Vet Res.** v. 50, p. 154-164, 1986.

COIFFIER, B.; LEPAGE, E.; BRIÈRE, J.; HERBRECHT, R.; TILLY, H.; BOUABDALLAH, R.; MOREL, P.; VAN DEN NESTE, E.; SALLES, G.; GAULARD, P.; REYES, F.; GISSELBRECHT, C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-b-cell lymphoma. **N Engl J Med.** v. 346, n. 4, p. 235-242, 2002.

COMAZZI, S.; GUSCETTI, F.; MARCONATO L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013 **Hematol Oncol.** v. 32, n. 2, p.68-71, 2014.

DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; EHRHART, E. J.; VALLI, V. E.; DERVISIS, N. G. Clinicopathologic Significance of Histologic Grade, Pgp, and P53 Expression in Canine Lymphoma. **J Am Anim Hosp Assoc.** v. 49, n. 3, p. 175-85, 2013.

DOBSON, J.M.; BLACKWOOD, L.B.; MCINNES, E.F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T.M.; TOM, B.D.M. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. **J. Small Anim. Pract.**, v.42, n.8, p. 377-384, 2001.

DOBSON, J.M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. **ISRN Vet Sci** doi: 10.1155/2013/941275, 2013.

DONG, H. Y.; BROWNE, P.; LIU, Z.; GANGI, M. PAX-5 is invariably expressed in B-cell lymphomas without plasma cell differentiation **Histopathology** v. 53, n. 3, p. 278–287, 2008

DONOGHUE, S.; BADEN, H.S; LAUDER, I.; SOBOLEWSKI, S.; PRINGLE, J.H. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphoma. **Cancer Res.** v.59, n. 20, p. 5386-5391, 1999.

DUKERS, D. F.; OUDEJANS, J. J.; VOS, W.; BERGE, R. L.; MEIJER, C. J. L. M. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. **J Pathol.** v. 196, p.307-315, 2002.

DZIMIRA S. Immunocytochemical and cytomorphometric diagnostics of malignant lymphomas in dogs. **Bull Vet Inst Pulawy.** v. 51, p. 71-78, 2007.

ECKEL-PASSOW, J. E.; LOHSE, C. M.; SHEININ, Y.; CRISPEN, P. L.; KRICO, C. J.; KWON, E. D. Tissue microarrays: one size does not fit all. **Diagn Pathol.** n. 5, v. 48, 2010.

EDWARDS, D. S.; HENLEY, W. E.; HARDING, E. F.; DOBSON, J. M.; WOOD, J. L. N. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. **Vet Comp Oncol.** v. 1, n. 4, p. 200–206, 2003.

FELLER, A. C; DIEBOLD, J. **Histopathology of nodal and extranodal non Hodgkin lymphoma.** Berlin: Springer, 3. ed., 2004.

FERNANDES, T. R. **Classificação morfológica e imunoistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de linfomas não-hodgkin em cães conforme os critérios da Histological**

Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals (WHO). Botucatu: 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

FERRARESSO, S.; BRESOLIN, S.; ARICO, A.; COMAZZI, S.; GELAIN, M. E.; RIONDATO, F.; BARGELLONI, L.; MARCONATO, L. Geertruy te Kronnie, ARESU, L. Epigenetic Silencing of TFPI-2 in Canine Diffuse Large BCell Lymphoma **PLOS ONE**. v.9, n.4, p. 1-10, 2014.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Linfossarcoma em cães. **Ciênc Rural**. v. 32, n.5, p.895-899, 2002.

FLOWERS, R.; SINHA, R.; VOSE, J. M. Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. **CA: Cancer J Clin**. v. 60 p. 393–408, 2010.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHARBANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **J Comp Pathol**. v.117, n.1, p. 35-59, 1997a.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; CHABANNE, L.; GHERNATI, I.; MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. **J Comp Pathol**. v. 117, p. 61-72, 1997b.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, P.; FELMAN, P.; BLAVIER, C.; BONNEFOND, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J. L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J. P. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Vet Pathol**. v. 39, p. 92-109, 2002.

FRANKE, A.; NIEDERFELLNER, G. J.; KLEIN, C.; BURTSCHER, H. Antibodies against CD20 or B-cell receptor induce similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. **PLoS One**. v. 18, n. 2, e16596. 2011.

FRANTZ, A. M.; SARVER, A. L.; ITO, D.; PHANG, T. L.; KARIMPOUR-FARD, A.; SCOTT, M. C.; VALLI, V. E. O.; LINDBLAD-TOH, K.; BURGESS, K. E.; HUSBANDS, B. D.; HENSON, M. S.; BORGATTI, A.; KISSEBERTH, W. C.; HUNTER, L. E.; BREEN, M.; O'BRIEN, T. D.; MODIANO, J. F. Molecular Profiling Reveals Prognostically Significant Subtypes of Canine Lymphoma. **Vet Pathol**. v. 50, n. 4, p. 693-703, 2013.

GARG, M.; LEE, B. E.; MCGARRY, K.; MANGRAY, S.; CASTILLO, J. J. CD20-negative diffuse large B-cell lymphoma presenting with lactic acidosis American Journal of Hematology, v. 90, n. 3, 2015.

GARRETT, L. D.; THAMM, D. H.; CHUN, R.; DUDLEY, R.; VAIL, D. M. Evaluation of a 6-Month Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma. **J Vet Intern Med**. v. 16, n. 6, p. 704–709, 2002.

GATTER, K. C.; WARNKE, R. A. Diffuse large B-cell lymphoma. In: JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. (Eds.) **World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. IARC Press:Lyon 2001, p. 171-174.

GAVAZZA, A.; LUBAS, G.; VALORI, E.; GUGLIUCCI, B. Restrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. **Vet. Res. Commun**. v. 32, n. S1, p. S291-S293, 2008.

GERARDI, G.D. **Reatividade de tecidos neoplásicos caninos à proteína associada à resistência a múltiplas drogas-1 (MRP1), à glutationa-s-transferase pi (GSTpi) e à proteína p53**. Jaboticabal: 2008. 92 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho.

GAMBLIN, R. M. ; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **Am J Vet Res.** v. 58, n. 8, p. 857-863, 1997.

GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic and clinical study. **Cancer**, v.66, p. 480-490, 1990.

HAARER, C. F.; ROBERTS, R. A.; FRUTIGER, Y. M.; GROGAN, T. M.; RIMSZA, L. M. Immunohistochemical Classification of De Novo, Transformed, and Relapsed Diffuse Large B-Cell Lymphoma Into Germinal Center B-Cell and Nongerminal Center B-Cell Subtypes Correlates With Gene Expression Profile and Patient Survival **Arch Pathol Lab Med.** v. 130, n. 12, p. 1819-1824, 2006.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; STEIN, H.; BANKS, P. M.; CHAN, J. K.; CLEARY, M. L.; DELSOL, G.; DE WOLF- PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K. C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1361-1392, 1994.

HARRIS, N. L.; JAFFE E. S.; DIEBOLD J.; FLANDRIN G.; MULLER-HERMELINK, H. K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T. A.; BLOOMFIELD, C. D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. **Histopathology**, v. 36, p. 69–86, 2000.

HWANG, H. S.; YOON, D. H.; SUH, C.; PARK, C.; HUH J. Prognostic value of immunohistochemical algorithms in gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma. **Blood Res.** v. 48, n. 4, p. 266-73, 2013.

INAMURA, J.; MIYOSHI, I.; KOEFFLER, H. P. p53 in hematologic malignancies. **Blood.** v. 84, p.2412-1421, 1994.

ITO, D.; FRANTZA, A. M.; MODIANO, J. F. Canine lymphoma as a comparative model for humannon-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 159, n. 3-4, p. 192-201, 2014.

ITO, D.; BREWER, S.; MODIANO, J. F.; BEALL, M. J. Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential. v. 56, n. 1, p. 219-25, 2015.

JACOBS, R.M.; MESSICK, J.B.; VALLI, V.E. Tumors of the hemolymphatic system. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa State University Press, Ames, 2002. p.119-198.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. **World Health Organization Classification of Tumors- Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, IARC Press, 2001.

JUBALA, C. M.; WOJCIESZYN, J. W.; VALLI, V. E. O.; GETZY, D. M.; FOSMIRE, S. P.; COFFEY, D.; BELLGRAU, D.; MODIANO, J. F. CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. **Vet Pathol.** v. 42, n. 4, p. 468- 476, 2005.

KANO, R.; INOIUE, C.; OKANO, H.; YAMAZAKI, J.; TAKAHASHI, T.; WATARI, T.; TOKURIKI, M.; HASEGAWA, A. Canine CD20 gene. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 108, p. 265–268, 2005.

KELLER, S. M.; KELLER, B. C.; GREEST, P.; BORGER, C. T.; GUSCETTI, F. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine lymphomas. **J Vet Diagn Invest.** v.19, p. 652-659, 2007.

KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Vet Pathol.** v. 36, p. 292-300, 1999.

KONONEN, J.; BUDENDORF, L.; KALLIONIMENI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O.

Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med.** v.4, p.844-847, 1998.

KRENACS, L.; HIMMELMANN, A. W.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; FEST, T.; RIVA, A.; WELLMANN, A.; BAGDI, E.; KEHRL, J. H.; JAFFE, E. S.; RAFFELD, M. Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. **Blood.** v. 92, p. 1308-1316, 1998.

KÜÇÜKZEYBEK, B. B.; BENER, S.; ÇALLI, A. O.; PAKSOY, T. D.; PAYZIN, B. Prognostic Significance of Bcl-2 and p53 Protein Expressions and Ki67 Proliferative Index in Diffuse Large B-cell Lymphoma. **Turk J Hematol.** v. 30, n. 3, p. 275-282, 2013.

LENNERT, K.; FELLER, A. C. **Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas**, 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

MARCONATO, L.; CRISPINO, G.; FINOTELLO, R.; MAZZOTTI, S.; ZINI, E. Clinical relevance of serial determinations of lactate dehydrogenase activity used to predict recurrence in dogs with lymphoma. **J Am Vet Med Assoc.** v. 236, n. 9, p.969-974. 2010.

MARCONATO L., GELAIN M. E., COMAZZI S. The dog as a possible animal model for human non- Hodgkin lymphoma: a review. **Hematol Oncol** doi: 10.1002/hon.2017, 2012.

MATSUUCHI, L.; GOLD, M. R. New views of BCR structure and organization. **Curr Opin Immunol.** v. 13, n. 3, p. 270-277. 2001.

MILANES-YEARSLEY, M.; HAMMOND, M. E.; PAJAK, T. F.; COOPER, J. S.; CHANG, C.; GRIFFIN, T.; NELSON, D.; LARAMORE, G.; PILEPICH, M. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. **Mod Pathol.** v. 15, n. 12, p. 1366-73, 2002.

MODIANO, J. F.; BREEN, M.; BURNETT, R. C.; PARKER, H. G.; INUSAH, S.; THOMAS, R.; AVERY, P. R.; LINDBLAD-TOH, K.; OSTRANDER, E. A.; CUTTER, G. C.; AVERY,

A. C. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. **Cancer Res.** v. 65, n. 13, p. 5654–5661, 2005.

MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Braz J Vet Res Anim Sci.** v.44, p.46-52, 2007.

MÖSSNER, E.; BRÜNKER, P.; MOSER, S.; PÜNTENER, U.; SCHMIDT, C.; HERTER, S.; GRAU, R.; GERDES, C.; NOPORA, A.; VAN PUIJENBROEK, E.; FERRARA, C.; SONDERMANN, P.; JÄGER, C.; STREIN, P.; FERTIG, G.; T., FRIES T.; SCHÜLL, C.; BAUER, S.; DAL PORTO, J.; DEL NAGRO, C.; DABBAGH, K.; DYER, M. J.; POPPEMA, S.; KLEIN, C.; UMAÑA, P. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. **Blood.** n. 115, v. 22, p. 4393–4402, 2010.

MUDALIAR, M. A. V.; HAGGART, R. D.; MIELE, G.; SELLAR G.; TAN, K. A. L.; GOODLAD, J. R.; MILNE, E.; VAIL, D. M.; KURZMAN, I.; CROWTHER, D.; ARGYLE, D. J. Comparative Gene Expression Profiling Identifies Common Molecular Signatures of NF-kB Activation in Canine and Human Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL). **PLOS ONE.** v. 8, n. 9, p. 1-17, 2013.

MURIS, J. J. F.; CILLESSEN, S. A. G. M.; VOS, W.; VAN HOUDT, I. S.; KUMMER, J. A.; VAN KRIEKEN, J. H. J. M.; JIWA, N. M.; JANSEN, P. M.; KLUIN-NELEMANS, H. C.; OSSENKOPPELE, G. J.; GUNDY, C.; MEIJER, C. J. L. M.; OUDEJANS, J. J. Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. **Blood.** v. 105, n. 7, p. 2916-2923, 2005.

NEUWALD, E.B.; TEIXEIRA, L.V.; CONRADO, F.O.; SILVA, M.O.D.; HLAVAC, N.R.C.; GONZÁLEZ, F.H.D. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. **Pesq Vet Bras.** v. 34, n. 4, p. 349-54, 2014.

OLEJNICZAK, S. H.; STEWART, C. C.; DONOHUE, K.; CZUCZMAN, M. S. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. **Immunol Invest.** v. 35, n. 1, p. 93-114, 2006.

O'MAHONY, O. H.; RILEY, A. CD20-negative follicular lymphoma. **Diagn Histopathol.** v. 18, n. 10, p. 457-460, 2012.

ONIONS, D. E. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. **J Natl Cancer Inst.** v. 72, n. 4, p. 909–991, 1984.

OWEN, L. N. **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals.** Geneva: World Health Organization, 1980.

PASANEN, A. K.; HAAPASAARI, K.; PELTONEN, J.; SOINI, Y.; JANTUNEN, E.; BLOIGU, R.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; KUITTINEN, O. Cell cycle regulation score predicts relapse-free survival in non-germinal centre diffuse large B-cell lymphoma patients treated by means of immunochemotherapy **European Journal of Haematology.** v. 91, p. 29–36, 2013.

PASTOR, M.; CHALVET-MONFRAY, K.; MARCHAL, T.; KECK, G.; MAGNOL, J. P.; FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. **J Vet Inter Med.** v. 23, n. 2, p.301-10, 2009.

PHILLIPS, B. B.; KASS, P. H.; NAYDAN, D. K.; WINTHROP, M. D.; GRIFFEY, S. M.; MADEWELL, B. R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **J Vet Diagn Invest.** v.12, n.2, p.111-117, 2000.

POLSON, A. G.; YU, S.; ELKINS, K.; ZHENG, B.; CLARK, S.; INGLE, G. S.; SLAGA, D. S.; GIERE, L.; DU, C.; TAN, C.; HONGO, J.; GOGINENI, A.; COLE, M. J.; VANDLEN, R.; STEPHAN, J.; YOUNG, J.; CHANG, W.; SCALES, S. J.; ROSS, S.; EATON, D.; EBENS, A. Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. **Blood.** v. 110, n. 2, p. 616-623, 2007.

PONCE, F.; MAGNOL, J. P.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FOURNEL-FLEURY C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **Vet J.** v. 167, n. 2, p. 158-66, 2004.

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

RICHARDS, K. L.; MOTSINGER-REIF, A. A.; CHEN, H.; FEDORIW, Y.; FAN, C.; NIELSEN, D. M.; SMALL, G. W.; THOMAS, R.; SMITH, C.; DAVE, S. S.; PEROU, C. M.; BREEN, M.; BORST, L. B.; SUTER, S. E. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and post-germinal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. **Cancer Res.** v. 73, n. 16, p. 5029–5039, 2013.

RICHARDS, K. L.; SUTER, S. E. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? **Immunological Reviews.** v. 263, p. 173-191, 2014

ROBERT, M.; FRIEDLANDER, M. D. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. **N Engl. J. Med.** v. 348, p. 1365-1375, 2003.

ROSENWALD A, WRIGHT G, CHAN WC, CONNORS JM, CAMPO E, FISHER RI, GASCOYNE, R. D.; MULLER-HERMELINK, H. K.; SMELAND, E. B.; GILTNANE, J. M.; HURT, E. M.; ZHAO, H.; AVERETT, L.; YANG, L.; WILSON, W. H.; JAFFE, E. S.; SIMON, R.; KLAUSNER, R. D.; POWELL, J.; DUFFEY, P. L.; LONGO, D. L.; GREINER, T. C.; WEISENBURGER, D. D.; SANGER, W. G.; DAVE, B. J.; LYNCH, J. C.; VOSE, J.; ARMITAGE, J. O.; MONTSERRAT, E.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; GROGAN, T. M.; MILLER, T. P.; LEBLANC, M.; OTT, G.; KVALOY, S.; DELABIE, J.; HOLTE, H.; KRAJCI, P.; STOKKE, T.; STAUDT, L. M.; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. **N Engl J Med.** v. 346, n. 25, p.1937–47, 2002.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog Models of Naturally Occurring Cancer. **Trends Mol Med.** v. 17, n. 7, p. 380–388, 2011.

RÜTGEN B. C.; WILLENBROCK, S.; REIMANN-BERG, N.; WALTER, I.; FUCHS-BAUMGARTINGER, A.; WAGNER, S.; KOVACIC, B.; ESSLER, S. E.; SCHWENDENWEIN, I.; NOLTE, I.; SAALMÜLLER A.; ESCOBAR, H. M. Authentication of Primordial Characteristics of the CLBL- 1 Cell Line Prove the Integrity of a Canine B-Cell Lymphoma in a Murine In Vivo Model. **PLoS ONE.** v. 7, n. 6, 2012.

RUTLEY, M. & MACDONALD, V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. **Can Vet J.** v. 48, n. 9, p. 977-979, 2007.

SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P. et al. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arq Bras Med Vet Zoot.** v.51, n.3, p.245-249, 1999.

SÖZMEN, M.; TASCA, S.; CARLI, E.; DE LORENZI, D.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. **J Vet Diagn Invest.** v. 17, p. 323–329, 2005.

SOKOŁOWSKA, J.; CYWINSKA, A.; MALICKA, E. p53 Expression in Canine Lymphoma. **J Vet Med.** v. 52, p.172-175, 2005.

SOKOŁOWSKA, J.; MICUN, J.; MALICKA, E.; LECHOWSKI, R. Proliferation activity in canine lymphomas. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 15, p. 727-724, 2012.

SUEIRO, F. A. R.; ALESSI, A. C.; VASSALLO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoeexpression. **J Comp Pathol.** v. 131, p. 207-213, 2004.

SUZANO, S. M. C. **Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do P53 nos linfomas caninos.** Botucatu: 2007. 72 f. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) -

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L.; PESSOA, A. W. P.; PORTO, C. D.; OLIVEIRA, D. E. Proliferação celular nos linfomas caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 313-319, 2008.

SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L.; ROCHA, N. S.; PESSOA, A. W. P. Classificação citológica dos linfomas caninos. **Braz J Vet Res Anim Sci**. v. 47, n. 1, p. 47-54, 2010.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4 ed. Lyon: IARC Press, 2008.

TAYLOR, R. P.; LINDORFER, M. A. Analyses of CD20 Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Cell Killing Mechanisms: Rational Design of Dosing Strategies. **Mol Pharmacol**. v.86, n.5, p. 485-491, 2014.

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

THALHEIM, L.; WILLIAMS, L.E.; BORST, L.B., FOGLE, J.E.; SUTER, S.E. Lymphoma Immunophenotype of Dogs Determined by Immunohistochemistry, Flow Cytometry, and Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements. **J Vet Intern Med**. n. 27, v. 6 p. 1509–1516, 2013.

TOMIYASU, H.; GOTO-KOSHINO, Y.; TAKAHASHI, M.; FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. **J Vet Med Sci**. n. 72, v.9, p. 1165-1172, 2010.

TORLAKOVIC, E.; TORLAKOVIC, G.; NGUYEN, P. L.; BRUNNING, R. D; DELABIE, J. The value of anti pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin embedded sections: a novel pan pre-B and B-cell marker. **Am J Surg Pathol**. v. 26, n. 10, p. 1343-1350, 2002.

TORLAKOVIC, E.; SLIPICEVIC, A.; ROBINSON, C.; DECOTEAU, J. F.; ALFSEN, G. C.; VYBERG, M.; CHIBBAR, R.; FLØRENES, V. A. Pax-5 Expression in Nonhematopoietic Tissues **Am J Clin Pathol.** v. 126, n. 5, p.798-804, 2006.

UCHIDA, J.; LEE, Y.; HASEGAWA, M.; LIANG, Y.; BRADNEY, A.; OLIVER, J. A.; BOWEN, K.; STEEBER, D. A.; HAAS, K. M.; POE, J. C.; TEDDER T. F. Mouse CD20 expression and function. **Int Immunol.** v. 16, n. 1, pp. 119-129, 2004.

VAIL, D.M.; MACEWEN, E.G.; YOUNG, K.M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: Withrow, S.J.; MacEwen, E.G. **Small animal clinical oncology.** 3rd ed. Philadelphia: Saunders Company; 2001. p.558-590.

VAIL,D.M.; YOUNG,K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW,S.J.;VAIL,D.M. **Small animal clinical oncology.** 4 ed.Missouri:Saunders,2007.p.699-784.

VALLI, V. E.; JACOBS, R. M.; PARODI, A. L.; VERNAU, W.; MOORE, P. F. **WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals.** 2 ed. Washington: Armed Forced Institute of Pathology, 2002.

VALLI, V. E. **Veterinary Comparative Hematopathology.** Iowa: Blackwell, 2007.

VALLI, V. E.; SAN MYINT, M.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZLY, F.; DURHAM, A.; EHRHART, E. J.; JOHNSON, Y.; JONES, C.; KIUPEL, M.; LABELLE, P.; LESTER, S.; MILLER, M.; MOORE, P.; MOROFF, S.; ROCCABIANCA, P.; RAMOS-VARA, J.; ROSS, A.; SCASE, T.; TVEDTEN, H.; VERNAU, W. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization Criteria. **Vet Pathol.** v.48, n.1, p. 198-211, 2011.

VALLI, V. E.; KASS, P. H.; SAN MYINT, M.; SCOTT, F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. **Vet Pathol.** v. 50, n. 5, p. 738-748, 2013.

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

WILLMANN, M.; MULLAUER, L.; GUIJA DE ARESPACOHAGA, A.; REIFINGER, M.; MOSBERGER, I.; THALHAMMER, J. G. Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B and B-cell marker. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 128, p. 359-365, 2009.

XU-MONETTE, Z. Y.; MØLLER, M. B.; TZANKOV, A.; MONTES-MORENO, S.; HU, W.; MANYAM, G. C.; KRISTENSEN, L.; FAN, L.; VISCO, C.; DYBKÆR, K.; CHIU, A.; TAM, W.; ZU, Y.; BHAGAT, G.; RICHARDS, K. L.; HSI, E. D.; CHOI, W. W. L.; HAN VAN KRIEKEN, J.; HUANG, Q.; HUH, J.; AI, W.; PONZONI, M.; FERRERI, A. J. M.; WU, L.; ZHAO, X.; BUESO-RAMOS, C. E.; WANG, S. A.; GO, R. S.; LI, Y.; WINTER, J. N.; PIRIS, M. A.; MEDEIROS, L. J.; YOUNG, K. H. MDM2 phenotypic and genotypic profiling, respective to TP53 genetic status, in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP immunochemotherapy: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program **Blood**, v. 122, n. 15, p. 2630-2640, 2013.

ZACCHETTI, A.; VAN GARDEREN, E.; TESKE, E.; NEDERBRAGT, H.; DIERENDONCK, J. H.; RUTTEMAN, G. R. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labeling by immunohistochemistry. **APMIS** v. 111 p. 430-438, 2003.

ZANINI, D. A.; KIMURA, K. C.; NISHIYA, A. T.; UBUKATA, R.; LEANDRO, R. M.; BRITO, C. P.; TROMBETTI, M.; LAGOA, A. C.; MACEDO, T. R.; RODRIGUES, L. C. S.; ROSENDO, J. A. S.; ARNDT, H. L.; DIAS, R. A.; DAGLI, M. L. Z.. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's Lymphoma **Ciênc Rural.** v. 43, n.7, p.1302-1308, 2013.

ZU Y, STEINBERG SM, CAMPO E, Validation of tissue microarray immunohistochemistry staining and interpretation in diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma.** v. 46, p. 693–701, 2005.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Normas para submissão de trabalhos à Revista **Veterinária e Zootecnia**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Campus de Botucatu.

Diretrizes para Autores

Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

Artigos de Revisão Bibliográfica

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

Relato de Caso

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

Comunicações Curtas

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

Referências e Citações

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento(5). Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias. Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

1. Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. *Vet Not.* 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. *Pesq Vet Bras.* 2008;28:597-9.

2. Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis.* 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3. Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. *Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina.* São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4. Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.* 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. *Produção de frangos de corte.* Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: *Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal;* 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. *Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação].* Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7. Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: .

Trabalho enviado à Revista **Veterinária e Zootecnia**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Campus de Botucatu.

LINFOMA CANINO: REVISÃO DE LITERATURA COM ÊNFASE NO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

Maria Claudia Lopes da Silva¹
Julio Lopes Sequeira²

RESUMO

Os linfomas não Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães, no entanto sua etiologia não está bem estabelecida e há diversos fatores que devam contribuir para seu desenvolvimento, como alterações no sistema imune, fatores ambientais e alterações genéticas. A neoplasia pode ocorrer em qualquer idade mas afeta predominantemente animais de meia idade a idosos. Anatomicamente, os linfomas caninos podem ser classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário, com cinco estágios clínicos e dois subestágios. Nos últimos anos foram utilizadas diversas classificações humanas, além de classificação proposta para os animais domésticos. A imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas mais atuais de classificação, assim como a determinação da expressão de marcadores biológicos de proliferação e apoptose. O Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL) é o subtipo mais frequente, tanto no cão quanto no homem. Os DLBCLs são neoplasias formadas por células linfoides B caracterizadas por um padrão de crescimento difuso e podem apresentar pelo menos cinco variantes que estão relacionadas com padrões distintos de comportamento biológico, inclusive nos cães. No entanto, rotineiramente, estes tumores são apenas classificados como DLBCLs sem considerar suas particularidades morfológicas, seu perfil imunistoquímico e seu índice proliferativo. Por isso, a World Health Organization (WHO) propõe que, nos trabalhos de pesquisa, estas variantes sejam investigadas detalhadamente com o intuito de identificar as diferenças que possibilitem discriminar novas entidades.

Palavras-chave: linfoma, cão, DLBCL, imunofenotipagem

¹ Mestranda no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área Patologia Animal, FMVZ- UNESP - Botucatu. Correspondência: mclsilva@fmvz.unesp.br.

² Prof. Ass. Dr. do Departamento de Clínica Veterinária, Área Patologia Animal, FMVZ, UNESP, campus Botucatu.

CANINE LYMPHOMA: LITERATURE REVIEW EMPHASIZING ON DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA

ABSTRACT

Non Hodgkin lymphomas (LNHs) are the most common hematopoietic tumors of dogs. However, its etiology is not well established and there are many probable factors that may lead to its development such as immune system aberrations, environmental elements and genetic changes. The tumor may occur at any age but it predominantly affects middle age to elderly

dogs. Canine lymphoma can be anatomically divided into multicentric, digestive, thymic, cutaneous or solitary and also into five clinical and two subclinical stages. Lately various human classifications and also one proposed for domestic animals have been used. Lymphoma immunophenotyping is incorporated into current classification systems as well as determination of biological markers for proliferation and apoptosis. Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is the most frequent subtype both in dogs and humans. DLBCLs are tumors composed of lymphoid B cell characterized by a diffuse growth pattern. DLBCLs may present at least five variants which relates to different patterns of biological behavior including in dogs. However, routinely these tumors are only classified as DLBCLs without taking into account its morphologic characteristics, immunohistochemical profile and proliferation index. On account of this the World Health Organization (WHO) proposes that on research projects those variants are thoroughly investigated in order to identify differences that enable establishment of new entities.

Key words: lymphoma, dog, DLBCL, immunophenotyping

LINFOMA CANINO: REVISIÓN DE LITERATURA CON ENFASIS EN LINFOMA DIFUSO DE CELULAS B GRANDES

RESUMEN

Los linfomas no Hodgkin (LNH) son las neoplasias hematopoyéticas más comunes en los perros, sin embargo, su etiología no está bien conocida. Existen varios factores que pueden contribuir con su desarrollo, como cambios en el sistema inmunológico, factores ambientales y alteraciones genéticas. El cáncer puede ocurrir en cualquier edad, pero se sabe que afecta principalmente a animales de mediana edad y animales más viejos. Anatómicamente, el linfoma canino se puede clasificar en multicéntrico, digestivo, tímico, cútaneo y solitario, con cinco estadios clínicos y dos subestadios. En los últimos años se han utilizado diversas clasificaciones en humano, y se han propuesto para los animales domésticos. El inmunofenotipaje de los linfomas se ha incorporado a la mayoría de los sistemas actuales de clasificación, igualmente, la determinación de marcadores biológicos de proliferación y apoptosis. Los linfomas difuso de células B grandes (DLBCL) es el subtipo más común en el perro y en el hombre. Los DLBCL son neoplasias que están formadas por células linfoides B caracterizadas por un patrón de crecimiento difuso y pueden presentar por lo menos cinco variantes que están relacionados con diferentes patrones de comportamiento biológico, incluso en perros. Sin embargo, usualmente estos tumores se clasifican sólo como DLBCL sin tener en cuenta sus características morfológicas, su perfil inmunohistoquímico y su índice de proliferación. Por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que en estos estudios, estas variantes sean investigadas a profundidad con el fin de identificar las diferencias que permiten identificar nuevas entidades.

Palabras clave: linfoma, perro, DLBCL, immunophenotyping

INTRODUÇÃO

Os linfomas não-Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães e estes têm sido propostos como modelo de ocorrência espontânea para o estudo da

etiologia e protocolos de tratamento dos LNHS humanos (1, 2, 3). Já há algum tempo a classificação morfológica dos LNHS caninos têm se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHS humanos (4, 5). No homem, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são linfomas difusos de grandes células B, o qual é também o tipo de LNH mais frequente nos cães (5, 3)

Nas classificações de LNHS humanas, principalmente a WHO, os subtipos são caracterizados por dados epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que permitem a identificação de entidades morfológicas (1, 3). Esta também tem sido a tendência para a classificação atual dos linfomas caninos, visto que cada vez mais há trabalhos que focam em alterações genéticas similares as encontradas no homem, as quais podem permitir maior acurácia na classificação e potencialmente desenvolvimento de terapia mais eficaz para determinados tipos de linfoma (6, 7, 8, 3).

Atualmente, a imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas de classificação dos linfomas caninos, assim como a determinação da expressão de marcadores biológicos como Ki-67, caspase-3 e p53 (9). A determinação do índice proliferativo, utilizando-se o Ki67, pode aumentar a acurácia da classificação dos linfomas e facilitar a diferenciação entre determinados subtipos que são morfológicamente semelhantes como o linfoma de zona marginal, utilizando-se os índices proliferativos e apoptóticos maiores apresentados pelos DLBCLs (10).

Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem maior índice de positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento (11). Este tipo de avaliação ainda é pouco comum nas neoplasias caninas, porém nos linfomas caninos empregando-se as classificações de Kiel e Working Formulation observou-se grande variação no percentual de células positivas, não sendo constatada diferença entre os linfomas de alto e baixo grau e entre os diferentes imunofenótipos (9). A determinação do percentual de células positivas para caspase-3 e a aplicação de classificações mais atuais, como as propostas para os animais domésticos (4) e para os seres humanos (12) nos linfomas caninos, mais especificamente os DLBCLs, podem auxiliar no estabelecimento de um perfil mais detalhado destas neoplasias.

Na literatura a expressão do p53 alterado no linfoma varia de 22 a 60% dos casos (13,14; 9; 15). SUEIRO et. al (2004) não detectaram correlação da expressão do p53 com imunofenótipo e grau de malignidade das neoplasias. Em estudo recente não foi constatada diferença nos níveis de expressão e frequência da mutação do gene p53 entre os grupos de animais portadores de linfomas sensíveis e resistentes à quimioterapia (16). Em outro estudo foi observado que a expressão do p53 teria impacto negativo na sobrevida total do animal, mas não influenciaria no tempo de recorrência da doença (15). Assim, na Medicina Veterinária, o papel desempenhado pelo p53 é controverso (14, 9).

O presente estudo teve como objetivo revisar as principais características do linfoma canino, considerando aspectos de etiologia, epidemiologia, diagnóstico e tratamento, com ênfase no subtipo Linfoma Difuso de Grandes Células B.

REVISÃO DE LITERATURA

Os linfomas não Hodgkin (LNHS) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães (17; 18), com incidência variando de 13 a 33 casos por 100.000 cães, o que os torna mais comuns nesta espécie do que nos homens. Quando se leva em conta apenas cães idosos a

prevalência pode chegar a 84 por 100.000, já para cães com menos de um ano cai para 1,5 por 100.000 cães (19). Existem trabalhos que apontam números ainda mais altos, como é o caso de um estudo da população de Golden retrievers na Alemanha onde se observou o valor de 116 por 100.000 cães. (20).

Ainda não está bem estabelecida uma causa para o linfoma, mas há fatores que devam contribuir para o desenvolvimento da doença. Aberrações no sistema imune foram observadas em cães com linfoma, além de aumento da ocorrência em cães com doenças auto imune. Não foi comprovado, no entanto, uma relação de causa efeito. Em humanos o risco de desenvolver câncer no sistema linforreticular é maior em pessoas com imunossupressão. Acredita-se que isso seja devido ao fato que pode ocorrer superexpressão de alguns oncogenes em linfócitos destes pacientes, o que eventualmente levaria ao desenvolvimento da neoplasia (21).

Foi teorizado ainda associação à exposição a produtos químicos, potencialmente por terem efeito imunossupressor. Outra possível causa para o linfoma seria infecção viral, sendo esta ainda não comprovada em cães, mas observada em alguns tipos de leucemia e linfoma em humanos. Em estudo realizado na cidade de São Paulo, foi observada associação positiva entre cães que residem fora da residência perto de ruas e avenidas movimentadas e aumento no risco de desenvolvimento de linfoma, sugerindo que a poluição ambiental advinda do trânsito de veículos pode estar associada com a doença (22). Além destas causas estão aumentando os estudos com relação a anormalidades cromossômicas, já tendo sido observadas alterações numéricas (20) e ainda translocações cromossômicas (23).

Alterações epigenéticas são eventos precoces durante a carcinogênese e a hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes supressores de tumor é um mecanismo bem conhecido de silenciamento gênico que contribui para o desenvolvimento e progressão tumoral. Inibidor de Via do Fator Tecidual 2 (TFPI-2) é um supressor de tumor envolvido na inibição de invasão. O silenciamento do TFPI-2 é amplamente relatado em várias malignidades humanas, mas pouco avaliado no linfoma (24).

Em 2014 Ferraresso et al investigaram a expressão do TFPI-2 no Linfoma Difuso de Grandes Células B canino comparando com linfoma normal e observaram hipermetilação em 77% das amostras tumorais. Verificaram ainda que o nível de metilação estava significativamente aumentado comparado ao controle e a análise identificou 82% dos loci com hipermetilação, com aumento médio de 2 a 120 vezes. A análise de expressão gênica confirmou diminuição da expressão do TFPI-2 nos DLBCLs comparado a linfonodo normal, sugerindo que a sua hipermetilação regula negativamente a transcrição. Foi encontrada ainda correlação positiva entre nível de metilação e idade do animal, provendo a primeira indicação de modificações epigenéticas no DLBCL associadas com a idade. No futuro este achado pode ser considerado em associação para o prognóstico e terapia (24).

Os cães exibem biologia tumoral, influência ambiental, comportamento biológico tumoral e aberrações genéticas semelhantes ao homem. A incidência de linfoma em humanos e cães é semelhante, o tipo mais comum de LNH é o mesmo em humanos e no cão – linfoma difuso de células B– e os mesmos agentes quimioterápicos são utilizados e por isso a doença na espécie canina tem sido proposta como modelo para o estudo da etiologia e de protocolos de tratamento dos LNHS humanos (1, 25, 2, 3).

Anatomicamente, os linfomas caninos podem ser classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e extranodal ou solitário. De acordo com a World Health Organization (WHO) os linfomas caninos podem ser classificados em cinco estágios clínicos e dois

subestágios os quais refletem o grau de envolvimento dos órgãos afetados e sinais clínicos apresentados pelo animal, respectivamente (26). Assim a extensão da doença pode ser descrita e a maioria dos linfomas caninos se apresenta em estágios avançados, III, IV ou V (21, 27, 28, 29). Os sinais clínicos associados são variáveis e dependem entre outros fatores da localização do tumor. (26)

Na forma multicêntrica, que é a mais comumente encontrada (30; 27; 1, 22, 29) o achado mais consistente é linfadenopatia indolor generalizada, com possível hepatoesplenomegalia e envolvimento da medula óssea. A forma mediastinal é relatada como a segunda apresentação mais comum (30). É caracterizada pelo aumento dos linfonodos mediastínicos craniais e/ou timo, e os sinais clínicos incluem dispneia, tosse, intolerância ao exercício e regurgitação (21).

Cães com a forma alimentar ou digestiva comumente apresentam sinais gastroentéricos inespecíficos como êmese, diarreia e perda de peso. Linfonodos mesentéricos, fígado e baço também podem estar envolvidos. (21). O linfoma cutâneo no cão pode ser generalizado ou multifocal e histologicamente pode ser dividido em epiteliotrópico (normalmente de origem T) e não epiteliotrópico (normalmente de origem B). Os tumores podem se apresentar na forma de nódulos, placas, úlceras, eritroderma e dermatite esfoliativa (26). A forma extranodal ou isolada é mais incomum e pode afetar qualquer tecido do corpo, sendo sítios comuns o tecido ocular e neural (31)

Os linfomas podem ser divididos ainda de acordo com sua origem em linfomas de células B e T, sendo que o T é apontado como de pior prognóstico (17) Na literatura internacional tem-se o linfoma B como o de maior ocorrência nos cães (32,1), já na literatura brasileira foi observado tanto predominância de linfomas T (27, 33), quanto de linfoma B (28). Foi levantada a hipótese que essa variação se deva ao número limitado de indivíduos avaliados, assim, um estudo mais amplo poderia eliminar uma possível variação regional em relação ao imunofenótipo da neoplasia (29).

Não há predisposição sexual para o desenvolvimento de linfoma, mas já foi observada em alguns estudos tendência de maior ocorrência em machos (31, 27; 34, 35; 33)

O linfoma pode ocorrer em qualquer idade, mas afeta predominantemente animais de meia idade a idosos. (20) Estudos relatam médias variando de 5,9 a 9,5 anos (30, 17; 36, 27; 34; 22, 29).

A predisposição racial para o desenvolvimento do linfoma na espécie canina tem sido descrita (1). Raças com risco aumentado de linfoma incluem Bouvier des Flandres, Rottweiler, Doberman, Pastor Alemão, São Bernardo, Labrador, Golden retriever, Scottish terrier, Setter e Bull Mastiff (19; 17; 34). Algumas raças de pequeno porte frequentemente acometidas pelo linfoma incluem o Poodle e o Scottish Terrier (17). Raças com menor acometimento incluem Dachshund, Poodle toy, Yorkshire terrier e Pomeranians (21; 26).

No Brasil a presença de animais sem raça definida é sempre expressiva e, portanto, isto se reflete nos resultados das casuísticas que têm sido publicadas. Dentre as raças mais observadas, a ocorrência é maior em animais de grande porte como Pastor Alemão, Boxer, Dobberman e Rottweiler (30, 27).

Foi observada uma maior probabilidade de desenvolver determinado imunofenótipo do linfoma de acordo com a raça. Os Boxers têm risco aumentado de desenvolver neoplasias T, assim como Bullmastiff e raças Sptiz e cães asiáticos de “colo”, enquanto que Border Collie, Baset Hound, Cocker Spaniel, Doberman, Pastor Alemão e provavelmente Rottweiler são afetados principalmente por neoplasias B (36; 37). Devido à ocorrência em grupos de raças que

possuem origem em comum, acredita-se que o risco aumentado de desenvolvimento de doenças linfoproliferativas de origem T pode ter surgido em algum ancestral, enquanto que o risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias B pode surgir de diferentes fatores de risco ou combinações que tiveram origem durante o processo de seleção da raça (37).

Já há algum tempo a classificação morfológica dos LNHS caninos têm se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHS humanos – classificação atualizada de Kiel, Working Formulation for Clinical Usage (WF), Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL) e mais recentemente a classificação da World Health Organization (WHO) – levando em conta caracteres epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que no homem permitem a identificação de entidades morfológicas (1).

Na Medicina Veterinária todos estes sistemas propostos foram aplicados na medida em que eram desenvolvidos (21, 4, 1). Mesmo que sem concordância entre os especialistas veterinários sobre qual seria o mais adequado, os resultados foram animadores (4). Independentemente da classificação utilizada a principal diferença identificada entre seres humanos e cães foi a predominância dos linfomas mais agressivos nesta última espécie, sendo os linfomas foliculares pouco frequentes (38). No entanto, o valor do cão como modelo da doença humana depende da possibilidade de distinção dos principais subgrupos de linfoma em ambas as espécies com uma classificação confiável dos LNHS caninos seguindo esquemas atualmente utilizados para os LNHS humano (1)

No homem, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são Linfomas Difusos de Grandes Células B (Diffuse Large B Cell Lymphoma – DLBCL), que é considerada a forma mais comum de linfoma não Hodgkin no mundo ocidental. O DLBCL está associado a um histórico agressivo, com média de sobrevida de menos de um ano em pacientes não tratados (39). Segundo os autores que utilizaram a classificação da WHO, o subtipo de LNH mais frequente nos cães é o DLBCL (5, 3).

Nas classificações mais antigas o DLBCL é correspondente aos subtipos histiocítico difuso e misto histiocítico-linfocítico difuso na Rappaport; célula de centro de folículo grande clivada e não clivada e imunoblástico B na Lukes Collins; difuso de grandes células, imunoblástico de grandes células, difuso misto de pequenas e grandes células na Working Formulation e linfoma difuso de grandes células B na REAL. (40)

A proposta da Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da World Health Organization (WHO) é baseada na classificação REAL/WHO utilizada nos linfomas humanos (4, 35). Ela tem sido utilizada por vários autores em diferentes espécies, porém sem que haja consenso na sua adequação para os LNHS caninos. Grupos importantes no estudo deste tipo de neoplasia ainda consideram que a classificação de Kiel atualizada (41) não deve ser descartada (1).

Na classificação atualizada de Kiel os subtipos correspondentes aos DLBCL são os linfomas centroblasticos monomórficos e polimórficos, os imunoblásticos B e os anaplásicos de grandes células B (41), que correspondem também ao maior percentual dos casos encontrados, mais de 50%, quando se aplica esta classificação aos linfomas caninos (1).

Os autores que utilizaram a Classificação de Kiel já demonstraram a importância dessa classificação para os linfomas caninos, sendo esta classificação utilizada ainda em trabalhos de pesquisa recentes (1). O aspecto comparativo ou a correspondência entre as duas classificações – WHO e Kiel – torna-se importante na avaliação dos Linfomas de Grandes Células B (Tabela 1),

na medida em que a classificação de Kiel serve como parâmetro para o estabelecimento do prognóstico nos cães (21).

Tabela 1. Correspondências entre as classificações da Kiel (41), WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (4) e WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (12) em relação ao DLBCL.

KIEL	WHO (2002)	WHO (2008)
Centroblásticos monomórficos e polimórficos	Linfoma de Grandes Células B (não clivadas e clivadas)	DLBCL, NOS variante centroblástica
Imunoblásticos B	Imunoblástico de Grandes Células	DLBCL, NOS variante imunoblástica
Anaplásicos de grandes células B	-	DLBCL, NOS variante anaplásica
Linfomas de células B com alta quantidade de células T	Linfoma B ricos em células T	DLBCL, NOS rico em células T/histiócitos
-	-	DLBCL, NOS variantes raras
Linfoma esclerosante de grandes células B do mediastino	Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B)	Linfoma de grandes células B mediastinal (tímico)
Linfoma angio endoteliótopico (intravascular)	Linfoma Intravascular de Grandes Células B	Linfoma Intravascular de Grandes Células B
-	-	DLBCL primário do SNC
-	-	DLBCL cutâneo primário, tipo perna
-	-	DLBCL EBV+ dos idosos
-	-	Linfoma de grandes células B ALK+
-	-	DLBCL associado à inflamação crônica
-	-	Linfoma plasmoblástico
-	-	Linfoma de efusão primária
-	-	Granulomatose linfomatosa
-	-	Linfoma de grandes células B, surgindo em doença de Castleman multicêntrica associada à HHV8.
-	-	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias

		entre DLBCL e linfoma de Burkitt.
-	-	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre DLBCL e linfoma de Hodgkin clássico.

Os DLBCLs são neoplasias de padrão de crescimento difuso formadas por células linfoides B que possuem núcleo de tamanho igual ou que excede o tamanho do núcleo de um macrófago normal ou que corresponde a mais de duas vezes o tamanho de um linfócito normal (12). A classificação da WHO propõe que os patologistas utilizem somente o termo Linfoma Difuso de Grandes Células B como diagnóstico final. Esta recomendação acompanha a proposta contida na classificação REAL (43), pois a identificação de subtipos de DLBCL seria de difícil reprodução entre os patologistas e alguns subtipos seriam ainda controversos. No entanto, a Classificação da WHO também propõe que estes subtipos sejam considerados nos trabalhos de pesquisa com o intuito de demonstrar as diferenças no comportamento biológico das diversas variantes procurando estabelecer novas entidades (12).

Segundo a Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da WHO, os DLBCLs podem apresentar pelo menos cinco variantes que estão relacionadas a comportamentos biológicos diversos - o Linfoma de Células B Rico em Células T, o Linfoma Imunoblástico de Grandes Células, o Linfoma de Grandes Células B (não clivadas e clivadas), o Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B) e o Linfoma Intravascular de Grandes Células B – descritos nas espécies domésticas, inclusive nos cães (4). Porém, estes tumores geralmente são incluídos entre os DLBCLs sem que sejam descritas em detalhe suas características morfológicas, seu perfil imunistoquímico e seu índice proliferativo.

O Linfoma de Células B Rico em Células T é caracterizado por progressão lenta, composto por uma população mista de células T pequenas clivadas e células B neoplásicas grandes, sendo que esta última população pode compor 5% ou menos do total da população celular. As lesões geralmente envolvem os linfonodos e podem aparecer como aumento de apenas um linfonodo periférico. Este subtipo tem sido comparado à lesão pulmonar conhecida como granulomatose linfomatosa em humanos (4).

O Linfoma Imunoblástico de Grandes Células exibe agressividade moderada, com arquitetura difusa composta por células grandes com núcleo redondo a oval ou clivado, mitoses frequentes, quantidade variável de citoplasma, que se cora fortemente, membrana nuclear espessa, cromatina reticular e periférica, e normalmente nucléolo único central. Macrófagos de corpos tangíveis são presentes e numerosos (4).

O Linfoma de Grandes Células B (não clivadas e clivadas) possui agressividade moderada, composto por população de células linfoides grandes relativamente uniforme, núcleo vesiculoso, cromatina reticular e dois a três nucléolos proeminentes periféricos. Macrófagos de corpos tangíveis e figuras de mitose são frequentes (4).

Um tipo raro que acomete o mediastino é o Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B), mais frequentemente observado em cães jovens de raças de grande porte. As lesões têm desenvolvimento lento e os animais normalmente apresentam êmese após alimentação aparentemente devido à compressão esofágica. As lesões são tipicamente bem encapsuladas,

exibem bandas de colágeno evidentes dando uma aparência macroscópica de timoma. Citologicamente as células tumorais são grandes, com núcleo vesicular, nucléolo proeminente, podendo ser altamente indentados e ocasionalmente muito grande e multilobulado (4).

O Linfoma Intravascular de Grandes Células B é uma doença sistêmica caracterizada pela proliferação de *clusters* de células linfoides dentro do lúmen de pequenas veias e, em menor grau, artérias do coração, pulmão e sistema nervoso central. É uma doença rara que pode ter um aparecimento repentino de síncope e morte em um animal sem nenhuma manifestação clínica (4).

De acordo com a classificação da WHO mais atualizada (2008) os subtipos correspondentes ao DLBCL são o DLBCL, sem outras especificações; o linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos; DLBCL primário do SNC; DLBCL cutâneo primário, tipo perna e DLBCL EBV positivo dos idosos (12).

As características citomorfológicas do DLBCL, sem outras especificações são diversas e podem ser divididas em variantes morfológicas comum e rara. As variantes morfológicas comuns compreendem a centroblastica, imunoblastica e anaplásica. As variantes raras podem apresentar estroma mixóide ou matriz fibrilar, alguns casos podem exibir formação de pseudorosetas, formato celular fusiforme ou mostrar características de células em anel de sinete. Grânulos citoplasmáticos, projeções de microvilos e junções intercelulares também podem ser vistos. Ele representa 25 a 30% dos LNH de adultos nos países ocidentais, sendo sua etiologia desconhecida. Normalmente se apresenta como uma neoplasia dita primária ou como progressão de outro tipo neoplásico menos agressivo como, por exemplo, linfoma folicular e linfoma de zona marginal (12).

Diante de uma suspeita de linfoma devem ser realizados exame físico completo, hemograma, bioquímico e urinálise, sendo o diagnóstico definitivo através de exame citológico ou histopatológico (26). O diagnóstico e classificação do linfoma podem ser realizado de forma simples, eficaz e com baixo custo através do exame citológico, sendo que a classificação de Kiel exibe melhor adequação por se basear em características morfológicas (42). No entanto, há algumas limitações. Devido à ausência de arquitetura tecidual não é possível observar uma desorganização da arquitetura normal ou invasão da cápsula, podendo dificultar a diferenciação entre um linfoma e uma hiperplasia reacional acentuada, a qual é caracterizada por grande número de células linfoides grandes. Ainda, linfoma de células pequenas pode exibir poucos indícios de suas características de malignidade. Além disso, classificação em baixo, moderado e alto grau, que é realizada através de características citológicas e imunofenotipagem pode ser feita com maior acurácia no exame histopatológico (26).

O diagnóstico pode também ser realizado através de técnicas moleculares tanto para o diagnóstico em si quanto para caracterizar melhor o tumor e incluem histo e citoquímica, imunoisto e imunocitoquímica; citometria de fluxo e PCR (21; 44).

Ocasionalmente pode ser difícil a diferenciação entre uma proliferação maligna e benigna, situação a qual pode ser resolvida através da avaliação da clonalidade, uma vez que a clonalidade é um marco de malignidade, ou seja, é suposto que o tumor origine-se de um único clone (26).

Atualmente, a imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas de classificação do linfoma e a técnica de imunoistoquímica é o padrão ouro para essa determinação (44). Dessa maneira, o estabelecimento da origem T ou B das células neoplásicas associado a sua morfologia permite o reconhecimento dos diferentes tipos de neoplasias linfoides (12).

Para a determinação do imunofenótipo são utilizados marcadores linfocitários como os anticorpos policlonal anti CD3 e monoclonal anti CD79 α , como marcadores pan T e pan B, respectivamente, tanto para o homem (12) quanto para os animais domésticos (4, 1, 5, 38). Entretanto, esta determinação pode ser obtida com maior acurácia ampliando-se o painel de anticorpos. Nos seres humanos, os DLBCLs normalmente expressam vários marcadores pan B, porém a expressão de um ou mais destes marcadores pode estar ausente, impedindo ou dificultando a determinação do imunofenótipo quando se utiliza apenas um marcador (45).

Para os linfomas B os mais utilizados nos linfomas humanos, além do anti CD79a, são o anti CD20 e o PAX-5 (anti- BSAP) entre outros (45). Deve-se resaltar que a pouca reação cruzada entre os anticorpos específicos humanos e caninos restringe o painel utilizado nos linfomas dos cães, tanto para o diagnóstico quanto para o estadiamento (46). Nos cães, embora o marcador pan B mais amplamente utilizado seja o anti CD79a (4, 10; 32), o anti CD20 também tem sido utilizado em menor escala com o mesmo fim (46). Mais recentemente, a expressão da PAX-5 (anti BSAP) foi empregada como marcador imunoistoquímico pan pré B e pan B em amostras de linfomas de cães incluídas em parafina (33).

O CD79 é um heterodímero sinalizador que é expresso apenas pelas células B e em vários tipos de linfoma (47). A molécula é um heterodímero covalente que contém CD79a (Ig α , mb 1) e CD79b (Ig β , B29), ambas subunidades contém um único domínio Ig extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular. O BCR (receptor de antígeno de células B) é um complexo entre CD79 e o Ig de superfície, todos estes componentes são necessários para a expressão do BCR na superfície celular. A ligação cruzada do BCR aciona o mecanismo de sinalização o que pode levar a apoptose ou na presença de sinal de resgate de células T pode levar a ativação e divisão celular, o que torna o CD79, além de marcador para linfoma B, um alvo de terapia anticâncer com anticorpos (48).

Já o CD20 é uma molécula de superfície celular específica de linfócitos B e sua ligação com anticorpo altera a progressão no ciclo celular e a diferenciação indicando que esta molécula é essencial na função dos linfócitos B. Ela é expressa em células pré B na medula óssea, principalmente após o rearranjo da cadeia pesada de Ig e sua expressão persiste até a diferenciação para plasmócitos. Os complexos multiméricos de CD20 podem formar canais de íons para condução de Ca²⁺ na membrana plasmática de células linfoides B. Pressupõe-se que o CD20 canino contenha domínios de sequências de aminoácidos consistindo de dois domínios extracelulares, quatro domínios transmembrana e três domínios intracelulares, sendo expresso por células mononucleares do sangue periférico, linfonodos e linfomas de células B, mas não em linfomas de células T ou linfomas não T - não B, assim como o CD20 humano (49).

A proteína ativadora específica de células B (BSAP) é um fator de transcrição de 52kD originalmente identificado como homólogo da proteína ativadora tecidual específica do ouriço do mar. A BSAP é codificada pelo gene PAX-5, um membro altamente conservado da família de genes de fatores de transcrição “paired Box” (PAX). Dentre as células hematopoiéticas a expressão do gene PAX5 é restrita a linhagem de células B. A transcrição do gene do PAX5 é iniciada em células pró B e é abundante nos estágios de maturação pré B e células B madura, mas é ausente em plasmócitos diferenciados. O PAX5 é um fator de transcrição essencial ao comprometimento da célula com a linhagem de linfócitos B, induzindo a expressão de vários genes e ao mesmo tempo reprimindo vias alternativas de diferenciação hematopoiética, o que torna possível a sua utilização como um marcador pan B (50)

A importância da detecção destes antígenos não reside somente na determinação do imunofenótipo. O CD20 tem sido utilizado amplamente como alvo de procedimentos terapêuticos nos linfomas B humanos que empregam anticorpos monoclonais como o Rituximab, que é um anticorpo quimérico monoclonal IgG1 anti CD20 humano produzido por engenharia genética em camundongo. Acredita-se que o Rituximab aja sobre as células do linfoma induzindo a lise celular mediada por complemento, a citotoxicidade celular dependente de anticorpo e a indução direta de apoptose, atuando simultaneamente com a quimioterapia (39; 51).

O uso de anticorpos monoclonais anti - CD20 para o tratamento de linfomas B aumentou significativamente a sobrevivência dos pacientes, porém há pacientes refratários à terapia ou os que apresentam recorrência da doença (52). Linhagens celulares de linfoma B submetidas a tratamento *in vitro* por anticorpos anti CD20 mostraram que células de maior expressão de CD20 são mais sensíveis ao tratamento (53).

Especial atenção deve ser dada a dose utilizada para o tratamento, uma vez que com o uso de doses altas da droga os mecanismos efetores necessários para a atividade do medicamento podem ser saturados comprometendo a eficácia da terapia. Sob essas condições uma reação chamada trogocitose predomina. Ela consiste na remoção do complexo CD20 – anticorpo monoclonal das células alvo por células efectoras que expressam receptores Fc γ permitindo que estas células malignas escapem sem danos e promovam a progressão do tumor (51).

Em cães ainda não está bem estabelecido o uso e eficácia deste tipo de drogas, mas existem estudos promissores que apontam uma maior efetividade do tratamento quando associada quimioterapia tradicional a imunoterapia (2).

Assim sendo, a determinação do perfil imunofenotípico dos linfomas não só torna o diagnóstico mais acurado, mas também abre novas perspectivas para se estabelecer protocolos de tratamento mais específicos.

Nos estudos sobre neoplasias, inclusive linfomas, pode-se observar a necessidade de avaliar além do imunofenótipo, o índice de proliferação celular e a taxa de apoptose das células neoplásicas (54). Quando se trata especificamente dos linfomas, além do imunofenótipo, há a necessidade de se estabelecer os índices proliferativos, já que estes podem aumentar a acurácia da classificação deste tipo de neoplasia. No que diz respeito aos DLBCLs, pode-se reduzir a dificuldade na diferenciação entre estes e determinados subtipos morfológicamente similares, como o linfoma de zona marginal, utilizando-se os índices proliferativos e apoptóticos maiores apresentados pelos DLBCLs (10). Além disso, a correlação positiva entre o índice proliferativo, a morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade já foi constatada (55).

Um estudo recente verificou que há uma variação significativa do tempo de sobrevivência de cães com diferentes índices mitóticos. Em cães apresentando tumores com índices mitóticos menores que 20 mitoses por campo de grande aumento (400 X) e maiores que 21 mitoses por campo de grande aumento foi observada sobrevivência média de 188 e 31 dias respectivamente (35).

O marcador mais confiável para este tipo de avaliação da proliferação celular é o antígeno Ki-67 (MIB-1). Este antígeno é uma proteína de 345 kD que é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto nas células em G0 e que pode ser detectada utilizando-se métodos imunistoquímicos (56).

Como foi mencionado anteriormente, outro índice relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é o índice apoptótico, pois o crescimento tumoral não é determinado somente pela porcentagem de células em proliferação e pelo tempo do ciclo celular (57). Um dos métodos empregados para este tipo de avaliação é a detecção imunistoquímica da expressão da

caspase-3 (9). Estas enzimas estão presentes no citoplasma da maioria das células, na forma inativa como uma cadeia única de polipeptídeos e são ativadas quando esta cadeia é quebrada. A expressão de caspase-3 é utilizada em muitos distúrbios hematopoiéticos na espécie humana, inclusive nas leucemias e nos linfomas. Os linfomas de alto grau de malignidade apresentam uma expressão maior de caspase-3 que aqueles de baixo grau (58). Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem maior índice de positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento (11).

Este tipo de avaliação ainda é pouco comum nas neoplasias caninas, porém nos linfomas caninos empregando-se as classificações de Kiel e Working Formulation observou-se grande variação no percentual de células positivas, não sendo constatada diferença entre os linfomas de alto e baixo grau e entre os diferentes imunofenótipo (9). Nos seres humanos esta variação na expressão de caspase-3 nos DLBCLs já foi observada (58). Deve-se ainda ressaltar, no entanto, que entre os DLBCLs humanos, já foi constatado que os tumores de alto grau apresentam índices apoptóticos maiores que os linfomas de baixo grau de malignidade (11, 58). A determinação do percentual de células positivas para caspase-3 e a aplicação de classificações mais atuais, como as propostas para os animais domésticos (4) e para os seres humanos (12) nos linfomas caninos, mais especificamente os DLBCLs, podem auxiliar no estabelecimento de um perfil mais detalhado destas neoplasias.

Outro marcador imunistoquímico relacionado com a apoptose é a expressão da proteína p53 mutante nas células neoplásicas. As mutações neste gene são as lesões gênicas mais frequentes nas neoplasias da espécie humana, sendo um importante indicador da resposta terapêutica dos LNHS humanos (59). A expressão do p53 alterado é superior a 30% nos linfomas de alto grau de malignidade de origem B (13). De acordo com SUEIRO et. al (2004) nos LNHS caninos cerca de 60% dos casos são positivos para a expressão do p53, porém, não foi detectada a correlação deste achado com os imunofenótipos e os graus de malignidade das neoplasias (14; 9). Outros estudos sugerem que essa taxa de positividade pode ser menor, chegando a até 22% dos LNH, sendo que a expressão do p53 teria impacto negativo na sobrevida total do animal, mas não influenciaria no tempo de recorrência da doença (15). Por outro lado, existe relato sobre número maior de células p53+ em linfomas T do que em linfomas B caninos (59). Em estudo recente não foi constatada diferença dos níveis de expressão e da frequência da mutação do gene p53 entre os grupos de animais portadores de linfomas sensíveis e resistentes à quimioterapia (16).

Assim, na Medicina Veterinária, o papel desempenhado pelo p53 nas diferentes neoplasias é controverso, sendo ainda escassos os estudos que apresentam este tipo de abordagem. Quando se trata dos linfomas caninos as diferentes classificações utilizadas e a comparação entre grandes grupos que consideram apenas os imunofenótipos, sem considerar muitas vezes os subtipos de LNHS, podem explicar, pelo menos parcialmente, a discrepância dos resultados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O linfoma não-Hodgkins (LNH) é atualmente uma das neoplasias que mais acomete os cães, levando a significativa diminuição na longevidade e qualidade de vida dos animais afetados. É frequente também no homem e devido às semelhanças no comportamento biológico tumoral, influência ambiental, aberrações genéticas, incidência, tipo mais frequente e também

tratamento, a doença no cão é utilizada como modelo de ocorrência espontânea para o estudo da etiologia e protocolos de tratamento dos LNHS humanos. Ela é uma doença heterogênea, uma vez que cada subtipo é uma entidade única, o que pode demandar diferentes abordagens. Assim, são necessários estudos que permitam diagnósticos mais precoces e acurados possibilitando terapias mais eficazes e conseqüentemente melhor prognóstico.

APOIO E FINANCIAMENTO

FAPESP - 2013/02253-3.

BIBLIOGRAFIA

1. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C 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. *Vet Pathol.* 2010;47:414.
2. Comazzi S, Guscetti F, Marconato L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013 *Hematol Oncol.* 2013;32(2):68-71.
3. Ito D, Frantza AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for humannon-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;159(3-4):192-201.
4. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF. WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals. 2 ed. Washington: Armed Forced Institute of Pathology; 2002.
5. Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzly F, et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol.* 2011;48(1):198-211.
6. Frantz AM, Sarver AL, Ito D, Phang TL, Karimpour-Fard A, Scott MC, et al. Molecular Profiling Reveals Prognostically Significant Subtypes of Canine Lymphoma. *Vet Pathol.* 2012;50(4):693-703.
7. Mudaliar MAV, Haggart RD, Miele G, Sellar G, Tan KA, Goodlad JR, et al. Comparative Gene Expression Profiling Identifies Common Molecular Signatures of NF-kB Activation in Canine and Human Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL). *PLOS ONE.* 2013;8(9):1-17.
8. Richards KL, Motsinger-Reif AA, Chen H, Fedoriw Y, Fan C, Nielsen DM, et al. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and post-germinal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. *Cancer Res.* 2013;73(16):5029–5039.

9. Suzano SMC. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do P53 nos linfomas caninos. [Tese] Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista ; 2007.
10. Valli VE. *Veterinary Comparative Hematopathology*. Iowa: Blackwell; 2007.
11. Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphoma. *Cancer Res*. 1999;59(20):5386-5391.
12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4 ed. Lyon: IARC Press; 2008.
13. Inamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84:2412-1421.
14. Sueiro FAR, Alessi AC, Vassallo J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunexpression. *J Comp Pathol*. 2004;131:207-213.
16. Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. *J Vet Med Sci*. 2010;72(9):1165-1172.
15. Dhaliwal RS, Kitchell BE, Ehrhart EJ, Valli VE, Dervisis NG. Clinicopathologic Significance of Histologic Grade, Pgp, and P53 Expression in Canine Lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2013;49(3):175-85.
17. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J. Small Anim Pract*. 2001;42(8):377-384.
18. Rutley M, Macdonald, V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. *Can Vet J*. 2007;48(9):977-979.
19. Vail DM, Macewen EG, Young KM. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW SJ, MACEWEN EG. *Small animal clinical oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Company; 2001. p.558-590.
20. Boerkamp KM, Teske E, Boon LR, Grinwis GCM, van den Bossche L, Rutteman GR. Estimated incidence rate and distribution of tumours in 4,653 cases of archival submissions derived from the Dutch golden retriever population. *BMC Vet Res*. 2014;10(34):1-10.
21. TESKE E. Canine malignant lymphoma: A review and comparison with human non hodgkin's lymphoma. *Vet Q*. 1994;16(4):209-219.

22. Zanini DA, Kimura KC, Nishiya AT, Ubukata R, Leandro RM, Brito CP, et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's Lymphoma *Ciênc Rural*. 2013;43(7):1302-1308.
23. Rütgen BC, Willenbrock S, Reimann-Berg N, Walter I, Fuchs- Baumgartinger A, Wagner S, et al. Authentication of Primordial Characteristics of the CLBL- 1 Cell Line Prove the Integrity of a Canine B-Cell Lymphoma in a Murine In Vivo Model. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e40078. doi:10.1371/journal.pone.0040078.
24. Ferrareso S, Bresolin S, Arico A, Comazzi S, Gelain ME, Riondato F, et al. Epigenetic Silencing of TFPI-2 in Canine Diffuse Large BCell Lymphoma *PLOS ONE*. 2014;9(4):1-10.
25. Rowell JL, Mccarthy DO, Alvarez CE. Dog Models of Naturally Occurring Cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(7):380–388.
26. Vail DM, Young KM. Hematopoietic tumors. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical oncology*. 4 ed. Missouri:Saunders; 2007. p.699-784.
27. Moreno K, Bracarense APFRL. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2007;44:46-52.
28. Cápua MLB, Coleta FED, Canesin APMN, Godoy AV, Calazans SG, Miotto MR, et al. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. *Ciênc Rural*. 2011;41(7):1245-1251.
29. Neuwald EB, Teixeira LV, Conrado FO, Silva MOD, Hlavac NRC, González FHD. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2014;34(4):349-54.
30. Sequeira JL, Franco M, Bandarra EP, Figueiredo LMA, Rocha NS. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 1999;51(3):245-249.
31. Figuera RA, Souza TM, Rodrigues A, Barros CSL. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. *MEDVEP – Cientif Med Vet Pequenos Anim Estim*. 2006;4(12):139-146.
32. Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol*. 2010;8(1):38-49.
33. Fernandes TR. Classificação morfológica e imunoistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de linfomas não-hodgkin em cães conforme os critérios da Histological Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals (WHO) [Dissertação] Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2014.

34. Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, et al. Genetic and Environmental Risk Indicators in Canine Non-Hodgkin's Lymphomas: Breed Associations and Geographic Distribution of 608 Cases Diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med.* 2009;23:301–310.
35. Valli VE, Kass P H, San Myint M, Scott F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol.* 2013;50(5):738-748.
36. Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, et al. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res.* 2005;65(13):5654–5661.
37. Dobson JM. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Vet Sci* 2013; 2013:941275 doi:10.1155/2013/941275.
38. Bienzle D, Vernau W. The diagnostic assessment of canine lymphoma: implications for treatment. *Clin Lab Med.* 2011;31(1):21-39.
39. Flowers R, Sinha R, Vose JM. Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA: Cancer J Clin.* 2010;60:393–408.
40. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. (Eds.) *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* IARC Press:Lyon 2001, p. 171-174.
41. Lennert K, Feller AC. *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 2 ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
42. Suzano SMC, Sequeira JL, Rocha NS, Pessoa AWP. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010;47(1):47-54.
43. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology.* 2000;36:69–86.
44. Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE, Suter SE. Lymphoma Immunophenotype of Dogs Determined by Immunohistochemistry, Flow Cytometry, and Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements. *J Vet Intern Med.* 2013;27(6):1509–1516.
45. O'mahony OH, Riley A. CD20-negative follicular lymphoma. *Diagn Histopathol.* 2012;18(10):457-460.

46. Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol* 2013;31(1):1-9.
47. Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, Czuczman MS. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol Invest*. 2006;35(1):93-114.
48. Polson AG, Yu S, Elkins K, Zheng B, Clark S, Ingle GS, et al. Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2007;110(2):616-623.
49. Kano R, Inoiue C, Okano H, Yamazaki J, Takahashi T, Watari T, et al. Canine CD20 gene. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108:265–268.
50. Torlakovic E, Slipicevic A, Robinson C, Decoteau JF, Alfsen GC, Vyberg M, et al. Pax-5 Expression in Nonhematopoietic Tissues *Am J Clin Pathol*. 2006;126(5):798-804.
51. Taylor RP, Lindorfer MA. Analyses of CD20 Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Cell Killing Mechanisms: Rational Design of Dosing Strategies. *Mol Pharmacol*. 2014;86(5):485-491.
52. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393–4402.
53. Franke A, Niederfellner GJ, Klein C, Burtscher H. Antibodies against CD20 or B-cell receptor induce similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. *PLoS One*. 2011;18(2):e16596. doi: 10.1371/journal.pone.0016596.
54. Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol*. 1999;36:292-300.
55. Suzano SMC, Sequeira JL, Pessoa AWP, Porto CD, Oliveira DE. Proliferação celular nos linfomas caninos. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45:313-319.
56. Zacchetti A, Van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labeling by immunohistochemistry. *APMIS* 2003;111:430-438.
57. Phillips BB, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest*. 2000;12(2):111-117.

58. Dukers DF, Oudejans JJ, Vos W, Berge RL, Meijer CJLM. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. *J Pathol.* 2002;196:307-315.

59. Sokolowska J, Cywinska A, Malicka E. p53 Expression in Canine Lymphoma. *J Vet Med.* 2005;52:172-175.