

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO C-MYC, BCL2, KI67 E ÍNDICE MITÓTICO  
COMO FATORES PROGNÓSTICOS EM CÃES COM  
LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B**

**Oscar Rodrigo Sierra Matiz**

**Médico Veterinário**

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO C-MYC, BCL2, KI67 E ÍNDICE MITÓTICO  
COMO FATORES PROGNÓSTICOS EM CÃES COM  
LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B**

**Oscar Rodrigo Sierra Matiz**

**Orientadora: Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans**

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

**2016**

Sierra Matiz, Oscar Rodrigo

S572a      Avaliação do C-MYC, Bcl2, Ki67 e índice mitótico como fatores prognósticos em cães com linfoma difuso de grandes células B / Oscar Rodrigo Sierra Matiz. – – Jaboticabal, 2016

vi, 39 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientadora: Sabryna Gouveia Calazans

Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Thiago Demarchi Munhoz

Bibliografia

1. Linfoma multicêntrico. 2. Imuno-histoquímica. 3. Proliferação celular. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7/.8



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** AVALIAÇÃO DO C-MYC, BCL2, KI67 E ÍNDICE MITÓTICO COMO FATORES PROGNÓSTICOS EM CÃES COM LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

**AUTOR:** OSCAR RODRIGO SIERRA MATIZ

**ORIENTADORA:** SABRYNA GOUVEIA CALAZANS

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

Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS  
UNIFRAN / Franca/SP

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

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

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2016

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**OSCAR RODRIGO SIERRA MATIZ** – nascido em Bogotá, Colômbia, no dia 15 de abril do ano 1987, filho de Antonio José Sierra Caviedes e Ruth Jesus Matiz Rodriguez Iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária no ano 2004 na Universidade de La Salle, Bogotá, Colômbia. Defendeu o trabalho de graduação intitulado “Feocromocitoma canino, presentación concomitante con hiperadrenocorticismo dependiente de pituitaria” sob orientação do Dr. Oscar Javier Benavides. Obteve título de Médico Veterinário em dezembro de 2010. Realizou residência em medicina interna de pequenos animais na Clínica Veterinária Dover, Bogotá, Colômbia durante o período de 2011 a 2013. Realizou estágios na área de Oncologia Madison-Wisconsin University, sob orientação do Dr. David Vail em 2013, no Coral Springs Animal Hospital, sob orientação do Dr. Francisco Alvarez em 2014 e recentemente na Purdue University, sob orientação do Dr. Michael O. Childress, em novembro de 2015. Foi selecionado como monitor no curso de pós-graduação *lato sensu* em Oncologia Veterinária no Instituto Bioethicus, Botucatu, SP, em outubro de 2014 (em andamento). Em agosto de 2014, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans, sendo bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em outubro de 2015, participou do Veterinary Cancer Society Conference, como congressista e apresentador de resumos na forma de pôster e oral. Durante o mestrado, prestou atendimento clínico voluntário no Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, na FCAV/UNESP-Jaboticabal, auxiliou na organização de eventos, traduziu livros, publicou artigos em anais de congressos e periódicos nacionais e internacionais.

**A minha base e força, Ruth, Antonio e Sandra**

**OFEREÇO**

**A meu eterno guerreiro e herói, quem  
acompanha meus passos desde perto, Elkin**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Tudo o que eu sou vem de Deus, a quem agradeço em primeiro lugar por ter me dado a vida suficiente a mim e aos meus pais, de me verem conquistar sonhos e realizações. Sei que a minha felicidade é a felicidade da minha família, e desde sempre agradeço a Deus por me colocar nos lugares certos com as pessoas certas, e nesse caso sinto do fundo do meu coração que me encontro no país que me abriu as portas e me abraçou mais que como um amigo, como um filho. A Deus por sua infinita bondade para comigo, e ao Brasil por ter me acolhido, *gracias*.

Meu coração é forjado com o amor infinito da minha mãe Ruth, a quem agradeço por ser o que eu sou, por sua motivação e força. Sempre as palavras mais lindas deverão ser para ela e sempre meu coração pertencerá ao dela. Minha cabeça e mãos são feitos com o trabalho do meu pai, com sua tenacidade e valor. Ao meu pai Antonio, agradeço por seu exemplo e confiança em mim, por ter me dado a oportunidade de conhecer o mundo. As minhas pernas tem um motor chamado irmãos, as quais tem me conduzido pelo caminho do bem. A minha irmã Sandrita, pilar de todo meu ser, agradeço eternamente por ser minha maior rocha e abrigo. A meu irmão Elkin, quem desde perto me guia, agradeço pelo tempo vivido, compartilhado e desfrutado. Sei que do céu, encontra-se contente e me olha com esse sorriso feliz que sempre transmitiu para mim. Agradeço a vida por ter me escolhido como seu irmão e porque sinto que nunca estarei mais orgulhoso de outra pessoa assim como dele. E a minha avó Aurora, que reflete amor e carinho em cada conversa, agradeço por sua humildade e beleza. A todos os membros da minha família, *gracias*.

Agradeço de coração e mente à minha orientadora Sabryna Calazans, quem é apoio e motivação. Ela merece minha eterna gratidão por ter me acolhido como parte do seu tempo, de sua vida. Aos meus amigos e professores brasileiros, que têm sido a alegria em momentos difíceis e o ponto de partida para estudar e ser melhor nessa linda profissão. Em especial a Paulo pela amizade e irmandade, a Rafaela, Leticia, Giovanni, Nazilton, Livia, Talita, Jorge, Igor, Alfredo, Marília, Ana, Rafael e Bruna. Aos queridos professores Mirela e Andriago, a todo o Serviço de Oncologia Veterinária

(SOV), aos residentes, amigos e funcionários do Hospital Veterinário da UNESP Jaboticabal, *gracias*.

Na distância agradeço aos meus amigos da vida, porque sei que minha felicidade forma parte da deles e sei que torcem por mim sem importar quantos quilômetros existam entre nós. A Diego Vanegas, Jose, John, Daniel, Andrés Julian, Ricardo, Hernando, Juan, Rafael, Cindy, Andrea e Claudia. Aos meus amigos colombianos aqui nessa terra brasileira, Diego Rojas, Lorena, Jorge, Alfredo, Alejandro, Ricardo e a todos os que compartilham esse mesmo sonho, *gracias*.

Agradeço ao grupo de estudos pelos quais esta pesquisa conseguiu ser realizada, já que é produto do trabalho de pessoas carismáticas e abertas ao novo conhecimento. A Juliana Santilli, Letícia Anai, Thiago Munhoz, Livia Semolin, Paulo Jark, Paula Rodrigues, Cláudia da Silva, Carlos Fonseca-Alves, Marcela Rodrigues e Felipe Sueiro. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter me concedido a bolsa de estudos e assim me permitir alcançar meus objetivos, a todos eles, *gracias*.

Por último e não menos importante, agradeço aos animais que formam parte do meu atendimento diário, são eles que merecem o estudo e toda a minha dedicação com a promessa de melhor qualidade de vida a todos.



## SUMÁRIO

	<b>Pagina</b>
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Linfoma em cães.....	3
2.2 Relação entre Bcl2, C-MYC, e índices de proliferação celular Ki67 e IM em LDGCB.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Seleção de casos .....	10
3.2 Técnica de imuno-histoquímica .....	11
3.3 Análise dos resultados.....	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1 Dados da população.....	14
4.2 Imunomarcção do C-MYC e Bcl2.....	17
4.3 Imunomarcção do Ki67 e IM.....	22
5 CONCLUSÕES.....	27
6 REFERÊNCIAS.....	28

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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 23.945/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Avaliação do "alvo duplo" BCL2/MYC como fator prognóstico e sua correlação com CD138 e Ki67 em linfomas multicêntricos e cutâneos de cães", sob a responsabilidade da Profª Drª Sabryna Gouveia Calazans, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado "Ad-referendum" da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em 26 de novembro de 2014.

Jaboticabal, 26 de novembro de 2014.



**Profª Drª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## **AVALIAÇÃO DO C-MYC, BCL2, KI67 E ÍNDICE MITÓTICO COMO FATORES PROGNÓSTICOS EM CÃES COM LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B**

**RESUMO** - O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é o tipo de linfoma mais comum em cães e humanos, caracterizado por seu comportamento agressivo e por promover tempos de sobrevida variáveis, mesmo quando se utiliza a mesma abordagem terapêutica. Atualmente, poucos fatores prognósticos tem sido associados especificamente com LDGCB canino. A imunoposição de C-MYC e Bcl2 é reconhecida em humanos como fator prognóstico, devido a relação desses oncogenes com proliferação celular e evasão da apoptose nessa doença. O objetivo desse estudo foi avaliar a imunomarcção dos anticorpos C-MYC, Bcl2, e marcadores de proliferação celular Ki67 e índice mitótico (IM) em cães com LDGCB tratados com protocolo CHOP 19 semanas e correlacioná-la com o tempo de sobrevida e estadiamento clínico visando defini-los como possíveis fatores prognósticos. Trinta amostras de linfonodos de cães diagnosticados com LDGCB foram avaliadas. Para determinar a marcação de C-MYC, Bcl2 e Ki67 foi realizada a técnica de imunohistoquímica utilizando-se os anticorpos C-MYC, Bcl2 (Santa Cruz Biotechnology) e MIB-1 (Dako), respectivamente. O IM foi calculado como descrito para outras neoplasias. A interpretação dos resultados da imunohistoquímica para C-MYC e Bcl2, foi calculada no percentagem de área do número de células marcadas, enquanto a contagem de Ki67 foi realizada com auxílio de uma grátula, contando-se células positivas por área de 1 cm<sup>2</sup>. Foram estabelecidos pontos de corte, calculando-se a média para todos os marcadores, e posteriormente os valores do C-MYC, Bcl2, Ki67 e a IM foram classificados e definidos como “baixo” ou “alto”. Amostras classificadas como alto C-MYC e alto Bcl2, concomitantemente, foram definidas como alvo duplo MYC/Bcl2. A média de C-MYC foi de 21 (intervalo: 2,5-53,5), de Bcl2 foi de 32,5 (intervalo: 16,9 – 76,8), de Ki67 foi de 107 (intervalo: 1 – 446) e de IM foi de 21 (intervalo: 0-73). Quando comparados os tempos de sobrevida para cada marcador, observou-se que o Ki67 apresentou diferença significativa entre as médias dos grupos baixo (281 dias) e alto (91 dias) ( $p < 0,05$ ). Não houve relação do alvo duplo MYC/Bcl2 com tempos de sobrevida ( $p > 0,05$ ), assim como não houve associação entre a imunomarcção dos anticorpos com o estadiamento clínico. Porém, houve correlação positiva entre C-MYC e Bcl2 ( $p < 0,05$ ) e entre Ki67 e IM ( $p < 0,0001$ ). A expressão imunohistoquímica dos anticorpos C-MYC e Bcl2, individualmente ou em alvo duplo, não parece constituir um fator prognóstico em cães com LDGCB. Porém, valores acima de 107 células positivas de Ki67 podem estar associados com tempos de sobrevida mais curtos em cães com LDGCB tratados com protocolo CHOP 19 semanas.

**Palavras-chave:** apoptose, imunohistoquímica, linfoma multicêntrico, proliferação celular

## EVALUATION OF C-MYC, BCL2, KI67 AND MITOTIC INDEX AS PROGNOSTIC FACTORS IN DOGS WITH DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA

**ABSTRACT** - Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of lymphoma in dogs and humans, being characterized by its aggressive behavior with variable survival times, even when same therapeutic approach is used. Currently, few prognostic factors are described in the literature regarding canine DLBCL. Immunoexpression of C-MYC and Bcl2 is recognized in humans as a prognostic factor in DLBCL, product of the relationship between these oncogenes with cellular proliferation and apoptosis escape. The objective of this study is to evaluate the immunolabeling of C-MYC, Bcl2, and markers of cellular proliferation Ki67 and mitotic index (MI) in dogs with DLBCL treated with 19 weeks CHOP protocol and correlate them to survival times and clinical stage in order to identify new prognostic factors. Thirty lymphnode samples of dogs diagnosed with DLBCL were evaluated. For immunoexpression of C-MYC, Bcl2 and Ki67, we perform immunohistochemistry using the antibodies C-MYC, Bcl2 (Santa Cruz Biotechnology) and MIB-1 (Dako), respectively. MI was calculated as previously discussed in other tumors. The interpretation of the immunohistochemistry results for C-MYC and Bcl2 was based on the expression level of the area of positive cells, whereas a grid reticle was used for counting Ki67 positive cells in a total area of 1 cm<sup>2</sup>. Cutoff values for all markers were established calculating the mean value and then the C-MYC Bcl2, Ki67 and MI values were classified and defined as "low" and "high". Cases classified as high C-MYC and high Bcl2, were defined as double target MYC/Bcl2. Mean values were 21 (range: 2,5-53,5) for C-MYC, 32,5 (range: 16,9-76,8) for Bcl2, 107 (range: 1-446) for Ki67 and 21 (range: 0-73) for MI. Only Ki67 immunoexpression was found to be statistical different when survival times were compared between groups low and high (281 days vs 91 days). When double target MYC/Bcl2 was analyzed, no relationship was identified with survival times ( $p>0,05$ ). Additionally, an association between the antibodies immunoexpression and clinical staging was not identified. However, a positive correlation between C-MYC and Bcl2 ( $p<0,05$ ) and, Ki67 and MI ( $P<0,0001$ ) was established. The immunohistochemistry expression of the antibodies C-MYC and Bcl2, individually or in double target, does not appear to constitute a prognostic factor in dogs with DLBCL, whereas a value of Ki67 $>107$  positive cells can be used in dogs with DLBCL to foresee shorter survival times when treated with 19 weeks CHOP protocol.

**Keywords:** apoptosis, cellular proliferation, immunohistochemistry, multicentric lymphoma

## LISTA DE FIGURAS

### Página

- Figura 1** Fotomicrografia de LDGCB em linfonodo de cão. Observam-se células linfoides malignas em padrão difuso de formato arredondado com núcleos amplos, moderado pleomorfismo, citoplasma escasso e nucléolo central (seta) ou múltiplos nucléolos (cabeça de seta). HE, 40x.....4
- Figura 2** Fotomicrografias da marcação do C-MYC e Bcl2 em LDGCB de cães. (A) C-MYC<21 “baixo”. (B) C-MYC>21 “alto” com evidência de células MYC positivas com marcação tanto nuclear como citoplasmática. (C) Bcl2<32,5 “baixo”. (D) Bcl2>32,5 “alto”, observa-se marcação predominantemente em citoplasmática. Histofine, DAB, 40X.....18
- Figura 3** Representação gráfica dos resultados de C-MYC e Bcl2. (A) Diagrama de caixa representando a imunomarcação de C-MYC entre grupos LDGCB e controle. Houve diferença significativa pelo teste  $t$  ( $p<0,05$ ). (B) Diagrama de caixa representando a imunomarcação de Bcl2 entre grupos LDGCB e controle. Houve diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney ( $p<0,05$ ). (C) Curvas de sobrevida de cães com LDGCB com C-MYC “baixo” e C-MYC “alto”. Não houve diferença significativa pelo teste de logrank ( $p>0,05$ ). (D) Curvas de sobrevida de cães com LDGCB com Bcl2 “baixo” e Bcl2 “alto”. Não houve diferença significativa pelo teste de logrank ( $p>0,05$ ). (E) Curvas de sobrevida de acordo com os escores de marcação 0, 1 e 2 para o alvo duplo MYC/Bcl2, sem diferença significativa pelo teste de logrank ( $p>0,05$ ). (F) Relação entre C-MYC e Bcl2 em amostras de LDGCB de cães. Observar correlação positiva pelo teste de Spearman ( $p<0,05$ ) .....19
- Figura 4** Fotomicrografia da marcação nuclear do Ki67 em LDGCB de cão. As células positivas foram contadas na área total de 1 cm<sup>2</sup> com auxílio de gráticula de 10 x 10 mm. MIB-1, Histofine, DAB, 40x..... 23

**Figura 5** (A) Curvas de sobrevida de cães com LDGCB com Ki67 < 107 “baixo” e Ki67 ≥ 107 “alto”, encontrou-se diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0,004$ ). (B) Curvas de sobrevida de cães com LDGCB com IM < 21 “baixo” (n=17) e IM ≥ 21 “alto” (n=13), sem diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ). ..... 23

**Figura 6** Relação entre Ki67 e IM em amostras e LDGCB de cães. Observar correlação positiva pelo teste de Spearman ( $p<0,05$ .) ..... 24

## 1 INTRODUÇÃO

O linfoma é o tumor hematopoiético mais frequente em cães e constitui o segundo tumor mais comum nessa espécie, compreendendo 7-24% de todas as neoplasias (VAIL et al., 2013; RICHARDS; SUTER, 2015). No Reino Unido, este tumor apresenta uma incidência anual de 107 casos a cada 100.000 cães (DOBSON et al., 2002), o que sugere que, no Brasil, mais de 55000 cães podem ser diagnosticados com linfoma a cada ano, considerando uma população de 52 milhões de cães em todo o território nacional (IBGE, 2013).

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) constitui o tipo histológico de linfoma mais comum em cães e homens (SWERDLOW et al., 2008; PONCE et al., 2010; VALLI et al., 2011). Várias semelhanças são observadas em ambas as espécies, desde aquelas relacionadas à etiologia até o tipo de resposta a tratamentos (RICHARDS et al., 2013; RICHARDS; SUTER, 2015). A maioria de pacientes morrem pela doença, apresentando tempo de sobrevida variável, inclusive quando se utiliza o mesmo protocolo quimioterápico (VAIL et al., 2013; MARCONATO et al., 2014). Na espécie humana, existem fatores prognósticos bem definidos para o LDGCB (HONG et al., 2014; ZHOU et al., 2014; KEAM et al., 2015), porém, considerando-se a espécie canina, apenas o índice linfócito/monócito e o valor de Ki67, ambos determinados por citometria de fluxo, foram recentemente definidos como fatores prognósticos confiáveis (MARCONATO et al., 2015; POGGI et al., 2016).

Assim como pode ser observado na maioria das neoplasias malignas, as vias da apoptose e da proliferação celular estão frequentemente alteradas em LDGCB (ALIZADEH et al., 2000; BAI et al., 2005). Considerando-se o LDGCB humano, o aumento da expressão de oncogenes Bcl2 e C-MYC, assim como da proteína anti-apoptótica Bcl2 ou do fator de transcrição C-MYC, podem ser considerados fatores prognósticos negativos (IQBAL et al., 2006; KLUK et al., 2011). Adicionalmente, a expressão associada dessas proteínas é denominada “alvo duplo”, comumente relacionado com um comportamento agressivo, caracterizado por baixa resposta à

quimioterapia (JOHNSON et al., 2009; SNUDERL et al., 2010; TOMITA 2011; GREEN et al., 2012). Na espécie humana, a ação sinérgica entre a expressão dos genes Bcl2 e MYC, constitui um fator prognóstico independente do índice de prognóstico internacional (IPI) e do subtipo molecular LDGCB (GREEN et al., 2012, JOHNSON et al., 2012). Por outro lado, apesar do Ki67 ter sido considerado um fator prognóstico em LDGCB humano (MILLER [et al., 1994](#)), vários autores não comprovaram a associação de marcadores de proliferação celular com o tempo de sobrevida em cães com LDGCB (KIUPEL et al., 1999; DOBSON et al., 2001; FLOOD-KNAIP et al., 2013; ZACCHETTI et al., 2013).

Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a marcação imunohistoquímica dos anticorpos C-MYC, Bcl2 e MIB-1 (Ki-67), bem como o IM, associadamente com a sobrevida de cães com LDGCB, além de verificar possíveis relações dos marcadores com estadiamento clínico do tumor.



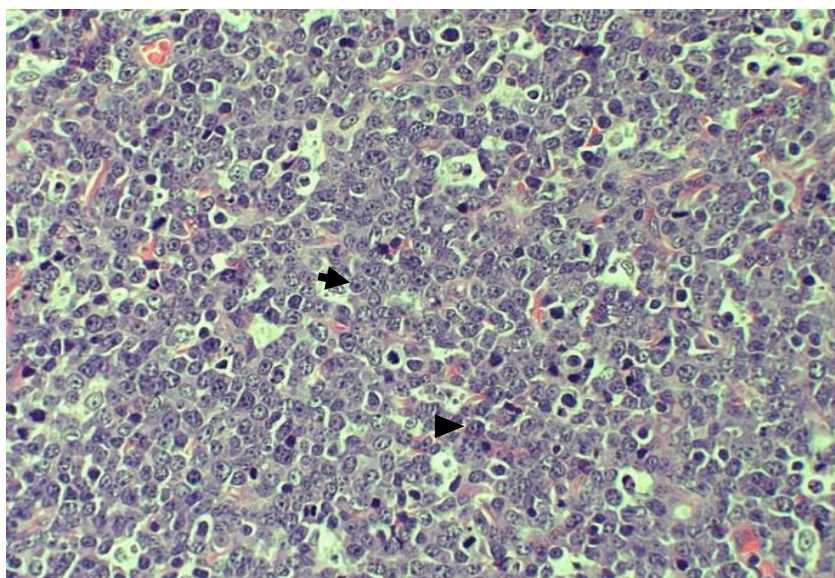
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Linfoma em cães

O linfoma é o principal tumor hematopoiético em cães e caracteriza-se por uma proliferação maligna de células linfoides que acomete qualquer tecido (TUREK et al., 2008), mas originam-se principalmente de órgãos linfoides como linfonodos, baço e medula óssea (DALECK; CALAZANS; DE NARDI, 2009). A idade de maior incidência oscila entre seis a nove anos (VAIL et al., 2013) e não há comprovação de predileção sexual (TESKE et al., 1994).

Existem diferentes elementos associados ao desenvolvimento do linfoma, favorecendo a hipótese de uma origem multifatorial (VAIL et al., 2013). Assim, variadas técnicas em biologia genética têm sido utilizadas para pesquisa de alterações em vias de sinalização, aberrações cromossômicas e mutações genéticas herdadas ou adquiridas que podem levar a ativação de proto-oncogenes (como Bcl2 e MYC) ou inativação de genes supressores (como TP53), e alterações em transdução de sinais que são descritas tanto em humanos como em cães (RICHARDS; SUTER 2015). A relação entre linfoma canino e humano reforça-se pelo fato do tumor apresentar vias moleculares comuns entre as espécies, destacando-se principalmente a via do Nf-κB, a do receptor de células B, a via antiapoptótica Bax/BCL2 e a via do supressor tumoral p16/Rb, além de semelhanças entre técnicas de hibridação genômica comparada, da qual se encontrou desregulação nos genes MYC, PDGFR $\alpha$ , KIT, HSF1 e LDHB (ARICO et al., 2014; RICHARDS; SUTER 2015). Além da origem genética, agentes infecciosos, fatores ambientais ou imunológicos e mais recentemente a metilação do supressor tumoral TFPI-2 como mecanismo epigenético em LDGCB de cães foram descritos (VAIL et al., 2013, FERRARESO et al., 2014).

Histologicamente, o linfoma é classificado em Hodgkin e não-Hodgkin, dependendo da presença de células Reed Sternberg. O linfoma Hodgkin é o mais frequentemente diagnosticado nos humanos com incidência de 85%, enquanto o linfoma não-Hodgkin acomete 15% dos casos (CANCER RESEARCH UK, 2013). Em cães, o linfoma tipo Hodgkin não é diagnosticado, uma vez que as células Reed Sternberg não são identificadas no tumor, sendo 100% dos linfomas classificados como não-Hodgkin. O LDGCB é o tipo histológico mais frequente na espécie humana e veterinária (SWERDLOW et al., 2008; PONCE et al., 2010; VALLI et al., 2011), sendo constituído por células linfoides malignas arredondadas em padrão difuso e com núcleos amplos, como ilustrado na Figura 1.



**Figura 1** Fotomicrografia de LDGCB em linfonodo de cão. Observam-se células linfoides malignas em padrão difuso de formato arredondado com núcleos amplos, moderado pleomorfismo, citoplasma escasso e nucléolo central (seta) ou múltiplos nucléolos (cabeça de seta). HE, 40x.

A forma mais comum de localização anatômica do LDGCB em cães é a multicêntrica, acometendo, na maioria dos casos, os linfonodos periféricos (VALLI et al., 2011). O envolvimento de linfonodos mesentéricos ocorre em 15 a 20% dos casos ao passo que a pele está comprometida em até 10%; a apresentação primária em outros órgãos como o baço e o mediastino só foi confirmada em 5% dos casos de LDGCB (VALLI et al., 2011). Os sinais clínicos são inespecíficos (apatia, hiporexia,

perda de peso), entretanto, a maioria dos animais acometidos permanece assintomática (DALECK; CALAZANS; DE NARDI, 2009).

Nos exames laboratoriais, observa-se principalmente anemia normocítica normocrômica decorrente de doença crônica e eventualmente a anemia hemolítica também pode se manifestar em cães com linfoma (MADEWELL, FELDMAN, 1980). Em casos de invasão medular por linfócitos malignos (mielofitose), trombocitopenia e leucopenia podem estar presentes (VAIL et al., 2013). As alterações bioquímicas são variáveis, portanto, valores de enzimas renais e hepáticas (creatinina, ureia, ALT, AST, fosfatase alcalina) só estarão aumentadas em casos de invasão pelos linfócitos aos diferentes órgãos abdominais. A hipercalcemia constitui uma síndrome paraneoplásica frequentemente descrita em linfoma mediastinal de imunofenótipo T (VAIL et al., 2013), porém não há informações sobre a incidência da hipercalcemia especificamente em LDGCB.

O diagnóstico do LDGCB requer uma avaliação morfológica do tecido que constitui o tumor. Na maioria dos casos, uma avaliação citológica permite estabelecer o diagnóstico, porém, o exame histopatológico é considerado o padrão ouro (VAIL et al., 2013). Além de sua morfologia, técnicas complementares como as de imunohistoquímica, imunocitoquímica, citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase do reordenamento do receptor de antígeno (PARR, do inglês *Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements*), também podem auxiliar a definir o imunofenótipo, taxas de proliferação e clonalidade (THALHEIM et al., 2013).

Posteriormente ao diagnóstico, o conhecimento da extensão da doença ou estadiamento é indispensável. Para isso, deve-se identificar o envolvimento de linfonodos periféricos e de outros órgãos não linfoides, proceder com radiografias de tórax em três projeções ou tomografia computadorizada e ultrassom abdominal, além de avaliar a medula óssea mediante mielograma (VAIL et al., 2013). Adicionalmente, o estadiamento clínico envolve o subestádio, considerando-se o subestádio “a” quando não existem sinais clínicos decorrentes do linfoma, e “b”, quando os sinais clínicos estão presentes (febre, apatia, anorexia, vômito, diarreia) (VAIL et al., 2013). O estadiamento seguindo a classificação WHO é descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sistema de estadiamento clínico seguindo a classificação WHO para linfoma canino (VAIL et al., 2013).

<b>Estádio</b>	<b>Descrição</b>
<b>I</b>	Envolvimento limitado a um linfonodo ou órgão linfoide (com exceção da medula óssea)
<b>II</b>	Envolvimento de vários linfonodos em um região do corpo
<b>III</b>	Envolvimento de todos os linfonodos
<b>IV</b>	Envolvimento de todos os linfonodos e fígado e/ou baço
<b>V</b>	Estádio III ou IV e manifestação em sangue, invasão na medula óssea e/ou outros órgãos não linfoides
<b>Subestádio</b>	
<b>A</b>	Sem sinais clínicos
<b>B</b>	Com sinais clínicos

Os critérios da classificação histopatológica dos linfomas baseiam-se em sua morfologia distintiva e características imunofenotípicas. Muitos sistemas foram empregados para classificar o LNH em humanos e algumas dessas classificações foram aplicadas também a cães (*The National Cancer Institute Working Formulation* e o sistema atualizado de Kiel) (VAIL et al., 2013). Entretanto, o sistema adotado pela *World Health Organization* (WHO) (VALLI et al., 2011) buscou classificar o linfoma relacionando-o à anatomia, histologia, tipo celular e imunofenótipo (B, T ou não-B não-T) e obteve concordância de 83% entre patologistas, tornando-se o sistema de classificação mais aplicável e mais utilizado mundialmente (VAIL et al., 2013).

Em humanos, o LDGCB é o subtipo mais comum e é descrito como o tumor maligno linfoide mais frequente e um dos mais agressivos, caracterizado pelo rápido crescimento e comportamento biológico e clínico heterogêneo (HUNT; REICHARD, 2008; NASTOUPIL; ROSE; FLOWERS, 2012). Em cães, o LDGCB também é o subtipo de linfoma mais comum (VALLI et al., 2013), e embora ambas as espécies inicialmente apresentem rápida resposta à quimioterapia (taxa de remissão até de

90% em cães), quase invariavelmente ocorre a resistência ao tratamento resultando na recidiva do linfoma (MUDALIAR et al., 2013).

De maneira semelhante aos homens, o LDGCB em cães é considerado uma doença sistêmica agressiva e deve ser tratado com poliquimioterapia. O protocolo mais utilizado em cães é o CHOP, que é constituído por uma combinação de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona com uma taxa de resposta de 80 a 95% e tempo médio de sobrevida de 12 meses, porém, taxas de resposta e duração da remissão são variáveis e dependem da presença de fatores prognósticos (KELLER et al., 1993; KAISER et al., 2007; SIMON et al., 2008; VAIL et al., 2013). Em humanos, a presença desses fatores encontra-se melhor estabelecida e, em alguns casos, o tratamento é complementado pelo emprego de outras terapias como radioterapia e imunoterapia (ZELENETZ et al., 2014).

Os fatores prognósticos mais importantes envolvidos em linfoma canino são o imunofenótipo e o estadiamento clínico: diversos estudos comprovam que o imunofenótipo T promove prognóstico desfavorável quando comparado ao imunofenótipo B (TESKE et al., 1994; RUSLANDER et al., 1997; MARCONATO et al., 2011; VAIL et al., 2013), assim como relatam-se tempos de sobrevida mais curtos em pacientes clinicamente doentes (subestádio b) em relação aos assintomáticos (subestádio a) (TESKE et al., 1994; JAGIELSKI et al., 2002; VAIL et al., 2013). Outros fatores como hipercalcemia, anemia, linfadenopatia mediastinal cranial, estágio V, tratamento prévio com corticoide e a neutropenia durante o tratamento quimioterápico, podem estar associados com tempos de sobrevida mais curtos ou baixa taxa de resposta à quimioterapia (TESKE et al., 1994; ABBO; LUCROY, 2007; MILLER et al., 2009; MARCONATO et al., 2011; WANG et al., 2015), porém, esses estudos não consideram os tipos histológicos de linfoma. Especificamente para o LDGCB apenas a relação monócito/linfócito e o valor de Ki67, mediante citometria de fluxo, foram identificados como fatores prognósticos. (MARCONATO et al., 2015; POGGI et al., 2016).

## **2.2 Relação entre Bcl2, C-MYC, e índices de proliferação celular Ki67 e IM em LDGCB**

Entre os principais pilares do câncer, a evasão da apoptose e o potencial de proliferação ilimitada foram reconhecidos como mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Assim, as coexpressões do oncogene MYC e da primeira família relatada de oncogenes relacionada à apoptose, BCL2 (CHONGHAILE et al., 2011), foram associadas à patogênese do linfoma (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Dentro desse contexto, o Bcl2 foi associado com o subtipo Centro Germinal de células B em humanos e demonstrou ter relação com prognóstico desfavorável (BAI et al., 2004, LETAI, 2008). Esta proteína origina-se de um erro no controle da transcrição do gene BCL2 (TOMITA, 2011). Em cães, existe evidência da expressão desta proteína em tumor venéreo transmissível (TVT) (STOCKMANN et al., 2011). Já em linfomas, a proteína Bad que forma parte da família do gene BCL2, mostrou marcação acentuada por imuno-histoquímica em linfomas especialmente do tipo B (DETTWILER et al., 2013).

O gene C-MYC encontra-se ampliado em vários tipos de neoplasias em humanos e em cães (DANG 1999, INOUE; [SHIRAMIZU 1999;](#)) e é considerado um dos genes que possuem potencial neoplásico dentro da família de oncogenes MYC, a qual está envolvida na regulação da apoptose e processos celulares como metabolismo, proliferação e diferenciação celular (TOMITA 2011; HORN et al., 2013). A alta expressão imuno-histoquímica do MYC está associada com prognóstico desfavorável em homens com LDGCB, uma vez que promove tempo de sobrevida e período livre de doença mais curtos (HORN et al., 2013; ZHOU et al., 2014). Além disso, quando associado com a expressão imuno-histoquímica de Bcl2, estes constituem um “alvo duplo”, frequentemente associado com pior prognóstico em LDGCB e algumas leucemias humanas (TOMITA, 2011; GREEN et al., 2012; JOHNSON et al., 2012). Essa associação demonstrou ser um dos primeiros mecanismos que quando acionados, permite às células tumorais evadirem da apoptose, já que a função anti-apoptótica do BCL2 associada com o aumento da

proliferação induzido pelo MYC, resultam na proliferação descontrolada (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O Ki67 é uma proteína expressada em todas as fases do ciclo celular com exceção da fase G0 e maior expressão na mitose. Em linfomas, Miller et al., (1994) demonstrou que este fator de proliferação celular apresentou relação com o prognóstico. Por outro lado, em cães, sua relação com o grau histológico e comportamento biológico mais agressivo tem sido descrita (FOURNEL-FLEURY et al., 1997). Embora a associação entre Ki67 e prognóstico ainda seja discutida (KIUPEL et al., 1999; ZACCHETTI et al.; 2013; VAIL et al., 2013), a relação da sua expressão com mais fatores prognósticos podem produzir informações valiosas sobre o comportamento do linfoma em cães, como já demonstrado em humanos (BROYDE et al., 2009). O anticorpo utilizado para identificar o Ki67 em reações de imunohistoquímica é o MIB-1, amplamente empregado na avaliação de alguns tipos de linfomas agressivos e outros tumores em humanos (CATTORETTI et al., 1992, NETO et al., 2001). Em cães, a utilização do MIB-1 também descreveu-se em vários tumores, demonstrando resultados variáveis (WATERS et al., 1997; ROELS et al., 1999; MATIASEK et al., 2009), porém, sua associação com LDGCB e outros marcadores não foram relatadas.

Assim como Ki67, o índice mitótico (IM) também é um indicador de proliferação celular que foi identificado como fator prognóstico em linfoma não-Hodgkin humano (AKERMAN et al., 1987) e outros linfomas de células B (RATY et al., 2002; SCHRADER et al., 2004). Apesar de algumas pesquisas terem sugerido que o IM não constitui um fator prognóstico em diferentes tipos de linfoma canino (KIUPEL et al., 1999, DOBSON et al., 2001, FLOOD-KNAIP et al., 2013), um estudo realizado com 379 cães com linfoma multicêntrico revelou uma relação significativa entre tempo de sobrevida curto e IM superior a 21 (VALLI et al., 2013).

### **3 MATERIAL E METODOS**

#### **3.1 Seleção de casos**

Foram selecionados blocos de parafina contendo amostras de linfonodos de cães com linfoma, atendidos em centros veterinários do Estado de São Paulo, a partir de janeiro de 2009 até janeiro de 2015. Todos os pacientes cumpriram dois critérios de inclusão: (1) diagnóstico histopatológico de LDGCB seguindo-se a classificação WHO (VALLI et al., 2011), (2) tratados exclusivamente com protocolo CHOP 19 semanas (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e prednisona) preconizado pela universidade de Madison-Wisconsin (VAIL et al., 2013). Adicionalmente, foram selecionadas como controle, 5 amostras de linfonodo poplíteo de cães saudáveis. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes, como raça, peso, idade, sexo, sinais clínicos e tempo de sobrevivência foram obtidos dos prontuários de cada animal. O estadiamento clínico foi estabelecido por exame físico completo, hemograma, bioquímica sérica básica (creatinina e alanina aminotransferase), ultrassom abdominal e radiografias de tórax em três projeções. Punção de medula óssea foi realizada em pacientes com evidência de linfócitos atípicos no sangue periférico, linfocitose ou pancitopenia detectada no primeiro hemograma (VAIL et al., 2013). O subestádio foi classificado em “a” quando não existiam sinais clínicos e “b” quando o paciente apresentava sinais gastrointestinais, respiratórias, febre, depressão ou letargia.

Considerou-se como tempo de sobrevivência, o tempo transcorrido entre o dia da consulta e o óbito dos animais. Para estimar o tempo de sobrevivência dos animais que permanecem vivos, considerou-se a data do último retorno ao hospital veterinário. Todas as amostras foram avaliadas pelo mesmo patologista e a imunofenotipagem foi realizada mediante técnica de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos CD3 para identificar linfócitos T e CD79a para linfócitos B.



### 3.2 Técnica de imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para determinar a marcação do C-MYC, Bcl2 e Ki67 e realizou-se no Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Campus Botucatu. Os espécimes incluídos em parafina foram submetidos a cortes de três micrômetros e montados em lâminas silanizadas (Starfrost – Knittel). Em seguida, as amostras foram submetidas a reações imuno-histoquímicas, utilizando-se anticorpos C-MYC, clone c-19 (1:300, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bcl2, policlonal (1:500, Santa Cruz Biotechnology) e MIB-1 (1:100, Dako).

Após desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato pH 6, em câmara de pressão Pascal (DakoCytomation). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de bloqueio pronta para uso (Spring Biosciences) seguindo indicações do fabricante. Após essa etapa, procedeu-se o bloqueio de reações inespecíficas com *protein block* (Novocastra) e os cortes foram incubados com os anticorpos primários durante duas horas a temperatura ambiente de 27° C. O anticorpo secundário HistoFine (Nichirei Biosciences) foi utilizado nas reações e a revelação foi obtida pelo substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) (Novolink). A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra de próstata canina sabidamente positiva para o C-MYC, uma amostra de tonsila humana para o Bcl-2 e uma amostra de linfoma canino sabidamente positivo para o MIB-1. Os controles negativos foram feitos substituindo-se os anticorpos primários por diluentes de anticorpo.

### 3.3 Análise dos resultados

Para os marcadores C-MYC e Bcl2 a interpretação dos resultados da imunohistoquímica foi calculado por porcentagem de área de células neoplásicas marcadas. Este cálculo foi realizado sob microscopia de luz, escolhendo-se aleatoriamente áreas positivas na objetiva de 10x e posteriormente, avaliando-se a média de cinco campos na objetiva de 40x, com o auxílio do equipamento de análise de imagens (ImageJ 1.49) acoplado em um microscópio de luz (Nikon E200). Para Ki67, optou-se pela técnica de contagem descrita por Webster et al., (2007) para mastocitoma canino, deste modo escolheram-se as áreas com maior marcação na objetiva de 10x e contou-se manualmente o total do número de células positivas em uma área de 1 cm<sup>2</sup>, utilizando-se gráticula de 10 x 10 mm acoplada a microscópio de luz (Nikon E200). Foram avaliados cinco campos na objetiva de 40x para estabelecer a média de marcação. Para determinar IM, utilizou-se a técnica descrita por Romansik et al., (2007), sendo assim, contou-se o total de figuras mitóticas em 10 campos na objetiva de 40x, nas áreas de maior atividade mitótica e calculou-se posteriormente a média.

Foram estabelecidos pontos de corte para todos os marcadores, calculando-se as médias de células positivas para C-MYC, Bcl2, Ki67 e do IM. A média da porcentagem das amostras positivas para C-MYC foi de 21 e para o Bcl2 foi de 32,5. A média do número de células positivas para Ki67 foi de 107 e do IM de 21. Posteriormente, os valores de C-MYC, Bcl2, Ki67 e IM foram classificados e definidos como “baixo” ou “alto” tendo como referência o ponto de corte já citado. Para se estabelecer o alvo duplo MYC/Bcl2 aplicou-se sistema de escores semelhante ao descrito por Green et al. (2012), considerando-se como verdadeiro alvo-duplo somente o escore 2 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Escores de marcação para o Bcl2 e C-MYC utilizados para estabelecer o alvo-duplo.

	<b>BCL2</b>	<b>C-MYC</b>
<b>Escore 0</b>	< 30%	< 20%
<b>Escore 1</b>	< 30%	>20%
	> 30%	< 20%
<b>Escore 2</b>	> 30%	> 20%

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para comparar as médias entre C-MYC e o grupo controle, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Para comparar as médias entre Bcl2 e o grupo controle, utilizou-se o teste *t*. Os graus de associação entre os diferentes marcadores foram estimados através do coeficiente de correlação de Spearman. O teste exato de Fisher foi aplicado para investigar possíveis associações entre os marcadores e o estadiamento clínico (estádios III ou IV e subestádio a ou b). Curvas de sobrevida foram estimadas e comparadas entre os grupos “baixo” e “alto” de cada marcador e entre os escores 0, 1 e 2 do alvo duplo, utilizando-se o método de Kaplan-Meier e teste de log-rank. Para estas análises, utilizou-se o programa GraphPad Prism, versão 6.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dados da população

As raças mais acometidas neste estudo foram os da raça Rottweiler (n=6), seguidos pelos sem raça definida (SRD) (n=5). Demais cães pertenciam às raças Schnauzer (n=3), Poodle (n=3), Labrador (n=2), Boxer (n=2), Pit Bull Americano (n=2), Basset Hound (n=1), Golden Retriever (n=1), Maltês (n=1), Pastor Alemão (n=1), Fox Terrier (n=1), Bull Terrier (n=1), e Beagle (n=1). A média de idade de apresentação foi de 8,6 anos (intervalo: 4-14), sendo 19 fêmeas e 11 machos. Baseado no estadiamento clínico, seis pacientes apresentaram estágio III; 23, estágio IV e um paciente, estágio V. A maioria dos animais encontrava-se sem sinais clínicos da doença, sendo 19 deles classificados em subestádio “a” e 11 com subestádio “b” (Tabela 3).

Quatorze cães de diversas raças morreram em decorrência da doença antes de terminarem o protocolo, e interessante, 83% e 100% dos pacientes das raças Rottweiler e SRD estiveram em remissão durante o tempo total do protocolo. Dois cães continuam vivos no momento da elaboração deste artigo, com tempos de sobrevivência de 252 e 420 dias. A taxa de sobrevivência calculada em um ano foi de 27,5%, e em dois anos, 0%.

Dentre os estudos realizados especificamente em cães com LDGCB, o cão SRD é o mais acometido (FERRARESO et al., 2014; MARCONATO et al., 2015), semelhantemente ao observado em nosso estudo, já que cães SRD apresentaram a segunda maior ocorrência, representando 16,5% dos pacientes. A raça mais frequente foi a Rottweiler, que alcançou 20% do total de casos de LDGCB. Cães dessa raça parecem ter maior predisposição a este tipo de linfoma, já que foi a segunda raça mais afetada (9,8%) em um estudo de Marconato et al., (2015) que avaliaram 51 cães. Em

outro estudo, os Rottweilers (10,7%) também foram a segunda raça mais frequente dentro de um total de 28 pacientes com LDGCB (ARESU et al., 2015). Apesar dos dados descritos, nenhum dos estudos oferece um número de animais suficientemente significativo para concluir que a raça Rottweiler é de fato predisposta a desenvolver LDGCB. Outras raças como o Golden Retriever e Labrador também são descritas como predispostas (ARESU et al., 2014; FERRARESO et al., 2014; MARCONATO et al., 2015), porém em menor número que o SRD e o Rottweiler, assim como observado neste estudo.

A média de idade de apresentação foi semelhante à relatada na literatura, cujas pesquisas revelam que o LDGCB é mais frequente em cães com 7,5 a 8 anos (FERRARESO et al., 2014; MARCONATO et al., 2015). A maioria dos pacientes apresentaram estágio IV (76,5%), e não apresentaram sinais clínicos decorrentes da neoplasia (subestádio "a") (64%) o que também pode ser observado em estudos prévios (MARCONATO et al., 2015). Uma pesquisa conduzida por Mutz et al. (2015), envolvendo 77 cães com linfoma multicêntrico, demonstrou maior número de pacientes em estágio V que IV. Contudo, este estudo realizou imunofenotipagem só em 61% dos casos e considerou cães com linfomas de imunofenótipos T e B, sem conclusões específicas para o LDGCB.

Em relação ao tempo de sobrevida no total dos pacientes estudados foi de 221 dias, dado similar aos estudos sobre LDGCB (VALLI et al., 2013); outros autores descreveram médias de tempos de sobrevida mais longos e taxas de sobrevida em dois anos de 10% em cães com linfoma multicêntrico tratados com o protocolo CHOP 19 semanas (VAIL et al., 2013), porém nesses estudos, não há diferenciação entre os tipos histológicos de linfoma.

**Tabela 3** Características clínicas dos pacientes caninos com LDGCB analisados nesses estudo.

	<b>N</b>	<b>(%)</b>
<b>SEXO</b>		
Macho	11	36
Fêmea	19	64
<b>RAÇA</b>		
Rottweiler	6	20
SRD	5	16,5
Schnauzer	3	10
Poodle	3	10
Labrador	2	6,5
Outras raças	11	37
<b>ESTÁDIO CLÍNICO</b>		
III	6	20
IV	23	76,5
V	1	3,5
<b>SUBESTÁDIO CLÍNICO</b>		
A	19	64
B	11	36

## 4.2 Imunomarcação de C-MYC e Bcl2

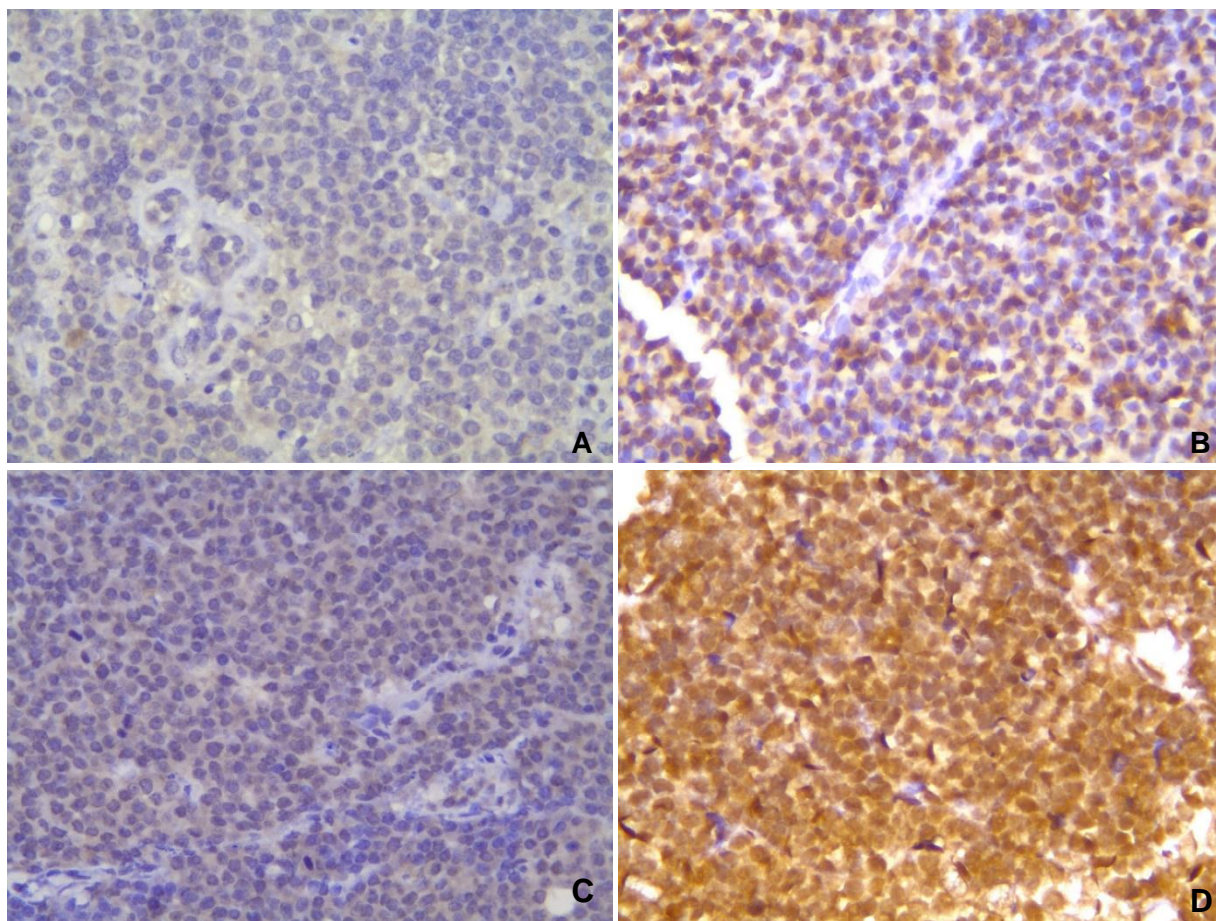
A marcação celular do C-MYC foi tanto nuclear como citoplasmática, enquanto a do Bcl2 foi predominantemente citoplasmática (Figura 2). O ponto de corte para C-MYC foi de 21 (intervalo: 2,5-53,5) e para Bcl2 de 32,5 (intervalo: 16,9 – 76,8). As médias das imunomarcações de C-MYC e Bcl2 nos LDGCB foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) às médias do grupo controle (C-MYC: 3,1 e Bcl2: 20,5) (Figura 3A e 3B). Quando comparadas as imunomarcações com os estádios III e IV e subestádios “a” e “b”, não foi encontrada diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Tendo como referência o ponto de corte, foram identificados dois grupos para o C-MYC, considerando o  $C-MYC < 21$  ( $n=18$ ) e o  $C-MYC \geq 21$  ( $n=12$ ), cujos tempos de sobrevivência foram de 187 e 237 dias, respectivamente. Não houve diferença significativa entre esses dois grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 3C). Da mesma maneira, foram classificados dois grupos para o Bcl2:  $Bcl2 < 32,5$  ( $n=18$ ) e  $Bcl2 \geq 32,5$  ( $n=12$ ), com tempos de sobrevivência de 233 e 191 dias, respectivamente. Não houve diferença significativa entre esses dois grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 3D).

Em relação ao alvo duplo MYC/Bcl2, ao analisar os escores de marcação, não se encontrou diferença entre os tempos de sobrevivência dos escores 0 (216 dias), 1 (168 dias) e 2 (259 dias) ( $p > 0,05$ ) (Figura 3E). Contudo, quando comparadas as expressões dos marcadores entre si, houve correlação positiva entre C-MYC x Bcl2 ( $r=0,5202$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 3F).

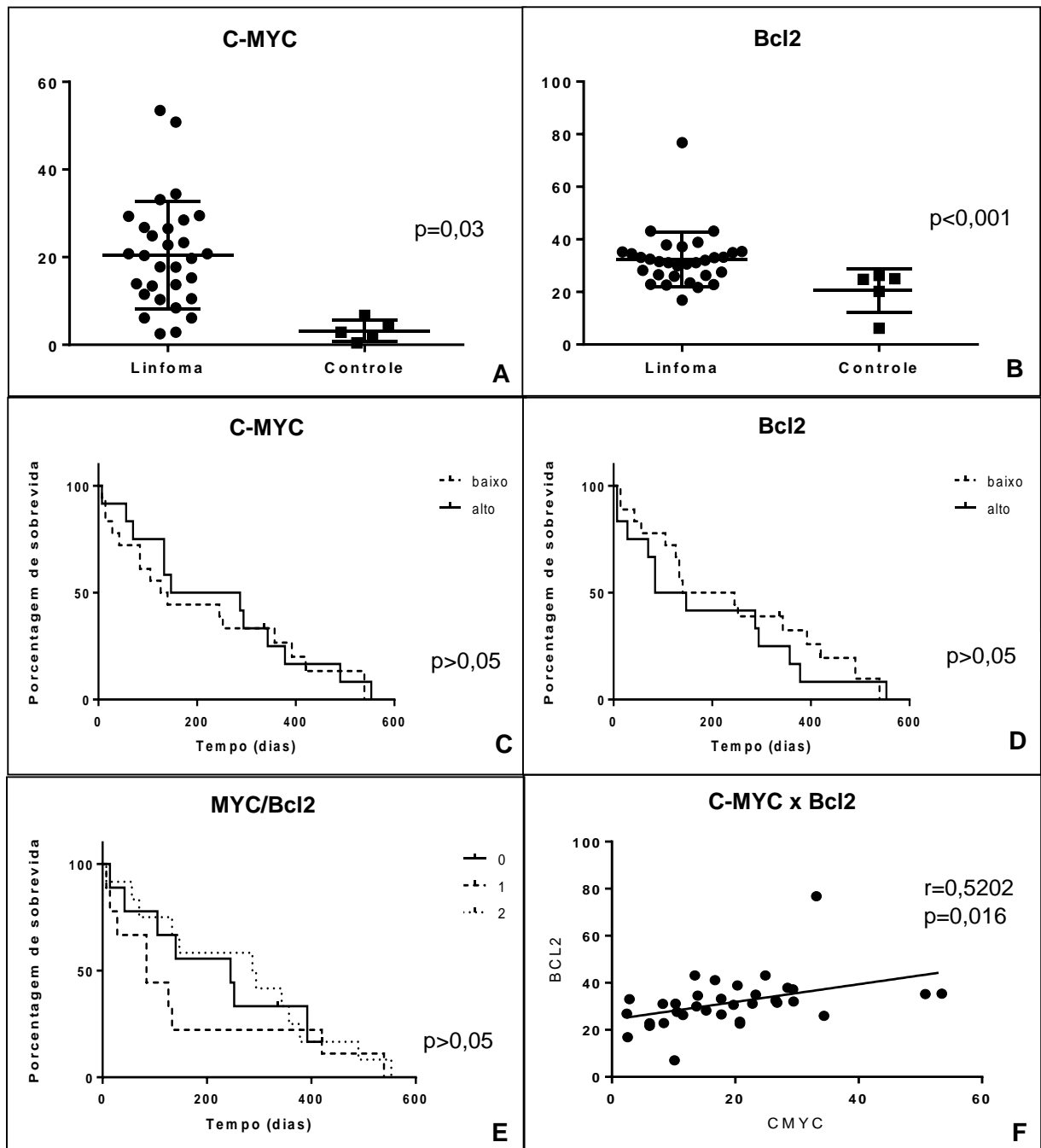
A literatura disponível sobre a marcação imuno-histoquímica do C-MYC e Bcl2 em LDGCB em cães é limitada a duas pesquisas publicadas em forma de resumo (NGUYEN et al., 2013; CURRAN et al., 2015), o que impede uma análise comparativa mais criteriosa. No nosso estudo, a imunoexpressão do C-MYC foi encontrada tanto no citoplasma como no núcleo, o que contrasta com os estudos realizados em humanos que descrevem marcação exclusivamente nuclear (KLUK et al., 2012; GREEN et al., 2012; JONHSON et al., 2012). Ademais, Kluk et al. (2012) associaram a marcação nuclear acima do 50% com translocações no gene MYC, que por sua vez,

associaram-se com tempo de sobrevivência mais curto em pessoas com LDGCB. Em cães, a marcação nuclear e citoplasmática do C-MYC foi previamente descrita em amostras de próstata normal e carcinoma prostático (FONSECA-ALVES et al., 2013). A marcação do Bcl2 foi preferencialmente citoplasmática, semelhantemente a estudo conduzido em linfoma humano (GREEN et al., 2012) e a outro estudo de Stockmann et al. (2011) em cães, cuja marcação do Bcl2 foi citoplasmática em amostras de TVT.



**Figura 2.** Fotomicrografias da marcação do C-MYC e Bcl2 em LDGCB de cães. (A) C-MYC<21 “baixo”. (B) C-MYC>21 “alto” com evidência de células MYC positivas com marcação tanto nuclear como citoplasmática. (C) Bcl2<32,5 “baixo”. (D) Bcl2>32,5 “alto”, observa-se marcação predominantemente em citoplasmática. Histofores, DAB, 40X.





**Figura 3** Representação gráfica dos resultados de C-MYC e Bcl2. (A) Diagrama de caixa representando a imunomarcagem de C-MYC entre grupos LDGCB e controle. Houve diferença significativa pelo teste  $t$  ( $p<0,05$ ). (B) Diagrama de caixa representando a imunomarcagem de Bcl2 entre grupos LDGCB e controle. Houve diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney ( $p<0,05$ ). (C) Curvas de sobrevivência de cães com LDGCB com C-MYC “baixo” e C-MYC “alto”. Não houve diferença significativa pelo teste de logrank ( $p>0,05$ ). (D) Curvas de sobrevivência de cães com LDGCB com Bcl2 “baixo” e Bcl2 “alto”. Não houve diferença significativa pelo teste de logrank ( $p>0,05$ ). (E) Curvas de sobrevivência de acordo com os escores de marcação 0, 1 e 2 para o alvo duplo MYC/Bcl2, sem diferença significativa pelo teste de logrank ( $p>0,05$ ). (F) Relação entre C-MYC e Bcl2 em amostras de LDGCB de cães. Observar correlação positiva pelo teste de Spearman ( $p<0,05$ ).

Estudos prévios em humanos demonstraram que a expressão proteica do MYC e Bcl2 obedecem a translocações dos oncogenes MYC e Bcl2 e que isoladamente representam um fator prognóstico negativo para LDGCB nesta espécie (IQBAL et al., 2006; KLUK et al., 2012). Embora a maior expressão do MYC e Bcl2 tenha sido comprovada em amostras de LDGCB em relação aos linfonodos controle, nesse estudo nenhuma associação foi identificada entre o C-MYC ou Bcl2 com os tempos de sobrevida, nem com o estadiamento clínico. Nesse contexto, concordando com estes resultados, Tang et al. (1994) também encontraram alta expressão da proteína Bcl2 em LDGCB humano, sem associação com o prognóstico.

A heterogeneidade das funções do oncogene MYC pode explicar a controvérsia existente entre alguns estudos conduzidos em humanos, já que apesar da maioria das pesquisas demonstraram que a translocação do oncogene MYC e a expressão da proteína MYC estão associadas com pior prognóstico em LDGCB (SAVAGE et al., 2009; KLUK et al., 2012; GREEN et al., 2012; PERRY et al., 2014), outros estudos não encontraram essa associação (KRAMER et al., 1998; KAWASAKI et al., 2001). Acredita-se que a função de proliferação celular mediante mecanismos antigênicos e metabólicos esteja aumentada em pacientes com translocações do oncogene MYC (THIEBLEMONT, BRIERE, 2013). Porém, discordando desta hipótese, Johnson et al. (2012) observaram que células MYC positivas apresentaram baixas taxas de proliferação celular, não relacionadas a pior prognóstico. No nosso estudo, a média do tempo de sobrevida dos cães do grupo C-MYC alto, foi maior em relação ao o grupo C-MYC baixo, concordando com o único estudo publicado em cães por Curran et al. (2015), que analisaram 43 cães com LDGCB e encontraram maior tempo livre de doença e de sobrevida em pacientes do grupo C-MYC alto. Sendo assim, é possível que a expressão proteica por imuno-histoquímica do C-MYC em cães com LDGCB? não represente a função proliferativa própria do oncogene MYC, e sim a de apoptose celular.

Do mesmo modo que as expressões individuais do MYC e Bcl2 estão associadas com o prognóstico em LDGCB em humanos, a associação entre eles, denominado de alvo duplo MYC/Bcl2, está associado com tempo de sobrevida mais curto e, portanto, com pior prognóstico (JONHSON et al., 2009, TOMITA, 2011, GREEN et al., 2012). Sabe-se que a expressão proteica do MYC ocorre também como

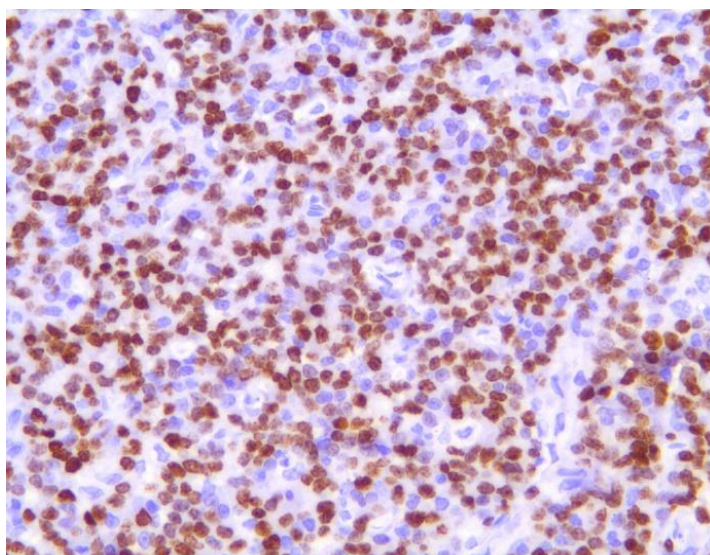
consequência da inativação do p53, ativação da via Nf-kB e perda da imunidade do hospedeiro (WIERSTRA; ALVES, 2008), e que a sua expressão por imunohistoquímica representa o resultado final de todos os mecanismos envolvidos na desregulação do gene MYC (JONHSON et al., 2012). Tanto MYC como Bcl2, são reconhecidos como oncogenes altamente expressos em LDGCB na espécie humana (IQBAL et al., 2006, SAVAGE et al., 2009). No nosso estudo, a associação do alvo duplo MYC/Bcl2 com prognóstico não foi comprovada em cães com LDGCB, o que contrasta com os estudos em linfomas humanos (JONHSON et al., 2009, TOMITA, 2011, GREEN et al., 2012). Porém, em medicina veterinária, há dois estudos que consideraram o alvo duplo em cães com LDGCB, revelando resultados contrastantes: um demonstrou que o grupo de pacientes positivos apresentou média de tempo de sobrevida mais curto (NGUYEN et al., 2013), ao passo que o outro estudo descarta esta associação (CURRAN et al., 2015). Adicionalmente, o esquema de escores utilizado por ambos foi parcialmente descrito.

Algumas peculiaridades da técnica de imunohistoquímica como a escolha do anticorpo e do sistema de escores de marcação podem interferir no resultado final (GREEN et al., 2012). Contudo, no nosso estudo, utilizaram-se anticorpos previamente empregados em tecido canino (STOCKMANN et al., 2011; FONSECA-ALVES et al., 2013), que, somados aos controles positivos e negativos nas reações imunohistoquímicas, comprovaram sua aplicabilidade em amostras de LDGCB de cães. Na maioria dos estudos a respeito do alvo duplo, o escore de marcação é dependente do ponto de corte para cada anticorpo. Não existe um ponto de corte definido para cada anticorpo, considerando-se as espécies humana e canina, o que limita as comparações entre os estudos (LOSSOS; MORGENZTERN, 2006). Neste estudo, definiu-se o ponto de corte calculando-se a média de marcação para cada anticorpo, assim foi possível classificar as amostras em dois grupos (“baixo” e “alto”), porém não se obteve diferença significativa nas curvas de sobrevida entre ambos grupos, nem entre os escores de marcação. Entre os pontos de corte definidos por outros autores, é possível citar a mediana de marcação descrita por Green et al. (2012), e o valor definido pelo sistema X tile, que permite identificar o ponto de corte baseado na relação entre o marcador e o tempo de sobrevida mediante um sistema de construção de imagens descritos por Johnson et al. (2012).

Quando analisadas as marcações do C-MYC e Bcl2 encontrou-se uma correlação positiva entre as expressões de cada anticorpo, o que pode ser resultante de uma cooptação das funções desses oncogenes. O oncogene MYC, além de influenciar a proliferação e diferenciação celular, tem uma função relevante na via da apoptose celular, e o Bcl2 constitui o gene que modula esse efeito apoptótico devido ao seu papel fortemente anti-apoptótico (BISSONNETTE et al., 1992). Acredita-se que esse efeito celular duplo (proliferação e anti-apoptose) explique o porquê do prognóstico desfavorável em pessoas com alvo duplo positivo em LDGCB. Inclusive, esta correlação pode ser comparada com os resultados obtidos por Schmitt et al. (2001) que demonstraram que o Bcl2 interfere na resistência à quimioterapia em ratos MYC positivo.

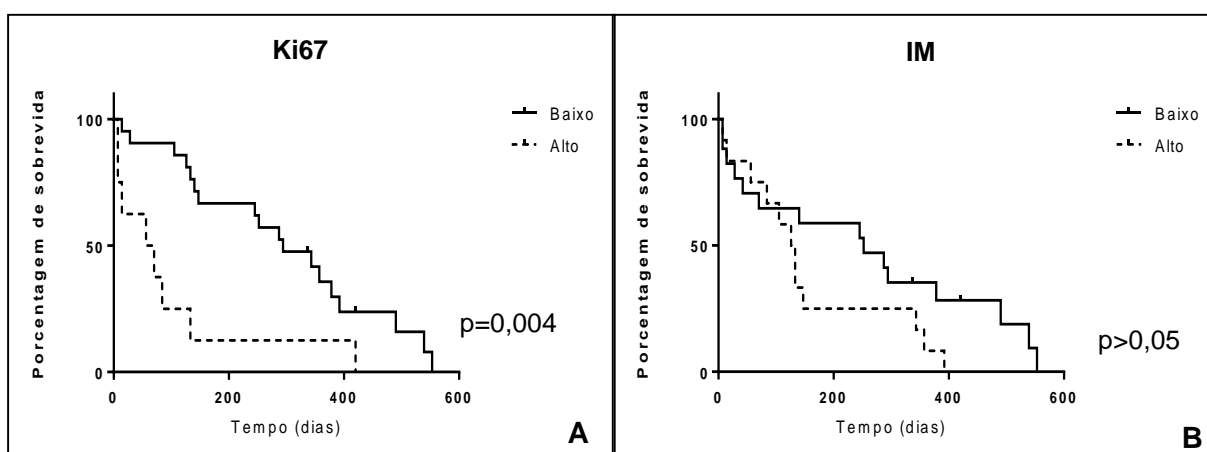
#### **4.3 Imunomarcacão de Ki67 e IM**

O Ki67 foi positivo em todas as amostras, porém um paciente apresentou média de marcação de 1 célula positiva em 1 cm<sup>2</sup> na objetiva de 40x. A marcação do Ki67 foi exclusivamente nuclear (Figura 4). O ponto de corte para o Ki67 foi de 107 (intervalo: 1 – 446) e de IM foi de 21 (intervalo: 0-73). Baseado no ponto de corte, foram identificados dois grupos considerando-se Ki67<107 (n=21) e Ki67≥107 (n=9), cujas médias dos tempos de sobrevida foram de 281 e 98 dias, respectivamente. A diferença entre as médias foi significativa ( $p<0,05$ ) (Figura 5A). Em relação ao ponto de corte do IM foram classificados dois grupos, sendo IM<21 (n=17) e IM≥21 (n=13), cujas médias dos tempos de sobrevida foram de 241 e 158 dias, respectivamente, porém sem diferença significativa ( $p>0,05$ ) (Figura 5B).

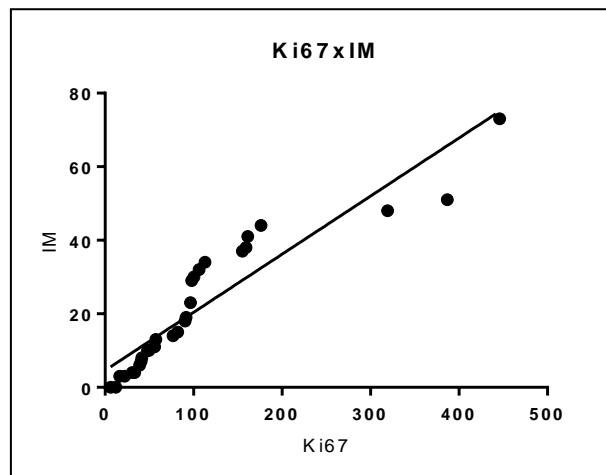


**Figura 4** Fotomicrografia da marcação nuclear do Ki67 em LDGCB de cão. As células positivas foram contadas na área total de 1 cm<sup>2</sup> com auxílio de graticula de 10 x 10 mm. MIB-1, Histofine, DAB, 40x.

Quando comparados os valores de Ki67 e IM com os estádios III ou IV e subestádios “a” ou “b”, não foi observada diferença estatística ( $p>0,05$ ), assim como quando comparados com C-MYC e Bcl2 ( $p<0,05$ ). Como esperado, houve forte correlação positiva entre a marcação de Ki67 e o IM ( $r=0,9995$ ,  $p<0,0001$ ) (Figura 6).



**Figura 5** (A) Curvas de sobrevivência de cães com LDGCB com Ki67 < 107 “baixo” e Ki67 ≥ 107 “alto”, encontrou-se diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0,004$ ). (B) Curvas de sobrevivência de cães com LDGCB com IM < 21 “baixo” ( $n=17$ ) e IM ≥ 21 “alto” ( $n=13$ ), sem diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).



**Figura 6** Relação entre Ki67 e IM em amostras e LDGCB de cães. Observar correlação positiva pelo teste de Spearman ( $p < 0,05$ ).

O Ki67 e o IM têm sido considerados fatores prognósticos em cães com mastocitoma ou melanoma (ROMANSIK et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; SMEDLEY et al., 2011). O Ki67 é uma proteína conservada no núcleo que mantém a estrutura do DNA durante a mitose e é expressa nas fases G1, S, G2 e M (SAWHNEY; HALL, 1992), dessa forma, identifica células em proliferação, característica marcante em pacientes com câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Embora a proliferação celular em linfomas tenha sido previamente relacionada a múltiplas origens, como mutações e erros em codificação dos genes Bcl2 e MYC (SAVAGE et al., 2009), o resultado deste estudo não identificou correlações entre os anticorpos C-MYC ou Bcl2 com Ki67 ou IM. Contudo, nosso resultado concorda com o demonstrado por Kluk et al. (2012) e Johnson et al. (2012), que concluíram que o Ki67 não é um indicador das translocações do gene MYC e portanto, não constitui um indicador na sua expressão por imuno-histoquímica.

Existem apenas duas pesquisas recentemente publicadas que avaliaram o prognóstico especificamente em cães com LDGCB. O estudo desenvolvido por Marconato et al. (2015) que definiu o índice linfócito/monócito  $< 1,2$  mediante citometria de fluxo, como fator prognóstico e similarmente Poggi et al. (2016) quantificou o Ki67 também por citometria de fluxo, e observaram tempos de sobrevida

mais curtos, tornando o Ki67 um fator prognóstico em cães com LDGCB. Esse resultado pode ser favoravelmente comparado com o presente estudo, que demonstra a relação existente entre a imunomarcação do Ki67 e tempos de sobrevida mais curtos.

O ponto de corte Ki67 de 107 células marcadas encontrado nesse estudo, pode ser definindo como um possível fator prognóstico negativo para LDGCB na espécie canina. De maneira interessante, o estudo desenvolvido por Poggi et al. (2016) não permitiu definir um ponto de corte devido à falta de diferença estatística quando comparados os tempos de sobrevida entre grupos com valores acima e abaixo da mediana. Porém os autores encontraram associação significativa quando calcularam os valores do Ki67 em percentis, o que permitiu definir três grupos, baixo, intermediário e alto; encontrando-se associação significativa entre o grupo intermediário e tempos de sobrevida mais curtos. Embora a análise estatística seja diferente entre o estudo de Poggi et al. (2016) e o nosso, os resultados sugerem que o Ki67 se presta bem como um marcador prognóstico em cães com LDGCB. Outros autores como Philips et al. (2000), discordam com nossos resultados, já que caracterizaram o Ki67 como fator prognóstico positivo em linfoma multicêntrico canino, correlacionando-o com tempo livre de doença duradouro. Da mesma forma, o estudo desenvolvido por Kiupel et al. (1999) contradiz nossos resultados, uma vez que os pesquisadores não encontraram associação entre o tempo de sobrevida e o número de células positivas ao Ki67. Vale ressaltar que a técnica de contagem realizada pelos autores foi diferente, pois se estabeleceu o total de células positivas em 100 células malignas, sem o uso de gráticula.

Com relação ao IM, o ponto de corte aqui estabelecido não constituiu um fator prognóstico em cães com LDGCB. Esse resultado contradiz o exposto por Valli et al. (2013) que consideraram o mesmo valor de IM (21) e observaram tempo de sobrevida mais curto em 26 cães com IM >21, comparando-os com 353 cães com IM <20, todos acometidos por linfoma multicêntrico. Contudo, os LDGCB não foram discriminados de outros tipos histológicos como linfomas indolentes e outros linfomas de baixo grau, o que resultou em um grupo heterogêneo e que pode ter comprometido o resultado final.

Quando analisados Ki67 e o IM, foi estabelecida uma forte correlação positiva, já que ambos são marcadores de proliferação celular. Ao mesmo tempo que o Ki67 é um indicador mais representativo das fases do ciclo celular (PHILLIPS et al., 2000), o IM avalia unicamente a fase de mitose, o que também pode explicar o porquê do Ki67 ser considerado um verdadeiro indicador da proliferação celular que ocorre no LDGCB. Em humanos, a relação entre Ki67 e IM já foi descrita, indicando que quando presentes altos índices de proliferação, pior é o prognóstico em pacientes com linfoma (TIEMMAN et al., 2005).

Por fim, embora a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos C-MYC e Bcl2 encontre-se superexpressa em cães com LDGCB, a avaliação individualmente ou em alvo duplo dessas proteínas não apresentou associação com o tempo de sobrevivência. Estudos adicionais são necessários para comprovar a correlação entre a expressão das proteínas C-MYC e Bcl2 e translocações nos oncogenes MYC e BCL2. Estudos que associem a apoptose celular com a expressão do C-MYC podem auxiliar a definir a função do oncogene MYC em tecidos de LDGCB em cães. Apesar da ausência de associação com o prognóstico, a correlação positiva entre C-MYC e Bcl2 reforça a relação existente entre esses oncogenes na tumorigênese de LDGCB em cães. A aplicabilidade da técnica de imuno-histoquímica para avaliar a proliferação celular pelo Ki67, pode ser considerada para definir o prognóstico em pacientes com LDGCB. Contudo, o ponto de corte estabelecido deve ser investigado em novos estudos. Por outro lado, o IM não demonstrou ter relação significativa com o prognóstico.



## 5 CONCLUSÕES

Nas condições que este estudo foi conduzido e diante os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O aumento da expressão de C-MYC e Bcl2, individualmente ou em alvo duplo, não está associado com tempo de sobrevida ou estadiamento clínico em cães com LDGCB.
- Existe correlação positiva entre as expressões das proteínas C-MYC e Bcl2 em cães com LDGCB.
- O valor de  $Ki67 \geq 107$  pode ser utilizado em cães com LDGCB para prever tempos de sobrevida mais curtos, quando tratados com protocolo CHOP 19 semanas.
- Existe forte correlação positiva entre a expressão de Ki67 e o IM em cães com LDGCB.
- O IM não demonstrou ser um fator prognóstico aplicável para cães com LDGCB.

## 6 REFERENCIAS

ABBO, A. H.; LUCROY, M. D. Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993–2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 231, n. 12, p. 1836–1842, 2007.

AKERMAN, M.; BRANDT, L.; JOHNSON, A.; OLSSON, H. Mitotic activity in non-Hodgkin's lymphoma. Relation to the Kiel classification and to prognosis. **British Journal of Cancer**, London, v. 55, n. 2, p. 219-223, 1987.

ALIZADEH, A. A.; EISEN, M. B.; DAVIS, R. E.; MA, C. LOSSOS, I. S.; ROSENWALD, A.; BOLDRICK, J. C.; SABET, H.; TRAN, T.; YU, X.; POWELL, J. I.; YANG, L.; MARTI, G. E.; MOORE, T.; HUDSON, J. JR.; LU, L.; LEWIS, D. B.; TIBSHIRANI, R.; SHERLOCK, G.; CHAN, W. C.; GREINER, T. C.; WEISENBURGER, D. D.; ARMITAGE, J. O.; WARNKE, R.; LEVY, R.; WILSON, W.; GREVER, M. R.; BYRD, J. C.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; STAUDT, L. M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**, London, v. 403, n. 6769, p. 503-511, 2000.

ARESU, L.; ARICÒ, A.; FERRARESSO, S.; MARTINI, V.; COMAZZI, S.; RIONDATO, F.; GIANTIN, M.; DACASTO, M.; GUADAGNIN, E.; FRAYSSINET, P.; ROUQUET, N.; DRIGO, M.; MARCONATO, L. Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. **The Veterinary Journal**, Newmarket, v. 200, n. 2, p. 318-24, 2014.

ARESU, L.; MARTINI, V.; ROSSI, F.; VIGNOLI, M.; SAMPAOLO, M.; ARICÒ, A.; LAGANGA, P.; PIERINI, A.; FRAYSSINET, P.; MANTOVANI, R.; MARCONATO, L. Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. **Veterinary and Comparative Oncology**, Roslin, v. 13, n. 4, p. 348–362, 2015.

ARICÒ, A.; FERRARESSO, S.; BRESOLIN, S.; MARCONATO, L.; COMAZZI, S.; TE KRONNIE, G.; ARESU, L. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals chromosomal copy number aberrations associated with clinical outcome in canine diffuse large B-Cell lymphoma. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 11, e111817, 2014.

BAI, M.; SKYRLAS, A.; AGNANTIS, N. J.; KAMINA, S.; PAPOUDOU-BAI, A.; KITSOULIS, P.; KANAVAROS, P. B-cell differentiation, apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. **Anticancer Research**, Highlands, v. 25, n. 1A, p. 347-362, 2005.

BAI, M.; SKYRLAS, A.; AGNANTIS, N. K.; KAMINA, S.; TSANOU, E.; GREPI, C.; GALANI, V.; KANAVAROS, P. Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. **Modern Pathology**, Indianapolis, v. 17, n. 7, p. 847–856, 2004.

BISSONNETTE, R. P.; ECHEVERRI, F.; MAHBOUBI, A.; GREEN, D. R. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. **Nature**, London, v. 359, n. 6395, p. 552-554, 1992.

BROYDE, A.; BOYCOV, O.; STRENOV, Y.; OKON, E.; SHPILBERG, O.; BAIREY, O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. **American Journal of Hematology**, Boston, v. 84, n. 6, p. 338-43, 2009.

CANCER RESEARCH UK. **Non-hodgkin lymphoma incidence statistics**. Londres, 2013. Disponível em <<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/non-hodgkin-lymphoma/incidence>>. Acesso em: 16 mar. 2016.

CATTORETTI, G.; BECKER, M. H. G.; KEY, G.; DUCHROW, M.; SCHLÜTER, C.; GALLE, J.; GERDES, J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **Journal of Pathology**, Edinburgh, v. 168, n. 4, p. 357–363, 1992.

CHONGHAILE, T. N.; SAROSIEK, K. A.; VO, T. T.; RYAN, J. A.; TAMMAREDDI, A.; DEL GAIZO MOORE, V.; DENG, J.; ANDERSON, K. C.; RICHARDSON, P.; TAI, Y. T.; MITSIADES, C. S.; MATULONIS, U. A.; DRAPKIN, R.; STONE, R.; DEANGELO, D. J.; MCCONKEY, D. J.; SALLAN, S. E.; SILVERMAN, L.; HIRSCH, M. S.; CARRASCO, D. R.; LETAI, A. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. **Science**, New York, v. 334, n. 6059, p. 1129-1133, 2011.

COMAZZI, S.; GUSETTI, 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. **Hematological Oncology**, Bellinzona, v. 32, n. 2, p. 68-71, 2014.

CURRAN, K.; LANA, S.; SCHAFFER, P.; FRANK, C.; HAMIL, L.; BURTON, J. HAMIL, L.; BURTON, J.; BROMBEREK, J.; EHRHART, E. J.; HAN, S.; AVERY, P. Expression levels of CMYC and BCL2 in canine diffuse large B cell lymphoma. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE VETERINARY CANCER SOCIETY, 2015, Vienna. **Proceedings...** Columbia: Veterinary Cancer Society, 2015. p. 89.

DALECK, C. R.; CALASANZ, S. G.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. (Ed.). **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 438-444.

DANG, C. V. C-MYC target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19, n. 1, p. 1-11, 1999.

DETTWILER, M.; CROCI, M.; VAUGHAN, L.; GUSCETTI, F. Immunohistochemical Expression Study of Proapoptotic BH3-Only Protein Bad in Canine Nonneoplastic Tissues and Canine Lymphomas. **Veterinary Pathology**, Guelph, v. 50, n. 5, p. 789-796, 2013.

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

DOBSON, J. M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J. L. N. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **Journal of Small Animal Practice**, Ames, v. 43, n. 6, p. 240–246, 2002.

FERRARESSO, S.; BRESOLIN, S.; ARICÒ, A.; COMAZZI, S.; GELAIN, M. E.; RIONDATO, F.; BARGELLONI, L.; MARCONATO, L.; KROONIE, G.; ARESU, L. Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large B-Cell lymphoma. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014. e92707.

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

FONSECA-ALVES, C. E.; RODRIGUES, M. M. P.; DE MOURA, V. M. B. D.; ROGATTO, S. R.; LAUFER-AMORIM, R. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. **Microscopic Research and Technique**, Genoa, v. 76, n. 12, p. 1250–1256, 2013.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; CHABANNE, L.; GHERNATI, I.; MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Growth Fractions in Canine Non-Hodgkin's Lymphomas as Determined In Situ by the Expression of the Ki-67 Antigen. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v. 117, n. 1, p. 61-72, 1997.

GREEN, T. M.; YOUNG, K. H.; VISCO, C.; XU-MONETTE, Z. Y.; ORAZI, A.; GO, R. S.; NIELSEN, O.; GADEBERG, O. V.; MOURITS-ANDERSEN, T.; FREDERIKSEN, M.; PEDERSEN, L. M.; MØLLER, M. B. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 30, n. 28, p. 3460-3467, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARRIS, N.; JAFFE, E.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H.; VARDIMAN, J.; LISTER, T.; BLOOMFIELD, C. 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. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 17, n. 12, p. 3835–3849, 1999.

HONG, J.; WOO, H. C.; KIM, H.; AHN, H. K.; SYM, S. J.; PARK, J.; AHN, J. Y.; CHO, E. K.; SHIN, D. B.; LEE, J. H. Anemia as a useful biomarker in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP immunochemotherapy. **Cancer Science**, Chicago, v. 105, n. 12, p. 1569-1575, 2014.

HORN, H.; ZIEPERT, M.; BECHER, C.; BARTH, T. F.; BERND, H. W.; FELLER, A. C.; KLAPPER, W.; HUMMEL, M.; STEIN, H.; HANSMANN M. L.; SCHMELTER, C.; MÖLLER, P.; COGLIATTI, S.; PFREUNDSCHUH, M.; SCHMITZ, N.; TRÜMPER, L.; SIEBERT, R.; LOEFFLER, M.; ROSENWALD, A.; OTT, G. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, Rotterdam, v. 121, n. 12, p. 2253-2263, 2013.

HUNT, K. E.; REICHARD, K. K. Diffuse large B-cell lymphoma. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Northfield, v. 132, n. 1, p. 118-24. 2008.

HWANG, H. S.; PARK, C. S.; YOON, D. H.; SUH, C.; HUH, J. High concordance of gene expression profiling–correlated immunohistochemistry algorithms in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. **The American Journal of Surgical Pathology**, Charlottesville, v. 38, n. 8, p. 1046-1057, 2014.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013 – PNS 2013**: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

INOUE, M.; SHIRAMIZU, K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumors. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v. 20, n. 2, p. 169-175, 1999.

IQBAL, J.; NEPPALLI, V. T.; WRIGHT, G.; HORSMAN, D. E.; ROSENWALD, A.; LYNCH, J.; HANS, C. P.; WEISENBURGER, D. D.; GREINER, T.

C.; GASCOYNE, R. D.; CAMPO, E.; OTT, G.; MÜLLER-HERMELINK, H. K.; DELABIE, J.; JAFFE, E. S.; GROGAN, T. M.; CONNORS, J. M.; VOSE, J. M.; ARMITAGE, J. O.; STAUDT, L. M.; CHAN, W. C. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 24, n. 6, p. 961-968, 2006.

JAGIELSKI, D.; LECHOWSKI, R.; HOFFMANN-JAGIELSKA, M.; WINIARCZYK, S. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). **Journal of Veterinary Medicine. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 49, n. 8, p. 419-424, 2002.

JOHNSON, N. A.; SAVAGE, K. J.; LUDKOVSKI, O.; BEN-NERIAH, S.; WOODS, R.; STEIDL, C.; DYER, M. J.; SIEBERT, R.; KURUVILLA, J.; KLASA, R.; CONNORS, J. M.; GASCOYNE, R. D.; HORSMAN, D. E. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: The critical factors associated with survival. **Blood**, Rotterdam, v. 114, n. 111, p. 2273-2279, 2009.

JOHNSON, N. A.; SLACK, G. W.; SAVAGE, K. J.; CONNORS, J. M.; BEN-NERIAH, S.; ROGIC, S.; SCOTT, D. W.; TAN, K. L.; STEIDL, C.; SEHN, L. H.; CHAN, W. C.; IQBAL, J.; MEYER, P. N.; LENZ, G.; WRIGHT, G.; RIMSZA, L. M.; VALENTINO, C.; BRUNHOEBER, P.; GROGAN, T. M.; BRAZIEL, R.; COOK, J. R.; TUBBS, R. R.; WEISENBURGER, D. D.; CAMPO, E.; ROSENWALD, A.; OTT, G.; DELABIE, J.; HOLCROFT, C.; JAFFE, E. S.; STAUDT, L. M.; GASCOYNE, R. D. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large b-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 30, n. 28, p. 3452-3459, 2012.

KAISER, C. I.; FIDEL, J. L.; ROOS, M.; KASER-HOTZ, B. Reevaluation of the University of Wisconsin 2-year protocol for treating canine lymphosarcoma, **Journal of the American Animal Veterinary Medical Association**, Lakewood, v. 43, n. 2, p. 85-92, 2007.

KAWASAKI, C.; OHSHIM, K.; SUZUMIYA, J.; KANDA, M.; TSUCHIYA, T.; TAMURA, K.; KIKUCHI, M. Rearrangements of bcl-1, bcl-2, bcl-6, and c-myc in diffuse large B-cell lymphomas. **Leukemia & Lymphoma**, Jerusalem, v. 42, n. 5, p. 1099-1106, 2001.

KEAM, B.; HA, H.; KIM, T. M.; JEON, Y. K.; LEE, S. H.; KIM, D. W.; KIM, C. W.; HEO, D. S. Neutrophil to lymphocyte ratio improves prognostic prediction of International Prognostic Index for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. **Leukemia & Lymphoma**, Victoria, v. 56, n. 7, p. 2032-2038, 2015.

KELLER, E. T.; MACEWEN, E. G.; ROSENTHAL, R. C. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Columbus, v. 7, n. 5, p. 289–295, 1993.

KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, Guelph, v. 36, n. 4, p. 292-300, 1999.

KLUK, M. J.; CHAPUY, B.; SINHA, P.; Roy, A.; Cin, P. D.; Neuberg, D. S.; Monti, S.; Pinkus, G.; Shipp, M.; Rodig, S. J. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 4, e33813, 2012.

KRAMER, M. H.; HERMANS, J.; WIJBURG, E.; PHILIPPO, K.; GEELLEN, E.; VAN KRIEKEN, J. H.; DE JONG, D.; MAARTENSE, E.; SCHUURING, E.; KLUIN, P. M. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, Rotterdam, v. 92, n. 9, p. 3152–3162, 1998.

LETAI, A. G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2008.

LI, S.; LIN, P.; YOUNG, K. H.; KANAGAL-SHAMANNA, R.; YIN, C. C.; MEDEIROS, L. J. MYC/BCL2 Double-Hit High-Grade B-Cell lymphoma. **Advances in Anatomic Pathology**, New York, v. 20, n. 5, p. 315-326, 2013.

LOSSOS, I. S.; MORGENSZTEM, D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. **Journal Clinical Oncology**, Alexandria, v. 20, n. 6, p. 995-1007, 2006.

MADEWELL, B. R.; FELDMAN, B. F. Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 176, n. 5, p. 419–425, 1980.

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

MARCONATO, L.; FRAYSSINET, P.; ROUQUET, N.; COMAZZI, S.; LEONE, V. F.; LAGANGA, P.; ROSSI, F.; VIGNOLI, M.; PEZZOLI, L.; ARESU, L. Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Chemoimmunotherapy Clinical Trial in a Pet Dog

Model of Diffuse Large B-cell Lymphoma. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 668–677, 2014.

MARCONATO, L.; MARTINI, V.; STEFANELLO, D.; MORETTI, P.; FERRARI, R.; COMAZZI, S.; LAGANGA, P.; RIONDATO, F.; ARESU, L. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio as a useful prognostic factor in dogs with diffuse large B-cell lymphoma receiving chemoimmunotherapy. **The Veterinary Journal**, Newmarket, v. 206, n. 2, p. 226-30, 2015.

MATIASEK, L. A.; PLATT, S. R.; ADAMS, V.; SCASE, T. J.; KEYS, D.; MILLER, J.; ADAMO, F.; LONG, S.; MATIASEK, K. Ki-67 and vascular endothelial growth factor expression in intracranial meningiomas in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Columbus, v. 23, n. 1, p. 146–151, 2009.

MEYER, P.; FU, K.; GREINER, T. C.; SMITH, L. N.; DELABIE, J.; GASCOYNE, R. D.; OTT, G.; ROSENWALD, A.; BRAZIEL, R. M.; CAMPO, E.; VOSE, J. M.; LENZ, G.; STAUDT, L. M.; CHAN, W. C.; WEISENBURGER, D. D. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 29, n. 2, p. 200-207, 2010.

MILLER, T. P.; GROGAN, T. M.; DAHLBERG, S.; SPIER, C. M.; BRAZIEL, R. M.; BANKS, P. M.; FOUCAR, K.; KJELDSBERG, C. R.; LEVY, N.; NATHWANI, B. N. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective southwest oncology group trial. **Blood**, Rotterdam, v. 83, n. 6, p. 1460-1466, 1994.

MILLER, A. G.; MORLEY, P. S.; RAO, S.; AVERY, A. C.; LANA, S. E.; OLVER, C. S., Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Columbus, v. 23, n. 1, p. 116–122, 2009.

MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J. E. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 3rd ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p. 267–270.

MUDALIAR, M. A.; HAGGART, R. D.; MIELE, G.; SELLAR, G.; TAN, K. A.; GOODLAD, J.; MILNE, E.; VAIL, D. M.; KURZMAN, I.; CROWTHER, D.; ARGYLE, D. Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF- $\kappa$ B activation in canine and human Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL). **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, e72591, 2013.



MUTZ, M.; BOUDREAUX, B.; KEARNEY, M.; STRODA, K.; GAUNT, S.; SHIOMITSU, K. Prognostic value of baseline absolute lymphocyte concentration and neutrophil/lymphocyte ratio in dogs with newly diagnosed multi-centric lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, Roslin, v. 13, n. 4, p. 337–347, 2015.

NASTOUPIL, L. J.; ROSE, A. C.; FLOWERS, C. R. Diffuse large B-cell lymphoma: current treatment approaches. **Oncology**, Philadelphia, v. 26, n. 5, p. 488–495, 2012.

NETO, J. A. D.; MARTINS, A. C. P.; PASTORELLO, M. T.; TUCCI, J. S.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J. Expressão imunohistoquímica do MIB-1 em carcinoma de células transicionais de bexiga. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 91-94, 2001. Suplemento 1.

NGUYEN, F.; FOUREL, J.; MOREAU, A.; ABADIE, J.; LE GOUILL, S.; DAVODEAU F. Prognostic value of Hans' algorithm and Bcl-2/c-MYC double hit score in canine diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALIGNANT LYMPHOMA, 2013. Lugano. **Anais eletronicos...** Bellinzona: Oncology Institute of Southern Switzerland, 2013. p. 23. Disponível em: <<http://eu-can-lymph.net/events/lugano2013/assets/basic-html/page25.html>>. Acesso em: 15 Dez. 2015.

PERRY, A. M.; ALVARADO-BERNAL, Y.; LAURINI, J. A.; SMITH, L. M.; SLACK, G. W.; TAN, K. L.; SEHN, L. H.; FU, K.; AOUN, P.; GREINER, T. C.; CHAN, W. C.; BIERMAN, P. J.; BOCIEK, R. G.; ARMITAGE, J. O.; VOSE, J. M.; GASCOYNE, R. D.; WEISENBURGER, D. D. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. **British Journal of Haematology**, Alcoa, v. 165, n. 3, p. 382-91, 2014.

PHILLIPS, B. S.; KASS, P. H.; NAYDAN, D. K.; WINTHROP, M. D.; GRIFFEY, S. M.; MADEWELL, B. R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Guelph, v. 12, n. 2, p. 111-117, 2000.

POGGI, A.; MINISCALCO, B.; MORELLO, E.; GATTINO, F.; DELAUDE, A.; FERRERO POSCHETTO, L.; ARESU, L.; GELAIN, M. E.; MARTINI, V.; COMAZZI, S.; RIONDATO, F. Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, Roslin, 2016. [Epub ahead of print]. Disponível em <DOI: 10.1111/vco.12184>. Acesso em: 5 Fev. 2016.

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. **Veterinary Pathology**, Guelph, v. 47, n. 3, p. 414–433, 2010.

RATY, R.; FRANSSILA, K.; JOENSUU, H.; TEERENHOVI, L.; ELONEN, E. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. **European Journal of Haematology**, Cologne, v. 69, n. 3, p. 11–20, 2002.

RICHARDS, K. L.; SUTER, S. E. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma?. **Immunological Reviews**, Denver, v. 263, n. 1, p. 173–191, 2015.

RICHARDS, K.; MOTSINGER-REIF, A. A.; CHEN, H. W.; 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 postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 73, n. 16, p. 5029-5039, 2013.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v. 121, n. 1 p. 13–24, 1999.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P. H.; MOORE, P. F.; LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, Guelph, v. 44, n. 3, p. 335-341, 2007.

RUSLANDER, D. A.; GEBHARD, D. H.; TOMPKINS, M. G.; GRINDEM, C. B.; PAGE, R. L. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. **In Vivo**, Kapandriti, v. 11, n. 2, p. 169–172, 1997.

SAVAGE K. J.; JOHNSON, N. A.; BEN-NERIAH, S.; CONNORS.; J. M. SEHN, L. A.; FARINHA, P.; HORSMAN, D. E.; GASCOYNE, R. D. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. **Blood**, Rotterdam, v. 114, n. 17, p. 3533-3537, 2009.

SAWHNEY, N.; HALL, P. A. Ki-67—structure, function, and new antibodies. **Journal of Pathology**, Edinburgh, v. 168, n. 2, p. 161–162, 1992.

SCHMITT, C. A.; LOWE, S. W. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E(mu)- myc lymphomas in vivo. **Blood Cells Molecules and Diseases**, New York, v. 27, n. 1, p. 206-216, 2001.

SCHRADER, C.; MEUSERS, P.; BRITTINGER, G.; TEYMOORTASH, A.; SIEBMANN, J. U.; JANSSEN, D.; PARWARESCH, R.; TIEMANN, M. Topoisomerase IIalpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. **Leukemia**, London, v. 18, n. 7, p. 1200–1206, 2004.

SIMON, D.; MORENO, S. N.; HIRSCHBERGER, J.; MORITZ, A.; KOHN, B.; NEUMANN, S.; JURINA, K.; SCHARVOGEL, S.; SCHWEDES, C.; REINACHER, M.; BEYERBACH, M.; NOLTE, I. Efficacy of a continuous, multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent protocol in dogs with lymphoma, **Journal of the American Animal Veterinary Medical Association**, Lakewood, v. 232, n. 6, p. 879–885, 2008.

SMEDLEY, R. C.; SPANGLER., L.; ESPLIN, D. G.; KITCHELL, B. E.; BERGMAN, P. J.; HO, H.-Y.; BERGIN, I. L.; KIUPEL, M. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. **Veterinary Pathology**, Guelph v. 48, n. 1, p.54-72, 2011.

SNUDERL, M.; KOLMAN, O. K.; CHEN, Y. B.; HSU, J. J.; ACKERMAN, A. M.; DAL CIN, P.; FERRY, J.A; HARRIS, N. L.; HASSRJIAN, R.P.; ZUKERBERG, L. G.; ABRAMSON, J. S.; HOCHBERG, E. P.; LEE, H.; LEE, A. I.; TOOMEY, C. E.; SOHANI, A. R. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, Charlottesville, v. 34, n. 3, p. 327-340, 2010.

STOCKMANN, D.; FERRARI, H.F.; ANDRADE, A.L.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C.R. Detection of the tumour suppressor gene *TP53* and expression of p53, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumour. **Veterinary and Comparative Oncology**, Roslin, v. 9, n. 4, p. 251–259, 2011.

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**. Lyon: IARC Press, 2008. p. 265-266.

TANG, S. C.; VISSER, L.; HEPPELLE, B.; HANSON, J.; POPPEMA, S. Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: An analysis of 83 cases. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 12, n. 1, p. 149-154, 1994.

TESKE, E.; VAN HEERDE, P.; RUTTEMAN, G.R.; KURZMAN, I.D.; MOORE, P.F.; MACEWEN, E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n. 12, p. 1722–1728, 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. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Columbus, v. 27, n. 6, p. 1509–1516, 2013.

THIEBLEMONT, C.; BRIÈRE, J. MYC, BCL2, BCL6 in DLBCL: impact for clinics in the future? **Blood**, Rotterdam, v. 121, n. 12, p. 2165-2166, 2013.

TIEMANN, M.; SCHRADER, C.; KLAPPER, W.; DREYLING, M. H.; CAMPO, E.; NORTON, A.; BERGER, F.; KLUIN, P.; OTT, G.; PILERI, S.; PEDRINIS, E.; FELLER, A. C.; MERZ, H.; JANSSEN, D.; HANSMANN, M. L.; VAN KRIEKEN, H.; MÖLLER, P.; STEIN, H.; UNTERHALT, M.; HIDDEMANN, W.; PARWARESCH, R. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the *European MCL Network*. **British Journal of Haematology**, London, v. 131, n. 1, p. 29–38, 2005.

TOMITA, N. BCL2 and MYC Dual-Hit Lymphoma/Leukemia. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology**, Nagoya, v. 51, n. 1, p. 7-12, 2011.

TUREK, M. M.; SABA, C.; POLONI, M. C.; ARGYLE, D. J. Canine lymphoma and leukemia. In: ARGYLE DJ, BREARLEY MJ, TUREK MM. (Eds). **Decision making in small animal oncology**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p 171-198.

VAIL DM, PINKERTON ME, YOUNG KM. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 5 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. p. 608-631, 2013.

VALLI, V. E.; SAN MYINT, M.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZKY, 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. **Veterinary Pathology**, Guelph, 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. **Veterinary Pathology**, Guelph, v. 50, n. 5, 738-748, 2013.

WANG, S.L.; LEE, J.J.; LIAO, A.T. Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma. **The Veterinary Journal**, Newmarket, v. 205, n. 1, p. 69-73, 2015.

WATERS, D. J.; HAYDEN, D. W.; BELL, F. W.; KLAUSNER, J. S.; QIAN, J.; BOSTWICK, D. G. Prostatic intraepithelial neoplasia in dogs with spontaneous prostate cancer. **Prostate**, Baltimore, v. 30, n. 2, p. 92–97, 1997.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. **Veterinary Pathology**, Guelph, v. 44, n. 3, p. 298-308, 2007.

WIERSTRA, I.; ALVES, J. The c-myc promoter: Still Mystery and challenge. **Advances in Cancer Research**, Charlestone, v. 99, p. 113-333, 2008.

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 labelling by immunohistochemistry. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinava**, Lyngge, v. 111, n. 3, p. 430-438, 2003.

ZELENETZ, A. D.; GORDON, L. I.; WIERDA, W. G.; ABRAMSON, J. S.; ADVANI, R. H.; ANDREADIS, C. B.; BARTLETT, N.; BELLAM, N.; BYRD, J. C.; CZUCZMAN, M. S.; FAYAD, L. E.; FISHER, R. I.; GLENN, M. J.; HARRIS, N. L.; HOPPE, R. T.; HORWITZ, S. M.; KELSEY, C. R.; KIM, Y. H.; KRIVACIC, S.; LACASCE, A. S.; NADEMANEE, A.; PORCU, P.; PRESS, O.; RABINOVITCH, R.; REDDY, N.; REID, E.; SOKOL, L.; SWINNEN, L. J.; TSIEN, C.; VOSE, J. M.; YAHALOM, J.; ZAFAR, N.; DWYER, M.; SUNDAR, H. Non-Hodgkin's Lymphomas, Version 2.2014. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, Fort Washington, v. 12, n. 6, p. 916-946, 2014.

ZHOU Z.; SEHN, L.H.; RADEMAKER, A.W.; GORDON L.I.; LACASCE, A.N.; CROSBY-THOMPSON, A.; VANDERPLAS, A.; ZELENETZ, A.D.; ABEL, G.A.; RODRIGUEZ, .A.; NADEMANEE, A.; KAMINSKI, M.S.; CZUCZMAN, M.S.; MILLENSON, M.; NILAND, J.; GASCOYNE, R.D.; CONNORS, J.M.; FRIEDBERG, J.W.; WINTER, J.N. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. **Blood**, Rotterdam, v. 123, n. 6, p. 837-842, 2014.

ZHOU, M.; WANG, J.; OUYANG, J.; XU, J.Y.; CHEN, B.; et al: MYC protein expression is associated with poor prognosis in diffuse large B cell lymphoma patients treated with RCHOP chemotherapy. **Tumor Biology**, Umea, v. 35, n. 7, p. 6757-62, 2014.