

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Neoplasias diagnosticadas em caninos na região sul do Rio Grande do Sul
entre 2000-2017: correlação histoquímica, imuno-histoquímica e variações
genéticas**

Ana Carolina Barreto Coelho

Pelotas, 2019

Ana Carolina Barreto Coelho

**Neoplasias diagnosticadas em caninos na região sul do Rio Grande do Sul
entre 2000-2017: correlação histoquímica, imuno-histoquímica e variações
genéticas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Ana Lucia Schild

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C672n Coelho, Ana Carolina Barreto

Neoplasias diagnosticadas em caninos na região sul do Rio Grande do Sul entre 2000-2017: correlação histoquímica, imuno-histoquímica e variações genéticas / Ana Carolina Barreto Coelho ; Ana Lucia Schild, orientadora. — Pelotas, 2019.

53 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Neoplasias. 2. TP53. 3. Imunofenótipo. 4. Linfoma. 5. Imuno-histoquímica. I. Schild, Ana Lucia, orient. II. Título.

CDD : 636.7

Ana Carolina Barreto Coelho

Neoplasias diagnosticadas em caninos na região sul do Rio Grande do Sul entre 2000-2017: correlação histoquímica, imuno-histoquímica e variações genéticas

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2019

Banca examinadora:

Dr^a. Ana Lucia Schild (Orientadora)
Doutora em Ciências/Patologia pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr^a. Eliza Simone Sallis
Doutora em Ciências/Patologia pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr^a. Margarida Buss Raffi
Doutora em Ciências/Patologia pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr^a. Luciana Sonne
Doutora em Patologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Á Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para ultrapassar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas, todas muito especiais.

A realização desta tese marca o término de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a sua concretização.

Aos meus pais Lenira e Afrânio e minha avó Leni, que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes, sempre com muito apoio, compreensão e amor. São para mim, grandes exemplos de garra e persistência.

À Dra. Ana Lucia Schild pela amizade, confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pelo incentivo na superação dos meus limites. Ao Dr. Clairton Marcolongo Pereira e Lavínia Faccini pela infinita disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos, que sempre compreenderam a importância do doutorado na minha vida. Às minhas amigas Júlia Rosa Almeida, Haide Scheid e Pablo Estima que neste período me apoiaram incondicionalmente, sendo companhias nos momentos de dúvidas, aconselhando-me e dando força para continuar a jornada.

Aos professores, em especial a professora Simone Sallis e a professora Margarida Raffi, e técnicos do Departamento de Patologia e do Laboratório Regional de Diagnóstico, agradeço por todo incentivo, carinho e disponibilidade no auxílio deste trabalho. À Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de continuar aprendendo desde a graduação.

A todas as pessoas com as quais compartilhei esses quatro anos, àquelas que tiveram influência no meu trabalho direta ou indiretamente, por tudo o que aprendi e cresci. A todos os companheiros de doutorado, em especial a colega Bianca Lemos Santos pelo apoio e companheirismo.

Resumo

COELHO, Ana Carolina Barreto. **Neoplasias diagnosticadas em caninos na região sul do Rio Grande do Sul entre 2000-2017: correlação histoquímica, imuno-histoquímica e variações genéticas.** 2019. 53f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O aumento dos casos de neoplasias em animais domésticos é um problema crescente na prática veterinária e importante causa de morte em diversas espécies, principalmente caninos e felinos. Dentre estas neoplasias os tumores de mama e os tumores de células redondas como linfoma e tumor venéreo transmissível (TVT), são frequentemente diagnosticados na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD / UFPel). São, portanto, incluídos nesta tese três trabalhos científicos. No primeiro foi realizado um estudo retrospectivo de linfomas caninos diagnosticados no LRD / UFPel entre 2000 e 2017, para determinar sua epidemiologia e distribuição anatômica, e avaliar os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos de cada caso, de acordo com a classificação de Kiel adaptada. Linfoma foi diagnosticado em 77 cães. Em relação à classificação anatômica, a forma multicêntrica foi a mais prevalente, representando 71,4% (55/77) dos diagnósticos. Nos 40 casos em que a imunofenotipagem foi realizada, os linfomas de células B representaram 62,5% dos diagnósticos (25/40), enquanto os linfomas de células T corresponderam a 37,5% dos diagnósticos (15/40). O grau de malignidade de acordo com a classificação de Kiel modificada foi baixo em 35% dos linfomas (14/40) e alto em 65% dos casos (26/40). A forma multicêntrica foi mais frequente na região de influência do LRD / UFPel. No segundo trabalho foi realizado um estudo molecular para identificação de mutações nos éxons 7 e 8 no gene TP53 em tumores de mama em 20 cães fêmea de diferentes raças ou misturados não foram encontradas alterações na sequência dos mesmos e suas regiões intrônicas limítrofes. O sequenciamento dos demais éxons e regiões intrônicas bem como a ampliação do número de cães analisados podem revelar alterações não detectadas aqui, demonstrando a importância de expandir o presente estudo. No terceiro artigo foi demonstrado que a IHQ é uma ferramenta importante para diferenciar o TVT canino de outros tumores de células redondas.

Palavras-chave: neoplasias; TP53; imunofenótipo; linfoma; imuno-histoquímica

Abstract

COELHO, Ana Carolina Barreto. **Neoplasms diagnosed in canines in the southern region of Rio Grande do Sul between 2000-2018: histochemical correlation, immunohistochemistry and genetic variations.** 2019. 53f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The increase in the incidence of tumors in domestic animals is a growing concern in veterinary practice and an important cause of death in several species, mainly dogs and cats. Among these neoplasms, breast cancer and round cell tumors such as lymphoma and transmissible venereal tumor (TVT) are frequently diagnosed in the area of influence of the Regional Diagnostic Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Pelotas (LRD / UFPel). Therefore, three scientific papers were included in this thesis. In the first, a retrospective study of canine lymphomas diagnosed in the LRD / UFPel between 2000 and 2017 was carried out to determine their epidemiology and anatomical distribution, and to evaluate the histopathological and immunohistochemical aspects of these lymphomas, according to the modified Kiel classification. Lymphoma was observed in 77 dogs. The multicentric form was the most prevalent, representing 71.4% (55/77) of the diagnoses. In 40 cases immunophenotyping was performed, and B-cell lymphomas accounted for 62.5% of the diagnoses (25/40), while T-cell lymphomas corresponded to 37.5% of the diagnoses (15/40). The degree of malignancy according to the modified Kiel classification was low in 35% of lymphomas (14/40) and high in 65% of cases (26/40). The multicentric form was more frequent in the region of influence of the LRD / UFPel. In a second paper, a molecular study was carried out to identify mutations in exons 7 and 8 in the TP53 gene in canine mammary tumors. Twenty mammary tumors of mixed breed female dogs were analyzed. The sequencing of the other exons and intron regions as well as the increase in the number of dogs analyzed may reveal alterations not detected here, demonstrating the importance of expanding the present study. IHQ is an important tool for differentiating canine TVT from other round cell tumors.

Keywords: neoplasms; TP53; immunophenotype; lymphoma; immunohistochemistry

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Linfoma no cão. A. Linfoma linfocítico. Pequenas células, com pequenos núcleos arredondados, cromatina densa e citoplasma escasso (HE 20X). B. Linfoma centrocítico. Pequenas células com citoplasma escasso, com núcleos pequenos e irregulares, cromatina variando de frouxa à densa (HE 20X). C. Linfoma Centrocítico-centroblástico. Dois grupos celulares distintos, pequenas células semelhantes ao tipo centrocítico e grandes células semelhantes ao tipo centroblástico (HE 20X). D. Linfoma Centroblástico. Células grandes com citoplasma levemente basofílico, variando de escasso à abundante. Núcleos arredondados, cromatina solta, com múltiplos nucléolos periféricos de tamanho médio e mitoses (HE 20X)..... 22
- Figura 2 Linfoma no cão. A. Linfoma imunoblástico positivo para anticorpo anti-CD79a (célula B) (20X). B. Linfoma centrocítico-centroblástico positivo para anticorpo anti-CD3 (célula T). (20X)..... 22

Artigo 3

- Figura 1 Tumor venéreo transmissível metastático. A e B. Quiasma óptico e parte ventral do tálamo exibindo uma massa nodular branca acinzentada medindo 1,0 cm de diâmetro. C. Câmara anterior do olho exibindo uma massa branca acinzentada. D. Pulmão com uma massa semelhante à do sistema nervoso central. E. Neoplasia composta por filas e cordões de células redondas a ovoides, com grandes núcleos redondos (HE 20X). F. Imunomarcação positiva no citoplasma das células do tumor para vimentina. Cromogeno DAB... 43

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Número de casos e características histológicas dos linfomas observados de acordo com os critérios do sistema Kiel modificado.....	20
Tabela 2	Classificação histológica e imunohistoquímica de 40 casos de linfomas caninos, idade, sexo e localização anatômica.....	21

Artigo 2

Tabela 1	Diagnósticos histopatológicos dos tumores de mama em cães.....	29
----------	--	----

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Artigos.....	13
2.1 Artigo 1.....	13
2.2 Artigo 2.....	23
2.3 Artigo 3.....	32
3 Considerações Finais.....	44
Referências.....	45
Anexo.....	52

1 Introdução

O aumento dos casos de neoplasias em animais domésticos é um problema crescente na prática veterinária especialmente nas espécies canina e felina (SALVADOR, 2010). No Brasil, um estudo realizado na região metropolitana de São Paulo apontou as neoplasias como a segunda principal causa de morte em cães, representando 13,28% (BENTUBO et al., 2007). No sul do país, na Mesorregião Centro Ocidental Rio-Grandense, 7,8% dos cães morreram ou foram submetidos à eutanásia por apresentarem complicações relacionadas a neoplasmas em estudo de 4844 casos (FIGHEIRA et al., 2008). As neoplasias são uma das principais causas de morte em cães com mais de 10 anos, acometendo 50% destes. Dos cães afetados, em torno de 25% morrem devido à doença (ADAMS et al., 2010).

Neste contexto, o nível de especialização e as exigências veterinárias de diagnósticos mais precisos, em particular para as neoplasias, têm despertado a necessidade de implementar técnicas auxiliares de diagnóstico (SILVA et al., 2015). O diagnóstico dos diversos tipos de neoplasia na clínica veterinária tem se tornando cada vez mais importante, já que cada tipo de neoplasia responde a um tratamento específico (WITHROW et al., 2013).

A imuno-histoquímica (IHQ), além das diversas técnicas histoquímicas, é uma ferramenta importante na caracterização de doenças neoplásicas em seres humanos e tornou-se igualmente importante na medicina veterinária. A técnica mostra-se fundamental na rotina diagnóstica para a identificação dos diferentes tipos histológicos e de fatores prognósticos, direcionando os animais afetados para tratamento adequado, além de identificar os tumores com maior risco de recidiva e evolução fatal (CAPELOZZI, 2009). O número de testes de IHQ oferecidos pelos laboratórios veterinários para o diagnóstico de neoplasias aumentou exponencialmente na última década (RAMOS-VARA et al., 2008).

As possibilidades para utilização desta técnica em oncologia veterinária são ilimitadas. A avaliação da proliferação celular, angiogênese, expressão de COX-2 e outros marcadores celulares representam fatores prognósticos e preditivos para inúmeros processos neoplásicos (HORTA et al., 2012). Além disso, a IHQ pode ser

aplicada na oncologia veterinária para a definição do imunofenótipo neoplásico e pode, também, ser usada, particularmente, em estudos retrospectivos, quando tecidos frescos ou congelados não podem ser avaliados ou quando as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente (ARSLAN et al., 2004). Esta técnica tem sido utilizada para determinação do imunofenótipo de linfomas (FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Diversos trabalhos têm dado conta de que a técnica tem possibilitado um diagnóstico detalhado, prognóstico e direcionamento de tratamento adequado para os linfomas caninos e de outras espécies animais (TESKE et al., 1994; KIUPEL et al., 1999; HORTA et al., 2012). A IHQ é, também, fundamental para o diagnóstico de neoplasias indiferenciadas como as de células redondas (RAMOS-VARA et al., 2008).

Além da IHQ, nos últimos anos a genética e a biologia molecular tem contribuído para o avanço no conhecimento sobre a biologia dos tumores. Grande parte do conhecimento em relação à biologia das neoplasias está direcionada aos humanos, tornando necessária a compreensão mais abrangente na área da medicina veterinária (RICHARDSON et al., 1997). O diagnóstico molecular em oncologia tem sido utilizado na detecção de mutações somáticas, alterações gênicas ou expressão proteica que podem alterar o diagnóstico, prognóstico e a terapia dos animais com neoplasias (ENGSTROM et al., 2011).

As mutações podem ocorrer em qualquer uma das etapas de crescimento e diferenciação celular. O acúmulo destas mutações é que pode resultar na desregulação progressiva do crescimento e originar uma célula tumoral. De modo geral, as mutações de genes específicos se acumulam em células somáticas, as quais perdem um número essencial de mecanismos de controle de crescimento, dando início a formação do tumor (JORDE et al., 2000). Mutações no gene supressor de tumor *TP53* parecem ser a alteração genética mais comum nos tumores de mama canino (LEE et al., 2004). O *TP53* produz uma proteína que é fundamental na regulação do ciclo celular, levando à morte celular ou senescência quando o sistema de reparo normal da célula não consegue corrigir erros no DNA (NAKAMURA et al., 2002). As mutações nesse gene estão associadas à progressão dos tumores, além de demonstrarem maior potencial de malignidade e piora do prognóstico (MUTO et al., 2000; LEE & KWEON, 2002; LEE et al., 2004).

Os objetivos do presente trabalho foram realizar um estudo comparativo dos linfomas observados em caninos utilizando a histoquímica e a imuno-histoquímica, bem como determinar a imunofenotipagem desta neoplasia em tecido incluído em parafina. Objetivou-se, também, determinar a prevalência das mutações somáticas do gene *TP53* em tumores de mama mais frequentemente diagnosticados em caninos. Descreveu-se, ainda, um caso de TVT com metástase no sistema nervoso central.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Canine lymphomas diagnosed in southern Brazil between 2000 and 2017: epidemiology and immunophenotype

Ana Carolina Barreto Coelho; Joanna Vargas Zillig Echenique; Bianca dos Santos Lemos; Pablo Estima-Silva; Eliza Simone Viégas Sallis; Margarida Buss Raffi e Ana Lucia Schild

Aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Canine lymphomas diagnosed in southern Brazil between 2000 and 2017: epidemiology and immunophenotype¹

Ana Carolina Barreto Coelho^{2,3}, Joanna Vargas Zillig Echenique², Bianca dos Santos Lemos², Pablo Estima-Silva², Eliza Simone Viégas Sallis⁴, Margarida Buss Raffi⁴ e Ana Lucia Schild^{5*}

ABSTRACT.- Coelho A.C.B, Echenique J.V.Z., Lemos B.S., Estima-Silva P., Sallis E.S.V., Raffi M.B. & Schild A.L. 2016. [Canine lymphomas diagnosed in the southern Brazil from 2000 to 2017: epidemiology and immunophenotype]. Linfomas caninos diagnosticados na região Sul do Rio Grande do Sul entre 2000 e 2017: epidemiologia e imunofenótipo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(00)00-00. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil. E-mail: alschild@terra.com.br

Lymphoma is a neoplasm that originates from solid hematopoietic tissues and is one of the most common tumors in dogs. The goal of the present study was to perform a retrospective study of canine lymphomas diagnosed at the Laboratório Regional de Diagnóstico, at the Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) between 2000 and 2017, to determine the epidemiology and anatomical distribution, and to evaluate the histopathological and immunohistochemical aspects of each case according to the adapted Kiel classification. The protocols for necropsies and biopsies in the laboratory were reviewed. Lymphoma was diagnosed in 77 dogs. Approximately 37.7% (29/77) of affected dogs had no defined breed, while dogs with defined breeds accounted for 58.4% (45/77) of the diagnoses. The occurrence in males (40/77) was slightly higher than that in females (36/77), and the mean age was 8.1 years (1.4-17 years). The most affected age group was between six and 10 years of age with 31 cases (40.2%). Regarding the anatomical classification, the multicentric form was the most prevalent, accounting for 71.4% (55/77) of the diagnoses. In 40 cases in which immunophenotyping was performed, B-cell lymphomas represented 62.5% of the diagnoses (25/40), while T-cell lymphomas corresponded to 37.5% of the diagnoses (15/40). The degree of malignancy according to the modified Kiel classification was low in 35% of lymphomas (14/40) and high in 65% of cases (26/40). The multicentric form was more frequent in the region of influence of the LRD/UFPel. Identification of the immunophenotype can improve the quality of life and survival in affected dogs since it allows the most appropriate treatment for each patient.

INDEX TERMS: Dog, lymphoma, immunophenotyping.

Resumo

O linfoma é uma neoplasia com origem nos tecidos hematopoiéticos sólidos e é um dos tumores mais frequentes em cães. O objetivo do presente trabalho foi efetuar um estudo retrospectivo dos linfomas caninos recebidos no Laboratório Regional de Diagnóstico, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas entre 2000 e 2017, determinando a epidemiologia e a distribuição anatômica, bem como os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos de cada caso de acordo com a classificação de Kiel adaptada. Foram revisados os protocolos de necropsias e biópsias recebidos no laboratório identificando-se 77 casos de cães com diagnóstico de linfoma. A doença afetou cães sem raça definida em 37,7% (29/77) dos casos, enquanto os cães com raças definidas tiveram 58,4% (45/77) dos diagnósticos. A ocorrência em machos (40/77) foi discretamente maior do que em fêmeas (36/77) e a idade média foi de 8,1 anos (1,4-17 anos). A faixa etária mais acometida foi entre seis e 10 anos de idade com 31 casos (40,2%). Quanto à classificação anatômica a forma multicêntrica foi a mais prevalente atingindo 71,4% (55/77) dos diagnósticos. Em 40 casos em que foi realizada a imunofenotipagem, os linfomas de células B representaram 62,5% dos casos (25/40), enquanto os linfomas de células T equivaleram a 37,5% dos diagnósticos (15/40). O grau de malignidade de acordo com a classificação de Kiel modificada foi baixo em 35% dos linfomas (14/40) e alto em 65% dos casos (26/40). Conclui-se que a forma multicêntrica é mais frequente na região de influência do LRD/UFPel e que a identificação do imunofenótipo pode melhorar a qualidade de vida e dar maior sobrevida aos cães afetados uma vez que permite o tratamento mais adequado para cada caso.

¹Recebido em

Aceito em

² Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

³Faculdade de Veterinária, Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter), Rua Orfanotrófio 555, Alto Teresópolis, Porto Alegre, RS 90840-440, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia, FV-UFPel, Campus Capão do Leão s/n, Pelotas, RS96010-900, Brasil.

⁵ Laboratório Regional de Diagnóstico, FV-UFPel, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

*Autor para correspondência: E-mail: alschild@terra.com.br

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cães, linfoma, imunofenótipo.

Introduction

Lymphoma, which is also called lymphosarcoma, is a common hematopoietic neoplasm in dogs and accounts for 7% to 24% of all canine tumors and up to 83% of hematopoietic neoplasms in this species (Vail & Young 2007 Vail 2010). The etiology of lymphoma has been reported to be multifactorial and includes viral infections, genetic predisposition, and environmental factors (Cunha et al. 2011). Human non-Hodgkin's lymphoma (NHL) has several characteristics in common with canine lymphoma and because of this similarity, the schemes used for morphological classification of human NHL, such as those of the Kiel and Working Formulation, have been used with success by several authors to classify canine lymphoma (Moreno & Bracarense 2007, Suzano et al. 2010). Both systems classify lymphoma according to the degree of malignancy, and the World Health Organization (WHO), classifies lymphoma anatomically according to its origin as multicentric, mediastinal or thymic, alimentary, cutaneous and extranodal, of which multicentric lymphoma is the most common presentation (Owen 1980).

The large amount of tumor biology information in different neoplastic types in each species requires careful diagnosis and encompasses cellular and molecular characteristics that go beyond the definition of malignancy (Ramos-Vara et al. 2008). Immunohistochemistry (IHC) is an important tool for characterizing neoplastic diseases in humans and has also become important in veterinary medicine. This technique is fundamental in routine diagnostics for identifying different histological types and prognostic factors, directing appropriate treatment for the affected animals, and identifying patients with a higher risk of relapse and fatal course of disease (Capelozzi 2009). In veterinary medicine, there are few studies on the epidemiological, clinical, morphological and phenotype characteristics of lymphoma in dogs (Moreno & Bracarense 2007).

The objective of the present study was to perform a retrospective study of canine lymphomas diagnosed at the Laboratório Regional de Diagnóstico, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) between 2000 and 2017, to determine its epidemiology and anatomical distribution, to describe the histopathological and immunohistochemical aspects of 40 diagnosed cases according to the Kiel classification, and to determine the predominant immunophenotype in dogs in the region of influence of the LRD/UFPel.

Material e Methods

Records from biopsies and necropsies performed between 2000 and 2017 by the LRD/UFPel were reviewed. Epidemiological information (breed, sex and age), histological descriptions and anatomical locations of the tumors were retrieved. The dogs were grouped by age, as follows: (1) up to two years; (2) between two and five years; (3) older than five years but younger than 10 years; and (4) older than 10 years (Cunha et al. 2011). Regarding the size of the breed, the dogs were divided into giant or large breeds, medium breeds and small breeds. To perform the anatomical classification, the criteria proposed by the World Health Organization (OMS) were used. In addition, 40 cases were selected and histologically reassessed and classified according to the modified Kiel system (Suzano et al., 2010) and were immunophenotypically characterized using immunohistochemical technique. For the detection of immunophenotype B, anti-CD79a antibody [CD79A Protein, Mouse, Recombinant (ECD, Fc Tag) BIOCARE MEDICAL] was used at a dilution of 1:100, and for T-immunophenotype, anti-CD3 antibody (Rabbit Monoclonal, EP41 - IgG BIOCARE MEDICAL) was used at a dilution of 1:100 in 7.2% PBS solution. Histological sections 3- μ m thick were mounted on charged slides, were deparaffinized and rehydrated in a xylol and alcohol battery. For endogenous peroxidase blocking, 10% hydrogen peroxide solution diluted in methanol was added for 20 minutes at room temperature. Antigen retrieval for anti-CD79a was performed using TRIS solution after microwaving for 15 minutes, and for anti-CD3 antigen retrieval, proteinase K was used for 15 minutes at room temperature. Blocking of nonspecific reactions (background) was performed with 5% skim milk diluted in 7.2% PBS for 25 minutes. The sections were covered with the solution containing the antibody and incubated in a humid chamber for 18 h (overnight) at 4°C. The sections were incubated with MACH 4 Mouse Probe for 15 minutes at 33°C and then incubated with MACH 4 HRP Polymer for 30 minutes at 35°C, both of which were purchased from BIOCARE MEDICAL (MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection System). The chromogen associated detection system (DAB) was applied for approximately 40 seconds. The slides were then sheared with Harris hematoxylin for approximately 15 seconds, washed in distilled water and dehydrated in increasing alcohol gradations, clarified in xylol and mounted with Entellan. For the negative control, 7.2% nonimmune PBS was used instead of the primary antibody, and as a positive control, unchanged swine tonsils were used. The slides were evaluated under an optical microscope and classified as positive or negative.

Results

Between 2000 and 2017, 77 cases of canine lymphoma were diagnosed in the LRD: 38 in biopsies/organs and 39 in necropsies. Thirty-one (40.2%) dogs were 5 to 10 years-old; 18 (23.4%) were older than 10 years; 17 (22.1%) were 2 to 5 years-old; and 2 (2.6%) were aged less than 2 years. The mean age of the affected dogs was eight years and one month. In nine protocols, the age was not reported. Regarding the sex of dogs affected by the disease, 40 cases (52%) were observed in males, and 36 cases (47%) were observed in females; in one case, the sex of the animal was not reported. Out of 77 cases, 45 occurred in dogs with a defined breed, and 29 occurred in dogs with an undefined breed. In three cases, the breed was not recorded in the protocols. Out of the 45 dogs with a defined breed, 22 (48.9%) were giant or large breeds, 14 (31.1%) were medium-sized breeds, and 9 (20%) were small breeds. Regarding the anatomic classification, the multicentric presentation was observed in 55 cases (71.4%), followed by the alimentary form in nine cases (11.7%), the cutaneous form in seven cases (9.1%), and extranodal disease in six cases (7.8%).

Out of the 40 cases of canine lymphoma selected for immunophenotyping, 21 were from necropsies, and 19 were from biopsies. The course of the disease from the first clinical signs until death or euthanasia was recorded in the protocols of 13 necropsies. Out of these 13 cases, 10 were positive for B cells, eight were multicentric, one was alimentary and one extranodal, and the course varied from three days to three years; in the dog with extranodal lymphoma, the disease duration was three days. Of the three cases that were positive for T cells, all were multicentric, and the course of disease ranged from two weeks to six months. In two biopsies that were sent to the LRD/UFPel and were both positive for B cells and multicentric, the survival of the affected dog in one case was two years and eight months, and in the other was four weeks. In the patient with the longer disease course, the dog was treated with the protocol indicated for the disease (a combination of cyclophosphamide, vincristine and prednisone for four weeks and maintenance with lomustine for five months). The patient with the duration of disease of one month was not treated.

Forty cases of lymphoma were diffuse, and the number of cases and the histological characteristics (Fig. 1A, B, C and D), according to the Kiel criteria are presented in Table 1. The degree of malignancy according to the modified Kiel classification was low in 35% of lymphomas (14/40) and high in 65% of lymphomas (26/40). According to the results of immunohistochemistry, B-cell lymphomas represented 62.5% of the cases (25/40), while T-cell lymphomas corresponded to 37.5% of the cases (15/40). Table 2 shows the frequency of the cell types observed in each case of lymphoma according to the Kiel classification, as well as the immunophenotype of each tumor.

Regarding the anatomical classification of the 40 selected cases, the multicentric form occurred in 65% (26/40) of dogs with a history of generalized lymphadenopathy; 17 were diagnosed at necropsy, and nine were diagnosed by biopsies. Eighteen dogs were positive for B cells, and eight were positive for T cells. The cutaneous form occurred in 12.5% (5/40) of the dogs, and all of them were positive for T cells; the alimentary form occurred in 12.5% (5/40) of the dogs, and all of them were positive for B cells; and the extranodal form occurred in 10% (4/40) of the dogs, with two dogs being positive for B cells (Fig. 1 A) and two dogs being positive for T cells (Table 2, Fig. 2B).

Discussion

In the present study, 29 dogs with lymphoma had no defined breed, and 48 patients were of various breeds, with Rottweilers being the most affected dog breed. In other reports, it has been shown that breeds, such as Rottweilers, Boxers, German Shepherds, Cocker Spaniels and Poodles, develop lymphoma more frequently than other dog breeds (Cardoso et al. 2003, Moreno & Bracarense 2007, Cunha et al. 2011). If we consider the individual breed, the incidence of lymphoma in dogs with an undefined breed was much higher than in those with defined breeds. It is estimated that in the municipality of Pelotas, where most of the dogs in this study came from, that there are approximately 66,700 dogs, of which approximately 80% have no defined breed or are crossbred (Prefeitura Municipal de Pelotas Pelotas 2012). This could justify the large number of cases in undefined breed dogs.

It was observed that sex apparently does not interfere with the occurrence of lymphoma, which has also been mentioned by other authors (Cunha et al., 2011), although there have been reports of a predisposition to lymphoma in males (Figuera et al. 2006, Moreno & Bracarense 2007, Gavazza et al. 2009).

The mean age of dogs affected by lymphoma was eight years, and the highest prevalence of the disease occurred in middle-aged dogs. In a similar study, in the central region of Rio Grande do Sul, the authors observed a tendency to develop lymphoma in elderly animals (Figuera et al. 2006). On the other hand, in a study conducted in the North of Paraná, the age group of dogs most frequently affected by the disease was between two and five years of age (Moreno & Bracarense 2007). This age group was also the most affected in a study carried out in the United States (Teske 1994). These differences suggest that there is no age pattern for the occurrence of lymphomas in dogs; however, animals less than 24 months of age are rarely affected.

According to the anatomical classification, the multicentric form was the most frequently diagnosed, accounting for 71.4% of the cases. In other studies, it has been demonstrated that the multicentric form is the most frequent form, with percentages higher than 80% (Teske 1994, Ponce et al. 2010, Neuwald et al. 2014). The high degree of malignancy observed in most lymphomas (65%) in this study has also been observed by other authors (Teske et al. 1994, Fournel-Fleury et al. 2002, Suzano et al. 2010, Ponce et al. 2010). These findings demonstrate that the behavior of lymphoma with respect to its anatomical location and malignant potential are similar regardless of the region of the study. On the other hand, in terms of the cellular origin, there appears to be a regional or geographical influence that interferes with the cell types of canine lymphoma (Teske et al. 1994, Fournel-Fleury et al. 2002). In the present study, most of the diagnosed lymphomas were B-cell lymphomas (62.5%), and in a similar study carried out in São Paulo, the most frequent type was T-cell lymphoma, which accounted for 60.2% of cases (De Moura et al. 2001). These differences may be related to geographical differences. In phenotype studies performed in man, it has been shown that in European countries and the United States, the most frequent phenotype is the B-cell phenotype, with the T-cell phenotype occurring in only 12% of cases. In Japan, this percentage increases to 50% (Fournel-Fleury et al. 2002). Geographic differences may influence the immunophenotype of lymphomas in man, which can be extrapolated to dogs (Fournel-Fleury et al. 2002). However, in the State of São Paulo, in a study of the immunophenotypes of lymphomas in humans, a predominance of B-cell lymphoma was found (Gouveia 2011), whereas in a study in dogs, also in São Paulo, T-cell lymphoma was predominant. Ponce et al. (2010) observed 35.4% of T-cell lymphomas in dogs and suggested that this percentage may be related to the greater number of skin biopsies performed, all with a T-cell immunophenotype. In the present study, out of seven skin samples with a diagnosis of lymphoma, five were submitted for immunohistochemistry to determine the immunophenotype, and all originated from T cells; however, in the LRD case, the skin samples did not outperform the other materials sent for diagnosis, which ruled out the influence of anatomical location on the percentage of T-cell lymphomas in the dogs of this study.

In the 13 cases of lymphoma in dogs that were diagnosed at necropsy, considerable variation was observed in the duration of the disease, independent of immunophenotype. During the advanced stage of the disease, regardless of the immunophenotype, the course of disease is rapid (Machicote & González 2008). In four cases of multicentric lymphoma that were positive for B cells, considering that the immunophenotype that is less aggressive, the evolution was less than one week, and in one case of multicentric T-cell lymphoma, which is more aggressive, the observed course of disease was two weeks. It should be noted that the information on the treatment of these animals was not available, and treatment should be considered since it may influence the survival time of the animals. Lymphomas, although highly heterogeneous, are considered to be responsive to chemotherapy. However, in dogs, survival of more than one month is not frequent in untreated animals (Macewan 1990). This suggests that these five dogs were not treated for the disease. In two diagnoses made by biopsy, in which the protocol provided information on the survival time of dogs, it was found that one of the dogs that was treated with chemotherapy survived for two years, and the other dog that did not undergo chemotherapy survived for a month. In a study of 147 dogs with lymphoma, the mean survival time with complete or partial regression of increases in lymph node volume was 265 days (Macewan et al. 1987). Most likely, the efficiency of chemotherapy is directly associated with the immunophenotype of lymphoma, which indicates that detection of immunophenotype by immunohistochemistry is necessary, considering the maintenance and quality of life of the pets affected by the disease. The extranodal form is rare in dogs (Jacobs et al., 2002), and in the present study, three of the four cases that were submitted for immunophenotyping were from biopsies and were classified as multicentric if other organs were involved. The incidence of mediastinal lymphoma has been reported to be low in some studies (Sequeira et al. 1999, Fournel-Fleury et al. 2002) and relatively high in others (Jacobs et al. 2002, Cardoso et al. 2003). In the present study, no cases of mediastinal lymphoma were diagnosed.

The determination of the immunophenotype of lymphoma is of undeniable importance, since it allows detailed diagnosis and prognosis and directs the choice of a more appropriate treatment (Horta et al. 2012). In a study by Kiupel et al. (1999) using the same antibodies from the present study, it was demonstrated that the determination of the immunophenotype in dogs with lymphoma was important for the prognosis of survival, indicating that dogs with B-cell lymphomas, which are less aggressive, were those with a longer survival time (Teske et al. 1994). In the present study, the percentage of tumors with a T-cell immunophenotype and a high degree of malignancy based on morphology was greater (73%) than that of low malignancy (27%). Apparently, from these results, it is possible to corroborate the observations made by Teske et al. (1994), who suggested that T-cell lymphomas always have a high degree of malignancy, independent of cell morphology. In addition, cutaneous lymphoma can be considered to be T-cell lymphoma in origin, and treatments directed to this cell type should be performed when phenotyping is not possible.

Conclusion

The results of the present study demonstrated that canine lymphoma presents mostly immunophenotype B and is multicentric, considering the region of influence of the LRD/UFPel. In cases of cutaneous lymphoma, when

it is impossible to perform the phenotyping, treatment protocols for tumors originating from T cells seems to be the most appropriate.

References

- Capelozzi V.L. 2009. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. *J. Bras. Pneumol.* 35(4):375-382.
- Cardoso M.J.L., Machado L.H.A., Rocha N.S., Moutinho F.Q. & Ciampolini P. 2003. Linfoma canino: Revisão de cinquenta e quatro casos. *Biosci. J.* 19(3):131-142.
- Cunha F.M., Silveira L.M.G., Xavier J.G., Allegretti L. & Bovino E.E. 2011. Linfoma multicêntrico em *Canis familiaris* (cão doméstico): estudo retrospectivo de 60 casos, entre agosto de 2009 e dezembro de 2010, no Município de São Paulo-SP. *J. Health. Sci. Inst.* 29(4):209-301.
- De Moura V.M.B.D., Sequeira J.L., Amorim R.L. & Bandarra E.P. 2001. Imunofenotipagem dos linfomas caninos em tecido incluído em parafina. *Rev. Educ. Contin. CRMV-SP.* 4(3):71-75.
- Figuera R.A., Souza T.M., Rodrigues A. & Barros C.S.L. 2006. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. *MEDVEP – Ver. Cientif. Med. Vet. Peq. Anim. Estim.* 4(12):139-146.
- Fournel-Fleury C., Ponce F., Felman P., Blavier A., Bonnefont C., Chabanne L., Marchal T., Cadore J.L., Goy-Thollot I., Ledieu D., Ghernati I. & Magnol J.P. 2002. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.* 39(1):92-109.
- Gavazza A., Sacchini F., Lubas G., Gugliucci B. & Valori E. 2009. Clinical, laboratory, diagnostic and prognostic aspects of canine lymphoma: a retrospective study. *Comp. Clin. Path.* 18(3):291-299.
- Gouveia G.R. 2011. Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. *Rev Bras. Hematol. Hemoter.* 33(4):315-322.
- Horta R.S., Costa M.P., Lavalle G.E., Araújo R.B. & Cassali G.D. 2012. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno histoquímica. *Cienc. Rural* 42(6): 1033-1039.
- Jacobs R.M., Messick J.B., Valli V.E. 2002. Tumors of the hemolymphatic system, p.119-198. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals.* 4^a ed. Iowa State Press, Ames.
- Kiupel M., Teske E., Bostock D. 1999. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.* 36(4):292-300.
- Macewan E.G. 1990. Spontaneous tumours in dogs and cats: models for study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 9(2):125-136.
- Macewen E.G., Hayes A.A., Matus R. E., Kurzman I. 1987. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190(5):564-568.
- Machicote G. & González J.L. 2008. Linfoma Cutâneo. *Clin. Vet. Peq. Anim.* 28(1):31-37.
- Moreno K. & Bracarense A.P.F.R.L. 2007. Linfoma canino de células T: aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de 38 casos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 44:103-110.
- Neuwald E.B., Teixeira L.V., Conrado F.O., Silva M.O.D., Hlavac N.R.C. & González F.H.D. 2014. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 34(4):349-354.
- Owen L. 1980. TNM Classification of tumors in domestic animals, p. 46-47. Geneva: World Health Organization.
- Ponce F., Marchal T., Magnol J.P., Turinelli V., Ledieu D., Bonnefont C., Pastor M., Delignette M.L. & Fournel-Fleury C. 2010. 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.* 47(3):414-433.

- Prefeitura Municipal de Pelotas 2012. Projeto de Castração por Bairros. Anexo III. Disponível em <http://www.pelotas.rs.gov.br/centro_zoonoses>
- Ramos-Vara J.A., Kiupel M., Baszler T., Bliven L., Brodersen B., Chelack B., Czub S., Del Piero F., Dial S., Ehrhart E.J., Graham T., Manning L., Paulsen D., Valli V.E. & West K. 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(4):393-413.
- Sequeira J.L., Franco M., Bandarra E.P., Figueiredo L.M.A. & Rocha N.S. 1999. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51(3):245-250.
- Suzano S.M.C., Sequeira J.L., Rocha N.S. & Pessoa A.W.P. 2010. Classificação citológica dos linfomas caninos. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 47(1):47-54.
- Teske E., Wisman P., Moore P.F. & Van Heerde P. 1994. Histological classification and immunophenotyping of canine Non-Hodgkin's lymphoma. Unexpected high frequency of T-cell lymphomas with B-cell morphology. *Exp. Hematol.* 22(12):1179-1187.
- Teske E. 1994. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non Hodgkin's lymphoma. *Vet. Quart.* 16(4):209-219.
- Vail D.M. 2010. Hematopoietic tumors, p. 2148-2158. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. (editors). *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Cat and Dog*, 7^a ed. Saunders, St. Louis.
- Vail D.M. & Young K.M. 2007. Canine lymphoma and lymphoid leukemia, p.699-733. In: Withrow S.J, Vail DM. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Saunders Elsevier, Missouri.

LEGENDS

Fig. 1. Lymphoma in dog. A. Lymphocytic lymphoma. Small cells, with small rounded nuclei, dense chromatin and scarce cytoplasm (HE 20X). B. Centrocytic lymphoma. Small cells with scarce cytoplasm, with small and irregular nuclei, loose to dense chromatin (HE 20X). C. Centrocytic-centroblastic lymphoma. Two distinct cell groups, small cells similar to the centrocytic type and large cells similar to the centroblastic type (HE 20X). D. Centroblastic lymphoma. Large cells with slightly basophilic cytoplasm, ranging from scarce to abundant. Rounded nuclei, loose chromatin, with multiple medium size peripheral nucleoli, and mitoses (HE 20X).

Fig. 2. Lymphoma in dog. A. Immunoblastic lymphoma positive for anti-CD79a antibody (B cell) 20X. B. Centrocytic-centroblastic lymphoma positive for anti-CD3 antibody (T-cell) 20X.

Table 1. Number of cases and histological characteristics of the lymphomas observed according to the criteria of the modified Kiel system

Modified Kiel system	Number of cases	Histological characteristics
Low grade of malignancy		
Lymphocytic	2	-Small cells, with small rounded nuclei, dense chromatin and scarce cytoplasm
Centrocytic	4	-Small cells with scarce cytoplasm, with small and irregular nuclei, loose to dense chromatin, and nucleolus present or absent
Centrocytic-centroblastic	8	-Two distinct cell groups, small cells similar to the centrocytic type and large cells similar to the centroblastic type.
High degree of malignancy		
Centroblastics	9	-Large cells with slightly basophilic cytoplasm, ranging from scarce to abundant. Rounded nuclei, loose chromatin, with multiple medium size peripheral nucleoli, and mitoses
Immunoblastic	9	-Cells of medium to large cytoplasm, ranging from abundant to sparse, round to oval nucleus, vesicular chromatin and prominent and central nucleolus, and the many mitotic figures
Lymphoblastic	3	- Rounded, small to medium-sized cells with scanty cytoplasm, with a clear halo around cells, rounded nuclei, dense chromatin and mitotic figures
Anaplastic	5	-Large and pleomorphic cells with slightly basophilic cytoplasm, large, rounded and irregular nuclei, loose chromatin and mitotic figures

Fonte: Suzano et al. 2010

Table 2. Histological and immunohistochemical classification of 40 cases of canine lymphomas, age, sex and anatomical location

Lymphoma subtypes classification ¹	Number of cases	Average age (years)	Sex		Anatomical location			
			M ¹	F	Mt	Al	Ct	Ex
B Cell lymphoma	25							
Low grade of malignancy	10							
Lymphocytic	1	1		1	1			
Centrocytic	2	9.5	2		2			
Centrocytic-centroblastic	7	7.9	6	1	5	2		
High degree of malignancy	15							
Centroblastic	4	7.7	2	2	4			
Immunoblastic	6	10.2	2	4	3	3		
Lymphoblastic	1	7	1					1
Anaplastic	4	7.3	1	3	3			1
T Cell lymphoma	15							
Low grade of malignancy	4							
Lymphocytic	1	6		1	1			
Centrocytic	2	8.5	1	1	1		1	
Centrocytic-centroblastic	1	9		1	1			
High degree of malignancy	11							
Centroblastic	5	7	3	2	4			1
Immunoblastic	3	7.7	1	2			3	
Lymphoblastic	2	13	1	1	1			1
Anaplastic	1	2.5		1			1	
Total	40		20	20	26	5	5	4

¹M=male; F=female; Mt= multicentric; Al=alimentary; Ct=cutaneous; Ex= extranodal

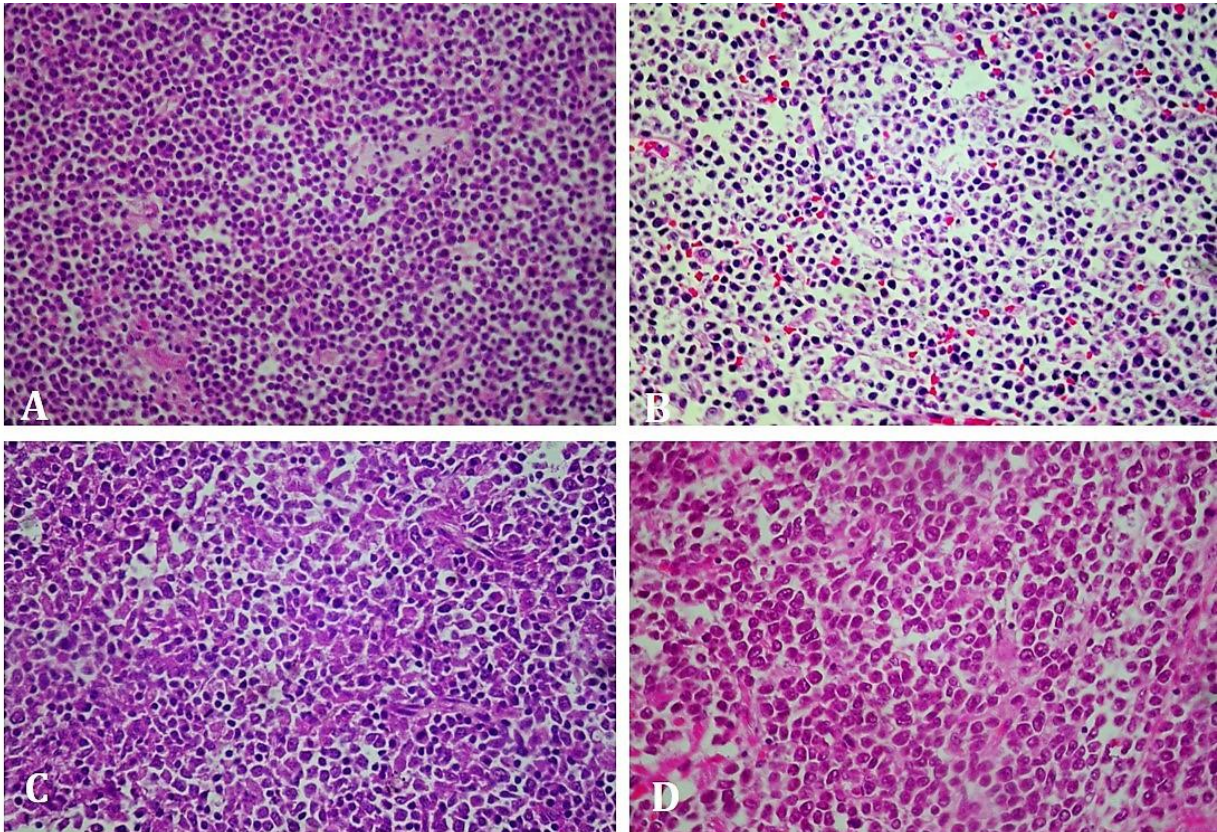


Fig. 1. Lymphoma in dog. A. Lymphocytic lymphoma. Small cells, with small rounded nuclei, dense chromatin and scarce cytoplasm (HE 20X). B. Centrocytic lymphoma. Small cells with scarce cytoplasm, with small and irregular nuclei, loose to dense chromatin (HE 20X). C. Centrocytic-centroblastic lymphoma. Two distinct cell groups, small cells similar to the centrocytic type and large cells similar to the centroblastic type (HE 20X). D. Centroblastic lymphoma. Large cells with slightly basophilic cytoplasm, ranging from scarce to abundant. Rounded nuclei, loose chromatin, with multiple medium size peripheral nucleoli, and mitoses (HE 20X).

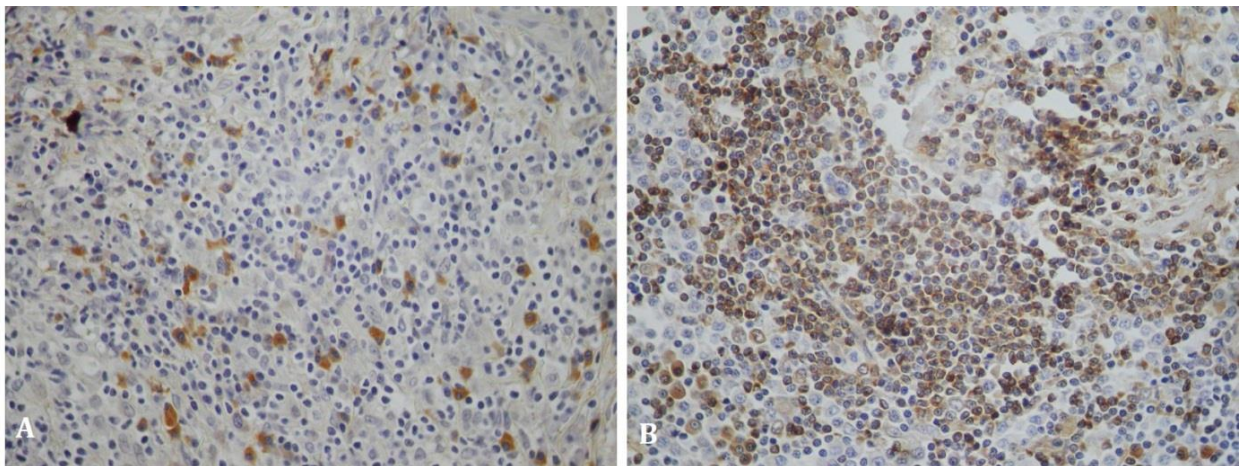


Fig. 2. Lymphoma in dog. A. Immunoblastic lymphoma positive for anti-CD79a antibody (B cell) 20X. B. Centrocytic-centroblastic lymphoma positive for anti-CD3 antibody (T-cell) 20X.

2.2 Artigo 2

Análise de mutações nos éxons 7 e 8 do gene TP53 em tumores de mama caninos

Ana Carolina Barreto Coelho; Leonardo Schuler Faccini; Clairton Marcolongo Pereira;
Thayane Woycinck Kowalski; Ana Lucia Schild; Lavínia Schuler-Faccini

Submetido à revista Ciência Rural

1 **Análise de mutações nos éxons 7 e 8 do gene *TP53* em tumores de mama caninos**

2 **Analysis of mutations in exons 7 and 8 of the *TP53* gene in canine breast tumors**

3 **Ana Carolina Barreto Coelho^{IeII} Leonardo Schuler Faccini^{III} Clairton Marcolongo**

4 **Pereira^{IV} Thayane Woycinck Kowalski^{VI} Ana Lucia Schild^V Lavínia Schuler-**

5 **Faccini^{VI}**

7 **- NOTA -**

8 **RESUMO**

9 Os tumores de mama em medicina veterinária são as neoplasias mais diagnosticadas
10 em fêmeas caninas não castradas e aproximadamente 50% desses tumores são considerados
11 malignos. Variações no gene supressor tumoral *TP53* estão classicamente associadas a
12 cânceres em humanos, sendo o gene que apresenta maior frequência de mutações em tumores
13 humanos, incluindo neoplasias de mama e parecem ser a alteração genética mais comum nas
14 neoplasias de mama em cães. No presente trabalho procuramos identificar mutações nos
15 éxons 7 e 8 no gene *TP53* em neoplasias de mama em 20 cães fêmea de diferentes raças ou
16 cruzas. O estudo se trata de uma abordagem preliminar no estudo de variações no gene *TP53*
17 em tumores de mama em caninos brasileiros incluindo os sem raça definida. O
18 sequenciamento dos demais éxons e regiões intrônicas e a ampliação do número de cães
19 analisados podem revelar alterações não detectadas aqui, demonstrando a importância de
20 expandir o presente estudo.

^I Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

^{II} Faculdade de Veterinária, Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter), Rua Orfanotrofio 555, Alto Teresópolis, Porto Alegre, RS 90840-440, Brasil.

^{III} Graduando em Faculdade de Veterinária, Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter), Rua Orfanotrofio 555, Alto Teresópolis, Porto Alegre, RS 90840-440, Brasil.

^{IV} Centro Universitário do Espírito Santo – Unesc, Av. Fioravante Rossi, 2930, Bairro Martinelli, Colatina, ES, 29703-858, Brasil.

^V Laboratório Regional de Diagnóstico, FV-UFPel, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

^{VI} Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular; Departamento de Genética, Instituto de Biotecnologias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1 **Palavras-chave:** Mutação, tumor de mama, gene *TP53*.

2

3 **ABSTRACT**

4 Breast tumors in veterinary medicine are the most diagnosed neoplasms in
5 uncastrated canine females and approximately 50% of these tumors are considered malignant.
6 Variations in the suppressor gene *TP53* are classically associated with cancer in humans,
7 including breast cancer and it appears to be the most common genetic anomaly in canine
8 breast tumors. In the present work, we sought to identify mutations in exons 7 and 8 in the
9 *TP53* gene in tubulo-papillary breast tumors in 20 female dogs of different races or mixed.
10 The study is a preliminary approach in the study of variations in the *TP53* gene in breast
11 tumors in Brazilian canines including the non-defined breed. The sequencing of the other
12 exons and intron regions as well as the increase in the number of dogs analyzed may reveal
13 alterations not detected here, demonstrating the importance of expanding the present study.

14

15 **Key words:** Mutation, breast tumor, *TP53* gene, canine.

16

17 Os tumores de mama em medicina veterinária são as neoplasias mais diagnosticadas
18 em fêmeas caninas não castradas e aproximadamente 50% desses tumores são considerados
19 malignos (MOE, 2001). Os carcinomas mamários apresentam heterogeneidade em sua
20 morfologia e comportamento biológico (MISDORP, 2002). Dentro desse tipo de tumor, os
21 carcinomas simples e complexos são os mais frequentemente diagnosticados (MISDORP
22 1999), sendo os carcinomas simples divididos em: tubular, túbulo-papilar, papilar cístico e
23 cribiforme (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

24

25 Nos últimos anos novos métodos prognósticos e preditivos para os tumores de mama
canino têm sido explorados com o intuito de prever a evolução clínica e o tempo de sobrevida

1 dos animais, além de selecionar esses pacientes para serem tratados com terapias mais
2 específicas e individualizadas (FERREIRA et al., 2017). Diversos fatores podem ser
3 considerados como prognósticos e preditivos para os tumores de mama canino, como por
4 exemplo o tamanho do tumor, o tipo e o grau histológico, ou a expressão de receptores de
5 estrógeno e de progesterona, mutação e super expressão de genes relacionados ao câncer,
6 como o gene **TP53**, entre outros (LEE et al., 2004; FERREIRA et al., 2017).

7 Mutações no gene supressor de tumor **TP53** parecem ser a alteração genética mais
8 comum nos tumores de mama canino (LEE et al., 2004). O **TP53** produz uma proteína que é
9 fundamental na regulação do ciclo celular, levando à morte celular ou senescência quando o
10 sistema de reparo normal da célula não consegue corrigir erros no DNA (NAKAMURA et al.,
11 2002). As mutações nesse gene estão associadas à progressão dos tumores, além de
12 demonstrarem maior potencial de malignidade e piora do prognóstico (MUTO et al., 2000;
13 LEE & KWEON, 2002; LEE et al., 2004). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a
14 presença de mutações no gene **TP53** em neoplasias de mama canino.

15 Foram selecionados vinte casos de neoplasias de mama canino analisados
16 histologicamente no Laboratório Regional de Diagnóstico, da Faculdade de Veterinária da
17 Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel). A classificação utilizada foi à proposta por
18 GOLDSCHMIDT (2011). As amostras congeladas dessas neoplasias, posteriormente, foram
19 enviadas ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal
20 do Rio Grande do Sul para extração do DNA.

21 DNA genômico foi extraído de fragmentos dos tumores usando o DNA mini Kit
22 (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. Quatro pares de primers foram
23 desenhados para amplificar regiões do exon 7 e 8 do gene **TP53**. Estas regiões foram
24 amplificadas usando a reação de polimerase em cadeia (PCR). Os fragmentos obtidos foram
25 visualizados em gel de agarose a 1.5% e posteriormente purificados e submetidos para

1 sequenciamento pelo método de Sanger. As sequências foram visualizadas e analisadas
2 usando o programa Codon Code Aligner[®], versão 3.0.1 (Codon Code Corporation, Dedham,
3 MA, USA). As sequências depositadas no Gen Bank foram utilizadas como referência.

4 Na Tabela 1 é apresentado o resultado do exame histopatológico das amostras dos
5 tumores de mama canino. Todas as amostras coletadas eram de fêmeas. A idade dos cães
6 afetados variou entre sete e 15 anos, em 11 protocolos não foi informada a idade dos animais.
7 Oito animais eram Sem Raça Definida (SRD), três Poodles, um Collie e um Border Collie.
8 Em oito casos não foi informada a raça. Não foram encontradas variantes no sequenciamento
9 dos exons 7 e 8, sendo todas correspondentes à referência.

10 No presente trabalho procuramos identificar mutações nos éxons 7 e 8 no gene ***TP53***
11 em neoplasma de mama em 20 cães fêmea de diferentes raças ou cruza. Variações no gene
12 supressor tumoral ***TP53*** estão classicamente associadas a cânceres em humanos, sendo a
13 síndrome de Li-Fraumeni (IWAKUMA et al., 2005) um exemplo de como mutações
14 germinativas em ***TP53*** podem levar a elevada predisposição ao câncer nos portadores destas
15 mutações. Mais ainda, o ***TP53*** é o gene que apresenta maior frequência de mutações em
16 tumores humanos, incluindo tumores mamários (OZAKI & NAKAGAWARA, 2011). Por
17 outro lado, existe muita similaridade entre os tumores mamários em cães e em humanos
18 (QUEIROGA et al., 2011). Nos cães, o gene ***TP53*** está localizado no cromossomo 5 e
19 apresenta extensa homologia com a sequência do DNA humano incluindo a distribuição de
20 éxons, bem como na estrutura e função da proteína (WANG et al., 2018). Mutações neste
21 gene já foram descritas em vários tumores caninos como linfomas, sarcomas, melanomas,
22 tumores cerebrais, venéreos e mamários (SANCHES-SERVIN et al., 2009; ASADA et al.,
23 2017). Mutações na região conservada do ***TP53*** parecem ter um papel relevante na
24 carcinogênese mamária em caninos, assim como em humanos (MAYR et al., 1999,
25 VELDHOEN et al., 1999; MUTO et al., 2000).

1 Uma das importantes limitações deste trabalho foi ter analisado apenas dois éxons: 7
2 e 8. Estes éxons foram escolhidos a partir de dados da literatura, como potenciais candidatos.
3 A maioria das mutações relacionadas a câncer estão localizadas nos éxons 5 a 8, que
4 codificam a região de ligação ao DNA (SCHON & TISCHKOWITZ, 2018). KOSHINO et al.
5 (2016) encontraram sete mutações em de 43 cães com linfoma, sendo quatro deles nos éxons
6 7 (n=2) e 8 (n=2). Neste estudo, a presença da mutação também foi relacionada com pior
7 prognóstico e menor tempo de sobrevida. Particularmente o éxon 8 é muito conservado entre
8 espécies e mutações neste éxon são frequentemente associadas com tumores em caninos
9 (JASIK& REICHERT, 2011; NASIR et al., 2001; KANAYA et al. 2002). YORK et al. (2017)
10 identificaram mutações no éxon 7 em duas de três linhagens celulares de osteossarcomas.
11 LEE & KEWONG (2002) e LEE et al., (2004) estudaram especificamente o **TP53** em
12 tumores mamários. No primeiro trabalho no exame de 20 tumores caninos, foram encontradas
13 8 mutações em **TP53**, sendo cinco localizadas nos éxons 7 e 8 e a presença destas mutações
14 também implicou em pior prognostico na evolução tumoral (LEE & KEWONG, 2002).

15 O sequenciamento dos demais éxons e regiões intrônicas bem como a ampliação do
16 número de cães analisados pode revelar alterações não detectadas aqui, demonstrando a
17 importância de expandir o presente estudo.

18 Outra característica particular do presente trabalho foi à inclusão de cães sem raça
19 definida. Poucos estudos têm se dedicado a identificar a variabilidade genética em populações
20 caninas miscigenadas. Desta forma, este estudo contribui, também, para o melhor
21 conhecimento de características genéticas de cães adotivos no Brasil.

1 Tabela 1: Diagnósticos histopatológicos dos tumores de mama em cães.

TUMORES	NÚMERO DE CASOS
Carcinoma túbulo papilar	6
Carcinoma e mioepitelioma maligno	4
Carcinoma papilar	3
Tumor benigno misto	3
Carcinoma tipo complexo	1
Adenoma	1
Carcinoma tipo misto	1
Carcinoma sólido	1
TOTAL	20

2

3 **REFERÊNCIAS.**

4

5 ASADA, H. et al. A 2-base insertion in exon 5 is a como mutation of the *TP53* gene in dogs
6 with histiocytic sarcoma. **The Journal of Veterinary Medical Science**, n.79, v.10, p. 1721–
7 1726, 2017. . Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5658567/>>.

8 Acesso em: 17 dez. 2018. doi: 10.1292/jvms.17-0197

9 GOLDSCHMIDT, M.V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary**
10 **Pathology**, v.48, n.1, p.117-31, 2011. Disponível em:
11 <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810393258>>. Acesso em: 12 out. 2018.
12 doi: 10.1177/0300985810393258.

13 IWAKUMA, T. et al. Li-Fraumeni syndrome: a p53 family affair. **Cell Cycle**, v.4, n.7, p.865-
14 7, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917654>>. Acesso em: 12
15 set. 2018. doi: 10.4161/cc.4.7.1800

- 1 JASIK, A & REICHERT, M. New p53 mutations in canine skin tumours. **Veterinary Record**,
2 v.169, n.26, p.684, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21987486>>.
3 Acesso em: 21 set. 2018. doi: 10.1136/vr.100232.
- 4 KANAYA, N. et al. Detection of the anti-P53 antibodies in dogs with tumors. Journal of
5 **Veterinary Medical Science**, v.64, p.973-979, 2002. Disponível em:
6 <<https://pdfs.semanticscholar.org/ecb3/8009085c18f4ed7540b6a31d9aecc339d0c9.pdf>>.
7 Acesso em: 21 nov. 2018.
- 8 KOSHINO, A. et al. Mutation of p53 Gene and Its Correlation with the Clinical Outcome in
9 Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.30, p.223–229, 2016.
10 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26678182>>. Acesso em: 23 nov.
11 2018. doi: 10.1111/jvim.13807.
- 12 LEE, C.H. et al. Mutation and over expression of p53 as a prognostic factor in canine
13 mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.5, p.63-69, 2004. Disponível em:
14 <<http://www.oncoveterinaria.com.ar/contenidos/archivos/file/Julio/P-53.pdf>>. Acesso em: 23
15 nov. 2018.
- 16 LEE, C. & KWEON, O. Veterinary Science Mutations of p53 Tumor Suppressor Gene in
17 Spontaneous Canine Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Science**, v. 3, p. 321–32,
18 2002. Disponível em: <[https://www.vetsci.org/Synapse/Data/PDFData/0118JVS/jvs-3-](https://www.vetsci.org/Synapse/Data/PDFData/0118JVS/jvs-3-321.pdf)
19 [321.pdf](https://www.vetsci.org/Synapse/Data/PDFData/0118JVS/jvs-3-321.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2018.
- 20 MAYR, B. et al. Novel canine tumor suppressor gene p53 mutations in cases of skin and
21 mammary neoplasms. **Veterinary Research Communications**, v.23, p.285-291, 1999.
22 Disponível em:
23 <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1006314903272.pdf>>. Acesso em:
24 15 out. 2018.

- 1 MISDORP, W. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat.
2 **2nd ed. Washington USA: Armed Forces Institute of Pathology**; 1999. p. 3–29.
- 3 MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten, D.J. **Tumors in domestic**
4 **animals**. 4. ed. Ames, USA: Iowa State Press, 2002. p. 575–606.
- 5 MOE, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. **Journal of**
6 **reproduction and fertility. Supplement**, v.57, p.439-443, 2001. Disponível em:
7 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11787188>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- 8 MUTO, T. et al. p53 Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant
9 Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology**, v.37, p.248-253, 2000. Disponível em:
10 <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1354/vp.37-3-248>>. Acesso em: 24 out. 2018. doi:
11 <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-248>.
- 12 NAKAMURA, S. et al. C-terminus of p53 is required for G (2) arrest. **Oncogene**, v.27,
13 p.2102-2107, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/1205251>>. Acesso em:
14 2 nov. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842002000200004>.
- 15 NASIR, L. et al. Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine
16 softtissue sarcomas. **Cancer Letters**, v.174, p.83-9, 2001. Disponível em:
17 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383501006371>>. em: 2 nov.
18 2018. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00637-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00637-1).
- 19 OZAKI, T. & NAKAGAWARA, A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer
20 research field. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011. 6039252011. Disponível
21 em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188172>>. Acesso em: 4 nov. 2018.
22 doi:10.1155/2011/603925
- 23 QUEIROGA, F.L. et al. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer:
24 most recent findings. **In Vivo**, v.25, n.3, p.455-65, 2011. Disponível em:
25 <<http://iv.iarjournals.org/content/25/3/455.short>>. Acesso em: 4 nov. 2018.

- 1 SÁNCHEZ-SERVÍN, A. et al. P53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the
2 canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, p 353-355, 2009.
3 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934603>>. Acesso em: 10 nov.
4 2018. doi: 10.4142/jvs.2009.10.4.353.
- 5 SCHON, K. & TISCHKOWITZ, M. Clinical implications of germline mutations in breast
6 cancer: TP53. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.167, n.2, p.417-423, 2018.
7 Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-017-4531-y>>. Acesso em: 4
8 nov. 2018. doi:10.1007/s10549-017-4531-y.
- 9 VELDHOEN, N. et al. Identification of tumour associated and germ line p53 mutations in
10 canine mammary cancer. **British Journal of Cancer**, v.81, p.409 415, 1999. Disponível em:
11 <<https://www.nature.com/articles/6690709>>. Acesso em: 6 nov. 2018. doi:
12 10.1038/sj.bjc.6690709.
- 13 WANG, J. et al. Proliferative and Invasive Colorectal Tumors in Pet Dogs Provide Unique
14 Insights into Human Colorectal Cancer. **Cancers**, v.10, n.9, p. 330, 2018. Disponível em:
15 <<https://www.mdpi.com/2072-6694/10/9/330>>. Acesso em: 6 nov. 2018.
16 doi:10.3390/cancers10090330.
- 17 YORK, D. et al. Enrofloxacin enhances the effects of chemotherapy in canine osteosarcoma
18 cells with mutant and wild-type p53. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.15, n.3,
19 p.1087–1100, 2017. Disponível em:
20 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12250>>. Acesso em: 6 nov. 2018.
21 doi:10.1111/vco.12250.

2.3 Artigo 3

Multiple metastases of a transmissible venereal tumor in a dog

Leonardo Schuler Faccini; Wilson Maccarini Legramanti; Lucas Teixeira de Castro;
Ana Carolina Barreto Coelho; Mariana Caetano Teixeira; Ana Lucia Schild; Clairton
Marcolongo Pereira

Submetido à revista Ciência Rural

1 **Multiple metastases of a transmissible venereal tumor in a dog**

2 **Tumor venéreo transmissível metastático no sistema nervoso central de um cão**

3 **Leonardo Schuler Faccini^I Wilson Maccarini Legramanti^I Lucas Teixeira de**

4 **Castro^I Ana Carolina Barreto Coelho^{II} Mariana Caetano Teixeira^{II} Ana Lucia**

5 **Schild^{III} Clairton Marcolongo Pereira^{IV}**

6
7 - NOTE -

8 **ABSTRACT**

9 The objective of this report is to describe the clinical and pathological aspects of a
10 case of canine transmissible venereal tumor (cTVT) with intraocular and central nervous
11 system metastases in a 9-month-old female dog. The animal had multiple nodules on its body
12 without previous history. A cytological examination of the nodules was performed, and the
13 result was compatible with cTVT. The dog was treated with vincristine sulfate until clinical
14 remission of the tumors. However, approximately two weeks after remission, the animal
15 experienced loss of vision and an enucleation was performed. One month later, the animal
16 displayed neurological signs, and euthanasia was performed, due to the worsening of the
17 animal's condition. A necropsy revealed a neoplastic mass in the thalamus region of the
18 central nervous system, multiple nodules in the lung, and a mass in the anterior chamber of
19 the right eye. Histologically, a layer of round cells interspersed with a discrete fibrovascular
20 stroma compatible with cTVT was observed. On immunohistochemistry, there was positive
21 staining for vimentin and negative staining for cytokeratin, CD79a, CD3, and CD117. The

^I Graduando em Faculdade de Veterinária, Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter), Rua Orfanotrofio 555, Alto Teresópolis, Porto Alegre, RS 90840-440, Brasil.

^{II} Faculdade de Veterinária, Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter), Rua Orfanotrofio 555, Alto Teresópolis, Porto Alegre, RS 90840-440, Brasil.

^{III} Laboratório Regional de Diagnóstico, FV-UFPel, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

^{IV} Centro Universitário do Espírito Santo – Unesc, Av. Fioravante Rossi, 2930, Bairro Martinelli, Colatina, ES, 29703-858, Brasil.

1 lesions along with the immunohistochemistry results confirmed the diagnosis of metastatic
2 cTVT.

3

4 **Key words:** Neoplasm, transmissible venereal tumor, brain metastasis.

5

6 **RESUMO**

7 O objetivo deste estudo é relatar os aspectos clínicos e patológicos de um caso de
8 tumor venéreo canino (TVT) com metástase intraocular e no sistema nervoso central em uma
9 cadela de 9 meses de idade. O animal apresentava múltiplos nódulos no corpo sem histórico
10 prévio. Foi feita citologia dos nódulos e o resultado foi compatível com TVT. O cão foi
11 tratado com sulfato de vincristina até a remissão clínica do tumor (um mês) e
12 aproximadamente duas semanas após a remissão, o animal apresentou perda de visão e foi
13 realizada enucleação. Um mês depois o animal apresentou sinais clínicos neurológicos e foi
14 realizado eutanásia pela piora do quadro. Na necropsia havia massa neoplásica na região do
15 tálamo, múltiplos nódulos no pulmão e uma massa na câmara anterior do olho direito.
16 Histologicamente, as massas eram um manto de células redondas entremeadas por discreto
17 estroma fibrovascular, de aspecto morfológico compatível com TVT. Na imuno-histoquímica
18 houve marcação positiva para vimentina e negativas para citoqueratina, CD79a, CD3 e
19 CD117. As lesões associadas aos resultados da imuno-histoquímica, permitiram o diagnóstico
20 de tumor venéreo transmissível metastático.

21

22 **Palavras-chave:** Neoplasia, tumor venéreo transmissível, metástase cerebral.

23

24 Canine transmissible venereal tumor (TVT) is a contagious, sexually transmitted
25 neoplasm that develops in dogs and propagates through coitus (GANGULY et al., 2016).

1 Unlike other infectious tumors, TVT is not caused by an infectious agent, but rather
2 by the allogeneic transference of tumor cells. It is estimated that this neoplasm originated
3 from a mutation that occurred approximately 11,000 years ago (STRAKOVA &
4 MURCHISON, 2015). The disease has spread and has been identified globally, and is most
5 common in regions with a greater number of stray dogs (STRAKOVA & MURCHISON,
6 2015).

7 Although the primary manifestation is in the genital system, extragenital cases have
8 been observed involving oral and nasal tissue, including the conjunctival mucosa adjacent to
9 these tissues (RODRIGUES et al., 2001; GANGULY, et al., 2016), and less commonly, the
10 eyes and central nervous system (CNS) (FERREIRA et al., 2000). Macroscopically, the
11 lesions are friable and often hemorrhagic due to the low cohesion between the neoplastic cells;
12 therefore, the first clinical sign observed tends to be bleeding (GANGULY et al., 2016). TVT
13 has a microscopic appearance like other round cell tumors, and the diagnosis is usually based
14 on history, clinical signs, cytology, and histopathology. Immunohistochemistry has been used
15 to differentiate this neoplasm from other round cell tumors (DAS, et al., 1990; GANGULY et
16 al., 2016). The most common treatment is vincristine chemotherapy (GANGULY et al., 2016).
17 The objective of this report is to describe the clinical and pathological aspects of a case of
18 TVT metastasis in the CNS of a dog.

19 A female mixed breed dog, approximately 9 months old, was examined at a
20 veterinary clinic in the city of Porto Alegre, RS. The animal had multiple nodules on its body,
21 vulva, ocular mucosa, and gingiva, along with signs of malnutrition and apathy. Samples for
22 cytological examination were collected through fine needle aspiration of the cutaneous
23 nodules and a vaginal swab.

24 Cytological examination of the cutaneous tumors revealed a large number of round,
25 moderately pleomorphic, isolated cells distributed in a layer, which stained poorly blue. The

1 cytoplasm of the cells was vacuolated, and the nucleus: cytoplasm ratio was moderate. The
2 nuclei were large and rounded, with loose chromatin. The nucleoli were rounded and
3 prominent. There were one to two figures of mitosis per field. On the vaginal cytology, the
4 same cell type was observed, in addition to a few inflammatory cells. The diagnosis was
5 round cell neoplasia, with a cytologic picture compatible with TVT.

6 The animal was treated with vincristine sulphate (0,3mg/m² weakly) and showed
7 clinical improvement after one month of treatment. Approximately two weeks after clinical
8 cure, the dog demonstrated a blue eye and was referred for an ophthalmological consultation.
9 Diagnosed with vision loss due to glaucoma secondary to a neoplasm, the eye was removed
10 and sent for histopathological evaluation.

11 On histopathological examination of the eye, neoplastic proliferation was observed
12 in the iris, the ciliary body, and a focal area of the cornea. The cells were arranged in a layer,
13 interspersed by a discrete fibrovascular stroma. The cells were rounded and had eosinophilic
14 cytoplasm, round nuclei with condensed dotted chromatin, and a single evident nucleolus.
15 Discrete anisocytosis, moderate anisokaryosis, and rare mitotic figures were observed. In
16 addition, an extensive area of hemorrhage was seen in the posterior chamber, as well as a
17 marked inflammatory infiltrate of degenerated neutrophils and hemorrhage in the ciliary body.
18 In the cornea, there was moderate neovascularization, in addition to an extensive area of
19 hemorrhage near Descemet's membrane, with multifocal areas of necrosis, an inflammatory
20 infiltrate of degenerate neutrophils, and a marked deposition of fibrin. In the crystalline, rare
21 Morgagni globules were observed. The changes observed on the histopathological
22 examination were compatible with a diagnosis of TVT.

23 One month after enucleation, the animal displayed respiratory difficulty, pain,
24 aggression, and epistaxis. Due to the worsening of clinical signs, the animal was euthanized
25 and submitted for necropsy and histological evaluation.

1 At necropsy, there was a grayish-white, well-defined, un-encapsulated nodule
2 measuring 1.0 cm in diameter in the region of the thalamus (Figure 1A and 1B). In the lung,
3 there were several nodules of similar appearance (Figure 1C). In the anterior chamber of the
4 eye, a small grayish-white tumor was observed (Figure 1D). Histologically, the tumor cells
5 were arranged in a layer and interspersed by a delicate fibrous stroma. The cells were
6 predominantly rounded, although some were pleomorphic. The cytoplasm was scarce, finely
7 granular, weakly basophilic, and had distinct limits. The nuclei were yielding, prominent, and
8 contained loose chromatin (Figure 1E). There were one to two obvious nucleoli. Three mitotic
9 figures were observed per field of higher magnification, in addition to a discrete inflammatory
10 infiltrate of eosinophils, plasma cells, and lymphocytes. On immunohistochemical
11 examination of the neoplastic tissue, the cells were observed to be positive for vimentin
12 (Figure 1F) and negative for cytokeratin, CD79a, CD3, and CD117.

13 The diagnosis of TVT was based on the clinical, cytological, and histological
14 alterations observed. Immunohistochemical staining was also performed, which yielded
15 positive results for vimentin and negative for lymphocytes and mast cells, as has been
16 observed in other reports of TVT (PARK et al., 2006).

17 The clinical manifestation of the tumor in the genitalia presented by the animal is
18 characteristic of TVT, but the extragenital presentation is less common. Although extragenital
19 manifestations are well reported, most are due to auto-implantation (contact with the dog's
20 own genitalia) or hetero-implantation (contact with the genitalia of another dog) (FERREIRA
21 et al., 2001). Metastases originating from the genitalia are markedly less common (5% of
22 cases), and when they occur, they usually affect regional lymph nodes due to lymphatic
23 communication. However, they can also occur in other organs, such as the liver, kidneys,
24 spleen, tonsils, skin and subcutaneous tissue, bone, CNS, mesentery, and eyes (GANGULY et
25 al., 2016). In this case, it is difficult to determine if the ocular tumor reported was due to

1 metastasis or implantation by direct eye contact with TVT cells, since the animal lived on the
2 street, and it was not possible to establish a more accurate history. Primary ocular TVT cases
3 have been reported (KOMNENOU et al., 2015); however, most authors consider this
4 manifestation as having a metastatic origin (KOMNENOU et al., 2015).

5 The dog in this study was treated with vincristine sulfate; however, the treatment was
6 stopped after one month, when no signs of the tumor were observed. Treatment with
7 vincristine is the method of choice for TVT, since it is highly effective. However, rare cases
8 of recurrence after treatment may occur. In addition, this drug does not cross the blood-brain
9 barrier (PINCZOWSKI et al., 2015), and this may have favored the rapid reappearance of the
10 tumor after treatment, especially in the remaining eye. Probably because tumor proliferation
11 was lodged in the optic nerve, in the region of the chiasm and in the CNS in the thalamus
12 region and it may contribute for the metastasis for the eye. Metastases of TVT to the CNS are
13 extremely rare, with only a few cases reported in the literature (FERREIRA et al., 2000).
14 Animals with brain metastasis may present varying clinical signs, and the tumor may be in
15 different regions, such as the pituitary, left piriform lobe, and optic chiasm; the rostral and
16 caudal portions of the left frontal lobe; and the right frontal lobe (FERREIRA et al., 2000).
17 The behavioral change observed in this case was likely due to the compression caused by the
18 tumor, mainly in the thalamus region. Lesions in this region have been implicated in
19 behavioral changes (ESPERIDIÃO-ANTONIO et al., 2007).

20 This case draws attention to the occurrence of TVT in the CNS of dogs with ocular
21 TVT.

22

23 **BIOETHICS AND BIOSSECURITY COMMITTEE APPROVAL**

24 Declaration

1 We authors of the article entitled " Metastatic Transmissible Venereal Tumor in the Central
2 Nervous System of a Dog" declared, for all due purposes, the project that gave rise to the
3 present data of the same has not been submitted for evaluation to the Ethics Committee of the
4 University /Research Institute Centro Universitário do Espírito Santo, but we are aware of the
5 content of the Brazilian resolutions of the National Council for Control of Animal
6 Experimentation - CONCEA "http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553.html" if
7 it involves animals.

8 Thus, the authors assume full responsibility for the presented data and are available for
9 possible questions, should they be required by the competent authorities.

10

11 **DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS**

12 We have no conflict of interest to declare.

13

14 **REFERÊNCIAS.**

15

16 DAS, A.K. et al. Histopathological study of canine transmissible venereal tumour. **Indian**
17 **Veterinary Journal**, v.67, p.473-474, 1990. Available from:
18 <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19902214393>>. Accessed: Aug. 10, 2018.

19 ESPERIDIAO-ANTONIO, V. et al. Neurobiology of the emotions. **Revista De Psiquiatria**
20 **Clinica**, v.35, n.2, p.55–65, 2008. Available from:
21 <<http://www.scielo.br/pdf/rpc/v35n2/a03v35n2>>. Accessed: Jul. 22, 2018. doi:
22 10.1590/S0101-60832008000200003.

23 FERREIRA, A.J.A. et al. Brain and ocular metastases from a Transmissible Venereal Tumour
24 in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.41, n.4, p.165–168, 2000. Available from:

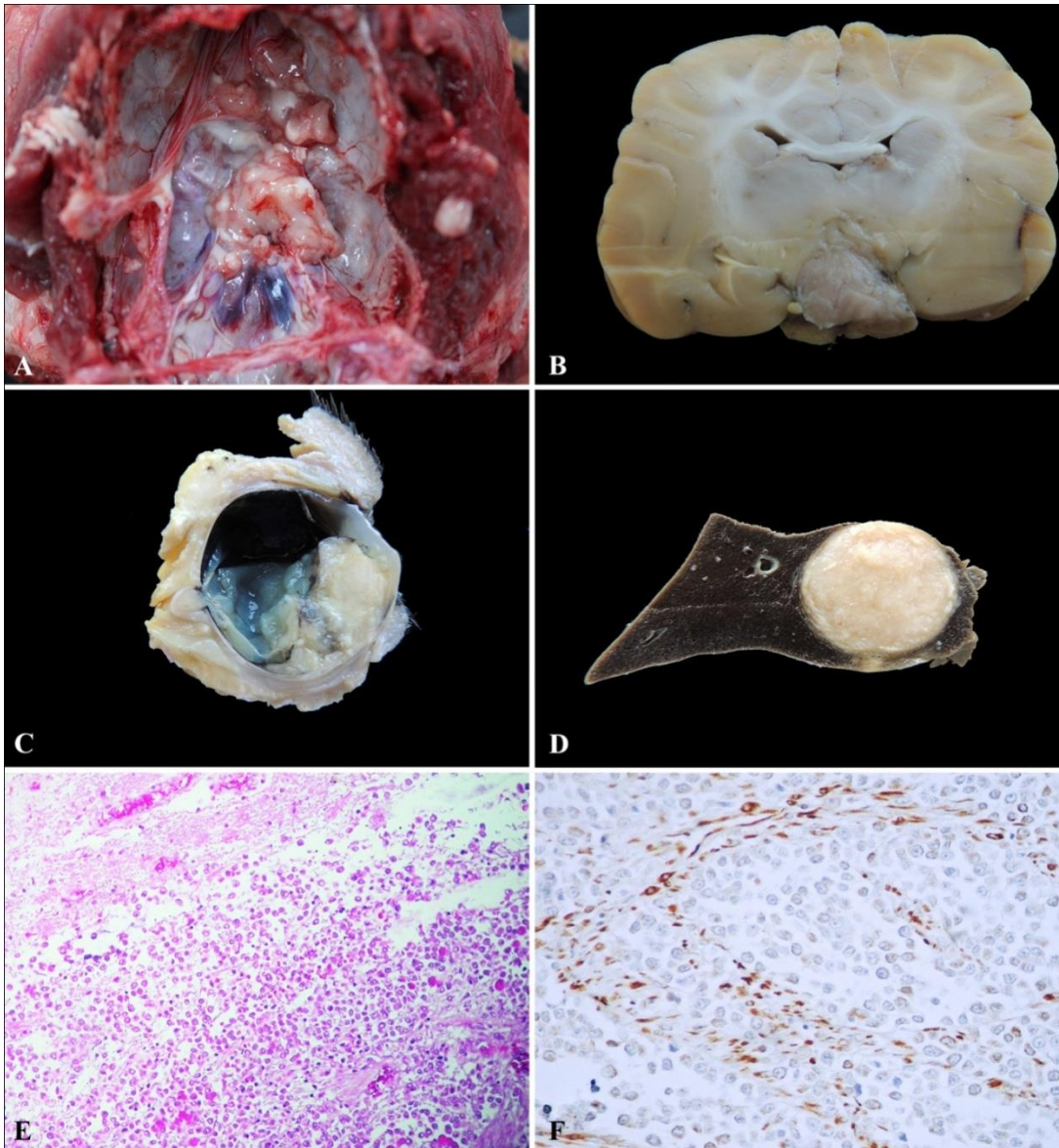
- 1 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03187.x>>. Accessed:
2 Jul. 27, 2018. doi: 10.1111/j.1748-5827.2000.tb03187.x.
- 3 GANGULY, B. et al. Canine transmissible venereal tumour: A review. **Veterinary and**
4 **Comparative Oncology**, v.14, n.1, p.1–12, 2016. Available from:
5 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/vco.12060>>. Accessed: Jul. 22, 2018. doi:
6 10.1111/vco.12060.
- 7 KOMNENOU, A.T. et al. Ocular manifestations of canine transmissible venereal tumour: A
8 retrospective study of 25 cases in Greece. **Veterinary Record**, v.176, n.20, p.523, 2015.
9 Available from:
10 <[https://veterinaryrecord.bmj.com/content/vetrec/early/2015/04/17/vr.102968.full.pdf?casa_t
11 oken=oKFukW3pxb8AAAAA:IAvM_w3_ZMrlpFCpnq10aRa6wgbApm-
12 pjrQSx9dONFnbxr5oQGuzByvE6Mz_ESWBrdSaXzK1Jisqmg](https://veterinaryrecord.bmj.com/content/vetrec/early/2015/04/17/vr.102968.full.pdf?casa_token=oKFukW3pxb8AAAAA:IAvM_w3_ZMrlpFCpnq10aRa6wgbApm-pjrQSx9dONFnbxr5oQGuzByvE6Mz_ESWBrdSaXzK1Jisqmg)>. Accessed: Jul. 27, 2018.
13 doi:10.1136/vr.102968.
- 14 PARK, M.S. et al. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal of**
15 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.1, p.130–133, 2006. Available from:
16 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566273>>. Accessed: Aug. 7, 2018. doi:
17 10.1177/104063870601800123.
- 18 PINCZOWSKI, P. et al. Brain metastasis in a case of canine transmissible venereal tumor
19 after a supposed successful treatment with vincristine sulfate. **Acta Veterinaria**, v.65, n.1,
20 p.137–142, 2015. Available from:
21 <<https://content.sciendo.com/view/journals/acve/65/1/article-p137.xml>>. Accessed: Jul. 25,
22 2018. doi: 10.1515/acve-2015-0011.
- 23 RODRIGUES, G.N. et al. Intraocular Transmissible Venereal Tumor in a Dog. **Ciência**
24 **Rural**, v.31, n.1, p.141–143, 2001. Available from:

1 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000100023>.

2 Accessed: Jul. 22, 2018. doi:10.1590/S0103-84782001000100023.

3 STRAKOVA, A. & MURCHISON, E.P. The cancer which survived: Insights from the
4 genome of an 11000 year-old cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.30,
5 p.49–55, 2015. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867244>>.

6 Accessed: Aug. 7, 2018. doi: 10.1016/j.gde.2015.03.005.



1
 2 Figure 1 – Metastatic transmissible venereal tumor. A and B. Optic chiasm and ventral part of the thalamus
 3 displaying a grayish white nodular mass measuring 1.0 cm in diameter (arrows). C. Anterior chamber of the eye
 4 displaying a greyish-white mass. D. Lung displaying a mass similar to that of the central nervous system. E.
 5 Neoplasm comprised of rows and cords of round to ovoid cells, with large, round nuclei (arrows). Hematoxylin and
 6 eosin. F. Positive immunolabeling in the cytoplasm of the cells of the tumor for vimentin (arrows). Chromogen DAB.

3 Considerações Finais

O comportamento dos linfomas em caninos é difícil de prever com base apenas na histopatologia, o que demonstra a importância da determinação do imunofenótipo, por meio da realização da técnica de IHQ. Os resultados do presente estudo demonstraram que o linfoma canino apresenta, em sua maioria, imunofenótipo B e é multicêntrico, considerando a região de influência do LRD/UFPel. Nos casos de linfoma cutâneo, quando é impossível realizar a fenotipagem, os protocolos de tratamento para tumores originados de células T parecem ser os mais adequados.

O sequenciamento dos demais éxons e regiões intrônicas do gene *TP53* bem como a ampliação do número de cópias podem revelar alterações não detectadas, demonstrando a importância de expandir o presente estudo.

A IHQ demonstrou ser fundamental para diferenciação do TVT de outras neoplasias de células redondas. Além disso, este caso chama atenção para a ocorrência de TVC no SNC de cães com TVT ocular.

Referências

ADAMS, V. J.; EVANS, K. M.; SAMPSON, J.; WOOD, J. L. N. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, p.512–524, 2010.

ARSLAN, A.; SAGLAM, Y. S.; TEMUR, A. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immuno-peroxidase technique. **Veterinary Record**, v.155, p.550-552, 2004.

ASADA, H.; TSUBOI, M.; CHAMBERS, J. K.; UCHIDA, K.; TOMIYASU, H.; GOTO-KOSHINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. A 2-base insertion in exon 5 is a common mutation of the TP53 gene in dogs with histiocytic sarcoma. **The Journal of Veterinary Medical Science**, n.79, v.10, p.1721–1726, 2017.

BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1021-1026, 2007.

CAPELOZZI, V. L. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.4, p.375–382, 2009.

CARDOSO, M. J. L.; MACHADO, L. H. A.; ROCHA, N. S.; MOUTINHO, F. Q.; CIAMPOLINI, P. Linfoma canino: Revisão de cinquenta e quatro casos. **Bioscience Journal**, v.19, n.3, p.131-142, 2003.

CUNHA, F. M.; SILVEIRA, L. M. G.; XAVIER, J. G.; ALLEGRETTI, L.; BOVINO, E. E. Linfoma multicêntrico em *Canis familiaris* (cão doméstico): estudo retrospectivo de 60 casos, entre agosto de 2009 e dezembro de 2010, no Município de São Paulo-SP. **Journal of the Health Sciences Institute**, v.29, n.4, p.209-301, 2011.

DAS, A. K.; DAS, U.; DAS, D.; SENGUPTA, J. Histopathological study of canine transmissible venereal tumour. **Indian Veterinary Journal**, v.67, p.473-474, 1990.

DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; AMORIM, R. L.; BANDARRA, E.P. Imunofenotipagem dos linfomas caninos em tecido incluído em parafina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia CRMV-SP**, v.4, n.3, p.71-75, 2001.

ENGSTROM, P. F.; BLOOM, M. G.; DEMETRI, G. D.; FEBBO, P. G.; GOECKELER, W.; LADANYI, M.; LOY, B.; MURPHY, K.; NERENBERG, M.; PAPAGNI, P.; ROBSON, M.; SWEETMAN, R. W.; TUNIS, S.; DEMARTINO, J.; LARSEN, J. K. NCCN Molecular Testing White Paper: Effectiveness, efficiency, and reimbursement. **Journal of the National Comprehensive Cancer**, v.9, n.6, p.1-16, 2011.

ESPERIDIAO-ANTONIO, V.; MAJESKI-COLOMBO, M.; TOLEDO-MONTEVERDE, D.; MORAES-MARTINS, G.; FERNANDES, J. J.; ASSIS, M. B.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Neurobiology of the emotions. **Revista De Psiquiatria Clinica**, v.35, n.2, p.55-65, 2008.

FERREIRA, A. J. A.; JAGGY, A.; VAREJÃO, A. P.; FERREIRA, M. L.; CORREIA, J. M.; MULAS, J. M.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, P.; PRADA, J. Brain and ocular metastases from a Transmissible Venereal Tumour in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.41, n.4, p.165-168, 2000.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; RODRIGUES, A.; BARROS, C. S. L. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.4, n.12, p.139-146, 2006.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p.223-230, 2008.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J. L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J. P. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Veterinary Pathology**, v.39, n.1, p.92-109, 2002.

GANGULY, B.; DAS, U.; DAS, A. K. Canine transmissible venereal tumour: A review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.14, n.1, p.1-12, 2016.

GAVAZZA, A.; SACCHINI, F.; LUBAS, G.; GUGLIUCCI, B.; VALORI, E. Clinical, laboratory, diagnostic and prognostic aspects of canine lymphoma: a retrospective study. **Comparative Clinical Pathology**, v.18, n.3, p.291-299, 2009.

GOLDSCHMIDT, M. V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p.117-31, 2011.

GOUVEIA, G. R. Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.33, n.4, p.315-322, 2011.

HORTA, R. D.; COSTA, M. P.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. **Revista Ciência Rural**, v.42, n.6, 2012.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G.; FLORES, E. R. Li-Fraumeni syndrome: a p53 family affair. **Cell Cycle**, v.4, n.7, p.865-7, 2005.

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

JASIK, A.; REICHERT, M. New p53 mutations in canine skin tumours. **Veterinary Record**, v.169, n.26, p.684, 2011.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. **Genética Médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.197-221.

KANAYA, N.; OKUDA, M.; TOYAMA, N.; OIKAWA, T.; INOKUMA, H.; MORIMOTO, M.; HAYASHI, T.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y.; TSUJIMOTO, H.; ONISHI, T. Detection of the anti-P53 antibodies in dogs with tumors. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.973-979, 2002.

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

KOMNENOU, A. T.; THOMAS, A. L.; KYRIAZIS, A. P.; POUTAHIDIS, T.; PAPAZOGLU, L. G. Ocular manifestations of canine transmissible venereal tumour: A retrospective study of 25 cases in Greece. **Veterinary Record**, v.176, n.20, p.523, 2015.

KOSHINO, A.; GOTO-KOSHINO, Y.; SETOGUCHI, A.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Mutation of p53 Gene and Its Correlation with the Clinical Outcome in Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.30, p.223–229, 2016.

LEE, C. & KWEON, O. Veterinary Science Mutations of p53 Tumor Suppressor Gene in Spontaneous Canine Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.3, p.321–32, 2002.

LEE, C. H.; KIM, W. H.; LIM, J. H.; KANG, M. S.; KIM, D. Y.; KWEON, O. K. Mutation and over expression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.5, p.63-69, 2004.

MACEWAN, E. G. Spontaneous tumours in dogs and cats: models for study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.9, n.2, p.125 136, 1990.

MACEWEN, E. G.; HAYES, A. A.; MATUS, R. E.; KURZMAN, I. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n.5, p.564-568, 1987.

MACHICOTE, G.; GONZÁLEZ, J. L. Linfoma Cutáneo. **Revista Clinica Veterinária Pequenos Animais**, v.28, n.1, p.31-37, 2008.

MAYR, B.; REIFINGER, M.; ALTON, K. Novel canine tumor suppressor gene p53 mutations in cases of skin and mammary neoplasms. **Veterinary Research Communications**, v.23, p,285-291, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Ames, USA: Iowa State Press, 2002. p.575–606.

MISDORP, W; ELSE, R.W.; HELLME´N, E.; LIPSCOMB, T.P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2.ed. Washington USA: **Armed Forces Institute of Pathology**; 1999. p.3–29.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. **Journal of reproduction and fertility - Supplement**, v.57, p.439-443, 2001.

MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Linfoma canino de células T: aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de 38 casos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, p.103-110, 2007.

MUTO, T.; WAKUI, S.; TAKAHASHI, H.; MAEKAWA, S.; MASAOKA, T.; USHIGOME, S.; FURUSATO, M. p53 Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology**, v.37, p.248-253, 2000.

NAKAMURA S, GOMYO Y, ROTH JA. C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. **Oncogene**, v.27, p.2102-2107. 2002.

NASIR, L.; RUTTEMANB, G. R.; REIDA, S. W. J.; SCHULZEC, CH.; ARGYLEA, D. J. Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft tissue sarcomas. **Cancer Letters**, v.174, p.83-9, 2001.

NEUWALD, E. B.; TEIXEIRA, L. V.; CONRADO, F. O.; SILVA, M. O. D.; HLAVAC, N. R. C.; GONZÁLEZ, F. H. D. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, p.349-354, 2014.

OWEN, L. TNM Classification of tumors in domestic animals, p. 46-47. **Geneva: World Health Organization**. 1980.

OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, 2011.

PARK, M. S.; KIM, Y.; KANG, M. S.; OH, S. Y.; CHO, D. Y.; SHIN, N. S.; KIM, D. Y. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.1, p.130–133, 2006.

PINCZOWSKI, P.; GIMENO, M.; ACEÑA, C.; VILLEGAS, A.; DE MARTINO, A.; LUJÁN, L. Brain metastasis in a case of canine transmissible venereal tumor after a supposed successful treatment with vincristine sulfate. **Acta Veterinaria**, v.65, n.1, p.137–142, 2015.

PONCE, F.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P.; TURINELLI, V.; LEDIEU, D.; BONNEFONT, C.; PASTOR, M.; DELIGNETTE, M. L.; FOURNEL-FLEURY, C. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Veterinary Pathology**, v.47, n.3, p.414-433, 2010.

Prefeitura Municipal de Pelotas 2012. Projeto de Castração por Bairros. Anexo III. Disponível em <http://www.pelotas.rs.gov.br/centro_zoonoses>
QUEIROGA, F. L. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In Vivo**, v.25, n.3, p.455-65, 2011.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E. J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V. E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, n.4, p.393-413, 2008.

RICHARDSON, R. C.; HAHN, K. A.; KNAPP, D. W. Biologia dos tumores. In: ETTINGER, S. A.; FELDMAN E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, v.1, 1997, p. 665-675.

RODRIGUES, G. N.; ALESSI, A. C.; LAUS, J. L. Intraocular Transmissible Venereal Tumor in a Dog. **Ciência Rural**, 2001. v. 31, n. 1, p. 141–143.

SALVADO, Inês Sofia de Sousa. **Estudo retrospectivo das neoplasias em canídeos e felídeos domésticos, analisadas pelo laboratório de anatomia patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, no período compreendido entre 2000 e 2009**. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

SÁNCHEZ-SERVÍN, A.; MARTÍNEZ, S.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; FAJARDO, R. P53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**, v.10, p.353-355, 2009.

SCHON, K.; TISCHKOWITZ, M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.167, n.2, p.417-423, 2018.

SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P.; FIGUEIREDO, L. M. A.; ROCHA, N. S. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.245-250, 1999.

SILVA, D. R.; FALEIRO, M. B. R.; MOURA, V. M. B. D. Tumores de células redondas em cães: aspectos gerais e marcadores imunoistoquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11, n.22, p. 2650, 2015.

STRAKOVA, A.; MURCHISON, E. P. The cancer which survived: Insights from the genome of an 11000 year-old cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.30, p.49–55, 2015.

SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L.; ROCHA, N. S.; PESSOA, A. W. P. Classificação citológica dos linfomas caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.1, p.47-54, 2010.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v.16, n.4, p.209-219, 1994.

TESKE, E.; WISMAN, P.; MOORE, P.F.; VAN HEERDE, P. Histological classification and immunophenotyping of canine Non-Hodgkin's lymphoma. Unexpected high frequency of T-cell lymphomas with B-cell morphology. **Experimental Hematology**, v.22, n.12, p.1179-1187, 1994.

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: Withrow S.J, Vail DM. Withrow and MacEwen's, **Small animal clinical oncology**. Saunders Elsevier, Missouri, 2007, p.699-733.

VAIL, D.M. Hematopoietic tumors. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. (editors). **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Cat and Dog**, 7.ed. Saunders, St. Louis, 2010. p. 2148-2158.

VELDHOEN, N.; WATTERSON, J.; BRASH, M.; MILNER, J. Identification of tumour associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. **British Journal of Cancer**, v.81, p.409 415, 1999.

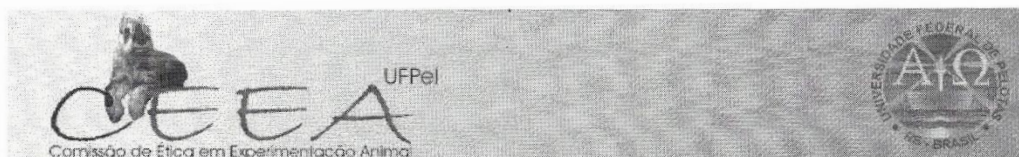
WANG, J.; WANG, T.; SUN, Y.; FENG, Y.; KISSEBERTH, W. C.; HENRY, C. J.; MOK, I.; LANA, S. E.; DOBBIN, K.; NORTHRUP, N.; HOWERTH, E. W.; Zhao, S. Proliferative and Invasive Colorectal Tumors in Pet Dogs Provide Unique Insights into Human Colorectal Cancer. **Cancers**, v.10, n.9, p. 330, 2018.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE R. L. **Why worry about cancer in companion animals?** In.: Withrow & Mac Ewen's Small Animal Clinical Oncology. 5.ed. Saunders, Elsevier. St. Louis. 2013.

YORK, D.; WITHERS, S. S.; WATSON, K. D.; SEO, K. W.; REBHUN, R. B. Enrofloxacin enhances the effects of chemotherapy in canine osteosarcoma cells with mutant and wild-type p53. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.15, n.3, p.1087–1100, 2017.

Anexo

Anexo – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



Pelotas, 20 de fevereiro de 2013

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Dra. Ana Lucia Schild

Faculdade de Veterinária

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Laboratório Regional de Diagnósticos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas está cadastrado junto a CEEA/UFPeI, de acordo com o parecer favorável referente ao processo nº23110.000339/2013-97. Salientamos que qualquer modificação no projeto aprovado, com a inclusão de alguma atividade não prevista anteriormente referente ao uso de animais, deva ser imediatamente informada a CEEA.

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Éverton F. da Silva
Médico Veterinário, CRMV/RS 7047
Faculdade de Veterinária - UFPeI