

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

Maria Claudia Lopes Silva¹
Julio Lopes Sequeira²

RESUMO

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

Palavras-chave: linfoma, cão, DLBCL, imunofenotipagem.

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

ABSTRACT

Non Hodgkin lymphomas (LNHs) are the most common hematopoietic tumors of dogs. However, its etiology is not well established and there are many probable factors that may lead to its development such as immune system aberrations, environmental elements and genetic changes. The tumor may occur at any age but it predominantly affects middle age to elderly dogs. Canine lymphoma can be anatomically divided into multicentric, digestive, thymic, cutaneous or solitary and also into five clinical and two subclinical stages. Lately various human classifications and also one proposed for domestic animals have been used. Lymphoma immunophenotyping is incorporated into current classification systems as well as determination of biological markers for proliferation and apoptosis. Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is the most frequent subtype both in dogs and humans. DLBCLs are tumors composed of lymphoid B cell characterized by a diffuse growth pattern. DLBCLs may present at least five variants which relates to different patterns of biological behavior

* Apoio e financiamento: Agências FAPESP - 2013/02253-3

¹ Residência em Patologia Veterinária pela FMVZ-UNESP-Botucatu. Contato principal para correspondência.

² Professor da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Campus Botucatu.

including in dogs. However, routinely these tumors are only classified as DLBCLs without taking into account its morphologic characteristics, immunohistochemical profile and proliferation index. On account of this the World Health Organization (WHO) proposes that on research projects those variants are thoroughly investigated in order to identify differences that enable establishment of new entities.

Keywords: lymphoma, dog, DLBCL, immunophenotyping.

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

RESUMEN

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

Palabras clave: linfoma, perro, DLBCL, immunophenotyping.

INTRODUÇÃO

Os linfomas não-Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães e estes têm sido propostos como modelo de ocorrência espontânea para o estudo da etiologia e protocolos de tratamento dos LNHs humanos (1,2,3). Já há algum tempo a classificação morfológica dos LNHs caninos têm se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHs humanos (4,5). Em humanos, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são linfomas difusos de grandes células B, o qual é também o tipo de LNH mais frequente nos cães (5,3)

Nas classificações de LNHs humanas, principalmente a WHO, os subtipos são caracterizados por dados epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que permitem a identificação de entidades morfológicas (1,3). Esta também tem sido a tendência para a classificação atual dos linfomas caninos, visto que cada vez mais há trabalhos que focam em alterações genéticas similares às encontradas em humanos, as quais podem permitir maior

acurácia na classificação e potencialmente desenvolvimento de terapia mais eficaz para determinados tipos de linfoma (6,7,8,3).

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

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

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

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

REVISÃO DE LITERATURA

Os linfomas não Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães (17,18), com incidência variando de 13 a 33 casos por 100.000 cães, o que os torna mais comuns nesta espécie do que em humanos. Quando se leva em conta apenas cães idosos, a prevalência pode chegar a 84 por 100.000, já para cães com menos de um ano, cai para 1,5 por 100.000 cães (19). Existem trabalhos que apontam números ainda mais altos, como é o caso de um estudo da população de Golden retrievers na Alemanha em que se observou o valor de 116 por 100.000 cães. (20).

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

Foi teorizado ainda associação à exposição a produtos químicos, potencialmente por terem efeito imunossupressor. Outra possível causa para o linfoma seria infecção viral, sendo esta ainda não comprovada em cães, mas observada em alguns tipos de leucemia e linfoma

em humanos. Em estudo realizado na cidade de São Paulo, foi observada associação positiva entre cães que residem fora da residência perto de ruas e avenidas movimentadas e aumento no risco de desenvolvimento de linfoma, sugerindo que a poluição ambiental advinda do trânsito de veículos pode estar associada com a doença (22). Além destas causas, estão aumentando os estudos com relação às anormalidades cromossômicas, já tendo sido observadas alterações numéricas (20) e ainda translocações cromossômicas (23).

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

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

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

Anatomicamente, os linfomas caninos podem ser classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e extranodal ou solitário. De acordo com a World Health Organization (WHO), os linfomas caninos podem ser classificados em cinco estágios clínicos e dois subestágios os quais refletem o grau de envolvimento dos órgãos afetados e sinais clínicos apresentados pelo animal, respectivamente (26). Assim a extensão da doença pode ser descrita e a maioria dos linfomas caninos se apresenta em estágios avançados, III, IV ou V (21,27,28,29). Os sinais clínicos associados são variáveis e dependem entre outros fatores da localização do tumor (26).

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

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

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

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

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

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

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

Foi observada uma maior probabilidade de desenvolver determinado imunofenótipo do linfoma de acordo com a raça. Os Boxers têm risco aumentado de desenvolver neoplasias T, assim como Bullmastiff e raças Sptiz e cães asiáticos de “colo”, enquanto que Border Collie, Baset Hound, Cocker Spaniel, Doberman, Pastor Alemão e provavelmente Rottweiler são afetados principalmente por neoplasias B (36,37). Devido à ocorrência em grupos de raças que possuem origem em comum, acredita-se que o risco aumentado de desenvolvimento de doenças linfoproliferativas de origem T pode ter surgido em algum ancestral, enquanto que o risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias B pode surgir de diferentes fatores de risco ou combinações que tiveram origem durante o processo de seleção da raça (37).

Já há algum tempo, a classificação morfológica dos LNHS caninos tem se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHS humanos – classificação atualizada de Kiel, Working Formulation for Clinical Usage (WF), Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL) e mais recentemente a classificação da World Health Organization (WHO) – levando em conta caracteres epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que em humanos permitem a identificação de entidades morfológicas (1).

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

E, humanos, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são Linfomas Difusos de Grandes Células B (Diffuse Large B Cell Lymphoma – DLBCL), que é considerado a forma mais comum de linfoma não Hodgkin no mundo ocidental. O DLBCL

está associado a um histórico agressivo, com média de sobrevida de menos de um ano em pacientes não tratados (39). Segundo os autores que utilizaram a classificação da WHO, o subtipo de LNH mais frequente nos cães é o DLBCL (3,5).

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

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

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

Os autores que utilizaram a Classificação de Kiel já demonstraram a importância dessa classificação para os linfomas caninos, sendo esta classificação utilizada ainda em trabalhos de pesquisa recentes (1). O aspecto comparativo ou a correspondência entre as duas classificações – WHO e Kiel – torna-se importante na avaliação dos Linfomas de Grandes Células B (Tabela 1), na medida em que a classificação de Kiel serve como parâmetro para o estabelecimento do prognóstico nos cães (21).

Os DLBCLs são neoplasias de padrão de crescimento difuso formadas por células linfoides B que possuem núcleo de tamanho igual ou que excede o tamanho do núcleo de um macrófago normal ou que corresponde a mais de duas vezes o tamanho de um linfócito normal (12). A classificação da WHO propõe que os patologistas utilizem somente o termo Linfoma Difuso de Grandes Células B como diagnóstico final. Esta recomendação acompanha a proposta contida na classificação REAL (42), pois a identificação de subtipos de DLBCL seria de difícil reprodução entre os patologistas e alguns subtipos seriam ainda controversos. No entanto, a Classificação da WHO também propõe que estes subtipos sejam considerados nos trabalhos de pesquisa com o intuito de demonstrar as diferenças no comportamento biológico das diversas variantes procurando estabelecer novas entidades (12).

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

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

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

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

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

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

Um tipo raro que acomete o mediastino é o Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B), mais frequentemente observado em cães jovens de raças de grande porte. As lesões têm desenvolvimento lento e os animais normalmente apresentam êmese após alimentação aparentemente devido à compressão esofágica. As lesões são tipicamente bem encapsuladas, exibem bandas de colágeno evidentes dando uma aparência macroscópica de timoma. Citologicamente, as células tumorais são grandes, com núcleo vesicular, nucléolo proeminente, podendo ser altamente indentados e ocasionalmente muito grande e multilobulado (4).

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

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

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

Diante de uma suspeita de linfoma, devem ser realizados exame físico completo, hemograma, bioquímico e urinálise, sendo o diagnóstico definitivo por exame citológico ou histopatológico (26). O diagnóstico e classificação do linfoma podem ser realizados de forma simples, eficaz e com baixo custo pelo exame citológico, sendo que a classificação de Kiel exibe melhor adequação por se basear em características morfológicas (43). No entanto, há algumas limitações. Devido à ausência de arquitetura tecidual não é possível observar uma desorganização da arquitetura normal ou invasão da cápsula, podendo dificultar a diferenciação entre um linfoma e uma hiperplasia reacional acentuada, a qual é caracterizada por muitas células linfoides grandes. Ainda, linfoma de células pequenas pode exibir poucos indícios de suas características de malignidade. Além disso, classificação em baixo, moderado e alto grau, que é realizada por meio das características citológicas e imunofenotipagem pode ser feita com maior acurácia no exame histopatológico (26).

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

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

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

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

Para os linfomas B, os mais utilizados nos linfomas humanos, além do anti CD79 α , são o anti CD20 e o PAX-5 (anti- BSAP) entre outros (45). Deve-se ressaltar que a pouca reação cruzada entre os anticorpos específicos humanos e caninos restringe o painel utilizado nos linfomas dos cães, tanto para o diagnóstico quanto para o estadiamento (46). Nos cães, embora o marcador pan B mais amplamente utilizado seja o anti CD79 α (4,10,32), o anti CD20 também tem sido utilizado em menor escala com o mesmo fim (46). Mais recentemente, a expressão da PAX-5 (anti BSAP) foi empregada como marcador imunistoquímico pan pré B e pan B em amostras de linfomas de cães incluídas em parafina (33).

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

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

A proteína ativadora específica de células B (BSAP) é um fator de transcrição de 52kD originalmente identificado como homólogo da proteína ativadora tecidual específica do ouriço do mar. A BSAP é codificada pelo gene PAX-5, um membro altamente conservado da família de genes de fatores de transcrição "paired Box" (PAX). Dentre as células hematopoiéticas a expressão do gene PAX5 é restrita a linhagem de células B. A transcrição do gene do PAX5 é iniciada em células pró B e é abundante nos estágios de maturação pré B e células B madura, mas é ausente em plasmócitos diferenciados. O PAX5 é um fator de transcrição essencial ao comprometimento da célula com a linhagem de linfócitos B, induzindo a expressão de vários

genes e ao mesmo tempo reprimindo vias alternativas de diferenciação hematopoiética, o que torna possível a sua utilização como um marcador pan B (50)

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

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

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

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

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

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

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

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

Como foi mencionado anteriormente, outro índice relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é o índice apoptótico, pois o crescimento tumoral não é determinado somente pela porcentagem de células em proliferação e pelo tempo do ciclo celular (57). Um

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

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

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O linfoma não-Hodgkins (LNH) é atualmente uma das neoplasias que mais acomete os cães, levando a significativa diminuição na longevidade e qualidade de vida dos animais afetados. É frequente também no homem e devido às semelhanças no comportamento biológico tumoral, influência ambiental, aberrações genéticas, incidência, tipo mais frequente e também tratamento, a doença no cão é utilizada como modelo de ocorrência espontânea para o estudo da etiologia e protocolos de tratamento dos LNHs humanos. Ela é uma doença heterogênea, uma vez que cada subtipo é uma entidade única, o que pode demandar diferentes

abordagens. Assim, são necessários estudos que permitam diagnósticos mais precoces e acurados possibilitando terapias mais eficazes e conseqüentemente melhor prognóstico.

REFERÊNCIAS

1. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol.* 2010;47(3):414-33.
2. Comazzi S, Guscetti F, Marconato L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematol Oncol.* 2013;32(2):68-71.
3. Ito D, Frantza AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for humannon-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;159(3-4):192-201.
4. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF. *Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals.* 2nd ed. Washington: Armed Forced Institute of Pathology; 2002.
5. Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzly F, et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol.* 2011;48(1):198-211.
6. Frantz AM, Sarver AL, Ito D, Phang TL, Karimpour-Fard A, Scott MC, et al. Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. *Vet Pathol.* 2012;50(4):693-703.
7. Mudaliar MAV, Haggart RD, Miele G, Sellar G, Tan KA, Goodlad JR, et al. Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF- κ B activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *PLOS One.* 2013;8(9):1-17.
8. Richards KL, Motsinger-Reif AA, Chen H, Fedoriw Y, Fan C, Nielsen DM, et al. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and post-germinal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. *Cancer Res.* 2013;73(16):5029-39.
9. Suzano SMC. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do P53 nos linfomas caninos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista ; 2007.
10. Valli VE. *Veterinary comparative hematopathology.* Iowa: Blackwell; 2007.
11. Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphoma. *Cancer Res.* 1999;59(20):5386-91.

12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
13. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84(8):2412-21.
14. Sueiro FAR, Alessi AC, Vassallo J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoreexpression. *J Comp Pathol*. 2004;131(2-3):207-13.
15. Dhaliwal RS, Kitchell BE, Ehrhart EJ, Valli VE, Dervisis NG. Clinicopathologic significance of histologic grade, Pgp, and P53 expression in canine lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2013;49(3):175-85.
16. Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. *J Vet Med Sci*. 2010;72(9):1165-72.
17. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract*. 2001;42(8):377-84.
18. Rutley M, MacDonald V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. *Can Vet J*. 2007;48(9):977-9.
19. Vail DM, MacEwen EG, Young KM. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small animal clinical oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Company; 2001. p.558-90.
20. Boerkamp KM, Teske E, Boon LR, Grinwis GCM, van den Bossche L, Rutteman GR. Estimated incidence rate and distribution of tumours in 4,653 cases of archival submissions derived from the Dutch golden retriever population. *BMC Vet Res*. 2014;10(34):1-10.
21. Teske E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non hodgkin's lymphoma. *Vet Q*. 1994;16(4):209-19.
22. Zanini DA, Kimura KC, Nishiya AT, Ubukata R, Leandro RM, Brito CP, et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's Lymphoma *Cienc Rural*. 2013;43(7):1302-8.
23. Rütgen BC, Willenbrock S, Reimann-Berg N, Walter I, Fuchs-Baumgartinger A, Wagner S, et al. Authentication of primordial characteristics of the CLBL- 1 cell line prove the integrity of a canine B-Cell lymphoma in a murine in vivo model. *PLoS One*. 2012;7(6):e40078. doi:10.1371/journal.pone.0040078.
24. Ferrareso S, Bresolin S, Arico A, Comazzi S, Gelain ME, Riondato F, et al. Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large BCell lymphoma. *PLOS One*. 2014;9(4):1-10.

25. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(7):380-8.
26. Vail DM, Young KM. Hematopoietic tumors. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical oncology*. 4th ed. Missouri: Saunders; 2007. p.699-784.
27. Moreno K, Bracarense APFRL. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2007;44:46-52.
28. Cápua MLB, Coleta FED, Canesin APMN, Godoy AV, Calazans SG, Miotto MR, et al. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. *Cienc Rural*. 2011;41(7):1245-51.
29. Neuwald EB, Teixeira LV, Conrado FO, Silva MOD, Hlavac NRC, González FHD. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. *Pesqui Vet Bras*. 2014;34(4):349-54.
30. Sequeira JL, Franco M, Bandarra EP, Figueiredo LMA, Rocha NS. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1999;51(3):245-9.
31. Figuera RA, Souza TM, Rodrigues A, Barros CSL. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. *MEDVEP: Rev Cient Med Vet Pequenos Anim Anim Estim*. 2006;4(12):139-46.
32. Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol*. 2010;8(1):38-49.
33. Fernandes TR. Classificação morfológica e imunoistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de linfomas não-hodgkin em cães conforme os critérios da Histological Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals (WHO) [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2014.
34. Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, et al. Genetic and environmental risk indicators in canine non-hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med*. 2009;23(2):301-10.
35. Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol*. 2013;50(5):738-48.
36. Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, et al. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res*. 2005;65(13):5654-61.
37. Dobson JM. Breed-Predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci*. 2013;2013:1-23. doi:10.1155/2013/941275.

38. Bienzle D, Vernau W. The diagnostic assessment of canine lymphoma: implications for treatment. *Clin Lab Med.* 2011;31(1):21-39.
39. Flowers R, Sinha R, Vose JM. Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(6):393-408.
40. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues.* Lyon: IARC Press; 2001. p.171-4.
41. Lennert K, Feller AC. *Histopathology of non-hodgkin's lymphomas.* 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
42. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3835-49.
43. Suzano SMC, Sequeira JL, Rocha NS, Pessoa AWP. Classificação citológica dos linfomas caninos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010;47(1):47-54.
44. Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE, Suter SE. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *J Vet Intern Med.* 2013;27(6):1509-16.
45. O'Mahony OH, Riley A. CD20-negative follicular lymphoma. *Diagn Histopathol.* 2012;18(10):457-60.
46. Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol.* 2013;31(1):1-9.
47. Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, Czuczman MS. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol Invest.* 2006;35(1):93-114.
48. Polson AG, Yu S, Elkins K, Zheng B, Clark S, Ingle GS, et al. Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2007;110(2):616-23.
49. Kano R, Inoiue C, Okano H, Yamazaki J, Takahashi T, Watari T, et al. Canine CD20 gene. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;108(3-4):265-8.
50. Torlakovic E, Slipicevic A, Robinson C, Decoteau JF, Alfsen GC, Vyberg M, et al. Pax-5 expression in nonhematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(5):798-804.
51. Taylor RP, Lindorfer MA. Analyses of CD20 monoclonal antibody-mediated tumor cell killing mechanisms: rational design of dosing strategies. *Mol Pharmacol.* 2014;86(5):485-91.

52. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393-402.
53. Franke A, Niederfellner GJ, Klein C, Burtscher H. Antibodies against CD20 or B-cell receptor induce similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. *PLoS One*. 2011;18(2):e16596. doi: 10.1371/journal.pone.0016596.
54. Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol*. 1999;36(4):292-300.
55. Suzano SMC, Sequeira JL, Pessoa AWP, Porto CD, Oliveira DE. Proliferação celular nos linfomas caninos. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45(4):313-9.
56. Zacchetti A, Van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labeling by immunohistochemistry. *APMIS*. 2003;111(3):430-8.
57. Phillips BB, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest*. 2000;12(2):111-7.
58. Dukers DF, Oudejans JJ, Vos W, Berge RL, Meijer CJLM. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. *J Pathol*. 2002;196(3):307-15.
59. Sokolowska J, Cywinska A, Malicka E. p53 expression in canine lymphoma. *J Vet Med*. 2005;52(4):172-5.

Recebido em: 12/01/2015

Aceito em: 28/09/2016