

Concentração de proteínas de fase aguda e vitamina D em cães com linfoma multicêntrico

Acute phase protein and vitamin D concentration in dogs with multicentric lymphoma

Michelle do Carmo Pereira Rocha^{1*} , Taismara Kustro Garnica² , Heidge Fukumasu² , Ricardo Andres Ramirez³ ,
Josiane Morais Pazzini⁴ , Felipe Augusto Ruiz Sueiro⁵ , Felipe Noletto de Paiva¹ , Andriego Barboza De Nardi¹ 

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil

²Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil

³Grupo de investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Medellín, Colômbia.

⁴União das Faculdades dos Grandes Lagos (UNILAGO), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

⁵CEO (Pathology and Molecular Biology) Employment, VETPAT Campinas, São Paulo, Brasil

*Correspondente: michelle14rocha@gmail.com

Resumo

Objetivou-se caracterizar a concentração sérica da vitamina D e das PFAs (Proteínas de Fase Aguda) (alfa-1 glicoproteína ácida, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina, albumina, IgA, IgG e alfa-1 – antitripsina) em cães com linfoma multicêntrico, submetidos ao tratamento quimioterápico com protocolo CHOP (Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisona), determinando o valor prognóstico desses marcadores para a doença. Foram avaliadas as concentrações séricas das PFAs, através do método da eletroforese e as concentrações da vitamina D, através da quimioluminescência em dois grupos experimentais, um grupo de 13 cães com linfoma multicêntrico classificados como alto grau pela citologia (GL) durante as semanas T0, T5 e T10 do tratamento com protocolo quimioterápico antineoplásico e em um grupo de 10 animais saudáveis para compor o grupo controle (GC), em coleta única. Para isso, foi realizado o diagnóstico, estadiamento e avaliação de resposta terapêutica dos 13 pacientes com linfoma multicêntrico através de técnicas de citopatologia, histopatologia, imuno-histoquímica do linfonodo periférico acometido. Foi observado que 9 pacientes tiveram resposta completa e 4 pacientes tiveram resposta parcial ao tratamento. Os dados foram analisados através do software R. Os resultados indicam que as diferenças entre as variáveis IgA, haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida foram significativas entre os grupos, e entre os diferentes momentos da quimioterapia ($p < 0,05$), indicando que podem ser marcadores sensíveis ao linfoma em cães. A α 1-glicoproteína ácida apresentou valor prognóstico para o linfoma, com 63% de especificidade. Porém a vitamina D não apresentou valor prognóstico para o linfoma multicêntrico em cães.

Palavras-chave: linfossarcoma; prognóstico; reação de fase aguda; resposta terapêutica; neoplasia hematopoiética.

Abstract

This study aimed to evaluate the serum concentration of vitamin D (25-Hydroxyvitamin D) and acute phase proteins (APPs; alpha-1 acid glycoprotein, haptoglobin, transferrin, ceruloplasmin, albumin, IgA, IgG and alpha-1 - antitrypsin) as potential biomarkers for prognostic and therapy response in dogs with multicentric lymphoma submitted to the CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine and Prednisone) chemotherapy protocol. Thirteen dogs with multicentric lymphoma classified as high grade by cytology were included in the treatment group (GL), while ten healthy dogs were included in the control group (GC). Serum was collected in the weeks T0, T5 and T10 of CHOP chemotherapy protocol, for the GL group, and in a single collection, for the GC group. All the collected samples were evaluated for the APPs and vitamin D concentrations through electrophoresis and chemiluminescence methods, respectively. Diagnostic and staging tests were performed for all the dogs in the GL group, and included cytopathology, histopathology and immunohistochemistry of the affected lymph node. Of these dogs, 9 achieved a complete response and 4 a partial response to the treatment. Data analysis was performed with the R software. The results demonstrated that serum concentrations of IgA, haptoglobin and α 1-acid glycoprotein were significantly different between the groups and also between the different chemotherapy times analyzed ($p < 0.05$), indicating that these proteins can be considered as sensitive biomarkers for lymphoma in dogs. Furthermore, the α 1-acid glycoprotein showed prognostic value for the disease, with 63% specificity. However, vitamin D concentration was not correlated with prognosis of the dogs with lymphoma.

Keywords: lymphosarcoma; prognosis; acute phase reaction; therapeutic response; hematopoietic neoplasia.

Recebido : 26 de abril de 2022. Aceito: 22 de julho de 2022. Publicado: 24 de agosto de 2022.



Introdução

Os linfomas são um grupo diversificado de neoplasias que tem em comum a sua origem em linfócitos⁽¹⁾, sendo uma das neoplasias mais comuns em cães, com incidência anual estimada em 13-24 para cada 100.000 cães nos Estados Unidos⁽²⁾. No Brasil, ainda não há estudos que indiquem com precisão a incidência da doença, entretanto é sabido que o linfoma representa 8,8% de todos os cânceres que acometem cães, vistos à necropsia⁽³⁾. O linfoma canino (LC) é semelhante ao linfoma Não-Hodgkin (LNH) de humanos, nos aspectos morfológico, imunofenotípico, genotípico, clínico e prognóstico, o que reforça a pesquisa em medicina e patologia comparada entre as espécies, tendo o cão como um modelo experimental promissor para a doença⁽⁴⁾.

O linfoma pode ser classificado de acordo com a sua localização anatômica, tendo a forma multicêntrica como a de maior incidência, perfazendo 75% dos casos. Por outro lado, baseando-se nos critérios citopatológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos, a classificação mais utilizada é o sistema da Organização Mundial da Saúde (OMS), no qual a forma mais frequente é o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). De acordo com estudo realizado em cães com linfoma multicêntrico no Brasil, 70 a 80% dos LC são de origem em células B, sendo o LDGCB o subtipo mais comum, representando 59,1% dos casos. Ainda no mesmo estudo, dentre os linfomas de células T, o linfoblástico foi o mais comum, representando 11,33% dos casos⁽⁵⁾.

O tratamento mais indicado para o linfoma multicêntrico é a quimioterapia com múltiplas drogas, entretanto, grande parte dos cães tratados apresentam recidivas, bem como desenvolvem resistência à quimioterapia^(6,7,8). Nesse contexto, a busca por elucidar os fatores predisponentes, prognósticos e estratégias para monitorar a resposta terapêutica desses pacientes têm se tornado constante na medicina veterinária, para que se possa intervir antes que o paciente manifeste a recidiva.^(5,6)

A concentração sérica da vitamina D (vit D) e das Proteínas de Fase Aguda (PFAs) tem sido apontadas como fatores prognósticos e preditivos de alta sensibilidade em diversas neoplasias, incluindo os linfomas, tanto em humanos quanto em animais⁽⁹⁾. Destaca-se ainda a existência de um receptor para 25(OH)D3, presente no núcleo das células neoplásicas, o receptor VDR (*Recombinant Vitamin D Receptor protein*), sugerindo um potencial alvo terapêutico⁽¹⁰⁾. As PFAs por outro lado, já foram relacionadas como marcadores possíveis para o linfoma multicêntrico em cães, inclusive, em casos de recidiva, demonstrando alterações em suas concentrações precocemente, podendo ainda, de acordo com alguns estudos, serem consideradas mais sensíveis que a citopatologia dos linfonodos periféricos⁽¹¹⁾.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de

concentração sérica da vitamina D e das PFAs, verificando o seu valor prognóstico em cães com linfoma multicêntrico em tratamento com o protocolo quimioterápico CHOP.

Materiais e métodos

Foram selecionados 13 pacientes caninos, sem critérios de raça, sexo ou idade, diagnosticados com linfoma multicêntrico, através de exames de histopatologia e citopatologia. Todos os animais passaram por avaliação clínica, ultrassonografia abdominal, radiografia torácica, hemograma, avaliação do perfil bioquímico sérico, incluindo análise de ALT [alanina aminotransferase], FA [fosfatase alcalina], concentrações de creatinina, ureia e cálcio e mielograma. Esses exames foram realizados com objetivo de avaliar o estado geral do animal, identificar comorbidades, realizar o estadiamento da doença e a classificação anatômica. As avaliações mencionadas foram feitas no momento da consulta inicial e repetidas a cada 4 semanas do tratamento quimioterápico. Segundo a OMS, o estadiamento do linfoma envolve o comprometimento de um linfonodo (estádio I), dos linfonodos de uma determinada região (estádio II), de todos os linfonodos (estádio III), do fígado e baço (estádio IV), de manifestações neoplásicas no sangue e medula óssea (estádio V), com ou sem sinais clínicos (subestadiamento B e A), respectivamente^(12,13).

Os critérios de inclusão para o GL foi a avaliação citológica compatível com linfoma de alto grau, além disso, a confirmação do tipo histológico e do imunofenótipo B, através da histopatologia e imuno-histoquímica. Foram excluídos do estudo, pacientes que possuíam histórico de doenças infecciosas recentes (até 1 mês anterior ao estudo), pacientes obesos de acordo com o Escore de Condição Corporal, ECC, de nove pontos proposto por⁽¹⁴⁾; e pacientes previamente tratados, mesmo aqueles que receberam apenas corticosteroides.

Nos pacientes do GL, foi realizada a coleta dos linfonodos através de biópsia excisional, preferencialmente do linfonodo poplíteo, no momento T0, pré-quimioterapia, para realização de exames de histopatologia e imuno-histoquímica. Após a coleta, os pacientes foram tratados com quimioterapia utilizando o protocolo CHOP, composto pela ciclofosfamida na dose de 250-300 mg/m², doxorubicina 25-30 mg/m², sulfato de vincristina 0,6-0,7 mg/m² e prednisolona em doses decrescentes de 2 a 0,5 mg/kg durante as quatro primeiras semanas, o protocolo completo teve duração de 19 semanas. As coletas de sangue total foram efetuadas aos tempos T0 (antes do início do tratamento), T5 (após cinco semanas de tratamento), e T10 (após dez semanas de tratamento). Essas amostras foram centrifugadas e o soro foi coletado e armazenado a -20°C.

Para composição do Grupo Controle (GC), foram selecionados 10 pacientes caninos saudáveis, submetidos a

exame físico, hemograma e análises bioquímicas (semelhantes às do GL) para avaliar a higidez desses animais. Ao longo do tratamento dos pacientes do grupo GL, foi avaliada a resposta terapêutica dos pacientes, a cada sessão semanal de quimioterapia, através do exame clínico, mensuração de linfonodos periféricos utilizando paquímetro eletrônico e mediante repetição dos exames de radiografia torácica e ultrassonografia abdominal, ao final de cada ciclo do protocolo que ocorreu a cada 4 semanas.

A avaliação histopatológica foi realizada, seguindo a classificação cito-histomorfológica adaptada da OMS^(6,15). A avaliação imuno-histoquímica foi realizada em laboratório parceiro, utilizando para a imunofenotipagem, o marcador CD3 para linfoma T, e PAX5 para linfoma B, além do marcador de proliferação celular Ki67 e as amostras foram dispostas em lâminas silanizadas. Como controle negativo, foi utilizada uma amostra de linfonodo sabidamente saudável de cão e para controle positivo foi utilizado uma amostra de linfonodo sabidamente positiva para linfoma T, e outra para linfoma B. As amostras foram avaliadas por microscopia de luz, utilizando graticula ocular de diâmetro de 26 mm (Microscópio Leica DMLB, HC PLAN 10x/20, 4"x5"). As imunorexpressões dos anticorpos CD3 e PAX5 foram estabelecidas por porcentagem de células marcadas, considerando-se o número de células positivas e o número total de células dentro da graticula, avaliadas em cinco campos de maior aumento, de 40 x^(16,17).

A análise da expressão dos marcadores Ki67 foi feita em objetiva de 40 x, contando-se as células positivas e todas as células presentes em cinco campos aleatórios, sendo estes resultados transformados em percentual de células positivas, sendo considerada a amostra positiva quando pelos menos 10% das células exibiu marcação imuno-histoquímica, de acordo com Sueiro et al. (2004). As lâminas foram avaliadas com auxílio de um analisador de imagens automático ZEISS com programa de morfometria KS300-3.0^(16,17).

Para avaliação das PFAs foi realizado proteinograma sérico, obtido em matriz de gel de poliacrilamida, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado segundo técnica descrita por Laemmli (1970)⁽¹⁸⁾ modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® - BIO-RAD). Na separação em SDS-PAGE das proteínas séricas nos cães, as proteínas foram analisadas pelo densitômetro de acordo com o peso molecular já conhecido de cada proteína sérica identificada.

Para a dosagem da vitamina D foi utilizado o método de ensaio laboratorial (Liaison 25 OH Vitamin D Total®), que usa a tecnologia de imunensaio quimioluminescente competitivo direto (CLIA), para a determinação quantitativa de 25(OH)D e outros metabólitos hidroxilados da vitamina D no soro. Durante a

primeira incubação, a 25(OH)D é dissociada da sua proteína de ligação e liga-se ao anticorpo específico na fase sólida. Ao fim de 10 minutos é adicionado o marcador vitamina D ligado a um derivado de isoluminol. Após uma segunda incubação de 10 minutos, o material não-ligado é removido com um ciclo de lavagem. Subsequentemente, os reagentes iniciadores são então adicionados e inicia-se uma reação quimioluminescente rápida. O sinal de luz é medido por um fotomultiplicador como unidades de luz relativas (RLU), sendo inversamente proporcional à concentração de 25(OH)D nos calibradores, nos controles ou nas amostras.

A análise estatística foi realizada com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Áustria). Inicialmente foi testada a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro) e homocedasticidade das variâncias (teste de variância) de todas as variáveis estudadas. Os valores reais ou transformados das variáveis estudadas foram comparados entre os grupos e momentos pelo teste de ANOVA, com medidas repetidas no tempo e, posteriormente, as diferenças encontradas foram identificadas pelo teste de Tukey. Os valores reais ou transformados das variáveis foram estudados nos pacientes com linfoma através do teste T Student. Quando alguma variável resultou em análises significativas, em seguida, foi submetida à determinação das curvas ROC (Registered Operative Curve), que avalia a capacidade discriminatória diagnóstica. Esse mesmo teste ROC calcula o ponto de corte, a especificidade, a sensibilidade e a área sob a curva do teste. Para posteriormente, os pacientes serem separados em alta e baixa concentração de cada proteína avaliada.

Na presente pesquisa foi determinado um valor de corte através do método curvas de ROC para a concentração da AGP, IgA, transferrina e haptoglobina, que foram as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,1$ no teste T-Student; ou seja, apresentaram diferenças significativas nas análises estatísticas. Por fim, esses resultados foram comparados através da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, a qual define o percentual de pacientes que recidivaram ao longo do tempo, ou seja, comparou o tempo livre de doença entre esses pacientes. Os resultados apresentam-se como a média \pm D e a significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$). Foi realizada também, para avaliação dos resultados, a análise de correspondência múltipla, para identificar a existência de associação entre as variáveis analisadas neste estudo, as dosagens das PFAs e os achados clínicos e patológicos dos pacientes. Para tal, foi utilizado o software Statistic 7.

Resultados

Foram incluídos de acordo com a rotina do HOVET-UNESP (Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista) Jaboticabal, SP-Brasil, 13 animais no

GL diagnosticados com linfoma multicêntrico através de citopatologia e histopatologia. Dentre os animais do GL, 8 (61,54%) eram machos e 5 (38,46%) eram fêmeas; a média para a idade foi de 6,8 anos com intervalo de 3-14 anos; e 4 (30,7%) animais foram considerados sem raça definida, representando a maioria. Quanto ao estadiamento, nenhum animal foi classificado nos estádios I e II, 1 (7,7%) animal foi classificado no estágio III, 10 (76,9%) animais foram classificados no estágio IV e 2 (15,4%) foram classificados no estágio V. Quanto ao subestádio, 2 (15,4%) foram classificados como subestádio “a” e 11 (84,6%) como subestádio “b” (Tabela 1).

Na avaliação citopatológica, todos os 13 casos foram classificados como linfomas de grandes células. A partir da avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, observou-se predominância do tipo LDGCB, correspondendo a 53,85% dos casos, Linfoma linfoblástico T com 15,38% dos casos, linfoma imunoblástico B com 15,38% dos casos e Linfoma de células T periférico inespecífico (15,38%). Foi encontrada uma média de 16,3 figuras de mitose em 10 campos de maior aumento. Em relação ao imunofenótipo observou-se um total de 9 pacientes (69,23%) de imunofenótipo B, e 4 pacientes (30,76%) de imunofenótipo T (Figura 1). Em relação ao índice de proliferação celular, Ki67, foi obtido um valor médio de 61,9% e uma moda de 70%. Foi observado que os pacientes que obtiveram resposta parcial ao tratamento obtiveram um valor superior a 70% do Ki67 (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica, resposta terapêutica, estadiamento e subestadiamento dos pacientes do grupo GL

Paciente	Grau histológico	Tempo até a recidiva	Imunofenótipo	Ki67	Estadiamento e subestadiamento
A1	Linfoma difuso grandes células	200 dias	B	40%	IV b
A2	Linfoma imunoblástico	121 dias	B	70%	IV b
A3	Linfoma linfoblástico T	28 di	T	70%	IV b
A4	Linfoma de células T periférico não especificado	77 dias	T	20%	V b
A5	Linfoma difuso grandes células	137 dias	B	65%	V b
A6	Linfoma difuso de grandes células	65 dias	B	45%	IV b
A7	Linfoma linfoblástico T	353 dias	T	90%	IV b
A8	Linfoma difuso de grandes células	461 dias	B	85%	IV a
A9	Linfoma difuso de grandes células	Não recidivou	B	15%	III a
A10	Linfoma de células T periférico não especificado	Não recidivou	T	85%	IV b
A11	Linfoma Imunoblástico	Não recidivou	B	70%	IV b
A12	Linfoma difuso de grandes células	84 dias	B	80%	IV b
A13	Linfoma difuso de grandes células	294 dias	B	70%	IV b

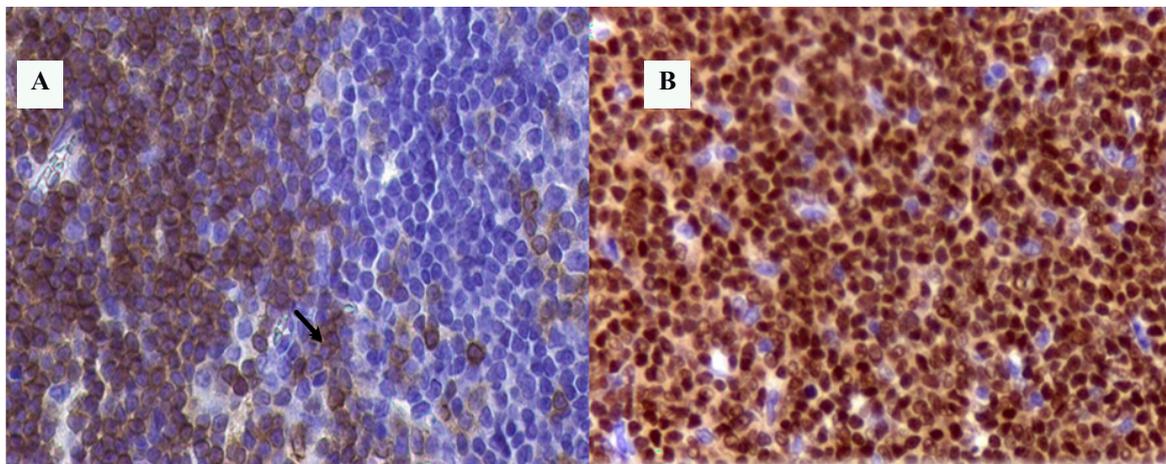


Figura 1. Fotomicrografia de imunomarcção de linfonodo canino. **A:** linfoma de células T, demonstrando difusa imunomarcção citoplasmática para CD3, obj.40x., com anticorpo CD3. **B:** linfoma de células B, demonstrando intensa imunomarcção nuclear para Pax5, obj.40x.

Avaliando a resposta ao tratamento, observou-se que todos os pacientes apresentaram remissão dos sinais clínicos após o primeiro ciclo de quimioterapia antineoplásica, na quinta semana do protocolo, destes, 9 animais apresentaram resposta completa e 4 animais tiveram resposta parcial. Foi observado na avaliação da resposta clínica desses pacientes que os linfonodos periféricos reduziram ao tamanho de 10

mm de diâmetro, após o primeiro ciclo do tratamento quimioterápico. Entretanto, 46,15% dos pacientes apresentaram recidiva antes dos 200 dias a partir do diagnóstico e 23,07% dos pacientes recidivaram com mais de 200 dias a partir do diagnóstico (Tabela 1). A média de tempo livre da doença obtida no trabalho foi de 182 dias (com intervalo de 28-461 dias) e tempo médio de sobrevida de

208,9 dias (com intervalo de 73-480 dias).

Em relação a avaliação da vitamina D, ou [25(OH)D3], foi observado que os cães avaliados, tanto no GC (Grupo Controle), quanto no GL (Grupo Linfoma) eram insuficientes ou deficientes em vitamina D3 (Tabela 2), ou seja, não houve diferença estatística significativa entre as médias de concentração da vitamina D entre os grupos. Na tabela 2 são apresentados os valores médios da concentração sérica média da vitamina D3, de GC e GL nos diferentes momentos do tratamento quimioterápico, demonstrando que não foram significativas as diferenças entre estes valores médios calculados em cada grupo e nem entre os momentos da quimioterapia antineoplásica ($P > 0,05$).

Tabela 2. Médias, desvios-padrão e valor de significância, das concentrações de Vita D3 (ng/mL) de cães com linfoma multicêntrico, nos momentos T0, T5 e T10 da quimioterapia e cães saudáveis, obtidas pela técnica de quimioluminescência CLIA

Variável	Grupo	tempo	Média	Dp	Valor de p	
D3	Controle	T0	45,93	26,39	0,1133	a
		T5	32,77	13,74	0,1133	a
	Linfoma	T5	29,79	14,69		a
		T10	30,49	12,77		a

Letras iguais, valores não diferem entre si. Dp: Desvio Padrão Unidade de medida: ng/mL. Valores de referência para a espécie: Deficiência - Até 24,9 ng/mL; Insuficiência - 25 - 99,9 ng/mL; Suficiência: 100 - 120 ng/mL; Elevado: > 150 ng/mL

Nas análises das concentrações séricas das PFAs, foram encontradas de 18 a 31 frações proteicas nos cães saudáveis e com linfoma, porém somente 11 frações apresentaram evidência no traçado eletroforético. As proteínas séricas totais incluíram albumina, alfa-globulinas, beta-globulinas e gama-globulinas. As subfrações de alfa-globulinas encontradas neste ensaio incluíram alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), alfa-2-ceruloplasmina e alfa-2-haptoglobina. A transferrina foi a beta-globulina encontrada. A IgA e IgG também foram identificadas. As análises estatísticas realizadas por meio do teste ANOVA demonstraram diferenças significativas relacionadas à presença da doença e à evolução da terapia antineoplásica entre as médias das variáveis IgA e α -glicoproteína ácida, com os valores diferindo entre si ($p < 0,05$).

Os pacientes do GL apresentavam maiores teores de IgA (Figura 2 A), AGP (α -glicoproteína ácida) (Figura 2B) e haptoglobina (Figura 2 C) na primeira semana do tratamento, ou seja, antes de iniciar a quimioterapia, no T0, ao compararmos estes valores com a concentração destas proteínas no GC. Ademais, somente os valores médios das concentrações de AGP e de IgA decaíram ao longo do tratamento quimioterápico, nas semanas T5 e T10 de avaliação (Tabela 4). A concentração de haptoglobina apresentou diferença expressiva com a presença da doença ($p < 0,05$), ou seja, ao comparar o grupo controle e o GL na semana T0, porém esta não apresentou oscilação significativa ao longo do tratamento quimioterápico (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Médias, desvios-padrão e valor de significância, das concentrações de PFAs em (mg/dL) de cães com linfoma multicêntrico e cães saudáveis, obtidas pela técnica de SDS-PAGE

Variável	Grupo	Momento	Média	DP	Valor de p	Letra
IgA	Controle	T0	16,33	4,971	0,0118	a
		T5	37,58	21,38		b
CERULOPLASMINA	Controle	T0	26,3	15,91	0,166	a
		T5	35,95	17,66		a
TRANSFERRINA	Controle	T0	249,7	63,3	0,3575	a
		T5	307,4	109,5		a
ALBUMINA	Controle	T0	3926	260,8	0,4418	a
		T5	4372	1356		a
AIANTITRIPSINA	Controle	T0	185,6	37,11	0,0645	a
		T5	270,9	128		a
IgG TOTAL	Controle	T0	1320	193,9	0,1909	a
		T5	1542	737,4		a
HAPTOGLOBINA	Controle	T0	108,7	56,15	0,0003	a
		T5	418,9	275,4		b
AGP	Controle	T0	11,14	3,066	0,0247	a
		T5	52,03	35,67		b

Letras iguais os valores não diferem entre si. DP: Desvio Padrão, Valor de p: Valor de significância

Tabela 4. Médias, desvios-padrão e valor de significância, das concentrações de PFAs de cães com linfoma multicêntrico em (mg/dL) nos momentos T0, T5, T10 da terapia antineoplásica obtidas pela técnica SDS-PAGE

Variável	Grupo	Momento	Média	DP	Valor de p	Letra
IgA	Linfoma	T0	37,58	21,38	0,0118	b
		T5	29,67	14,72		ab
		T10	26,58	10,24		ab
CERULOPLASMINA	Linfoma	T0	35,95	17,66	0,166	a
		T5	38,64	21,1		a
		T10	45,49	23,54		a
TRANSFERRINA	Linfoma	T0	307,4	109,5	0,3575	a
		T5	333,6	150,2		a
		T10	330	133,4		a
ALBUMINA	Linfoma	T0	4372	1356	0,4418	a
		T5	4136	889,4		a
		T10	4644	1380		a
AIANTITRIPSINA	Linfoma	T0	270,9	128	0,0645	a
		T5	303,3	109,8		a
		T10	260,2	98,76		a
IgG TOTAL	Linfoma	T0	1542	737,4	0,1909	a
		T5	1121	531,8		a
		T10	1154	489,8		a
HAPTOGLOBINA	Linfoma	T0	418,9	275,4	0,0003	b
		T5	608,5	353,3		b
		T10	644,6	349,7		b
AGP	Linfoma	T0	52,03	35,67	0,0247	b
		T5	43,03	38,39		ab
		T10	43,97	32,73		ab

Letras iguais, valores não se diferem entre si. Os resultados apresentam-se como a média \pm D e a significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$). DP: Desvio Padrão, Valor de P: Valor de significância.

Os gráficos 2A, 2B E 2C demonstram que os cães com linfoma apresentavam maior a dispersão dos valores individuais das dosagens de IgA, AGP e haptoglobina, respectivamente, em relação à média, quando comparados ao GC, indicando forte correlação entre a

doença e as alterações na concentração da variável em questão. O gráfico 2A demonstra, da mesma forma, a dispersão dos valores de IgA do GL foi maior que no GC, valores diferiram estatisticamente entre si.

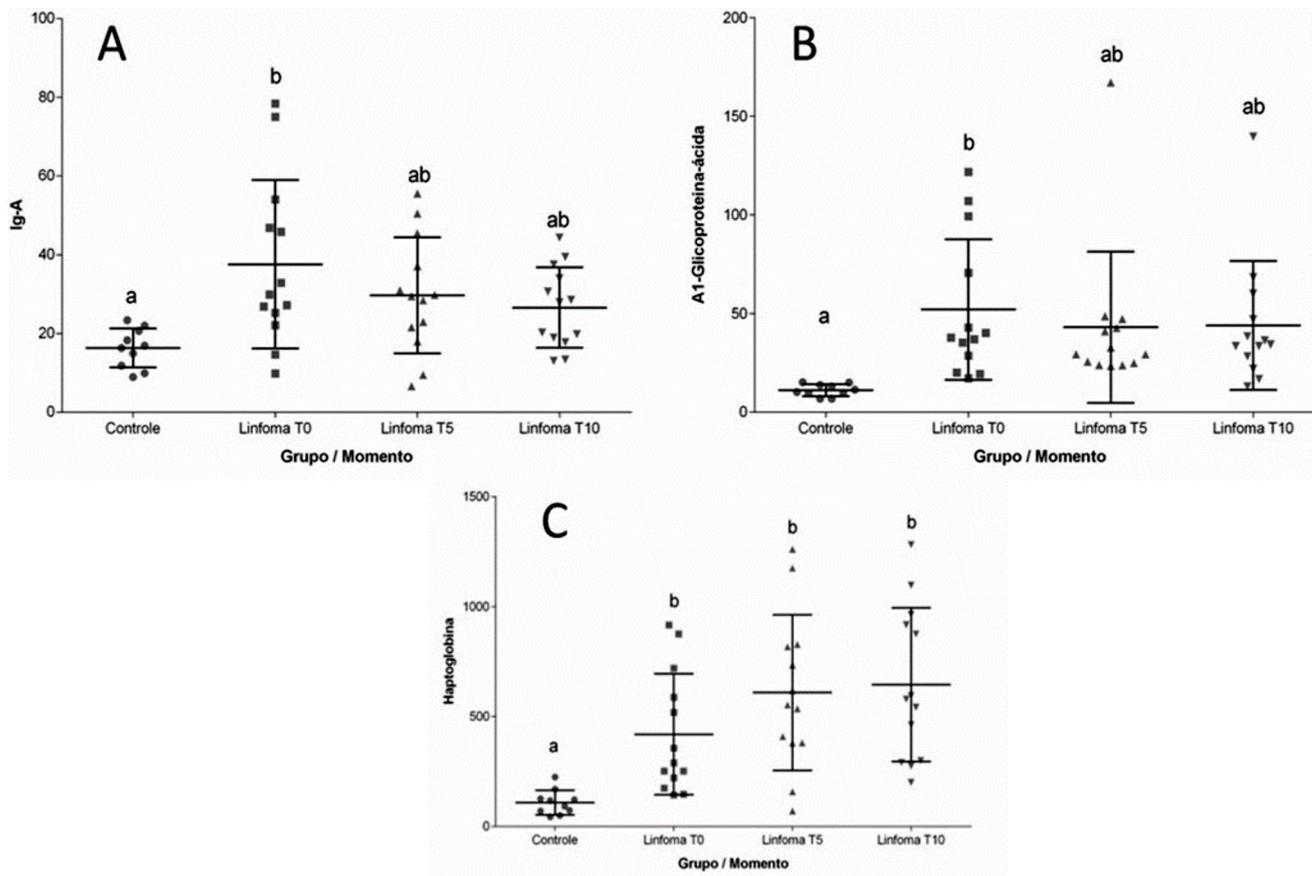


Figura 2. (A): Dispersão entre os valores da concentração da IGA em mg/dL de cães com Linfoma ao longo do tratamento quimioterápico e do grupo controle. Comparação entre concentrações de IGA entre o GL nas semanas T0,T5 e T10 de tratamento quimioterápico e o GC. Houve diferença significativa pelo teste t ($p=0,0118$). **(B):** Dispersão entre os valores da concentração da haptoglobina em mg/dL dos pacientes com Linfoma ao longo do tratamento quimioterápico e do grupo controle. Comparação entre concentrações de haptoglobina entre o GL nas semanas T0,T5 e T10 de tratamento quimioterápico e o GC.. Houve diferença significativa pelo teste t ($p=0,0003$). **(C):** Comparação entre as concentrações da α 1-Glicoproteína ácida ao longo do tratamento quimioterápico e entre os Grupos experimentais (GC: Grupo Controle e GL: Grupo Linfoma). Comparação entre concentrações de AGP entre o GL nas semanas T0,T5 e T10 de tratamento quimioterápico e o GC. Houve diferença significativa pelo teste t ($p=0,0247$).

Os pacientes com maiores concentrações de α 1-glicoproteína ácida no momento do diagnóstico demoraram mais tempo para a apresentar a recidiva da doença e tiveram uma maior sobrevida. Foi determinado um valor de corte para a concentração da α 1-glicoproteína ácida no momento do diagnóstico, a partir do qual foi observada uma distinção na perspectiva de sobrevida e tempo livre de doença desses pacientes. Pacientes com concentração sérica de α 1-glicoproteína ácida superior a 34,8 mg/dL (Tabela 5) no momento do diagnóstico demoraram mais tempo para apresentar recidiva em relação aos pacientes com

concentração sérica inferior a esse valor no momento T0 do tratamento quimioterápico, conforme pode ser observado no gráfico da figura 3, obtido a partir das análises pelo método da curva de Kaplan-Meier (Figura 3).

A sensibilidade e especificidade para a concentração da α -1-glicoproteína ácida em linfoma multicêntrico de cães foram de respectivamente: 61% e 62%. O valor probabilidade da recidiva em pacientes com coorte foi de 35%, enquanto que o valor da recidiva em pacientes sem coorte foi de 58%, com P-Recidiva de 0,139 e com valor de P igual a 0,0232 (Tabela 5).

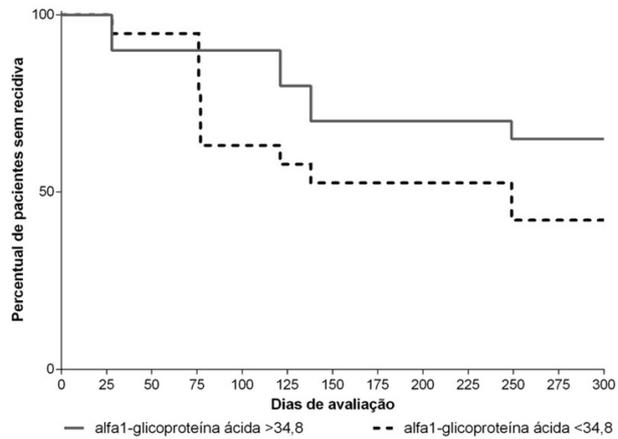


Figura 3. Curvas de recidiva ao longo do tempo dos pacientes com linfoma com a concentração sérica de α 1-Glicoproteína ácida maior e menor que 34,8 mg/dL. Curvas de sobrevivência de cães com Linfoma com alfa-1-glicoproteína ácida “baixa” e alfa-1-glicoproteína ácida “alta”. Houve diferença significativa pela análise de curvas ROC e teste de Kaplan Meier ($p=0,0304$).

Tabela 5. Comparação entre os pacientes com linfoma multicêntrico que recidivaram antes de 200 dias (6/13), com tempo livre de doença médio de 182 dias, e os que não recidivaram (7/13) dentro do intervalo de tempo do estudo

Variável	Recidiva	Média	DP	Valor de p P-Prognóstico	Valor Coorte
IGA	N	30,84	15,84	0,0866	0,9999
	S	31,78	17,41		
CERULOPLASMINA	N	43,99	17,69	0,2014	0,1213
	S	35,4	23,5		
TRANSFERRINA	N	291,3	119,3	0,0906	0,09103
	S	361,5	133		
ALBUMINA	N	4629	1180	0,1764	0,2258
	S	4098	1225		
A1 ANTITRIPSINA	N	276,1	101,1	0,9034	0,8658
	S	280,5	125,3		
IGG TOTAL	N	1217	711,8	0,5476	0,2599
	S	1337	482,2		
HAPTOGLOBINA	N	592,7	315,9	0,0484	0,3981
	S	516,1	360,1		
AGP	N	55,94	42,03	0,0232	0,0304
	S	35,15	20,18		<34,8
VITAMINA D3	N	29,87	15,07	0,5722	0,5447
	S				

Letras iguais, valores não se diferem entre si. Os resultados apresentam-se como a média \pm D e a significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p<0,05$). DP: Desvio Padrão, Valor de P: Valor de significância.

Discussão

Os achados acerca da classificação dos linfomas no modelo adaptado da OMS, corroboram ao descrito em literatura, onde o tipo LDGCB figura como tipo histológico mais comum nos EUA, Europa e Brasil^(19,20). Esse tipo histológico também é o mais comum entre os linfomas Não-Hodgkin em humanos, demonstrando a relevância de estudos em oncologia comparada⁽²⁰⁾.

Considerando o imunofenótipo, observa-se em literatura uma predominância do imunofenótipo B, representando cerca de 70% dos casos de linfoma multicêntrico, sendo que o linfoma T de alto grau apresenta um pior prognóstico e menor tempo de sobrevivência em diversos estudos^(12,15). Isso ocorre devido ao imunofenótipo T estar associado a um maior número de síndromes paraneoplásicas, como a hipercalecemia e também a uma resposta inferior ao tratamento e maior índice de recidiva^(12,15). Entretanto, de forma discordante, Frantz et al. (2012) apontam uma relação muito mais próxima entre os imunofenótipos, com 55% dos casos pertencentes ao imunofenótipo B e 45% dos casos com o T. Em relação ao Ki67, este marcador foi positivo em todas as amostras, com um valor percentual médio alto de 61,9%, o que demonstra um alto índice celular proliferativo, corroborando com os achados que classificam os linfomas em alto grau⁽²¹⁾.

As respostas ao tratamento dos pacientes neste estudo foram avaliadas na quinta e décima semanas de tratamento, de acordo com estudos de Vieira (2013)⁽²²⁾. A resposta tumoral ao tratamento foi determinada na quinta semana do protocolo CHOP, devido à maior probabilidade dos cães com linfoma multicêntrico apresentarem remissão completa após a primeira administração de doxorrubicina do protocolo, porém, Hernandez et al. (2017)⁽²³⁾ estipularam a décima semana para as observações, pois neste período se pode ter melhor parâmetro da ação da doxorrubicina nos pacientes. Durante a avaliação de resposta clínica foram observados redução do tamanho dos linfonodos ao tamanho normal, menores que 10 mm, conforme estudo de Dobson et al., (2001)⁽²⁴⁾, que determinaram que isso caracteriza resposta completa, bem como o desaparecimento dos sinais clínicos nos pacientes nesse período e a ausência de alterações nos exames de imagem, ultrassonografia abdominal e radiografias de tórax.

Em relação à avaliação da concentração sérica das PFAs, em estudos de Vieira (2010)⁽²⁵⁾, também se verificou que, de forma geral, as médias das concentrações séricas das proteínas no soro dos pacientes foi maior no grupo dos cães com linfoma em relação ao grupo controle, corroborando com outros autores que afirmam que há uma maior produção de globulinas e PFAs em cães com doenças inflamatórias e neoplásicas^(26,27). Ainda, de acordo com estudo de Vieira (2010)⁽²⁵⁾, também foi relatado um aumento significativo nas

concentrações séricas de alfa-1- glicoproteína ácida ($p < 0,05$) na presença do linfoma, porém associado a um aumento significativo na concentração de transferrina e IgG. Entretanto, nos achados descritos no presente estudo (Tabelas 2 e 3), não houve diferença significativa entre as variáveis IGG, Transferrina, Albumina, Ceruloplasmina e Alfa-1-antitripsina entre os grupos experimentais, nem entre as semanas avaliadas durante o tratamento ($p > 0,05$). As concentrações normais destas PFAs, podem sugerir que no momento da coleta, os cães doentes não apresentavam o suficiente estímulo pro-inflamatório para influenciar a elevação das concentrações destas proteínas, como explicado por Cerón et al. (2005) ⁽²⁸⁾. O imunofenótipo B e a coleta no início da progressão da doença podem influenciar na concentração das PFAs no soro desses pacientes que tendem a ter uma reação de Fase aguda um pouco mais tardia, sugerindo a coleta e dosagem das PFAs em mais intervalos para que se tenha uma avaliação ainda mais fidedigna⁽²⁸⁾. De acordo com Gahmberg et al. (1978) ⁽²⁹⁾ a glicoproteína ácida pode ser produzida por linfócitos, de modo a justificar a sua elevada concentração em cães diagnosticados com linfoma ⁽²⁸⁾.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os momentos da quimioterapia em relação às concentrações das proteínas séricas analisadas. Porém, pode-se observar uma redução na concentração de IgA, IgG e alfa-1- antitripsina na décima semana do tratamento (Tabela 3). Esse achado foi justificado pela ação do antineoplásico, doxorrubicina, que pode causar lesões nos parênquimas hepático e renal, levando a hipoproteinemia e proteinúria ⁽³⁰⁾.

A haptoglobina é uma das mais importantes PFA em todas as espécies. Em cães com câncer, Calazans et al. (2009) ⁽²⁶⁾ compararam o perfil das PFA em soro de cães saudáveis e com linfoma multicêntrico, detectando uma elevação da ceruloplasmina e haptoglobina, assim como uma diminuição na albumina, nos cães com linfoma^(26, 28, 31). Além disso, outro estudo de Battisti et al. (2013) ⁽³²⁾ avaliaram as PFAs em cadelas com neoplasia mamária, detectando concentrações da haptoglobina elevadas e de albumina diminuídas nas cadelas com tumores ulcerados, quando comparadas com o grupo controle, sugerindo que esta pode ser um fator prognóstico para este tipo de neoplasia ⁽³²⁾. Segundo Cerón et al. (2005) ⁽²⁸⁾, a haptoglobina já pode ser identificada na circulação nas primeiras 24 horas após a injúria e suas concentrações aumentam consideravelmente, sendo o ápice em quatro dias. Dessa forma, pode ser um marcador sensível para o linfoma e outras neoplasias em cães de forma precoce ⁽²⁸⁾.

A IgA encontra-se em maior concentração nas doenças infecciosas, doença do tecido conjuntivo, doença hepática, mieloma e outros tumores do sistema reticulo-endotelial. A IgA apresenta-se em menor concentração nos fetos, nos animais recém nascidos antes da ingestão

do colostro e nas deficiências imunológicas. Muitas vezes, desordens hematopoiéticas induzem a um processo de globulinemia, o que justifica o seu aumento no LC, no pré-tratamento, e pode ser um indicativo de recidiva nesses pacientes ⁽³³⁾. Os achados sugerem um fator protetivo da α -1-glicoproteína ácida para o linfoma multicêntrico em cães, onde cães com maior teor sérico de α -1-glicoproteína ácida no momento do diagnóstico tem menor probabilidade de apresentarem recidiva ou apresentam um maior intervalo livre de doença em relação aos cães com menores concentrações desta proteína.

Os resultados encontrados estão em concordância com os estudos de Garnica et al. (2020) ⁽⁸⁾, nos quais a AGP foi tida comprovadamente como um agente anti-inflamatório natural, que inibe a ativação dos neutrófilos e aumenta a secreção do receptor antagonista de interleucina-1 através dos macrófagos, inibindo, portanto, a proliferação de linfócitos, principalmente neoplásicos, em casos de linfoma⁽⁸⁾. Calazans (2006) ⁽²⁶⁾ e Eckersall (2008) ⁽³⁴⁾ relataram que a determinação das concentrações de α -1-glicoproteína ácida pode ser útil em estimar a carga tumoral, comparando cães com linfoma tratados ou não com doxorrubicina. Além disso, elevações na concentração sérica dessa proteína têm sido descritas em cães com linfoma, carcinomas, exceto o carcinoma mamário, e sarcomas (Céron et al., 2005). A α 1-glicoproteína ácida apresentou-se significativamente elevada ($p < 0,05$) em cães com linfoma, no momento zero, corroborando com achados de literatura, sugerindo que a determinação das concentrações de α 1-glicoproteína ácida (AGP) pode ser útil em estimar a carga tumoral, comparando cães com linfoma tratados com doxorrubicina com os sem tratamento ^(26,34).

Entretanto, especialmente em felinos, a AGP-1 é uma das principais PFA que, em processos neoplásicos malignos ou processos inflamatórios agudos/crônicos, pode elevar sua concentração sérica cerca de 1000 vezes de níveis basais. A utilização deste parâmetro deve ser incluída no monitoramento de cães e gatos, como marcador diferencial para avaliação de neoplasias ou processos inflamatórios agudos ⁽²⁸⁾. Os resultados das análises da curva de Kaplan Meier diferiram dos resultados observados em Dias et al. (2017) ⁽²³⁾, em que não foi observada uma correlação entre concentrações mais altas de alfa-1-glicoproteína ácida e um melhor prognóstico do linfoma multicêntrico em cães. Para estes autores, apenas concentrações mais baixas de transferrina e albumina estão associadas a um menor TLD (Tempo Livre de Doença) e menor tempo de sobrevida dos pacientes ⁽²³⁾.

Assim como a presente pesquisa, o estudo de Vieira et al. (2010) ⁽²⁵⁾ também observou um aumento substancial da concentração da AGP nos pacientes caninos com linfoma multicêntrico em relação ao grupo

controle, sugerindo que esses pacientes apresentavam uma reação de fase aguda (RFA) exacerbada nos momentos das coletas sorológicas, entretanto, mesmo não tendo sido avaliado o valor prognóstico dessa proteína no referido estudo, foi observado que os pacientes com maior teor desta proteína apresentaram maior sobrevida. Esses resultados diferiram dos resultados observados em Dias et al. (2017)⁽²³⁾, em que não foi observada correlação entre concentrações mais altas de alfa-1-glicoproteína ácida e um melhor prognóstico do linfoma multicêntrico em cães. Nesta pesquisa foi verificado que apenas as concentrações mais baixas de transferrina e albumina estavam associadas a um menor TLD e menor tempo de sobrevida dos pacientes⁽²³⁾.

Em relação a vitamina D, embora existam poucos estudos em cães, a associação entre a sua baixa concentração sérica e o risco de desenvolvimento de neoplasias foi descrito em cães com diversos tipos neoplásicos, inclusive em linfomas^(35,36). São considerados deficientes em vitamina D os pacientes com níveis séricos abaixo de 24,99 ng/mL e insuficientes em vitamina D quando nos níveis séricos estão na faixa de 25-99 ng/mL, sendo considerado em nível adequado apenas os pacientes com níveis séricos acima de 99 ng/mL⁽³⁷⁾. Em GC, 80% dos animais foram insuficientes e 10% foram deficientes, com intervalo de concentração de 25,3- 115,2 ng/mL e valor médio de 45,93 ng/mL. O intervalo da concentração de 25(OH)D obtido na população do GL, em T0, foi de 11,2- 62,1 ng/mL com valor médio foi de 32,77 ng/mL. Em relação às diferentes semanas da quimioterapia, 23,07% dos pacientes apresentaram deficiência de Vitamina D3 em T0, 46,15% pacientes foram deficientes em T5, e 38,46% pacientes foram deficientes em T10.

Os resultados acerca da vitamina D foram semelhantes ao estudo de Wakshlag et al. (2011)⁽³⁸⁾ que correlacionou níveis baixos de vitamina D3 com maior incidência de mastocitoma em labradores; estes animais tinham concentração média de 36,7 ng/mL de Vitamina D3 sérica. Ainda, há estudo que demonstrou importante correlação dos níveis de vitamina D3 com a incidência de inúmeras neoplasias, como linfomas, hemangiosarcomas, carcinomas e sarcomas (Husbanda B, 2013)⁽³⁹⁾. Acredita-se que vitamina D3 atue na regulação da proliferação, maturação e apoptose celular, e dessa forma, influencia o desenvolvimento de doenças autoimunes, cardiovasculares e, principalmente, neoplásicas⁽¹⁴⁾.

O achado do presente estudo, em que não foram significativas as diferenças entre estes valores médios calculados em cada grupo, nem entre os momentos da quimioterapia antineoplásica ($P > 0,05$), sugere que níveis séricos de vitamina D mais baixos não são um fator de risco para o desenvolvimento de linfoma multicêntrico em cães; apesar da média da concentração ser diferente

entre os grupos, isso não se confirmou significativamente na análise estatística. Resultados semelhantes foram observados em estudos de Sánchez-Céspedes et al. (2018)⁽⁴⁰⁾, no qual se comparou a concentração sérica de vitamina D3 entre cadelas portadoras de tumores mamários e cães não portadores (machos e fêmeas) e não foram encontradas diferenças que indicassem a relação da concentração de vitamina D3 e a carcinogênese mamária. Diferentemente, no estudo de Selting et al. (2014)⁽³⁷⁾ observou-se forte correlação entre os níveis de vitamina D3 no soro e sua correlação com o desenvolvimento de câncer em cães, com os animais com níveis ideais de vitamina D3 (100-120 ng/ml) apresentando drástica redução na incidência de câncer, em casos de sarcoma de tecidos moles.

Conclusões

As proteínas séricas a IgA, a alfa-1-glicoproteína ácida e haptoglobina podem ser consideradas como potenciais marcadores sensíveis para dar um suporte diagnóstico nos casos do linfoma multicêntrico em cães, entretanto ainda são necessários estudos com a avaliação de um número maior de animais para a determinação do valor prognóstico desses marcadores. Sendo assim, as PFAs podem funcionar como indicativo de linfoma em cães, mas não isoladamente, desde que tenham um quadro clínico sugestivo. A alfa-1-glicoproteína ácida demonstrou valor prognóstico em linfoma multicêntrico alto grau em cães, sendo um fator protetivo para os pacientes com a doença. Ademais, a dosagem de vitamina D3 mensurada nos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico não se apresentou como um marcador prognóstico eficaz em paciente com linfoma multicêntrico, classificados pela citologia como alto grau e de imunofenótipo B, que correspondeu ao tipo de linfoma predominante nesta pesquisa.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses

Contribuições do autor

Conceituação: M.C.P. Rock; *Investigação:* M.C.P. Rocha, J. M. Pazzini e A.B. DeNardi. *Metodologia:* M.C.P. Rock; T.K. Garnica, H. Fukumasu e F.A.R. Sueiro. *Gerenciamento do projeto:* M.C.P. Rocha, J. M. Pazzini e A.B. DeNardi. *Curadoria de dados:* R. A. R. Uscategui. *Redação (esboço original):* M.C.P. Rock. *Redação (revisão e edição):* J. M. Pazzini e F. N. de Paiva. *Supervisão:* A.B. DeNardi.

Referências

- (1) 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*. 2011; 238(4):480-485.

- (2) Dorn C.R., Taylor D.O. & Hibbard H.H. 1987. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am. J. Vet. Res.* 28:993-1001.)
- (3) Silva, Marcia C., et al. Gradação histológica e aspectos clínico-patológicos. *Pesq. Vet. Bras* 38.4 2018: 38.(4): 751-761.
- (4) Thomas R, Seiser EL, Motsinger-Reif A. Refining tumor associated aneuploid through “genomic recording” of recurrent DNA copy number aberrations in 150 canine Non-Hodgkin’s lymphomas. *Leukemia & Lymphoma*. 2011;52:1321-1335.
- (5) Aricó A, Ferrareso S, Bresolin S, Marconato L, Comazzi S, TeKronnie 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*. 2014;9(11):e111817.
- (6) Marconato L, Aresu L, Stefanello D, Comazzi S, Martini V, Ferrari R, Riondato F, Rouquet N, Frayssinet P, Sabbatini S. Opportunities and challenges of active immunotherapy in dogs with B-cell lymphoma: a 5-year experience in two veterinary oncology centers. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2019;7:146.
- (7) Curran, K.; Thamm, D.H. Retrospective analysis for treatment of naive canine multicentric lymphoma with a 15-week, maintenance free CHOP protocol. *Vet. Comp. Oncol.*, v.14, p.147-155, 2016.
- (8) Garnica, T.K., Lesbon, J.C.C., Ávila, A.C.F.C.M. et al. Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. *Sci Rep* 10, 20371 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77366-7>
- (9) Mellanby RJ. Beyond the skeleton: the role of vitamin D in companion animal health. *Journal of Small Animal Practice*. 2017;57(4):175-180.
- (10) Malone EK, Rassnick KM, Wakshlag JJ, Russell DS, Al-Sarraf R, Ruslander DM, Johnson CS, Trump DL. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in vitro and has single-agent activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2010;8(3):209-220.
- (11) Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. 2014;185: 2327.
- (12) Valli VE, Kass PH, SanMyint M, Scott F. Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Veterinary Pathology*. 2013;50(5):738-748.
- (13) Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal*. 2011;188(2):149-155.
- (14) Mocellin S. Vitamin D and cancer. *Deciphering the truth*. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(2):172-8
- (15) Marconato L, Martini V, Stefanello D, Moretti P, Ferrari R, Comazzi S, Laganga P, Riondato F, Aresu L. Peripheral blood lymphocyte/monocyteratio as a useful prognostic factor in dogs with diffuse large B cell lymphoma receiving chemo immunotherapy. *The Veterinary Journal*. 2015;206(2):226-230.
- (16) Sierra Matiz OR, Santilli J, Anai LA, Da Silva MCL, Sueiro FA, Sequeira JL, Magalhães LF, Magalhães GM, Tinucci Costa M, Calazans SG. Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2018;30(2):263-267.
- (17) Poggi A, Miniscalco B, Morello E, Gattino F, Delaude A, Ferrero-Poschetto L, Aresu L, Gelain ME, 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*. 2017;15(2):431-440.
- (18) Laemmli, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970). <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- (19) Jark PC, Fracacio CP, Anai LA, Silva MCL, Calazans SG, Senhorello ILS, Costa MT, Sequeira JL, Sueiro FAR. Caracterização histopatológica e imunofenotípica do linfoma multicêntrico canino no Brasil: um estudo de 203 casos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2020;72(3):787-793.
- (20) Beaver LM, Strottner G, Klein MK. Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008). *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Nov 1;237(9):1052-5 doi: <https://doi.org/10.2460/javma.237.9.1052>.
- (21) Frantz, a.m., Sarver, a.l., Ito, d., Phang, t.l., Karimpour-fard, a., Scott, m.c. 2012. molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. *vet pathol*. 50(4):693-703.
- (22) Vieira, M.C., et al. Acute Phase Proteins in Canine Lymphoma During Antineoplastic Chemotherapy. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2010, 3(2), 86-92.
- (23) Dias FR, Anai LA, Jark P, Hernandez GV, Sierra-Matiz OR, Calazans SG. Estudo Retrospectivo de 33 Casos De Linfoma Cutâneo Canino. *Investigação*. 2015;14(3).
- (24) Dobson, J. M.; Gorman, N. T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response two chemotherapeutic protocols. *Journal of Small Animal Practice*, London, v. 35, p. 9-15, 2001.
- (25) Vieira MC, Coleta FED, Godoy AV, Sobreira MFR, Galvão ALB, Borin S, Crivelenti LZ, Anai LA, Nogueira AFS, Santana AE. Acute Phase Proteins in Canine Lymphoma During Antineoplastic Chemotherapy. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2010;3(2):86-92.
- (26) Calazans SG, Daleck CR, Fagliari JJ, Repetti CF, De Nardi AB, Castro JHT, Fernandes, S. C.; César, J. R. F.; Rodigheri, S. M. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2009;61(5):1044-1048.
- (27) Cray C. Acute phase proteins in animals. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012;105:113-150.
- (28) Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute phase protein in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*. 2005;34(2):85-99.
- (29) Carl G. Gahmberg, Leif C. 1978. Andersson. Leukocyte surface origin of human at-acid glycoprotein (orosomucoid). *J. Exp. Med*. 507-521.
- (30) Nakagea APM, Santana AE. Avaliação das funções hepática e renal de cães expostos ao antineoplásico doxorrubicina. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*. 2008;6(3):371-379.
- (31) McGrotty, Y. L.; Arteaga, A.; Knottenbelt, C. M.; Ramsey, I. K.; Eckersall, P. D. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinical Pathology*, Santa Barbara, v. 34, n. 3, p. 255-258, 2005.
- (32) Battisti, M.K.; Silva, D.M.; Reusingi, M.S. et al., Proteínas de fase aguda em cadelas com neoplasia mamária. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.5, p.902-907, mai, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000500025>

- (33) Gershwin, L. J. Clinical Veterinary Immunology. In: Kaneko J. J., Harvey J. W.; Bruss M. L. Clinical biochemistry of domestic animals, 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008, p. 157-172.
- (34) Eckersall PD. Proteins, Proteomics and The Dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. Burlington: Academic Press. 2008. p.117-155.
- (35) Wakshlag, JJ, Rassnick KM, Malone EK, Struble AM, Vachhani P, Trump DL, Tian L. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. British Journal of Nutrition. 2011;106(S1):S60-S63.
- (36) Gerber B, Hauser B, Reusch CE. Serum levels of 25-hydroxycholecalciferol and 1, 25-dihydroxycholecalciferol in dogs with hypercalcaemia. Veterinary Research Communications. 2004;28(8):669-680.
- (37) Selting KA, Sharp CR, Ringold R, Thamm DH, Backus R. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs— correlation with health and cancer risk. Veterinary and Comparative Oncology. 2016;14(3):295-305.
- (38) Wakshlag JJ, Rassnick KM, Malone EK, Struble AM, Vachhani P, Trump DL, et al. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. Br J Nutr. 2011;106(Suppl1):S60–3. doi: <https://doi.org/10.1017/S000711451100211X>.
- (39) Husbands B. Low stores of 25-hydroxyvitamin D levels and its association with cancer in dogs. VCS presentation, 2013.
- (40) Sánchez-Céspedes R, Fernández-Martínez MD, Raya A, Pineda C, López I, Millán Y. Vitamin D receptor expression in canine mammary gland and relationship with clinicopathological parameters and progesterone/oestrogen receptors. Veterinary and Comparative Oncology. 2018;16(1):E185-E193.