

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Avaliação de Ki67, BAX, Caspase-3 e VEGF em linfomas felinos**

**NATALIA CAMARGO FARALDO**

**JULHO  
2024**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Avaliação de Ki67, BAX, Caspase-3 e VEGF em linfomas felinos**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

**JULHO  
2024**

F219a Faraldo, Natalia Camargo  
Avaliação de Ki67, BAX, Caspase-3 e VEGF em  
linfomas felinos / Natalia Camargo Faraldo. --  
Botucatu, 2024  
38 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia, Botucatu  
Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

1. Imunoistoquímica. 2. Linfoma em Gatos. 3.  
Marcadores Moleculares. 4. Prognóstico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

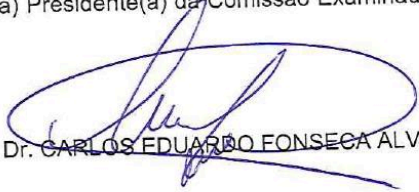
Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATALIA CAMARGO FARALDO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CÂMPUS DE BOTUCATU

Aos 03 dias do mês de julho do ano de 2024, às 09:30 horas, no(a) Sala 4 da Central de Aulas do H.V., realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de NATALIA CAMARGO FARALDO intitulada 'Avaliação de Ki67, BAX, Caspase-3 e VEGF em

linfomas plúmo

.....'. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) DCVRA / FMVZ - UNESP, Profa. Dra. RENEE LAUFER AMORIM (Participação Presencial) do(a) DCV / FMVZ UNESP, Prof. Dr. RODRIGO DOS SANTOS HORTA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UFMG. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Apro-  
vido. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho de mestrado aos meus irmãos, Ana Laura e Nicolas, para que seja uma inspiração na busca constante por mais conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Nelmara Camargo e Roberto Carlos Faraldo, por todo o apoio e por todos os esforços para assegurar minha formação e realização dos meus sonhos. Agradeço também aos meus avós, Jovina, Antônio, Nair e Nelson, por ensinarem aos seus filhos a importância da educação e do trabalho árduo.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Eduardo Fonseca Alves, por ter me aceito como aluna e por juntar forças comigo para realizar este projeto. Além disso, sou grata por ele ser a maior inspiração para minha vida acadêmica desde a graduação. Espero um dia alcançar o nível onde ele está!

Agradeço à Universidade Estadual Paulista (UNESP), bem como à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) de Botucatu e seus professores, por todo o apoio e ensinamentos prestados durante os 24 meses do mestrado. Especialmente à Professora Dra Renée Laufer Amorim, por me ensinar as minúcias da imunistoquímica.

Agradeço aos pós-graduandos, que além de colegas tornaram-se amigos e professores: Zara Alves Lacerda, Luis Guilherme Dercore Benevenuto, Fernanda Barthelson Carvalho de Moura, Derick Santana Alves e Alana Lucena Oliveira.

Agradeço aos meus demais familiares, ao meu companheiro, Felipe Almeida Fernandes, aos meus amigos, e aos meus gatos, por todo o apoio emocional, paciência e amor dedicados a mim durante a execução deste estudo.

Por fim, agradeço aos seres superiores que me guiam, me guardam e me protegem. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"O conhecimento é a asa do espírito que nos  
leva aos céus." - William Shakespeare

## RESUMO

O linfoma é uma das neoplasias mais frequentes em gatos, tendo uma forte associação entre a infecção pelo vírus da leucemia viral felina (FeLV). Poucos estudos foram previamente realizados para identificar fatores prognósticos nesses pacientes. As técnicas de imunohistoquímica e biologia molecular podem fornecer informações valiosas sobre o prognóstico de uma doença e oferecer possibilidades terapêuticas personalizadas. Este estudo teve por objetivo investigar o papel prognóstico de alguns marcadores de proliferação celular, apoptose e neovascularização em gatos acometidos por linfoma. Para isso, foram selecionados 48 casos de linfomas felinos. Foram obtidas informações epidemiológicas dos pacientes assim como a classificação do linfoma por meio do exame histopatológico associado à técnica de imunohistoquímica para Ki67, BAX, Caspase-3 e VEGF. Dentre os 48 gatos avaliados, 83% (40/48) eram animais sem raça definida e três eram siameses. O linfoma mais frequente foi o linfoma gastrointestinal (30/48), seguido do multicêntrico (11/48), extranodal (6/48) e mediastinal (1/48). A média de idade foi de 10 ( $\pm$  10) anos. Em relação aos marcadores imunohistoquímicos, não houve relação da expressão de Ki67 ( $p=0.803$ ) e VEGF ( $p=0.1709$ ) com a sobrevida. Em contrapartida, houve uma maior sobrevida nos gatos com maior expressão de BAX ( $p=0.0073$ ). Os dados indicam que a alta expressão de BAX pode apresentar valor prognóstico em pacientes felinos com linfoma.

**Palavras-chave:** Imunohistoquímica; Linfoma em Gatos; Marcadores Moleculares; Prognóstico.



## **ABSTRACT**

Lymphoma is one of the most common neoplasms in cats, and there is a strong association with feline leukemia virus (FeLV) infection. Few studies have identified prognostic factors in these patients. Immunohistochemistry and molecular biology can provide valuable information about disease prognosis and offer personalized therapeutic options. This study investigated the prognostic role of certain cell proliferation markers, apoptosis, and neovascularization in cats affected with lymphoma. 48 feline lymphoma cases were selected for the research. Epidemiological information was obtained from the patients. Histopathology and immunohistochemical analysis were conducted to classify the lymphomas. The markers used in the immunohistochemistry were Ki67, BAX, Caspase-3, and VEGF. Among the 48 cats evaluated, 83% (40/48) were mixed-breed animals and three were Siamese. The most frequent lymphomas type were alimentary lymphoma (30/48), followed by multicentric lymphoma (11/48), extranodal lymphoma (6/48) and mediastinal lymphoma (1/48). The average age was 10 years. Regarding the immunohistochemical markers, there was no correlation between the expression of Ki67 and VEGF with survival ( $p=0.803$ ;  $p=0.1709$ ). Conversely, there was a longer survival in cats with higher expression of BAX ( $p=0.0073$ ). Data indicate that the expression of BAX may have prognostic value in feline patients with lymphoma.

Keywords: Immunohistochemistry; Cat Lymphoma; Molecular Markers; Prognosis.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Linfoma Felino.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Marcadores Prognósticos.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Ki-67.....	18
2.2.2 BAX.....	18
2.2.3 Caspase-3.....	19
2.2.4 VEGF.....	20
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1Objetivos Específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>25</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Origem das Amostras.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Critério de Inclusão.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Histologia e Imuno-histoquímica.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Análise dos Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

Os felinos domésticos desempenham um papel importante na sociedade, ocupando quase 20% das casas brasileiras (GONÇALVES et al., 2019). Dentre as diversas enfermidades que acometem os felinos, a infecção causada pelo vírus da leucemia felina (FeLV) apresenta grande importância no território nacional (BIEZEUS et al., 2023). O FeLV é considerado um retrovírus que induz diferentes alterações sistêmicas, acometendo o sistema circulatório, e afetando órgãos linfóides e hematopoiéticos (ALMEIDA et al., 2019). Os vírus são encontrados nas secreções (sangue, saliva, lágrimas, etc.) de felinos infectados (ALVES et al., 2015). O primeiro relato foi realizado por William Jarrett e colaboradores no ano de 1964, quando analisaram resquícios virais nos linfoblastos de um felino com linfoma (JARRETT et al., 1964).

Os países desenvolvidos estão testemunhando uma era "pós-vacinação" da FeLV, caracterizada pela significativa redução de casos de gatos positivos para o vírus e consequentes mudanças no panorama da doença. Entre as transformações mais notáveis, destaca-se uma modificação do perfil da doença, em relação ao tipo e localização da neoplasia (VAN DER STEEN e TESKE, 2023). Nos gatos positivos para FeLV, os linfomas geralmente se manifestam de forma multicêntrica, mediastinal e extranodal (neural, ocular, cutâneo, entre outros). Por outro lado, nos gatos negativos para FeLV, os linfomas gastrointestinais são os mais prevalentes (COLLET e KHOUBYARIAN, 2016). O início dos anos 2000 foi considerado um marco de transição, quando houve uma queda brusca dos casos de FeLV em países desenvolvidos, sendo denominado o período "post-feline leukemia vírus era"

(LOUWERENS et al., 2005).

No entanto, a realidade brasileira é diferente. O linfoma felino em gatos FeLV positivos ainda ocorre com frequência, mas sem dados fidedignos na literatura nacional. Os dados disponíveis são relatos de casos isolados ou textos acadêmicos (dissertações e teses) não publicados em meios de comunicação científicos e indexados (FUSCO et al, 2023). Uma pesquisa nacional avaliou 56 linfomas felinos no Brasil e conseguiu extrair DNA de 29 blocos de parafina dos respectivos linfomas. Dos 29 casos, 24 foram positivos para FeLV. Ou seja, 82,7% da população do estudo era composta por gatos com linfoma associado à FeLV. Isso demonstra a importância desse grupo de tumores para a população felina brasileira (SILVA et al., 2022).

Os fatores prognósticos nos linfomas felinos incluem a localização anatômica, o estágio da doença no momento do diagnóstico, a presença ou ausência de infecção por FeLV e FIV, e a resposta inicial ao tratamento (FUSCO et al, 2023). Ainda não existem marcadores prognósticos para o linfoma felino. Segundo Riley esses marcadores poderiam ser usados para avaliar e quantificar, e prever a sobrevida de um paciente com neoplasia (RILEY et al., 2009). Logo, este estudo teve por objetivo avaliar o valor prognóstico dos marcadores Ki-67, BAX, Caspase-3 e VEGF em gatos com linfoma.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Linfoma Felino**

O linfoma é considerado uma neoplasia maligna originada dos linfócitos (DALECK e DI NARDI, 2016). É o tipo de tumor que mais acomete os felinos, correspondendo a 90% dos casos de neoplasias hematopoiéticas e 30% dos cânceres nesses animais (SILVA, 2019). Em 2016, presumia-se uma incidência de 200 novos casos de linfoma para cada 100 mil gatos, sendo os animais adultos e idosos os mais acometidos. Dentre as raças felinas, as raças orientais e siameses apresentam maior prevalência de linfomas (DALECK e DI NARDI, 2016).

A etiologia dos linfomas está ligada a mutações secundárias a fatores ambientais e infecções adquiridas, que podem ativar proto-oncogenes ou inativar genes supressores de tumores, induzindo à atipia nos linfócitos. Além disso, o estado de imunossupressão pode ser uma das principais causas para a carcinogênese nos linfomas sendo induzido por doenças infecciosas, como a leucemia viral felina (FeLV) e a imunodeficiência felina (FIV) (DALECK e DI NARDI, 2016). A infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) está particularmente associada ao desenvolvimento de linfomas em gatos. Este retrovírus insere seu DNA no genoma do hospedeiro, causando mutações que podem levar à transformação neoplásica das células infectadas. Esta integração viral frequentemente resulta na ativação de oncogenes ou na inativação de genes supressores de tumor, contribuindo para a alta incidência de linfomas, especialmente linfomas T e mediastinais, em gatos positivos para FeLV (CLARK et al, 2023). Além disso, o contato com fumaça de tabaco, inflamações crônicas e dietas desequilibradas também são fatores de risco (SILVA, 2019).

Atualmente, a classificação mais utilizada para linfomas em felinos segue as diretrizes impostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de tumores de tecidos hematopoéticos e linfóides. Esta classificação categoriza os linfomas de acordo com a clínica, a morfologia, imunofenótipo e genética molecular (CAMPO et al, 2017). Os linfomas podem ser classificados de acordo com sua localização como multicêntrico, mediastinal, alimentar, cutâneo e extranodal (nasal, renal, cardíaco, em sistema nervoso, entre outros) (DALECK e DI NARDI, 2016). Os linfomas multicêntricos nos felinos comumente surgem no baço, fígado, linfonodos mesentéricos e periféricos, é comum nos gatos, podendo afetar também a medula

óssea (SILVA, 2019). As formas mediastinais acometem o timo e os linfonodos do mediastino, e são essas que têm maior envolvimento com a FeLV em felinos jovens.

O linfoma alimentar é frequente nos gatos, geralmente idosos e sem FeLV, apresentando-se em qualquer parte do intestino, geralmente na porção do intestino delgado. Nas formas extranodais dos linfomas, frequentemente o rim é afetado, podendo atingir o sistema nervoso central em momentos de depressão do sistema imunológico; o FeLV está presente em pelo menos metade dos casos desse tipo de linfoma (SILVA, 2019). A apresentação cutânea também acomete animais com idade avançada e FeLV-negativos, subdividindo-se em duas categorias: na epiderme e na derme (DALECK e DI NARDI, 2016). O linfoma nasal ou respiratório também acomete felinos idosos e negativos para FeLV, caracterizando-se, em particular, pelo imunofenótipo de linfócitos B (SILVA, 2019). A FeLV aumenta em 60 vezes as chances do aparecimento de linfomas, a FIV aumenta 5 vezes, e a concomitância desses vírus aumenta 77 vezes as chances (NOGUEIRA et al., 2020). Há duas faixas etárias com maior incidência de linfoma em gatos. A primeira ocorre por volta dos dois anos de idade, e a segunda entre os dez e doze anos (NELSON e COUTO, 2015). Linfomas de baixo grau geralmente ocorrem em felinos idosos, enquanto os de alto grau são mais comuns em felinos jovens. Os linfomas de alto grau também são frequentes em gatos positivos para FeLV, ao passo que os de baixo grau são mais comuns em animais negativos (SILVA et al., 2022). A linfa dissemina os linfomas pelo organismo, permitindo que essa neoplasia se instale em diversos locais. Por isso, um diagnóstico abrangente é essencial tanto para determinar o tipo de linfoma quanto sua localização. O local de surgimento do linfoma é crucial para estabelecer o protocolo clínico e o prognóstico (LITTLE, 2015).

Animais em estágios iniciais podem não apresentar sinais clínicos e quando presentes podem ser inespecíficos (DALECK e DI NARDI, 2016). Contudo, um dos primeiros sinais é a linfadenomegalia, geralmente nos mandibulares, pré-escapulares e axilares, que podem progredir para uma forma generalizada, aumentando em média 10 vezes o seu tamanho original, sem apresentar dor e com movimentação livre. Desconforto, dor, apatia, febre, anorexia e acúmulo de líquidos cavitários são sintomas inespecíficos que comumente surgem nos pacientes com linfoma (NELSON e COUTO, 2015). Durante a palpação abdominal, observa-se

alças abdominais mais espessas, aumento dos linfonodos mesentéricos e, às vezes, uma massa focal (NOGUEIRA et al., 2020). A forma mediastinal, principalmente a tímica, pode causar efusão pleural, dificuldade respiratória e regurgitação. O linfoma gastrointestinal se manifesta com diarreia, êmese, perda de peso e anorexia. A forma renal leva à falência dos rins, polidipsia, poliúria e incontinência urinária. Quando o linfoma afeta o sistema nervoso, pode resultar em ataxia, alterações comportamentais, paraparesia ou tetraparesia, anisocoria e fraqueza muscular (ALVES et al., 2015).

Recomenda-se para o diagnóstico a realização de citologia e histologia para identificação do linfoma. Além desses procedimentos, são indicados hemograma, exames bioquímicos, mielograma, radiografias, ultrassonografias e sorologia para FeLV e FIV em felinos (DALECK e DI NARDI, 2016). Os exames hematológicos revelam infiltração medular por células cancerígenas, alterações na função esplênica devido à infiltração neoplásica, e imunossupressão que, em casos raros, pode resultar em trombocitopenia e anemia hemolítica imune. Essas anomalias podem ser causadas pela síntese de substâncias neoplásicas, como interleucinas, fatores de crescimento e hematopoiéticos, ou pela falha dos órgãos afetados pelo tumor (NELSON e COUTO, 2015). O comprometimento da medula óssea é a principal consequência do linfoma analisada pelos exames hematológicos, resultando na diminuição da hematopoiese. Outra ocorrência comum é a anemia, geralmente não regenerativa, persistente e crônica. Além disso, pode haver leucocitose por neutrofilia (DALECK e DI NARDI, 2016). Exames de imagem são imprescindíveis no diagnóstico e avaliação dos linfomas. Cerca de 90% dos casos de linfoma apresentam alterações na ultrassonografia abdominal. Além dessas alterações, o exame ultrassonográfico pode revelar espessamento das alças intestinais, aumento dos linfonodos e até a presença de uma massa localizada. A técnica de imuno-histoquímica investiga a expressão de proteínas nos tecidos, utilizando marcadores como CD3 (para identificação de células T) e CD20 e CD79a (para células B) (SILVA, 2019). Após a realização destes exames, procede-se o estadiamento, unindo as informações diagnósticas e os parâmetros físicos (Quadro 1) (LITTLE, 2015).

#### **Quadro 1.** Estadiamento de linfoma felino

ESTÁDIO	ALTERAÇÕES NOS PACIENTES
I	Tumor solitário (extranodal) ou área anatômica localizada (linfonodos). Inclui tumores intratorácicos primários
II	Tumor solitário (extranodal) com envolvimento de linfonodos regionais; Dois ou mais linfonodos do mesmo lado do diafragma; Dois tumores extranodais com ou sem envolvimento de linfonodos regionais no mesmo lado do diafragma; Tumor gastrointestinal primário cirurgicamente retirável, geralmente na área ileocecal, com ou sem envolvimento apenas de linfonodos mesentéricos associados
III	Dois tumores extranodais em lado opostos do diafragma; Dois ou mais linfonodos craniais e caudais ao diafragma; Todos os tumores primários intra-abdominais não retirados cirurgicamente; Todos os tumores epidurais ou paraespinhais, independente do da presença de outro(s) tumor(es)
IV	Estágios 1 a 3 com envolvimento hepático e/ou esplênico
V	Estágios 1 a 4 com envolvimento inicial do sistema nervoso central ou medula óssea

Fonte: COSTA et al., (2017)

Predominantemente, os linfomas são tratados com quimioterapia, uma vez que são neoplasias sistêmicas com múltiplos focos no organismo. Contudo, se o linfoma se apresentar na forma de uma massa única ou delimitada, podem ser consideradas cirurgias, radioterapia, ou outras terapias específicas. O uso de múltiplos agentes quimioterápicos tem mostrado eficácia em aumentar a sobrevivência de alguns pacientes, especialmente aqueles com linfoma mediastinal, multicêntrico ou gastrointestinal. Duas abordagens comuns são COP (ciclofosfamida, vincristina e prednisona) e CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona). Durante o tratamento, é essencial que o paciente seja acompanhado semanalmente, com realização de exame físico e hemograma (NELSON & COUTO, 2015).



Gatos diagnosticados com linfoma apresentam uma sobrevida média de aproximadamente oito meses, sendo este um dado geral que pode variar conforme o tipo e a localização específica do linfoma (FUSCO et al, 2023). O prognóstico varia significativamente entre os diferentes tipos de linfoma felino. Por exemplo, o linfoma gastrointestinal tende a ter um prognóstico relativamente melhor devido à possibilidade de tratamentos eficazes e à detecção precoce (VAN DER STEEN e TESKE, 2023). Em contraste, o linfoma mediastinal, que afeta a região torácica, muitas vezes apresenta um prognóstico menos favorável, dada a proximidade com órgãos vitais e a complexidade no tratamento (CLARK et al, 2023). Fatores como a resposta ao tratamento inicial, a extensão da doença, a saúde geral do gato e a adesão ao suporte médico durante o tratamento também desempenham papéis críticos na determinação da sobrevida e na qualidade de vida dos felinos diagnosticados com linfoma (LITTLE, 2015). Animais que alcançam remissão completa geralmente apresentam uma sobrevida maior em comparação aos que alcançam apenas remissão parcial. A resposta ao tratamento e o tempo de remissão são essenciais para o prognóstico. Por exemplo, gatos com linfoma nasal demonstram maior sobrevida em comparação aos casos de linfoma renal (DALECK e DE NARDI, 2016). Além disso, a presença simultânea de linfoma e FeLV (Vírus da Leucemia Felina) geralmente resulta em um prognóstico pior (LITTLE, 2015).

## **2.2 Marcadores Prognósticos**

Marcadores prognósticos são indicadores biológicos mensuráveis que fornecem informações essenciais sobre a provável evolução de uma doença (DUFFY e CROWN, 2019). A detecção precisa de indicadores moleculares prognósticos desempenha um papel crucial ao simplificar a escolha lógica de alvos terapêuticos promissores durante o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra o câncer. Além disso, possibilita uma estratificação de risco consistente e replicável, desempenhando um papel essencial nos ensaios clínicos (SMITH et al., 2011).

Os avanços clínicos e tecnológicos estão contribuindo para diagnósticos precoces e ampliando as opções de tratamento, o que resulta em taxas mais altas de sobrevivência e melhor qualidade de vida. Marcadores moleculares são uma área de contribuição promissora, pois a avaliação deles pode auxiliar na

determinação do prognóstico e oferecer oportunidades terapêuticas específicas. Técnicas como imunistoquímica e biologia molecular permitem a avaliação da expressão de proteínas, alterações na expressão dessas podem ser um indicador forte do potencial maligno de uma lesão. Metástases, recidiva, intervalo livre de doença e sobrevivência global são os principais parâmetros avaliados em estudos prognósticos (GOUVEIA, 2022).

#### **2.4.1 Ki-67**

O anticorpo Ki-67, que atua como indicador do aumento na atividade de divisão celular, está exclusivamente localizado no núcleo das células em processo de crescimento e divisão. Sua presença é identificada em todas as etapas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), exceto na fase de repouso (G0) (GOUVEIA, 2022). A elevada expressão de Ki-67 indica um maior índice de proliferação em células tumorais, sugerindo um potencial localmente invasivo. Portanto, este marcador destaca-se como um dos indicadores mais eficazes na avaliação da agressividade biológica dos tumores. Em linfomas, uma alta taxa de proliferação geralmente indica um comportamento mais agressivo do tumor. Assim, a avaliação do Ki67 pode fornecer informações cruciais sobre a rapidez com que as células cancerígenas estão se dividindo, auxiliando na previsão do prognóstico (GADBAIL et al., 2021).

Winkel (2016) concluiu em sua tese de doutorado que o Ki-67 se revelou uma abordagem mais eficiente na avaliação do índice proliferativo em gatos com linfoma gastrointestinal, quando comparado ao índice mitótico. Uma expressão mais elevada de Ki-67 foi identificada nos animais afetados pela forma linfoblástica ou de células B, associando-se a uma resposta terapêutica reduzida e a um tempo de sobrevida mais curto.

#### **2.4.2 BAX**

O gene BAX faz parte da família BCL-2, que são reguladores da apoptose, assim como a proteína que ele codifica (proteína BAX). A função principal da proteína BAX inclui a indução da permeabilização da membrana mitocondrial, um passo crítico na via intrínseca de apoptose (YOULE & STRASSER, 2008).

O gene BCL2, originalmente associado a malignidades de células B, desempenha um papel crucial na codificação da proteína Bcl-2. Essa proteína multifacetada, encontrada em uma variedade de tecidos normais e tumores, exerce

sua influência reguladora sobre a via intrínseca de apoptose mediada pelas mitocôndrias (DAGHER et al., 2019). A presença proeminente da proteína Bcl-2 é detectada em um amplo espectro de linfomas. Em muitos casos, essa observação está associada a uma translocação cromossômica específica que une o locus da cadeia pesada de imunoglobulina do cromossomo 14 com o locus 18 de outro cromossomo, resultando em uma sobre-expressão acentuada dessa proteína. Além de sua localização na membrana mitocondrial externa, Bcl-2 exerce um efeito notável como inibidor do processo de apoptose. A proeminência de Bcl-2 é observada em linfócitos maduros não proliferativos, tanto em regiões de células T quanto de células B, encontrados no baço, linfonodos e amígdalas. Adicionalmente, a presença de Bcl-2 é também identificada em células T sobreviventes na medula tímica e em pequenos linfócitos maduros localizados nos folículos primários dos tecidos linfáticos (HENRICH et al., 2019).

No contexto dos linfomas, a expressão e atividade do gene BAX representam indicadores cruciais para a avaliação da resposta apoptótica das células linfomatosas, desempenhando um papel fundamental na compreensão da progressão da doença e na determinação da eficácia do tratamento. Estudos abordam a análise da expressão do biomarcador BAX em linfomas tanto em seres humanos quanto em animais. Investigações por meio de análises imunoistoquímicas e moleculares têm sido conduzidas com o intuito de estabelecer a correlação entre a expressão de BAX, a taxa de proliferação celular, a capacidade invasiva e a resposta terapêutica em casos de linfomas (SMITH et al., 2009).

### **2.4.3 Caspase- 3**

A caspase-3, uma enzima da família das caspases, desempenha um papel multifacetado na regulação da apoptose e na resposta a diferentes tipos de estresse celular. Além de sua função clássica na indução da morte celular programada, a caspase-3 também está envolvida na manutenção da integridade genômica, na supressão do desenvolvimento tumoral e na modulação de vias de sinalização intracelular. Sua influência abrangente nas respostas celulares a estímulos variados a torna uma peça fundamental na homeostase e na integridade do organismo. A análise da atividade da caspase-3 oferece informações sobre a eficácia do processo de apoptose em células cancerosas. Quando a atividade da caspase-3 é reduzida,

as células podem evitar a morte celular programada, o que contribui para a progressão do linfoma (HO et al., 2008).

O estudo de Cepelová et al (2014) buscou determinar se a presença de caspase-3 ativa nas células neoplásicas de Hodgkin e Reed-Sternberg de humanos correlaciona-se com a resposta e o prognóstico do tratamento. Analisando 56 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, a detecção de caspase-3 ativa por imunohistoquímica revelou que 29,3% tiveram melhor remissão, contrastando com aqueles com menos de 5%, onde ocorreram recidivas e falecimentos. Onze pacientes (19,6%) obtiveram resposta ao tratamento, sugerindo uma associação entre caspase-3 e resultados clínicos favoráveis.

#### **2.4.4 VEGF**

O *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) é uma proteína que atua na modulação da angiogênese, sendo central no processo de formação de novos vasos sanguíneos. Sua influência é destacada no desenvolvimento embrionário, na cicatrização de feridas e em processos neoplásicos. Elevados níveis de VEGF estão associados a uma maior vascularização tumoral, indicando um potencial para crescimento e disseminação mais agressivos. Portanto, a avaliação do VEGF pode oferecer informações sobre o estado angiogênico do linfoma e suas implicações prognósticas (SHIBUYA, 2011).

Em um estudo com 37 cães com linfoma, níveis plasmáticos de VEGF e TGF- $\beta$  foram avaliados, junto com MMP-2 e MMP-9. Cães linfomatosos exibiram elevação de act-MMP-9 e VEGF, especialmente em linfomas de células T e estágio V. Durante a quimioterapia, act-MMP-9 e VEGF diminuíram em linfomas de células B, sugerindo um possível papel preditivo (ARESU et al., 2014).

### **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os linfomas provenientes de felinos domésticos (*Felis catus*) do Brasil e investigar o papel prognóstico de alguns marcadores nos linfomas de gatos.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos do projeto foram:

1. Analisar amostras de linfomas de gatos domésticos quanto ao tamanho nuclear (se linfocítico ou linfoblástico).
2. Avaliar dados das amostras de linfoma provenientes de gatos.
3. Avaliar a expressão imunistoquímica de Ki67, BAX, Caspase-3 e VEGF em linfomas felinos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. M.; SOUSA FILHO, R. P.; RODRIGUES, I. L.; CRUZ, R. O.; RODRIGUES, A.P. R.; SILVA, I. N. G. Linfoma leucemizado em felino coinfectado com os vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.71, n.1, p.219-224, 2019.
- ALVES, M. C. R.; CONTI, L. M. C; ANDRADE JUNIOR, P. S. C.; DANATELE, D. M. Leucemia viral felina: revisão. **PubVet**, Maringá, v. 9, n.2, p. 86-100, fev., 2015.
- ARESU, L.; ARICO, A.; COMAZZI, S.; GELAIN, M. E.; RIONDATO, F.; MORTARINO, M.; MORELLO, E.; STEFANELLO, D.; CASTAGNARO, M. VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma. **Vet. Comp. Oncol.** 12(1):29-36, 2014
- BIEZEUS, G.; CRISTO, T. G.; CASA, M. S.; LOVATEL, M.; VAVASSORI, M.; TEIXEIRA, M. B. S.; MILETTI, L. C.; COSTA, U. M.; CASAGRANDE, R. A. Progressive and regressive infection with feline leukemia virus (FeLV) in cats in southern Brazil: Prevalence, risk factors associated, clinical and hematologic alterations. **Preventive Veterinary Medicine**, Volume 216, 2023.
- CAMPO, M. S. et al. Classificação da Organização Mundial da Saúde de Tumores de Tecidos Hematopoéticos e Linfoides. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**, 2017.
- CEPELOVA, M.; KAMARADOVA, K.; KABICKOVA, E.; STARY, J.; CUMLIVSKA, E.; KODET, R.; GAJDOS, P. Expression of the active caspase-3 in children and adolescents with classical Hodgkin lymphoma. **Cesk Patol.** 2014; 50(1):40-4
- CLARK, Felicia; MURPHY, Brian; RUSSELL, Karen; DAVIS, Debbie. Clinicopathological findings of FeLV-positive cats at a secondary referral center in Florida, USA (2008–2019). **PLOS ONE**, 2023.
- COLLET, M. G.; KHOOBYARIAN, N. Gastrointestinal lymphoma in FeLV-negative cats: A comparative study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 6, p. 453-459, 2016.
- DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. Oncologia em cães e gatos. 2 ed. Rio de Janeiro: **Rocca**, p 930-948, 2016.
- DAGHER, E.; ABADIE, J.; LOUSSOUARN, D.; FANUEL, D.; CAMPONE, M.; NGUYEN, F. Bcl-2 expression and prognostic significance in feline invasive mammary carcinomas: a retrospective observational study. **BMC Veterinary Research** (2019) 15:25
- DUFFY, M. J.; CROWN, J. Biomarkers for Predicting Response to Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients. **Clinical Chemistry.** 65:10, 1228-1238 (2019)
- FUSCO, Giovanna; MARATI, Luisa; PUGLIESE, Annamaria; LEVANTE, Martina; FERRARA, Gianmarco; DE CARLO, Esterina; AMOROSO, Maria Grazia; MONTAGNARO, Serena. Prevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats from southern Italy: a 10-year cross-sectional study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2023.

GADBAIL, A. R.; SARODE, S. C.; CHAUDHARY, M. S.; GONDIVKAR, S. M.; TAKADE, S. A.; YUWANATI, M.; PATIL, S. Ki67 Labelling Index predicts clinical outcome and survival in oral squamous cell carcinoma. **J Appl Oral Sci.** 1/10, 2021; 29:e20200751.

GONÇALVES, R. J.; VOLKWEIS, F. S. Vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina. **Artigo de conclusão de curso pelo Centro Universitário do Planalto Central (Uniceplac)**, 2019.

GOUVEIA, G. P. F. Avaliação da Expressão Imunohistoquímica de EGFR e Ki-67 no Carcinoma de Células Escamosas Oral em Gato. **Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa**, 2022.

HENRICH, M.; BAUKNECHT, A.; HECHT, W.; REINACHER, M. Lack of Bcl-2 expression in feline follicular lymphomas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2019, Vol. 31(6)809-817

HO, L. H.; READ, S. H.; DORSTYH, L.; LAMBRUSCO, L.; KUMAR, S. Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. **Oncogene**. 2008 Feb;27(51):7114-22.

LITTLE, S. E. O gato: medicina interna. **Rocca**, Rio de Janeiro, ed.1, p.1116-1120, 2015.

LOUWERENS M.; LONDON, C.A.; PEDERSEN, N.C.; LYONS, L.A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. **J Vet Intern Med.** 2005 May-Jun;19(3):329-35. doi: 10.1892/0891-6640 (2005)19[329:flitpl] [2.0.co](https://doi.org/10.1892/0891-6640 (2005)19[329:flitpl] 2.0.co);2. PMID: 15954547

JARRETT, W. F. H. et al. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). **Nature**, v. 202, p. 567–569, 1964.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina interna de pequenos animais. **Elsevier Editora Ltda**, ed.5, p.3257-3388, 2015.

NOGUEIRA, M. M.; MELO, M. M. Linfoma alimentar linfócito felino – uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.14, n.3, p.1, Set, 2020.

RILEY, R.D.; SAUERBREI, W.; ALTMAN, D.G. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. **Br J Cancer**. 2009 Apr 21;100(8):1219-29.

SHIBUYA, M. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. **Genes & Cancer**, 2(12), 1097-1105.

SILVA, D. H. L. Classificação imunofenotípica do linfoma de gatos domésticos e sua correlação com o vírus da leucemia felina. **Dissertação de Mestrado da Escola de Veterinária da UFMG**, 2019.

SILVA, D.H.L.; ECCO R.; PIEREZAN, F.; CASSALI, G.D.; REIS J.K.P.; GONÇALVES, A.B.B.; BICALHO, J.M.; DELARMELINA, E.; LEME, F.O.P. Classification of lymphoma in cats and its relationship with detection of feline leukemia virus proviral DNA. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 42:07021, 2022. Departamento de Clínica e Cirurgia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

SMITH, A.; WISEMAN, D. H.; LIAO, Z.; BELL, A. K.; HASSERJIAN, R. P.; WOOD, B. L. Expression of Bax in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Prognostic Significance and Relationship with Tumor Microvessel Density and the Apoptosis Index. **Clinical Cancer Research**. 15(4): 1278-87, 2009.

SMITH, R. A.; TUDOR-SMITH, C.; NEOPTOLEMOS, J. P.; GHANEH, P. Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer. **British Journal of Cancer** (2011), 104, 1440-1451

VAN DER STEEN, F. E. M. M.; TESKE, E. Feline Lymphoma: Patient Characteristics and Response Outcome of the COP-Protocol in Cats with Malignant Lymphoma in The Netherlands. **Animals**, v. 13, n. 16, p. 2667, 2023.

YOULE, R. J., & STRASSER, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 9(1), 47-59.

WINKEL, V. M.; LUCAS, S. R. R. Estudo das expressões de marcadores imunoistoquímicos do sistema imune em felinos com linfoma gastrointestinal. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2016.



# Capítulo 2

Artigo Científico a ser submetido para o Periódico: *Plos One*  
Fator de Impacto: 3.752

## **Avaliação do valor prognóstico do Ki67, BAX, Caspase-3 e VEGF em pacientes com linfoma felino**

Natalia Camargo Faraldo<sup>1</sup>, Andresa da Fontoura Souza Rosenfeld<sup>2</sup>, Renée Laufer-Amorim<sup>3</sup>, Renata Afonso Sobral<sup>4</sup>, Carlos Eduardo Fonseca-Alves<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, Brazil.

<sup>2</sup> Médica Veterinária Autônoma, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Veterinary Clinic, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, Brazil.

<sup>4</sup>Clinical, Surgical and Palliative Care Oncology, Onco Cane Veterinary, São Paulo 04084-002, Brazil.

## Abstract

Lymphoma is one of the most common neoplasms in cats, and there is a strong association with feline leukemia virus (FeLV) infection. Few studies have identified prognostic factors in these patients. Immunohistochemistry and molecular biology can provide valuable information about disease prognosis and offer personalized therapeutic options. This study investigated the prognostic role of certain cell proliferation markers, apoptosis, and neovascularization in cats affected with lymphoma. 48 feline lymphoma cases were selected for the research. Epidemiological information was obtained from the patients. Histopathology and immunohistochemical analysis were conducted to classify the lymphomas. The markers used in the immunohistochemistry were Ki67, BAX, Caspase-3, and VEGF. Among the 48 cats evaluated, 83% (40/48) were mixed-breed animals and three were Siamese. The most frequent lymphomas type were alimentary lymphoma (30/48), followed by multicentric lymphoma (11/48), extranodal lymphoma (6/48) and mediastinal lymphoma (1/48). The average age was 10 years. Regarding the immunohistochemical markers, there was no correlation between the expression of Ki67 and VEGF with survival ( $p=0.803$ ;  $p=0.1709$ ). Conversely, there was a longer survival in cats with higher expression of BAX ( $p=0.0073$ ). Data indicate that the expression of BAX may have prognostic value in feline patients with lymphoma.

Keywords: Immunohistochemistry; Cat Lymphoma; Molecular Markers; Prognosis.

## 1. Introdução

Os felinos domésticos desempenham um papel importante na sociedade, ocupando quase 20% das casas brasileiras (GONÇALVES et al., 2019). Dentre as diversas enfermidades que acometem os felinos, a infecção causada pelo vírus da leucemia felina (FeLV) apresenta grande importância no território nacional (BIEZEUS et al., 2023). O FeLV é considerado um retrovírus que induz diferentes alterações sistêmicas, acometendo o sistema circulatório, e afetando órgãos linfóides e hematopoiéticos (ALMEIDA et al., 2019). Os vírus são encontrados nas secreções (sangue, saliva, lágrimas, etc.) de felinos infectados (ALVES et al., 2015). O primeiro relato foi realizado por William Jarrett e colaboradores no ano de 1964, quando analisaram resquícios virais nos linfoblastos de um felino com linfoma (JARRETT et al., 1964).

Os países desenvolvidos estão testemunhando uma era "pós-vacinação" da FeLV, caracterizada pela significativa redução de casos de gatos positivos para o vírus e consequentes mudanças no panorama da doença. Entre as transformações mais notáveis, destaca-se uma modificação do perfil da doença, em relação ao tipo

e localização da neoplasia (VAN DER STEEN e TESKE, 2023). Nos gatos positivos para FeLV, os linfomas geralmente se manifestam de forma multicêntrica, mediastinal e extranodal (neural, ocular, cutâneo, entre outros). Por outro lado, nos gatos negativos para FeLV, os linfomas gastrointestinais são os mais prevalentes (COLLET e KHOUBYARIAN, 2016). O início dos anos 2000 foi considerado um marco de transição, quando houve uma queda brusca dos casos de FeLV em países desenvolvidos, sendo denominado o período “post-feline leukemia vírus era” (LOUWERENS et al., 2005).

No entanto, a realidade brasileira é diferente. O linfoma felino em gatos FeLV positivos ainda ocorre com frequência, mas sem dados fidedignos na literatura nacional. Os dados disponíveis são relatos de casos isolados ou textos acadêmicos (dissertações e teses) não publicados em meios de comunicação científicos e indexados (FUSCO et al, 2023). Uma pesquisa nacional avaliou 56 linfomas felinos no Brasil e conseguiu extrair DNA de 29 blocos de parafina dos respectivos linfomas. Dos 29 casos, 24 foram positivos para FeLV. Ou seja, 82,7% da população do estudo era composta por gatos com linfoma associado à FeLV. Isso demonstra a importância desse grupo de tumores para a população felina brasileira (SILVA et al., 2022).

Os fatores prognósticos nos linfomas felinos incluem a localização anatômica, o estágio da doença no momento do diagnóstico, a presença ou ausência de infecção por FeLV e FIV, e a resposta inicial ao tratamento (FUSCO et al, 2023). Ainda não existem marcadores prognósticos para o linfoma felino. Segundo Riley esses marcadores poderiam ser usados para avaliar e quantificar, e prever a sobrevida de um paciente com neoplasia (RILEY et al., 2009). Logo, este estudo teve por objetivo avaliar o valor prognóstico dos marcadores Ki-67, BAX, Caspase-3 e VEGF em gatos com linfoma.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Origem das amostras**

Inicialmente, uma análise de amostragem populacional utilizando o programa computacional específico (G-power®, Brunsbüttel, Germany) foi realizada com os seguintes critérios: taxa de erro tipo I ( $\alpha$ ) = 0,05 e taxa de erro tipo II ( $\beta$ ) = 0,2, com um poder estatístico de 80%. A partir dessas análises, foram selecionados 48 casos de felinos com linfoma para obtenção de blocos de parafina. Os blocos de parafina

foram provenientes de animais portadores de linfoma felino tratados ou não com quimioterapia. Foram obtidos dados epidemiológicos dos pacientes, como idade e sexo.

## **2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão**

Foram incluídos na presente pesquisa felinos de qualquer idade e sexo. O principal critério de inclusão foi a realização prévia de biópsia e a disponibilidade do bloco de parafina com tecido suficiente para a realização da técnica de imuno-histoquímica. Somente felinos que realizaram estadiamento clínico (TNM) foram incluídos nesta pesquisa. As informações clínicas foram retiradas dos prontuários dos pacientes. Os pacientes dos quais não foi possível obter informações sobre tratamento e sobrevida foram excluídos da pesquisa. A sobrevida foi calculada com base no tempo entre o diagnóstico do linfoma até o momento do óbito do paciente.

## **2.3 Histologia e Imunoistoquímica**

Para a análise histológica, as amostras em blocos de parafina foram cortadas em secções de 4µm, colocadas em lâminas histológicas lapidadas e coradas com a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). A avaliação da imunomarcção dos anticorpos foi determinada por microscopia óptica como expressão positiva ou negativa nas células, no citoplasma ou na imunomarcção nuclear. As amostras foram seccionadas de blocos de parafina, em espessura de 4µm e colocadas em lâminas carregadas positivamente (Starfrost, Knittel, Bielefeld, Alemanha). Para a recuperação dos antígenos, as lâminas foram incubadas em uma solução de pH elevado (EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH 50x - Dako) em uma panela de pressão (Pascal, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 45 minutos. A peroxidase endógena foi inibida com o uso de peróxido de hidrogênio diluído a 8% em álcool metílico por 15 minutos, seguido de tratamento com leite desnatado a 8% à temperatura ambiente. As amostras foram então incubadas overnight a 4°C com anticorpos Ki-67 (1:100), Caspase-3 (1:1000), BAX (1:1500) e VEGF (1:100), seguindo protocolos padronizados de diluição para tecidos felinos. Um sistema de detecção de polímero foi aplicado como anticorpo secundário por uma hora, e as células imunorreativas foram visualizadas através da detecção colorimétrica

(3,30-diaminobenzidina) seguindo protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu.

A reação imunoistoquímica das amostras foi classificada de forma semiquantitativa. Para o Ki-67, foram tiradas três microfotografias com aumento de 40x e as células cuja reação foi positiva foram contadas, calculando-se a média de células positivas entre as três áreas. Por fim, as amostras foram separadas conforme a quantidade de células positivas em: nenhuma (0 células com reação positiva), poucas (1-50 células com reação positiva), intermediárias (51-100 células com reação positiva) e muitas (mais de 101 células com reação positiva), (BUSSOLATI e GUGLIOTTA, 2009). Os demais marcadores (BAX, VEGF e Caspase-3) foram segregados apenas quanto à intensidade: nenhuma (0), poucas (1), intermediárias (2) e muitas (3).

#### **2.4 Análise dos resultados**

Os dados foram tabulados em uma planilha do Excel e avaliados quanto à frequência e distribuição. Para a análise estatística, foi realizado um teste de normalidade que identificou uma distribuição não paramétrica dos dados. A análise de sobrevivência foi conduzida por meio da curva de Kaplan-Meier. Para realização da curva de Kaplan-Meier a mediana de expressão dos marcadores foi realizada e os animais subdivididos em amostras com expressão alta e baixa, considerando alta quando o escore dos marcadores foi 2 e 3 (intermediário e muitas marcações positivas) e baixa quando o escore foi 0 e 1 (nenhuma ou pouca marcação positiva). O teste Fisher foi realizado para verificar a associação do escore imunoistoquímico semiquantitativo com as variáveis clínicas e patológicas numa matriz de correlação. A estatística foi realizada no programa computacional GraphPad Prism 8.0, e o valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

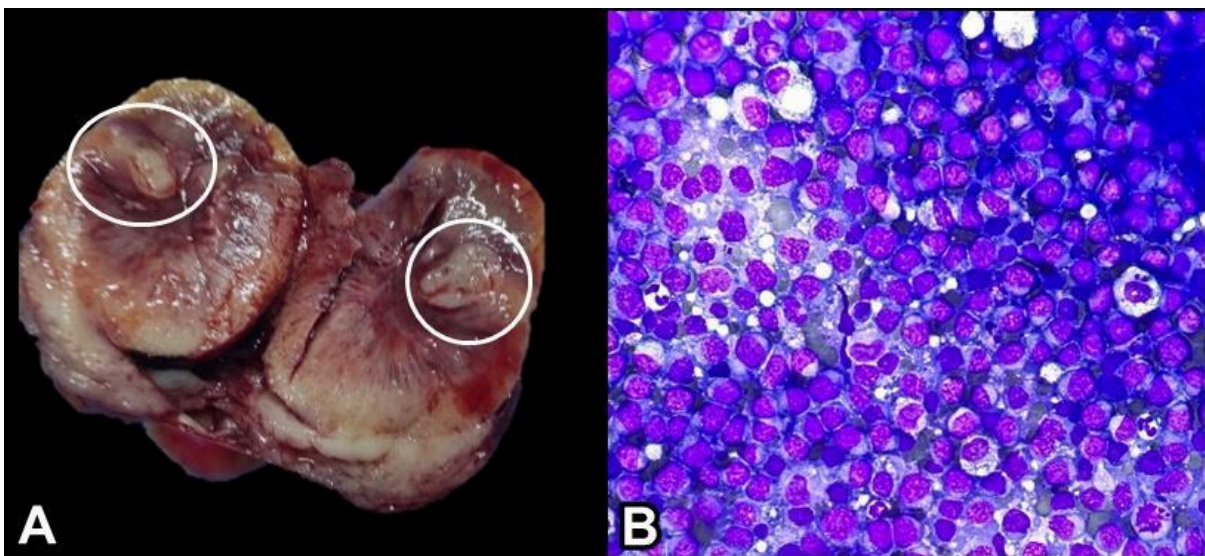
### **3. Resultados**

Foram selecionados blocos de 48 animais, e em 40/48 dos casos tratava-se de gatos sem raça definida; nos outros casos, eram três siameses e cinco sem informações disponíveis. A relação macho-fêmea foi equivalente, com 22 machos e 22 fêmeas, além de quatro animais dos quais não obtivemos informações sobre o sexo. A média de idade dos pacientes foi de dez anos, porém nove animais não

tiveram suas idades divulgadas. A maioria dos felinos era adulta ou idosa (a partir dos dois anos), somando 38 gatos, sobrando apenas um paciente filhote (até dois anos).

Quanto aos linfomas, a localização predominante foi no trato alimentar, com 30 pacientes, seguida por 11 multicêntricos, seis extranodais, e, por fim, um paciente apresentou linfoma na forma mediastinal. Com relação ao tratamento, obtivemos informações de 41 gatos, dos quais 19 fizeram quimioterapia e 22 não fizeram. Os protocolos mais empregados foram COP (ciclofosfamida, vincristina e prednisona), CHOP (L-asparaginase, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina e prednisona), clorambucila associada a prednisona ou apenas o uso de corticoides. A média da sobrevida global desses pacientes foi de 4 ( $\pm$  5) meses. Não foi possível mensurar a sobrevida de sete animais.

FIGURA 1 - Exemplo de Linfoma Renal



(A) Rim retirado do paciente, demonstrando os locais do surgimento da massa do linfoma (círculos brancos). (B) Fotomicrografia da lâmina de citologia do paciente com linfoma renal.

Dentre os 48 casos selecionados, encontramos 20 gatos com informações sobre infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV), dos quais 17 eram negativos para FeLV e três positivos, os demais casos não tinham informações sobre status de FELV. Quanto à localização anatômica, os felinos positivos para FeLV apresentaram linfoma alimentar.

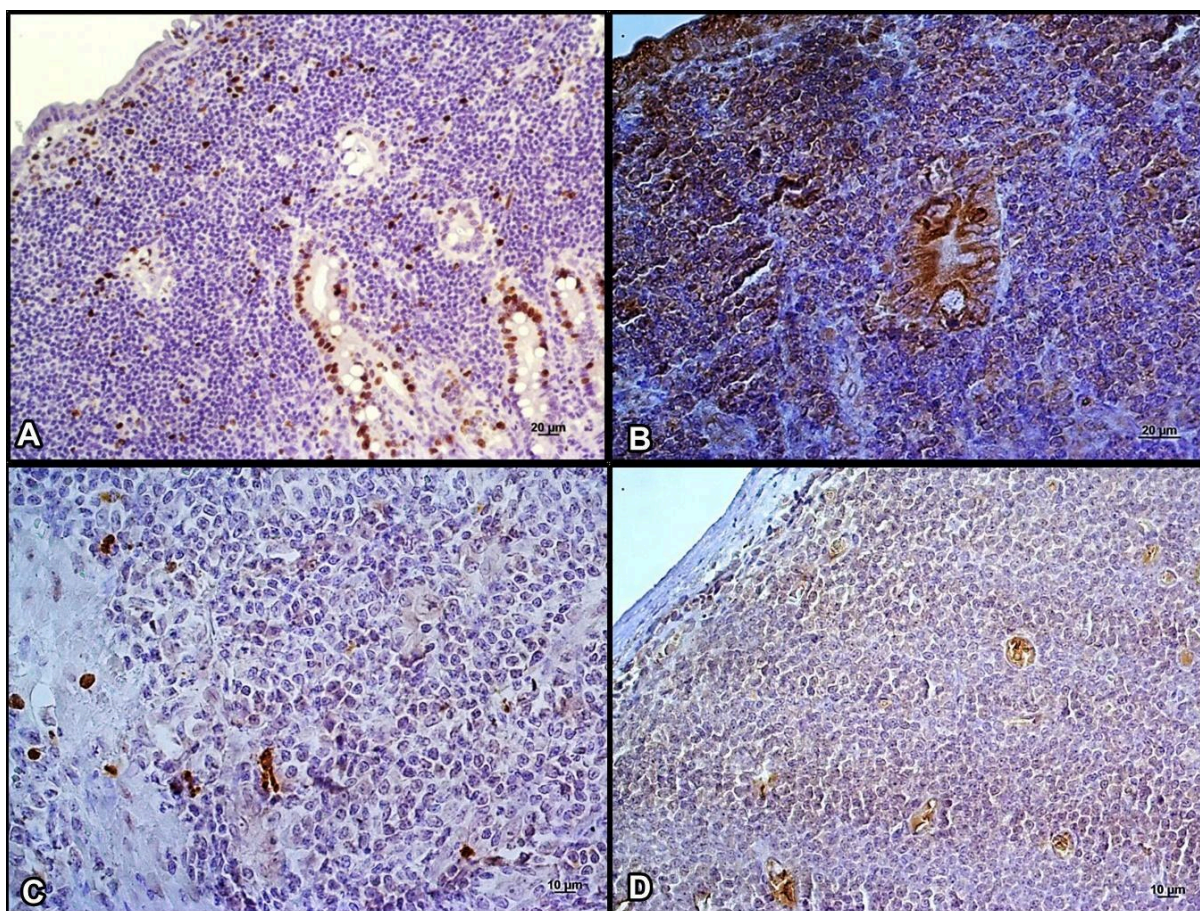
Foram analisados, através de histologia, os blocos de parafina de linfomas felinos, usando a técnica de HE. Na avaliação microscópica, os casos de linfoma foram separados conforme o tamanho do núcleo em relação às hemácias, dividindo-se em 26 linfomas linfocíticos e 23 linfoblásticos, cujas localizações não diferiam entre os dois tipos, estando equivalentemente distribuídos. A TABELA 1 reuniu a distribuição dos linfomas e outros dados obtidos durante a pesquisa.

TABELA 1 - Número de casos de linfomas por variáveis

<b>Localização Anatômica</b>	<b>Alimentar</b>	<b>Multicentrica</b>	<b>Mediastinal</b>	<b>Extranodal</b>
Linfocítica	17	7	1	1
Linfoblástica	13	4	0	5
Macho	11	6	1	4
Fêmea	15	5	0	2
Filhotes (até 1 ano)	1	0	0	0
Adultos (2-10 anos)	14	6	1	1
Idosos (11+ anos)	9	3	0	4
Sem Quimioterapia	7	10	1	4
COP	5	0	0	1
CHOP	2	0	0	0
Corticóide	1	0	0	0
Clorambucila + corticoide	9	1	0	0
Sobrevida até 60 dias	11	10	1	4
Sobrevida até 120 dias	6	0	0	0
Sobrevida +240 dias	7	1	0	1

Procedeu-se a padronização imunoistoquímica (FIGURA 2) e a posterior reação com todas as amostras. O KI67 teve marcações espalhadas por todo o campo de visão, predominantemente nas criptas intestinais da camada mucosa da amostra. O marcador BAX teve forte marcação na região mucosa próxima às microvilosidades e diminuindo sua intensidade ao aproximar-se do final da camada mucosa. A Caspase-3 teve algumas células esparsas no meio da camada mucosa, enquanto o VEGF obteve marcação prevalente na mucosa, próximo das criptas intestinais, podendo-se visualizar pequenos vasos em formação. Foi compilado na TABELA 2 a quantidade de marcações positivas de acordo com o escore.

FIGURA 2 - Padronizações Imunoistoquímicas



Padronização das reações de imunoistoquímica, (A) Ki67, (B) BAX, (C) Caspase 3 e (D) VEGF.

TABELA 2 - Reações positivas por marcador

Marcações	Nenhuma	Pouca	Intermediária	Alta
Ki67	1	26	16	6
VEGF	4	19	19	6
BAX	2	16	23	7
CASPASE 3	6	11	20	11

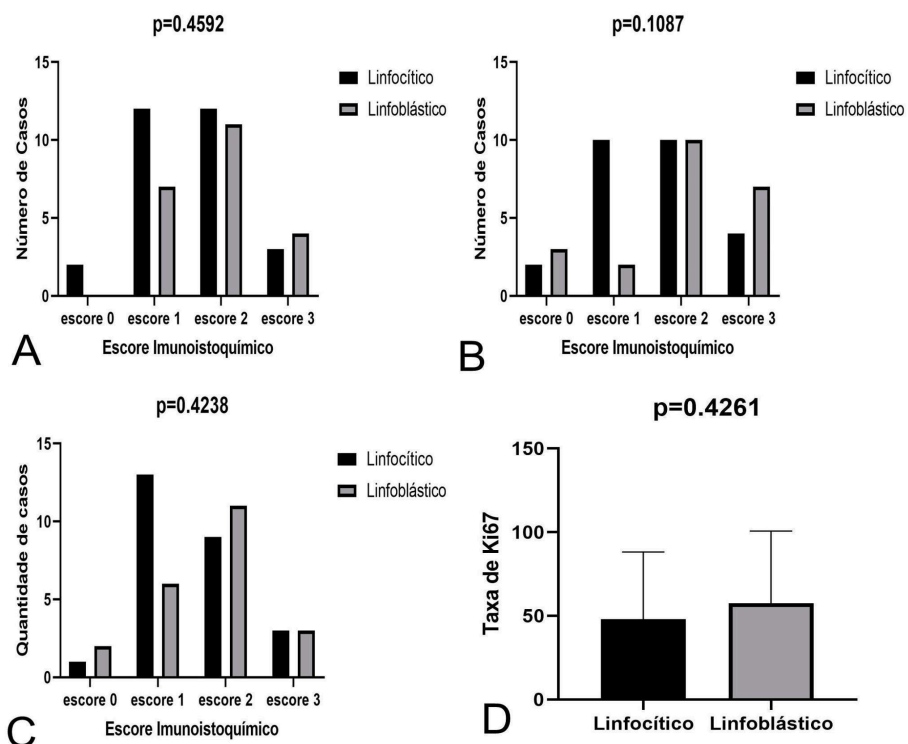
Legenda: Para Ki67 é considerada nenhuma reação positiva quando nenhuma célula foi marcada, poucas reações positivas quando contou-se de 1 à 50 células com marcações, intermediárias reações positivas quando contou-se de 51 a 100 células com marcações e alta reações positivas quando contou-se mais de 101 células com marcações. Para VEGF, BAX e Caspase 3 considerou-se o escore de intensidade, onde nenhum corresponde ao escore 0, pouca 1, intermediária 2 e alta 3.

Os linfomas linfocíticos e linfoblásticos apresentam uma distribuição semelhante de escores imunoistoquímicos para o marcador BAX (Figura 3A), com



uma leve predominância de escores intermediários (1 e 2) em ambos os tipos. A falta de significância estatística ( $p = 0,4592$ ) indica que não há uma diferença clara na expressão do marcador BAX entre os dois tipos de linfoma. Da mesma forma, ambos os tipos de linfoma apresentam variações nos escores imunohistoquímicos para o marcador caspase 3 (Figura 3B), mas sem uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,1087$ ), sugerindo que a expressão da caspase 3 é semelhante nos linfomas linfocíticos e linfoblásticos. Os escores imunohistoquímicos para o marcador prognóstico VEGF também variam entre os linfomas linfocíticos e linfoblásticos, mas sem diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,4238$ ), indicando que a expressão de VEGF é comparável entre esses tipos de linfoma (Figura 3C). A distribuição dos escores sugere variação na expressão de VEGF, porém não suficiente para diferenciar significativamente entre linfomas linfocíticos e linfoblásticos. Além disso, a taxa de Ki-67 é semelhante entre os linfomas linfocíticos e linfoblásticos (Figura 3D), com uma média em torno de 50 e grande variabilidade nos dados, conforme indicado pelas longas linhas de erro. O valor  $p = 0,4261$  reforça a ausência de uma diferença significativa na expressão do Ki-67, indicando que a proliferação celular é comparável entre os dois tipos de linfoma.

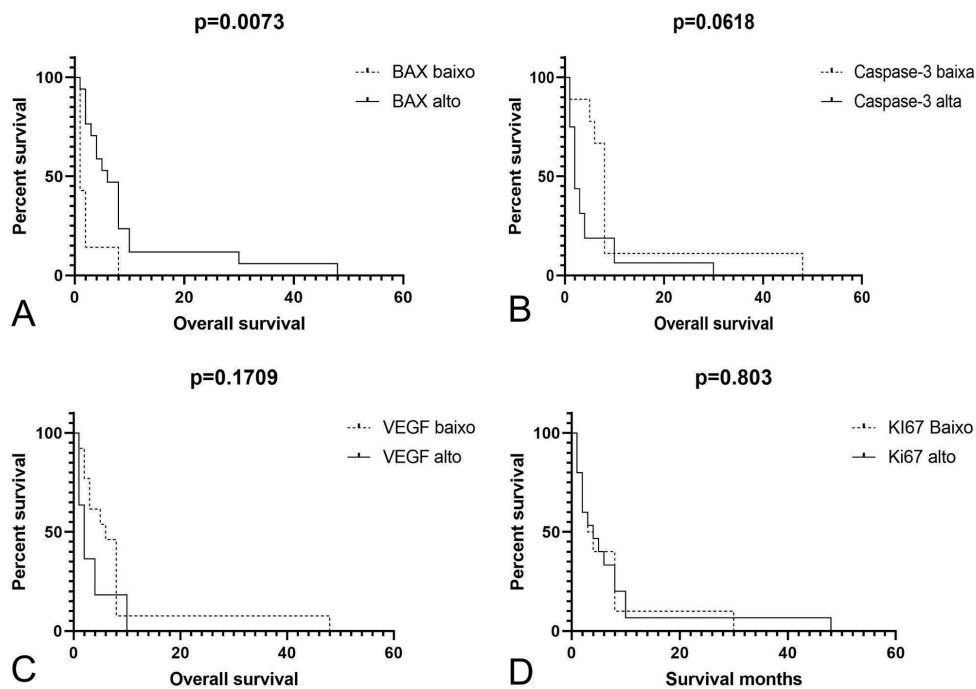
Figura 3- Gráficos estatísticos comparando os linfomas linfocíticos e linfoblásticos ao escore de marcação dos biomarcadores BAX, CASPASE 3, KI67 e VEGF.



Correlação entre casos de linfomas linfocíticos (em preto) e linfoblásticos (em cinza) e o escore de positividade dos biomarcadores: (A.) BAX, (B.) CASPASE 3, (C.) VEGF e (D.) Ki67.

Na análise estatística das variáveis sobrevida e cada marcador prognóstico, foi feita uma matriz de correlação, resultando na expressão do biomarcador BAX se destaca como um fator prognóstico importante. Gatos com maior expressão de BAX tendem a sobreviver por mais tempo do que aqueles com menor expressão, uma observação que é estatisticamente significativa, com um p-valor de 0,0073, indicando que essa correlação não é devida ao acaso. Por outro lado, a expressão do biomarcador Caspase-3 mostra alguma correlação com a sobrevida, sugerindo uma tendência de melhor sobrevida em gatos com maior expressão de Caspase-3. No entanto, essa correlação não é estatisticamente significativa ( $p = 0,0618$ ), o que significa que não podemos descartar a possibilidade de que a diferença observada seja devida ao acaso. Em contraste, a expressão dos marcadores Ki-67 e VEGF não parece estar significativamente correlacionada com o tempo de sobrevida. O p-valor de 0,803 para Ki-67 e 0,1709 para VEGF indica que as curvas de sobrevida para baixa e alta expressão desses biomarcadores são semelhantes, sugerindo que outros fatores podem ser mais relevantes para prever a sobrevida em casos de linfoma felino. Esses resultados estão demonstrados no FIGURA 4.

FIGURA 4- Gráfico estatístico comparando o tempo de sobrevida com a expressão alta ou baixa dos biomarcadores.



(A.) BAX, (B.) CASPASE 3, (C.) VEGF e (D.) Ki67. Considerou-se baixo, para Ki67, quando houve positividade de até 50 células marcadas e alto quando houve positividade de mais de 51 marcadas. Para VEGF, Caspase-3 e BAX considerou-se alto quando o escore de intensidade ficou entre 2 e 3, e baixo quando o escore de intensidade ficou entre 0 e 1.

#### 4. Discussão

Os 48 animais selecionados são oriundos de diferentes locais, com intervalo de tempo entre 2008 e 2023. Estudos sobre linfoma felino variam em quantidade de casos; os mais próximos ao realizado neste estudo têm uma média de 55 pacientes (Fabrizio et al., 2014; Noronha et al., 2018; Cristo et al., 2019). Os felinos sem raça definida (SRD) são predominantes na maioria das pesquisas envolvendo populações de gatos. Neste estudo, não é diferente, com 83% sendo dessa classe. O mesmo ocorreu no estudo brasileiro de Cristo e colaboradores (2019), onde os gatos SRD são 45 dos 53 avaliados (Cristo et al., 2019). O sexo dos animais não demonstrou ser significativo para o surgimento ou não do linfoma, pois eram 22 machos e 22 fêmeas. Em uma amostra maior, esses valores tendem a se distanciar, como no estudo de Sato et al. (2014), onde a amostra foi de 163 gatos, dos quais 92 eram machos e 71 fêmeas. Porém, mesmo assim, a variável sexo não apresenta significância (SATO et al., 2014).

A bibliografia aponta que os gatos têm duas faixas etárias com maior recorrência de linfoma, no início da vida adulta e no início da velhice (NELSON e COUTO, 2015). Considerando que os felinos tornam-se adultos aos dois anos e idosos aos dez, os casos apresentados neste estudo compreendem pacientes dentro desse intervalo proposto pela bibliografia, com a mediana de idade em torno de dez anos. A mesma mediana foi averiguada no estudo de Bik et al (2023).

O linfoma alimentar foi o mais presente entre os casos coletados neste estudo, seguido pelo multicêntrico, extranodal e mediastinal; conforme observado no estudo de Sato et al. (2014) e Limmer et al. (2014), onde houve predominância do linfoma alimentar. Em contrapartida, no estudo catarinense de 2018, houve mais casos de linfoma multicêntrico (23/53) e menos (1/53) de linfoma alimentar (NORONHA et al., 2018).

Quanto ao tratamento dos felinos com linfoma, em um estudo realizado na Holanda em 2023, foram selecionados 174 felinos com linfoma, dos quais 110 foram tratados com o protocolo COP (Versteegh et al., 2023). O estudo de Collete et al. (2015) averiguou o protocolo CHOP em seus pacientes. Os pacientes deste estudo que foram submetidos a tratamento utilizaram COP e CHOP, além de combinações de quimioterápicos e corticoides. Os felinos contabilizados tiveram uma média de sobrevida global de quatro meses, independentemente da realização ou não de tratamento. Fabrizio et al. (2014) relatou uma sobrevida um pouco maior, de oito meses, enquanto Limmer et al. (2014) observou um tempo de sobrevida menor, de dois meses.

A FeLV ainda não foi investigada em todos os casos deste estudo; porém, 20 animais haviam realizado testes para a detecção do vírus, dos quais três tiveram resultados positivos e seus linfomas eram todos da forma alimentar. O inverso foi apresentado por Limmer et al. (2014), onde seis gatos (6/26) testaram positivo para FeLV e a classificação dominante foi a multicêntrica (2/6) (LIMMER et al., 2014).

A marcação imunoistoquímica do Ki-67 costuma ser no núcleo da célula (Silva et al., 2017). Rebollada-Merino et al. (2022) relatou em seu estudo sobre linfomas intestinais em felinos que Ki-67 se expressou de forma difusa nas criptas epiteliais. O mesmo aconteceu nas amostras padronizadas deste estudo. BAX pertence à família dos BCL; linfomas intestinais podem apresentar expressão intensa desse biomarcador, corroborando o encontrado em nosso experimento (YOULE e STRASSER, 2008; REBOLLADA-MERINO et al., 2022). A Caspase-3 apresentou marcação esparsa, que também pode ser entendida como granular, tendo o mesmo resultado encontrado no estudo de Silva et al. (2017) com carcinomas mamários em felinos. Por fim, o VEGF demonstra a formação de novos vasos em tecidos estromais, nas células neoplásicas, também apontado por Chen et al. em seu estudo de 2020 (CHEN et al., 2020).

Analisando a intensidade de marcação de cada biomarcador utilizado, constatou-se uma maior concentração de amostras que tiveram pouca ou intermediária marcação. Para o Ki-67, isso significa que a proliferação celular nesses linfomas foi mediana ou baixa, como foi explicado no artigo de Rutgen et al. (2021). Quanto ao BAX, muitas marcações podem indicar uma maior tendência para

a apoptose, enquanto poucas marcações podem sugerir uma redução na capacidade de induzir apoptose, o que pode estar relacionado a uma maior resistência celular, indicando a persistência das células neoplásicas (MOANY et al., 2022). A Caspase-3 também mensura a apoptose, porém poucas marcações sugerem uma potencial resistência à apoptose, o que pode estar relacionado a um comportamento mais agressivo do linfoma (MOANY et al., 2022). Por fim, poucas marcações de VEGF podem indicar uma menor indução de angiogênese, diminuindo a vascularização tumoral (LOUREIRO et al., 2020).

O alto índice de BAX, nos casos de escore de intensidade 2 e 3, revelou-se um bom marcador prognóstico para os linfomas felinos. Um estudo publicado no *BMC Cancer* analisou a expressão de Bax como um marcador prognóstico independente em carcinoma espinocelular oral (OSCC). Os resultados indicaram que a alta expressão de Bax estava associada a uma melhora significativa na sobrevida específica de 5 anos (85,7% para tumores com alta expressão versus 50,3% para baixa expressão) (NARAYAN et al, 2020). Pertenciam a este grupo 30 linfomas felinos desse estudo, que, em sua maioria era de localização alimentar (ou gastrintestinal), corroborando com o estudo de Kehl et al (2022) e de Suter (2023), que os gatos com escore alto de BAX, cuja sobrevida também demonstrou ser mais alta, era de predominância gastrointestinal.

#### **4. Conclusão**

Conclui-se que, no estudo de linfomas felinos, a expressão do biomarcador BAX emerge como um fator prognóstico significativo. Gatos com maior expressão de BAX apresentam uma sobrevida prolongada, uma correlação estatisticamente robusta, sugerindo que este biomarcador pode ser crucial na avaliação prognóstica e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Em contraste, a expressão dos biomarcadores Caspase-3, Ki67 e VEGF, apesar de indicarem algumas tendências, não demonstraram significância estatística em relação à sobrevida, sugerindo que eles podem não ser tão relevantes como preditores isolados de prognóstico.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. M.; SOUSA FILHO, R. P.; RODRIGUES, I. L.; CRUZ, R. O.; RODRIGUES, A.P. R.; SILVA, I. N. G. Linfoma leucemizado em felino coinfectado com os vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.71, n.1, p.219-224, 2019.
- ALVES, M. C. R.; CONTI, L. M. C; ANDRADE JUNIOR, P. S. C.; DANATELE, D. M. Leucemia viral felina: revisão. **PubVet**, Maringá, v. 9, n.2, p. 86-100, fev., 2015.
- BIK, C. A. ; RUIJTER, B. R.; VAN DEN BOSSCHE, L.; TESKE, E. ; NIESSEN, S. J. M.; FORCADA, Y. Pegylated-L-asparaginase therapy for feline large cell lymphoma: 82 cases (2017-2020). **Journal of Feline Medicine and Surgery**. 1-9, 2023.
- BUSSOLATI, G.; GUGLIOTTA, P. Immunohistochemistry: Basics and Methods. **Springer Science & Business Media**, 2009.
- CHEN, B.; LIN, S. J. H.; LI, W. T.; CHANG, H. W.; PANG, V. F.; CHU, P. Y.; LEE, C. C.; NAKAYAMA, H.; WU, C. H.; JENG, C. R. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in feline mammary gland carcinomas: association with pathological characteristics and clinical outcomes. **BMC Veterinary Research** (2020) 16:125.
- COSTA, F. V. A.; SOUZA, H. J. M.; CUNHA, S. C. S.; CORGOZINHO, K. B. Oncologia Felina. Rio de Janeiro: L. F. Livros Veterinários, 2017. ISBN: 978-85-89137-20-1
- COLLETE, S. A.; ALLSTADT, E. M.; CHON, W.; VERNAU, A. N.; SMITH, L. D.; GARRETT, K.; CHOY, R. B.; REDHUN, C. O.; RODRIGUEZ, C. O.; SKORUPSKI, K. A. Treatment of feline intermediate-to high-grade lymphoma with a modified university of Wisconsin–Madison protocol: 119 cases (2004–2012). **John Wiley & Sons Ltd, Veterinary and Comparative Oncology**, 14, S1, 136–146, 2015.
- COLLET, M. G.; KHOUBYARIAN, N. Gastrointestinal lymphoma in FeLV-negative cats: A comparative study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 6, p. 453-459, 2016.
- CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L. F.; PEREIRA, L. H. H. S.; WITHOEFT, J. A.; FURLAN, L. V.; COSTA, L. S.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Feline Lymphoma and High Correlation with Feline Leukemia Virus Infection in Brazil. **J. Comp. Path.** 2019, Vol. 166, 20-28
- FABRIZIO, F.; CALAM, A.E.; DOBSON, J. M.; MIDDLETON, S. A.; MURPHY, S.; TAYLOR, S. S.; SCHWARTZ, A. ; STELL A. J. Feline mediastinal lymphoma: a retrospective study of signalment, retroviral status, response to chemotherapy and prognostic indicators. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. 2014, Vol 16(9) 637-644.
- FUSCO, Giovanna; MARATI, Luisa; PUGLIESE, Annamaria; LEVANTE, Martina; FERRARA, Gianmarco; DE CARLO, Esterina; AMOROSO, Maria Grazia; MONTAGNARO, Serena. Prevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats from southern Italy: a 10-year cross-sectional study.

**Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2023.

GONÇALVES, R. J.; VOLKWEIS, F. S. Vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina. **Artigo de conclusão de curso pelo Centro Universitário do Planalto Central** (Uniceplac), 2019.

LIMMER, S.; EBERLE, N.; NERSCHBACH, V.; NOLTE, I.; BETZ, D. Treatment of feline lymphoma using 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol in 26 cats. **Veterinary and Comparative Oncology**. Volume 14, Issue S1, p 21-31, 2014.

LOUREIRO, L.V.M., NEDER, L., CALLEGARO-FILHO, D. *et al.* The immunohistochemical landscape of the VEGF family and its receptors in glioblastomas. **Surg Exp Pathol** 3, 9 (2020).

LOUWERENS M.; LONDON, C.A.; PEDERSEN, N.C.; LYONS, L.A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. **J Vet Intern Med**. 2005 May-Jun;19(3):329-35. doi: 10.1892/0891-6640 (2005)19[329:flitpl] [2.0.co](https://doi.org/10.1892/0891-6640 (2005)19[329:flitpl] 2.0.co);2. PMID: 15954547

JARRETT, W. F. H. *et al.* A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). **Nature**, v. 202, p. 567–569, 1964.

KEHL, A.; TÖRNER, K.; JORDAN, A. *et al.* Pathological findings in gastrointestinal neoplasms and polyps in 860 cats and a pilot study on miRNA analyses. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 9, p. 477, 2022.

MOANY, M.; AHMED, M.M.; AL-REJAIE, S.S. The Role of NF-κB and Bax/Bcl-2/Caspase-3 Signaling Pathways in the Protective Effects of Sacubitril/Valsartan (Entresto) against HFD/STZ-Induced Diabetic Kidney Disease. **Biomedicines**, 2022, 10, 2863.

NARAYAN, K.; *et al.* BAX expression measured by AQUAnalysis is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina interna de pequenos animais. **Elsevier Editora Ltda**, ed.5, p.3257-3388, 2015.

NORONHA, L. F.; CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; FURLAN, L. V.; COSTA, L. S.; PEREIRA, L. H. H. S.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Caracterização Anatopatológica dos Linfomas em Gatos Domésticos. **28º SIC UDESC**, 2018.

REBOLLA-MERINO, A.; PORRAS, N.; CALVO-IBBITSON, A.; RODRIGUES-FRANCO, F.; RODRIGUES-BERTOS, A. Bcl-2 Immunoexpression in Feline Epitheliotropic Intestinal T-Cell Lymphomas. **Vet. Sci**. 2022, 9, 168.

Riley RD, Sauerbrei W, Altman DG. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. **Br J Cancer**. 2009 Apr 21;100(8):1219-29.

RUTGEN, B. C.; BAUMGARTNER, D.; FUCHS-BAUMGARTNER, A.; RIGILLO A, ŠKOR, O.; HAMMER, S.E.; SAALMULLER, A.; SCHWENDENWEIN, I. Flow Cytometric Assessment of Ki-67 Expression in Lymphocytes From Physiologic Lymph Nodes, Lymphoma Cell Populations and Remnant Normal Cell Populations From Lymphomatous Lymph Nodes. **Front. Vet. Sci.** 8:663656, 2021.

SATO, H.; YASUHITO F.; GOTO-KOSHINO, Y.; UCHIDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Classification of Feline Lymphoma. **J. Vet. Med. Sci.** 76 (6): 807-811, 2014.

SILVA, M. N.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; SILVA, K. V. G. C.; CORGOZINHO, K. B.; SOUZA, H. J. M.; CUNHA, S. C. S.; FERREIRA, A. M. R. Histologic evaluation of Ki-67 and cleaved caspase-3 expression in feline mammary carcinoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery.** 2017, Vol. 19(4) 440–445.

SILVA, D. H. L. Classificação imunofenotípica do linfoma de gatos domésticos e sua correlação com o vírus da leucemia felina. **Dissertação de Mestrado da Escola de Veterinária da UFMG**, 2019.

SILVA, D.H.L.; ECCO R.; PIEREZAN, F.; CASSALI, G.D.; REIS J.K.P.; GONÇALVES, A.B.B.; BICALHO, J.M.; DELARMELINA, E.; LEME, F.O.P. Classification of lymphoma in cats and its relationship with detection of feline leukemia virus proviral DNA. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 42:07021, 2022. Departamento de Clínica e Cirurgia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

SUTER, S. Feline gastrointestinal lymphomas: diagnosis and treatment. In: **Veterinary Meeting & Expo**, 2023, Orlando, FL. Proceedings. Orlando: DVM360, 2023.

VAN DER STEEN, F. E. M. M.; TESKE, E. Feline Lymphoma: Patient Characteristics and Response Outcome of the COP-Protocol in Cats with Malignant Lymphoma in The Netherlands. **Animals**, v. 13, n. 16, p. 2667, 2023.

VERSTEEGH, H.; ZANDVLIET, M. M. J. M.; FEENSTRA, L. R.; VAN DER STEEN, F. E. M. M.; TESKE, E. Feline Lymphoma Patient Characteristics and Response Outcome of COP-Protocol in Cats with Malignant Lymphoma in The Netherlands. **Animals.** 2023, 131 2667.

YOULE, R. J., & STRASSER, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 9(1), 47-59.