

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR, ÍNDICE
APOPTÓTICO E DA EXPRESSÃO DO P53 NOS
LINFOMAS CANINOS**

SARA MARIA DE CARVALHO E SUZANO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

BOTUCATU – SP
MARÇO, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Suzano, Sara Maria de Carvalho e.

Avaliação da proliferação, índice apoptótico e expressão do P53 nos
linfomas caninos / Sara Maria de Carvalho e Suzano. – Botucatu [s.n], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Assunto CAPES: 50503006

1. Cão - Doenças 2. Linfoma 3. Câncer em cão 4. Apoptose

CDD 636.70896994

Palavras-chave: Apoptose; Canino; Linfoma; Proliferação

TESE DE DOUTORADO
SARA MARIA DE CARVALHO E SUZANO

Composição da Banca Examinadora

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

Prof^a Adj. Adriana Warderley de Pinho Pessoa

Prof^a Ana Paula Frederico Bracarense

Prof^a Ass. Dra. Renée Lauder Amorim

Prof^a Dra. Noeme Sousa Rocha

Aos meus pais, João Carlos Suzano, Rosa Maria de Carvalho e Suzano, aos meus irmãos Caio e Cláudia de Carvalho e Suzano (e ao Dimple). Muito obrigada, por tudo que vocês fizeram por mim e principalmente por me fazer sentir que o porto seguro existe e se por acaso um dia tudo der errado, sei exatamente para onde correr. Amo vocês...

DEDICO.

Ao meu orientador, Professor Assistente Doutor Julio Lopes Sequeira, mais uma vez pela orientação, amizade e por toda confiança, que apesar da distância, foi sempre a mesma. Com certeza isso fez com que a realização dos meus sonhos fosse mais fácil. Pessoas assim, são muito importantes na vida de quem começa a trilhar qualquer caminho, um modelo de ética e profissionalismo. Hoje, quando algum aluno me agradece por uma oportunidade dada e pela confiança depositada, eu imediatamente lembro que é exatamente isso que vou te agradecer sempre. Muito obrigada!

AGRADEÇO.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão do auxílio financeiro que possibilitou esta pesquisa.

As docentes do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP. **Professora Assistente Doutora Renée Laufer Amorim** e **Professora Doutora Noeme Sousa Rocha** muito obrigada pelos ensinamentos e amizade e confiança, não só no decorrer deste trabalho, mas desde os meus primeiros passos profissionais.

Ao **Professor Assistente Doutor Deílson Elgui de Oliveira** e ao técnico de laboratório **Marcos Roberto Franchi**, por toda a ajuda na padronização da imunoistoquímica.

Aos funcionários do Serviço de Patologia Veterinária. Ao técnico de necropsia **Maury Raul**, pela inestimável dedicação na sala de necropsia e ao técnico do Laboratório de Histologia **Noel Melo**, pelos ensinamentos no processamento do material.

À pós-graduanda **Camila Dias Porto** por tantas vezes que pedi algo quase impossível, e ela rapidamente fez. Por exemplo, Camila meu relatório financeiro, com todas as notas fiscais, está pronto?

À Doutora e hoje amiga, **Adriana Wanderlei de Pinho Pessoa**, por toda alegria, dedicação e companheirismo na realização dos nossos trabalhos (eles ficaram lindos).

As **Universidades Castelo Branco e do Grande Rio**, principalmente aos coordenadores de curso **Marcelo Pacheco** e **Irineu Benevides**, que permitiram meus afastamentos, em algumas vezes freqüentes e deram além de apoio, incentivo para a realização desta tese.

Aos queridos amigos conquistados nestes anos no Rio de Janeiro, principalmente a **Dala Kezen**, uma amiga acima de tudo, sempre com uma palavra de ânimo e coragem além do amor e carinho que é inerente a ela. Uma pessoa maravilhosa.

À minha companheira fiel de tantos momentos maravilhosos e outros não muito bons, **Fabiana Batalha**, muito obrigada pela amizade (e pela estatística, é claro).

A **Rosaura Leite Rodrigues**, uma parceira dedicada nas disciplinas, com muita responsabilidade sempre me lembrando de tudo, anotando tudo e ainda me socorrendo nas lâminas mais estranhas.

Aos amigos muito mais que especiais, **Renée, Rogério, Sofia e Cecília** mais uma vez pelos momentos “família” em que me acolheram (tantas vezes durante muitos dias) com tanto carinho e alegria. Muito obrigada, com certeza a vida continuou mais fácil e gostosa. Nunca me esquecerei da discussão feita a seis mãos, eu e minhas ajudantes amadas Sofia e Ceci.

Ao **Rodrigo Mannarino**, por me mostrar que às vezes ele realmente tem razão, isso não foi fácil, mas sempre necessário.

A todos os meus alunos da UCB e da UNIGRANRIO que em algum momento me ajudaram, me compreenderam e me ensinaram durante este período de pesquisa.

Aos Médicos Veterinários Residentes e pós-graduandos da Patologia Veterinária pelo auxílio neste trabalho durante as minhas inúmeras ausências.

E finalmente agradeço, com muito respeito, aos animais que participaram involuntariamente desta pesquisa. Este trabalho foi realizado, para melhorar as condições e qualidade de vida aos nossos pacientes.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Números e padrões de distribuição dos AgNORs dentro do núcleo celular. (VALJDOVICH <i>et al.</i> , 2004).....	07
TABELA 2: Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos segundo JACOBS <i>et al.</i> (2002).....	13
TABELA 3: Estadiamento Clínico dos Linfomas Caninos proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY <i>et al.</i> , 1984).....	14
TABELA 4: Diluições estabelecidas para os anticorpos anti-CD-3, anti- CD79a, anti-Ki-67 (MIB-1), anti-Caspase-3 e anti-p-53.....	18
TABELA 5: Distribuição racial dos 40 animais portadores de linfomas caninos.....	21
TABELA 6: Distribuição por sexo dos 40 animais portadores de linfomas caninos.....	22
TABELA 7: Idade dos 40 animais portadores de linfomas caninos.....	22
TABELA 8: O estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY <i>et al.</i> , 1984) nos 40 animais portadores de linfomas caninos.....	22
TABELA 9: Classificação anatômica dos linfomas caninos, nos 40 animais....	22
TABELA 10: Grau de malignidade 40 casos de linfomas caninos de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	23
TABELA 11: Grau de malignidade 40 casos de linfomas caninos de acordo com a classificação Working Formulation (NCI-WF, 1982).....	23
TABELA 12: Linfomas de baixo e alto grau de malignidade de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	24
TABELA 13: Imunofenotipagem dos linfomas caninos.....	26
TABELA 14: relação entre o imunofenótipo e a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	26
TABELA 15: Número de casos, média e desvio-padrão do número de AgNORs nas células neoplásicas de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	27

TABELA 16: Número, média e desvio-padrão do índice de proliferação celular utilizando anticorpo anti-Ki-67 (MIB 1), de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	28
TABELA 17: Número, média e desvio-padrão do índice de apoptose utilizando anticorpo anti-caspase-3, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	29
TABELA 18: Número, média e desvio-padrão do índice de apoptose utilizando anticorpo anti-caspase-3 nos linfomas de alto e baixo grau de malignidade, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	29
TABELA 19: Número, média e desvio-padrão da expressão de p-53, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).....	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Linfoma Centrocítico-centroblástico (Kiel), a população de células neoplásicas apresentam-se às vezes pequenas com núcleo clivado e outras grandes com nucléolos múltiplos. HE.....	31
FIGURA 2: Linfoma Imunoblástico (Kiel). As células apresentam núcleo redondo com um único nucléolo central. HE.....	31
FIGURA 3: Linfoma Centroblástico (Kiel). As células neoplásicas apresentam nucléolos múltiplos e periféricos. HE.....	32
FIGURA 4: Linfoma Linfoblástico (Kiel). Presença de células médias, núcleo redondo e sem nucléolos evidentes. HE.....	32
FIGURA 5: Linfoma T. Positividade para o anticorpo primário anti-CD3, ABC, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.....	33
FIGURA 6: Linfoma B. Positividade para o anticorpo primário anti-CD79a, ABC, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.....	33
FIGURA 7: Linfoma Imunoblástico – múltiplos AgNORs distribuídos pelo núcleo das células neoplásicas e algumas células apresentando um único ponto nuclear (1000x).....	34
FIGURA 8: Linfoma Imunoblástico – múltiplos AgNORs distribuídos pelo núcleo das células neoplásicas e algumas células apresentando um único ponto nuclear (1000x).....	34
FIGURA 9: Linfoma Imunoblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti- Ki-67 (MIB 1), EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.....	35
FIGURA 10: Linfoma T pleomórfico (Kiel) – positividade para anticorpo anti- Ki-67 (MIB 1), EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.....	35
FIGURA 11: Linfoma Imunoblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti-caspase-3, EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.....	36
FIGURA 12: Linfoma Centroblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti-caspase-3, EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.....	36
FIGURA 13: Linfoma Imunoblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti-p53, EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.....	37

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ASBTRACT.....	02
1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Procedência do material.....	13
3.2 Processamento do Material.....	14
3.3 Aplicação das classificações dos Infomas não-Hodgkin humano nos linfomas caninos.....	15
3.4 Avaliação Histoquímica.....	15
3.4.1 Argyrophil Nucleolar Organizer Regions – AgNORs.....	15
3.5 Técnicas Imunoistoquímicas.....	16
3.5.1 Imunofenotipagem dos Linfomas Caninos.....	16
3.5.2 Avaliação Imunoistoquímica dos índices de proliferação celular, de apoptose e a expressão do p-53.....	17
3.6 Análise imunoistoquímica.....	19
3.7 Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 Dados clínicos dos animais.....	21
4.2 Aplicação das Classificações de Kiel e Working Formulation nos linfomas caninos.....	23
4.3 Imunofenotipagem.....	25
4.4 Índice de proliferação celular pelo método do AgNORs.....	26
4.5 Índice de proliferação celular pelo método do Ki-67 (MIB-1).....	27

4.6 Índice de Apoptose pelo método da Caspase-3.....	28
4.7 Expressão de p-53.....	30
5. DISCUSSÃO.....	38
5.1 Dados clínicos.....	38
5.2 Classificação Morfológica.....	40
5.3 Imunofenotipagem.....	41
5.4 Correlação entre a Classificação Morfológica e o Imunofenótipo.....	43
5.5 Índice de proliferação celular pelo método do AgNORs.....	44
5.6 Índice de proliferação celular pelo método do Ki-67 (MIB-1).....	46
5.7 Índice de Apoptose pelo método da Caspase-3.....	47
5.8 Expressão de p-53.....	49
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
8. TRABALHO CIENTÍFICO.....	63

RESUMO

SUZANO, S.M.C. Avaliação da Proliferação Celular, índice apoptótico e expressão do p-53 linfomas caninos. **Botucatu, 2007. 72p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.**

O estudo dos linfomas caninos além de abordar a classificação morfológica e imunofenotípica necessita ser ampliado para que se tenha a avaliação da cinética celular. Esta verificação só pode ser feita com segurança quando são avaliados não só os parâmetros que indicam a taxa de proliferação celular, mas também aqueles relacionados a apoptose, bem como a expressão de proteínas responsáveis por este evento. No homem, muitas vezes a determinação da taxa de proliferação e os marcadores de apoptose têm influência preponderante no prognóstico e no tratamento destas neoplasias e o mesmo deve ocorrer nos linfomas caninos, uma vez que os linfomas nesta duas espécies possuem comportamento biológico muito semelhante. Nesta pesquisa, foram utilizados 40 casos de linfomas caninos. Estes foram classificados de acordo com as classificações de Kiel e Working Formulation (WF), e realizada a imunofenotipagem utilizando marcadores para linfócito T (CD3) e para linfócitos B (CD79a). A proliferação celular foi avaliada pelos métodos de contagem dos AgNORs e células imunopositivas para Ki-67 (MIB-1) e o índice apoptótico foi avaliado pela caspase-3. Foi verificada também a expressão do p-53 mutante. De acordo com as classificações de Kiel e WF os linfomas de alto grau foram os mais freqüentes, a imunofenotipagem mostrou a mesma freqüência de linfomas T e B. Quando avaliada a proliferação celular, houve diferença significativa entre os linfomas de alto e baixo grau tanto pelo método do AgNOR como pela expressão do KI-67 (MIB-1), mas sem significância em relação ao imunofenótipo. Entre as neoplasias de alto grau de malignidade a média de número de NORs por núcleo de célula neoplásica foi de $1,37 \pm 0,32$, e nos casos de baixo grau de $0,98 \pm 0,36$. De acordo com o KI-67 a média do percentual de células positivas foi de $43,19\% \pm 19,01$ e $14,09\% \pm 11,74$ nos casos de alto e baixo grau, respectivamente. O índice de apoptose pela caspase-3 e a expressão do p53 não apresentaram diferenças entre as neoplasias de alto e baixo grau, nem entre os diferentes imunofenótipos.

Palavras-chaves: Linfoma; canino; proliferação; apoptose; p-53

ABSTRACT

SUZANO, S.M.C. Cellular proliferative evaluation, apoptotic index and p-53 expression in canine lymphomas. **Botucatu, 2007. 72p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.**

Lymphoma studies deals with morphological classification and immunophenotypic features, but they have to be amplified for cellular kinetics evaluation. This evaluation can only be safely made, when not only proliferative index are evaluated, but also when apoptosis and some proteins involved in this processes are studied. In men the proliferative index and apoptosis markers have, most of the time, important influence in neoplasia prognosis and treatment, and the same thing should happen with canine lymphoma, once lymphoma in humans and dogs share similarities in biological behavior. In this work it was used 40 canine lymphomas were classified according to Kiel and Working Formulation (WF) methods and immunophenotype was achieved with T lymphocyte marker (CD3) and B lymphocyte marked (CD79a). Cellular proliferation was evaluated by AgNORs and Ki-67 (MIB-1) and apoptotic index by caspase-3. Mutant p-53 expression was also verified. According to Kiel and WF classification system, high grade lymphomas were more frequent and T and B lymphoma showed the same frequency. When cellular proliferation was evaluated, there was a significant difference between high grade and low grade lymphomas by AgNOR and Ki-67 (MIB-1) methods, but did not differ when comparing immunophenotype. Among high grade malignancy lymphomas the NORs medium number per cell nucleoli was 1.37 ± 0.32 and in low grade was 0.98 ± 0.36 . Concerning Ki-67 the positive cellular percentual was $43.19\% \pm 19.01$ e $14.09\% \pm 11.74$ in high and low grade, respectively. Apoptotic index and p53 expression did not show differences between high and low grade lymphoma, neither when comparing immunophenotype.

Key-words: Lymphoma; canine; proliferation; apoptosis; p-53

1. INTRODUÇÃO

Linfoma é uma das neoplasias mais freqüentes na espécie canina e representa cerca de 7 a 24% de todas as neoplasias caninas e 83% dos tumores de origem hematopoiética. Anatomicamente, os linfomas caninos são classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário. Ainda pode-se classificá-los de acordo com o grau de malignidade em linfomas de baixo, médio e alto grau e quanto ao imunofenótipo em linfomas T, linfomas B ou ainda em linfomas T/B.

Como os linfomas caninos apresentam características semelhantes aos dos linfomas não-Hodgkin humanos, as classificações morfológicas destes linfomas não-Hodgkin humanos têm sido adotadas por diversos autores no estudo deste tipo de neoplasias em cães (GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994a; FOURNEL-FLEURY et al., 1997 e FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

Nos seres humanos a associação do tipo morfológico com o índice de proliferação celular e apoptose da neoplasia é muito importante para a determinação do prognóstico e do tratamento (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; KIUPEL et al., 1999). Além destes índices, outro fator importante na evolução da doença é a expressão da p-53 mutante pelas células neoplásicas.

Nos cães a aplicação destes índices, tanto de proliferação celular como de apoptose, tem sido utilizada com os mesmos objetivos, sendo sempre analisados em conjunto com o tipo celular da neoplasia, por meio das classificações morfológicas e da determinação de seu imunofenótipo (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; KIUPEL et al., 1999; PHILLIPS et al., 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como principais objetivos:

- ✓ Avaliar a taxa de proliferação dos linfomas caninos utilizando o método histoquímico de AgNORs e método imunohistoquímico para evidenciação da expressão do Ki-67 (MIB-1).
- ✓ Avaliar o índice apoptótico dos linfomas caninos utilizando o método imunohistoquímico para evidenciação da expressão da Caspase-3.
- ✓ Avaliar a expressão do p53 mutante nos linfomas caninos por meio de método imunohistoquímico.

- ✓ Correlacionar as características citológicas e imunofenotípicas dos linfomas caninos aos seus índices proliferativos e apoptóticos, e a expressão do p53.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os linfomas estão entre as neoplasias mais freqüentes na espécie canina (CAPURRO et al., 1992; TESKE 1994a e 1994b; MILNER et al., 1996; VONDEHAAR & MORRISON, 1998). Nesta espécie sua incidência é de 6 a 30 casos em cada 100.000 cães/ano (VONDEHAAR & MORRISON, 1998), sendo maior que na espécie humana (APPELBAUM et al., 1984; GREENLEE et al., 1990; JACOBS et al., 2002). Ocorrem mais freqüentemente em animais entre 5 e 11 anos (SEQUEIRA & FRANCO, 1992; VALLI et al., 1993; JONES et al., 1997; SEQUEIRA et al., 1999 e JACOBS et al., 2002), não havendo predileção por sexo (TESKE 1994a; VONDEHAAR & MORRISON, 1998). A etiologia deste tipo de neoplasia é desconhecida, não tendo sido confirmada a participação de agentes virais ou químicos no seu aparecimento (HAYES et al., 1995; TESKE 1994a; HAYES et al., 1995; GAVAZZA et al., 2001).

Os sinais clínicos relacionados aos linfomas dos cães são, muitas vezes, inespecíficos, mas linfadenopatia indolor, perda de peso progressiva, caquexia, edema local ou generalizado, apatia e emese são os mais comumente encontrados. Os sinais clínicos dependem do órgão ou órgãos envolvidos. Anatomicamente, os linfomas caninos são classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário ou extranodal, sendo a forma multicêntrica a mais freqüente (JACOBS et al., 2002).

Do ponto de vista etiológico, epidemiológico, clínico, morfológico e imunofenotípico os linfomas caninos apresentam muitas semelhanças com os linfomas não-Hodgkin humanos. Nas duas espécies, este tipo de neoplasia mostra características comuns suficientes para embasar a proposição de se utilizar a doença do cão como modelo experimental, permitindo o teste de terapias e procedimentos clínico-cirúrgicos, antes de sua utilização no homem (GREENLEE et al., 1990; TESKE 1994a e FOURNEL-FLEURY et al., 1997).

Esquemas de classificação morfológica propostos para os linfomas não-Hodgkin humanos, como as classificações de Kiel e da Working Formulation, têm sido aplicados com sucesso por diversos autores nos linfomas da espécie canina, mostrando que nestes as neoplasias de alto grau são as mais freqüentes (GREENLEE et al., 1990; TESKE 1994a; FOURNEL-FLEURY et al., 1997 e FOURNEL-FLEURY et al., 2002). No homem, as

características morfológicas destas neoplasias servem como base para o estabelecimento do prognóstico e de protocolos de tratamento (ASTER et al., 1999; MILITO et al., 2002 e MELLANBY et al., 2002). No cão, a classificação de Kiel mostrou sua importância para o prognóstico, no que diz respeito à determinação do tempo de remissão em animais tratados, enquanto que a classificação da Working Formulation tem importância maior no prognóstico do tempo de sobrevida (TESKE et al., 1994b).

O emprego de técnicas imunológicas no estudo e classificação das desordens linfoproliferativas tem se mostrado particularmente importante no estabelecimento de um diagnóstico preciso (CANIATTI et al., 1996). Atualmente, nos seres humanos, a imunofenotipagem é indispensável para determinar o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin de acordo com as classificações mais atuais, Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), Real (HARRIS et al. 1994) e WHO (JAFFE et al. 2001). Em trabalho de pesquisa em nosso laboratório, tivemos a oportunidade de padronizar a marcação imunofenotípica de linfomas caninos utilizando o anticorpo policlonal anti-CD3 para marcar linfomas de células T e o anticorpo monoclonal anti-mb1 (CD79a) para marcar linfomas de células B (DE MOURA et al., 2000). Nos cães, assim como no homem, o imunofenótipo T dos linfomas tem sido associado a um prognóstico ruim, com sobrevida menor e períodos de remissão mais curtos, quando comparado aos linfomas de células B (KIUPEL et al., 1999; DOBSON et al., 2001).

Em estudos sobre neoplasias, inclusive linfomas, pode-se observar a necessidade de avaliar, além do imunofenótipo, o índice de proliferação celular e a taxa de apoptose das células neoplásicas (KIUPEL et al., 1999).

A proliferação celular relacionada com as neoplasias tem sido amplamente estudada por mostrar uma boa correlação com o comportamento biológico destes tumores e adicionar informações que orientem o tratamento e o prognóstico (ROELS et al., 1999).

Existem muitos métodos de avaliação da proliferação celular, entre estes podem ser citadas técnicas simples como a contagem das figuras de mitose ou métodos mais sofisticados como a contagem dos AgNORs (Argyrophil Nucleolar Organizer Regions) por métodos histoquímicos e a

avaliação imunoistoquímica, utilizando-se a marcação dos antígenos Ki-67 (MIB-1) e PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (GRIFEY et al., 1999).

As figuras de mitoses são contadas no corte histológico empregando-se colorações de rotina. Um dos maiores problemas deste método é que o período de mitose é muito curto dentro do ciclo celular, portanto células em proliferação podem não ser detectadas e o índice proliferativo será subestimado (GRIFEY et al., 1999). Deve-se ressaltar que este método ainda é muito utilizado na rotina laboratorial para a avaliação do comportamento biológico das neoplasias.

O índice de proliferação pode ser determinado também por meio de métodos histoquímicos, utilizando-se a contagem dos AgNORs. Estes são estruturas presentes nos núcleos celulares, relacionadas com a síntese de proteínas nas células em proliferação. O grande número de AgNORs reflete um alto índice de proliferação e a intensidade da marcação indica a velocidade do ciclo. Esses parâmetros têm sido utilizados com grande eficácia nos linfomas do homem e do cão. As neoplasias de grau alto de malignidade possuem um número maior de AgNORs intranucleolares e estes apresentam-se distribuídos difusamente enquanto os tumores de grau baixo de malignidade possuem AgNORs agregados dentro dos nucléolos (CROCKER et al., 1988).

De acordo com a contagem e o padrão de distribuição dos NORs nos núcleos, Valjdovich et al., em 2004, estabeleceram três grupos que estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

TABELA 1: Números e padrões de distribuição dos AgNORs dentro do núcleo celular. (VALJDOVICH et al., 2004).

GRUPO	CARACTERÍSTICAS DOS NORs
GRUPO 1	AgNORs encontram-se agregados de forma homogênea dentro do nucléolo (cada nucléolo apresenta apenas 1 NOR)
GRUPO 2	AgNORs estão em vários agregados somente dentro do nucléolo
GRUPO 3	Numerosos e pequenos AgNORs difusos dentro do núcleo

Este método de determinação da taxa de proliferação celular tem se mostrado importante na classificação do grau de malignidade das neoplasias. Os linfomas de alto grau geralmente apresentam padrão de distribuição do grau 3. Além do grau de malignidade, a contagem dos AgNORs estima o tempo de remissão da neoplasia e a sobrevida dos pacientes tratados com quimioterapia (MADEWELL, 2001; VALJDOVICH et al., 2004).

Este método histoquímico é muito utilizado na medicina veterinária, pois além do baixo custo, da boa relação com a classificação e com o prognóstico, é possível determinar a velocidade do processo proliferativo (DERENZINI & PLOTON, 1991 e KIUPEL et al., 1999).

A contagem dos AgNORs é de grande valia para o prognóstico dos linfomas caninos pois além da quantidade destas estruturas intranucleares estar relacionada com a graduação dos tumores, um número menor de AgNORs no núcleo das células neoplásicas é proporcional a um maior tempo de vida do paciente, devido a evolução mais lenta da neoplasia (VAIL et al., 1996 e KIUPEL et al., 1999).

Métodos imunoistoquímicos também têm sido empregados para a detecção de proteínas associadas à proliferação celular tanto nas neoplasias humanas como na Medicina Veterinária (ALVES et al., 1999; ROELS et al., 1999). Os dois marcadores mais freqüentemente utilizados são os antígenos PCNA e o Ki-67 (MIB-1) (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; KIUPEL et al., 1999).

O PCNA marca uma proteína essencial para a síntese do DNA e que varia na sua quantidade nas diferentes fases do ciclo celular, apresentando pico na fase S. A principal desvantagem deste marcador é o tempo de vida útil prolongado desta proteína após a saída da célula do ciclo celular, havendo com isso uma superestimação do índice de proliferação da neoplasia (GRIFEY et al., 1999 e ALVES et al., 1999).

O antígeno Ki-67 (MIB-1) pode ser detectado em todas as fases do ciclo celular menos na G₀ (GERDES et al., 1991). Este tem relação direta

com a fração de crescimento de uma população celular e é considerado, atualmente, como o melhor marcador imunoistoquímico de proliferação celular (ALVES et al., 1999).

A determinação da expressão do antígeno Ki-67 tem valor prognóstico nos linfomas não-Hodgkin humanos, pois a análise desse índice pode estabelecer um fator independente para cada caso (HALL et al., 1988).

A taxa de células neoplásicas que estão em proliferação nos linfomas não-Hodgkin está relacionada com os diferentes tipos morfológicos e com o grau de malignidade. Geralmente os tumores de grau alto de malignidade possuem um índice de proliferação celular mais alto que os de grau baixo. (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; WANG et al., 2005).

Na espécie canina, a quantificação do antígeno Ki-67 nos diferentes grupos de linfomas, pode resultar em um aumento na acurácia das classificações dos linfomas caninos. Fournel-Fleury et al., (1997), observaram uma correlação positiva entre a proporção de células positivamente marcadas pelo Ki-67, a morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade.

Kiupel et al. (1999) afirmaram que a avaliação do comportamento biológico dos linfomas caninos deve ser baseada nas classificações citomorfológicas e imunofenotípicas. No entanto, ocorrem algumas diferenças quanto à evolução biológica e a resposta ao tratamento entre linfomas que apresentam o mesmo tipo celular. Estes autores sugerem que a avaliação morfológica e imunofenotípica dos linfomas caninos devem ser acompanhadas da determinação do índice de proliferação.

O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais: o tempo do ciclo celular, a porcentagem das células em proliferação e o número de células perdidas. Portanto, além dos marcadores de proliferação celular, outro índice muito importante relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é a apoptose (PHILIPS et al., 2000).

Um dos métodos de quantificar a frequência de células tumorais que estão em apoptose é avaliar a expressão de algumas enzimas relacionadas diretamente com o evento da apoptose, as chamadas caspases. As

caspases estão presentes no citoplasma da maioria das células, nas formas inativas como uma cadeia única de polipeptídeos e são ativadas quando esta cadeia é quebrada, o que leva a apoptose (ROBERT & FRIEDLANDER, 2003).

Mais de dez tipos de caspases já foram descritos nos mamíferos, sendo a caspase-3 a mais estudada. Esta enzima está relacionada com a apoptose em muitos distúrbios hematopoiéticos na espécie humana, inclusive nas leucemias e nos linfomas. A expressão da caspase-3 nos vários tipos de linfomas não-Hodgkin já foi relatada e outros estudos sugerem que tanto o nível da sua expressão, como a sua forma de marcação intracitoplasmática, tem relação com a progressão tumoral. Os linfomas de grau alto de malignidade apresentam uma expressão citoplasmática maior de caspase-3 que as neoplasias de grau baixo (DONOGHUE et al., 1999 e DUKERS et al., 2002).

Além da expressão de caspase-3 pelas células neoplásicas, a localização da marcação tem sido relacionada com o prognóstico. A localização da imunomarcação é tão importante quanto a imunopositividade. Na espécie humana, linfomas de grau alto que possuem positividade para caspase-3 respondem melhor aos tratamentos. Entre as neoplasias positivas para esta enzima, aquelas com intensa marcação puntiforme citoplasmática tendem a apresentar um prognóstico melhor do que as que apresentam marcação difusa (DONOGHUE et al., 1999). Não existem dados na literatura consultada sobre a determinação imunistoquímica da expressão de caspase-3 nas neoplasias caninas.

Outro marcador imunistoquímico relacionado com apoptose é a marcação da proteína p53 mutante nas células neoplásicas (ALVES et al., 1999). O gene p53 é um gene supressor tumoral, que está localizado no cromossoma 17 e a proteína codificada por ele atua no crescimento celular, reparo e síntese de DNA, diferenciação celular e apoptose. Quando detectados erros durante a transcrição, a p53 sofre fosforilação e estimula genes que expressam proteínas inibidoras do ciclo celular. A célula então é bloqueada na fase G1. Ao parar o ciclo celular a proteína do p53 permite que mecanismos de reparação atuem sobre o DNA celular, corrigindo-os. Se

esses mecanismos falharem, o p53 ainda pode acionar eventos apoptóticos levando a destruição celular. A inativação funcional do p53 é uma das alterações mais comuns em diversas neoplasias. As mutações levam à alterações das proteínas codificadas, que passam a ter a meia-vida maior, se acumulam nas células neoplásicas e podem ser detectadas pela técnica da imunohistoquímica (SCHIMTH, 1999).

As mutações neste gene são as lesões gênicas mais freqüentes nas neoplasias da espécie humana. A expressão do p53 mutante pode ser, além de um importante fator prognóstico nos casos de linfomas não-Hodgkin humanos, um modulador da resposta neoplásica à quimioterapia ou radioterapia (SOHN et al., 2003 e SOKOLOWSKA et al., 2005).

Imamura et al (1994), relataram que a expressão de p53 alterado é superior a 30% nos linfomas de grau alto de malignidade de origem B na espécie humana. Piris et al. (1994) observaram que entre acúmulo da proteína p53 ocorre nos linfomas de grau alto de malignidade e nos indivíduos que apresentam os estádios mais avançados da doença.

Aoyagi et al., (2002) relataram que em seres humanos existe relação do acúmulo de p53 mutante no núcleo das células neoplásicas com a resistência tumoral ao tratamento quimioterápico ou radioterápico. Os mesmos autores verificaram que todos os linfomas não-Hodgkin de grau alto apresentaram expressão de p53.

Na medicina veterinária o papel desempenhado pelo p53 nas diferentes neoplasias ainda é controverso, sendo escassos os estudos que apresentam este tipo de abordagem.

Setoguchi et al. (2001) por meio da técnica de PCR, avaliaram mutações no gene p53 em vários tumores caninos, inclusive nos linfomas e verificaram que, assim como no homem, existe relação entre as alterações mutagênicas desta proteína e o aparecimento das neoplasias.

Outros autores estudando a detecção do p53 nos mastocitomas caninos determinaram que a quantificação desta proteína não esta relacionada com a graduação histológica, com o estadiamento clínico ou com a resposta tumoral à quimioterapia (JAFFE et al., 2000; GINN et al.,

2000). Wolf et al., (1997), também afirmaram que a quantificação do p53 por meio da imunistoquímica não pode ser relacionada com prognóstico nos tumores colorretais nos cães e que tanto os tumores malignos como os benignos apresentam intensa expressão de p53.

No trabalho realizado em cães por GAMBLIN et al., (1997), 40% dos linfomas foram positivos para p53. Segundo estes autores este fato pode sugerir resistência ao tratamento, muito semelhante à verificada na espécie humana.

De acordo com SUEIRO et al., (2004), 60% dos casos de linfomas estudados em cães foram positivo para a expressão de p53, porém não houve correlação deste achado com os imunofenótipos e os graus de malignidade das neoplasias. Deve-se ressaltar, no entanto, que a expressão da proteína p53 mutante, no núcleo das células neoplásicas, está relacionada com o decréscimo no tempo de sobrevivência do paciente (GREENLE et al., 1990; TESKE, et al., 1994b; SUEIRO et al., 2004).

O estudo do índice apoptótico nos tumores tem sido muito importante na determinação da agressividade tumoral e da resistência ao tratamento (AOYAGI et al., 2002). Os quimioterápicos mais recentes, utilizados no tratamento de vários tipos de tumores, têm como base induzir a apoptose das células neoplásicas, portanto se existe uma neoplasia com alta expressão de bcl-2, (gene responsável pelo controle, ou inibição da apoptose) ou presença de gene p53 alterado, é esperado um pior prognóstico desta neoplasia ou resistência ao tratamento. Linfomas não-Hodgkin humanos de grau alto quando apresentam positividade para o anticorpo anti-bcl-2 e para o anti- p53, têm um comportamento biológico mais agressivo e pior prognóstico que aqueles que só expressam positividade para o anticorpo anti-p53 (SONH et al., 2003).

De acordo com o que foi aqui apresentado observa-se que o estudo dos linfomas caninos além de abordar a classificação citológica e imunofenotípica das neoplasias necessita ser ampliado para que se tenha a avaliação da cinética celular. A verificação desta dinâmica só pode ser feita com segurança quando são avaliados não só os parâmetros que indicam a

taxa de proliferação celular, mas também aqueles relacionados à apoptose. Os dados presentes na literatura referentes a estes fenômenos nas neoplasias dos cães ainda são conflitantes, porém isto não diminui a sua importância. No homem, muitas vezes a determinação da taxa de proliferação e os marcadores de apoptose têm influência preponderante no prognóstico e no tratamento dos linfomas não-Hodgkin. O mesmo tipo de fenômeno pode ocorrer nos linfomas caninos. Da mesma forma, a expressão de p53 já teve sua importância destacada em diversas neoplasias que acometem os seres humanos. Nos cães, os estudos que envolvem a influência da p53 no processo neoplásico ainda mostram resultados incipientes e, às vezes, discrepantes. No que diz respeito aos linfomas caninos, poucos trabalhos de pesquisa abordaram a expressão desta proteína, que nos linfomas humanos tem sido utilizada como fator de prognóstico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência do material

Foram utilizados casos de linfoma de animais necropsiados no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu – SP. Este material incluiu tanto casos que constam no arquivo do serviço, quanto casos diagnosticados durante o período de 2004 a 2006. Todo material foi proveniente dos diferentes serviços do Hospital Veterinário da FMVZ, assim como de clínicas particulares da região.

Durante o exame clínico dos animais, além de coletados dados sobre raça, sexo e idade foram estabelecidos a classificação anatômica e o estadiamento clínico dos linfomas.

A classificação anatômica foi determinada segundo JACOBS et al. (2002) e o estadiamento clínico foi realizado de acordo com o modelo proposto pela Organização Mundial de Saúde para linfomas caninos (OWEN, 1980; GRAY et al., 1984) (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2: Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos segundo JACOBS et al. (2002).

FORMA	LOCALIZAÇÃO
Multicêntrica	Linfonodos periféricos e profundos podendo envolver órgãos como fígado, baço, rins, pulmão, coração, trato gastrintestinal e medula óssea.
Digestiva	Trato gastrintestinal e linfonodos regionais. Podendo envolver órgãos abdominais como fígado, baço e rins.
Tímica	Envolve o timo e linfonodos regionais.
Cutânea	Envolve a pele sob a forma de massas solitárias ou múltiplas, estas acompanhadas ou não de envolvimento sistêmico.
Solitária	Envolve apenas um órgão

TABELA 3: Estadiamento Clínico dos Linfomas Caninos proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY et al, 1984).

ESTADIO	CRITÉRIO
I	Envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide de um único órgão (exceto medula óssea)
II	Envolvimento de vários linfonodos regionais com ou sem envolvimento das tonsilas
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos
IV	Envolvimento do fígado e/ou baço, com ou sem envolvimento generalizado dos linfonodos.
V	Envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos.

Obs: Os estádios são ainda subdivididos em A (sem sinais sistêmicos) ou B (com sinais sistêmicos), segundo GREENLEE *et al.* (1990). Os sinais sistêmicos são inespecíficos, podendo ocorrer febre, letargia, anorexia, vômitos e diarreia.

Depois de obtida a relação dos casos, as lâminas correspondentes foram selecionadas a partir do arquivo de lâminas histológicas do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, e novamente analisadas para a confirmação do diagnóstico de linfoma. Posteriormente, foram selecionados os blocos correspondentes aos 40 casos do arquivo do Laboratório de Histopatologia da FMVZ.

3.2 Processamento do material

O material, já incluído em parafina foi novamente cortado em micrótomo, obtendo-se cortes entre três a cinco micrômetros (μm). O material proveniente da rotina de diagnóstico do Serviço de Patologia, durante o desenvolvimento do projeto, foi submetido aos procedimentos de rotina para inclusão em parafina. Os cortes corados pelo método de Hematoxilina-eosina foram utilizados para a classificação cito-histológica dos linfomas. Cortes do mesmo material foram submetidos à técnica de imunistoquímica e a coloração dos AgNORs.

3.3 Aplicação das Classificações dos Linfomas Não-Hodgkin Humanos nos Linfomas Caninos

Para cada caso, utilizou-se a classificação histopatológica de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e Working Formulation (ERSBOL et al., 1985) propostas para os linfomas não-Hodgkin humanos.

3.4 Avaliação histoquímica

3.4.1 Argyrophil Nucleolar Organizer Regions - AgNORs

Técnica de coloração pela prata - AgNORs

A técnica utilizada foi descrita por PLOTON et al., (1986) e segue o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP. Para a padronização desta técnica foram utilizados fragmentos de massas neoplásicas, colhidos durante exame necroscópico, com diagnóstico de linfoma.

Após processamento histológico e inclusão em parafina, foram obtidos cortes com espessura de três micrômetros de espessura em micrótomo rotativo. Os cortes depositados sobre as lâminas histológicas permaneceram em estufa a 60°C por 12 horas e em seguida submetidos ao processo de desparafinização e hidratação. Este processo constou de dois banhos em solução de xilol à temperatura ambiente por 10 minutos, seguidas de passagens seqüenciais, de um minuto cada, em três soluções de álcool a 95%. O material foi mergulhado em água corrente por cinco minutos e submetido a um banho de água destilada.

Após este processo o material foi lavado em uma solução de Triton X 0,5 % (diluído em água deionizada) a fim de remover proteínas citoplasmáticas, que poderiam prejudicar a análise e contagem dos NOR aumentando o fundo (background), (VIDAL, et al., 1994).

A técnica de coloração dos NORs consiste da mistura de 2 partes de uma solução aquosa de prata a 50 % com uma parte de solução aquosa de gelatina a 2 % em água deionizada com ácido fórmico a 1 %. Para a

diminuição dos precipitados inespecíficos de prata sobre o material, adotou-se a coloração com lâminas invertidas. Um mililitro da mistura das soluções foi depositado sobre uma bandeja de coloração de polipropileno e as lâminas, com a face do material voltada para baixo eram depositadas sobre o corante e mantidas na estufa à 57 °C durante 20 minutos. O material recebeu dois banhos de água deionizada a fim de cessar a reação e retirar o excesso da solução de prata. Após a passagem nessas soluções, as lâminas foram novamente postas em berço de coloração e submetidas ao processo de desidratação e montagem. Foram feitas passagens seqüenciais em soluções de álcool a 95% e absoluto de um minuto cada, e logo em seguida três banhos de xilol, de cinco minutos cada, sucedidos por montagem com resina sintética.

Avaliação Quantitativa de AgNORs

A avaliação quantitativa de AgNORs foi realizada por meio da contagem direta dos pontos de AgNORs presentes nos núcleos de 100 células em cada caso analisado, utilizando o analisador de imagens semi-automático modelo ZEISS com programa de morfometria *Pro-Image* 1.0. As lâminas foram observadas em microscópio óptico na objetiva de imersão.

3.5 Técnicas Imunoistoquímicas

3.5.1 Imunofenotipagem dos Linfomas Caninos:

A imunofenotipagem dos linfomas foi realizada utilizando-se técnica imunoistoquímica da avidina-biotina-peroxidase (HSU, 1981) de acordo com protocolo estabelecido pelo laboratório do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP Campus de Botucatu – SP, que inclui os seguintes procedimentos:

Para recuperação antigênica, as lâminas foram tratadas com solução de EDTA 10 µM, pH 8,0 previamente aquecido a 95° em cozimento à vapor (“Steammer”) por 25 minutos. Após resfriamento até a temperatura ambiente as

lâminas foram colocadas em solução de partes iguais de H₂O₂ (20 volumes) em água destilada para bloqueio da peroxidase endógena, por meia hora.

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida, por 18 horas a 4°C, lavadas em solução tampão de TRIS (D5637 – Sigma Chemical CO) e incubadas com anticorpo biotilado e solução de avidina-biotina-peroxidase do kit ABC (Dako K0492), por 30 minutos, em câmara úmida, a temperatura ambiente.

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (1mg/ml) em TRIS e 600 µl de água oxigenada (H₂O₂) 20 volumes. Os esfregaços foram contra-corados com Hematoxilina de Harris.

Foram empregados como marcadores linfóides os seguintes anticorpos primários:

- ✓ Anti-CD3 (Dako): Anticorpo policlonal humano que reconhece uma molécula (antígeno C3) ligada ao receptor das células T.
- ✓ Anti-CD79a (Dako): Anticorpo monoclonal humano que reconhece um polipeptídeo que faz parte do complexo receptor de antígeno dos linfócitos B.

3.5.2 Avaliação Imunoistoquímica dos índices de proliferação celular, de apoptose e a expressão do p-53

Padronização da técnica de Imunoistoquímica

A padronização da técnica de imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu e no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, UNESP, Campus de Botucatu.

Para a padronização desta técnica foram utilizados fragmentos de linfonodos normais, reativos e linfomas caninos, fixados em solução de formol tamponado, provenientes do Serviço de Patologia Veterinária.

Também foram utilizadas amostras de neoplasias epiteliais humanas obtidas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Anticorpos utilizados para a padronização do método

✓ Ki-67 (MIB-1): o antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas ausentes nas células em repouso (Go).

✓ p-53 (CM-1): a mutação na proteína p53 é a alteração genética mais freqüente nos casos de malignidade. A mutação resulta em maior expressão da proteína no núcleo celular e esse aumento pode ser detectado por meio da imunistoquímica.

✓ Caspase-3: é uma das proteínas envolvidas no início da apoptose, responsável pelos eventos proteolíticos. A ativação da caspase-3 indica que a célula entrou em apoptose.

Diluição dos anticorpos utilizados

Cada anticorpo foi diluído em solução a 0,1% de albumina sérica bovina em solução tampão de TRIS (TRIZMA base, D5637 Sigma). As diluições estabelecidas estão representadas na tabela 4:

TABELA 4: Diluições estabelecidas para os anticorpos anti-CD-3, anti-CD79a, anti-Ki-67 (MIB-1), anti-Caspase-3 e anti-p-53.

Anticorpos	Diluição estabelecida
Anti CD-3, policlonal (Dako)	1:100
Anti CD79a, monoclonal (Dako)	1:50
Anti-Ki-67 (MIB-1), monoclonal (Dako)	1:50
Anti-Caspase-3, policlonal (Cell Signiling)	1:200
Anti-p-53, policlonal (Novocastra)	1:400

Roteiro de aplicação da técnica de imunistoquímica

Preparação das lâminas

As lâminas foram inicialmente mergulhadas em álcool a 70% e depois de secas, imergidas em cola líquida a base de organossilano (A3648 – SIGMA).

Obtenção dos cortes histológicos

Cortes histológicos com três micrômetros de espessura foram feitos em micrótomo rotativo depositados em lâminas histológicas e em seguida, permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas para fixação do tecido à lâmina.

Após este procedimento, foram submetidos aos processos de desparafinização e hidratação.

Bloqueio da peroxidase endógena

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de água oxigenada a 10 volumes por 15 minutos.

Recuperação antigênica

A recuperação antigênica dos epítomos antigênicos foi realizada com solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0, em forno de microondas, na potência máxima por 15 minutos;

Após o procedimento, o material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente.

Reação com os anticorpos primários e secundários

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em câmara úmida, por 18 horas a 4°C, lavadas em solução tampão de TRIS.

Foi empregado o anticorpo secundário ligado a um polímero e moléculas de peroxidase do kit EnVision Dual-link (Dako – K4063) durante 30 minutos a temperatura ambiente de acordo com as recomendações do fabricante.

Revelação

Para visualização da reação as lâminas foram tratadas com solução de 3,3´diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 Dako) durante cinco minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, por 35 segundos.

3.6 Análise imunoistoquímica

Para os anticorpos anti-Ki-67, anti-caspase-3 e anti-p-53, a reação imunoistoquímica foi estimada conforme a marcação positiva. Foi realizada a contagem de todas as células presentes em cinco campos aleatórios em objetiva de 40x do microscópio óptico. Nestes mesmos campos aleatórios foram também contadas as células positivas para cada anticorpo.

Estes valores foram transformados em percentual de células positivas e submetidos à análise estatística.

3.7 Análise estatística

Foi realizado para os anticorpos anti-Ki-67, anti-Caspase-3 e anti-p53 e para o AgNOR, o teste t (student) a fim de verificar diferença das médias do percentual de células positivas em cada anticorpo e para o AgNOR entre os linfomas de alto e baixo grau, considerando o grau de significância $P < 0,05$. Foram analisadas também as médias dos percentuais de células positivas dos diferentes métodos entre os imunofenótipos, linfomas B ou T/B. Para esta análise utilizou-se o teste t (student), considerando o grau de significância $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados clínicos dos Animais

Dos 40 animais utilizados no presente estudo, 12 eram sem raça definida (SRD), nove animais eram da raça Pastor Alemão, cinco animais eram da raça Boxer e cinco animais eram da raça Rottweiler, Os outros nove animais pertenciam a outras raças (Tabela 5).

Em relação ao sexo, entre os 40 animais portadores de linfomas, 26 eram machos e 14 eram fêmeas (Tabela 6). A idade dos pacientes variou de dois a 13 anos, sendo que 52,5% dos animais possuíam idade entre quatro a sete anos, 32,5 % idade acima de oito anos a 15% eram animais entre 0 a três anos (Tabela 7).

O estadiamento e a classificação anatômica foram realizados em todos os animais, destes, 18 animais estavam no estágio IV, 16 apresentaram comprometimento da medula óssea, portanto se apresentavam no estágio V e seis pacientes apresentavam apenas comprometimento dos linfonodos e foram classificados como estágio III (Tabela 8).

Em relação à classificação anatômica, 35 animais apresentaram a forma multicêntrica da neoplasia com comprometimento de vários órgãos, três animais foram classificados como a forma tímica, com comprometimento do timo e linfonodos mediastínicos e outros dois casos eram da forma solitária, comprometendo outros órgãos como, rim e baço. (Tabela 9).

TABELA 5: Distribuição racial dos 40 animais portadores de linfomas caninos.

RAÇAS	Nº DE CASOS	%
SRD	12	30
Pastor Alemão	09	22,5
Boxer	05	12,5
Rottweiler	05	12,5
Outras	09	22,5
TOTAL	40	100

TABELA 6: Distribuição por sexo dos 40 animais portadores de linfomas caninos.

SEXO	Nº DE CASOS	%
Machos	26	65
Fêmeas	14	35
TOTAL	40	100

TABELA 7: Idade dos 40 animais portadores de linfomas caninos.

IDADE	Nº DE CASOS	%
0 a 3 anos	06	15
4 a 7 anos	21	52,5
Acima de 8 anos	13	32,5
TOTAL	40	100

TABELA 8: O estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY et al., 1984) nos 40 animais portadores de linfomas caninos.

ESTÁDIAMENTO CLÍNICO	Nº DE CASOS	%
Estádio III	06	15
Estádio IV	18	45
Estádio V	16	40
TOTAL	40	100

TABELA 9: Classificação anatômica dos linfomas caninos, nos 40 animais.

CLASSIFICAÇÃO ANATÔMICA	Nº DE CASOS	%
Multicêntrica	35	87,5
Tímica	03	7,5
Solitária	02	5
TOTAL	40	100

4.2 Aplicação das classificações de Kiel e Working Formulation nos linfomas caninos:

Os casos de linfoma foram classificados de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e pela classificação proposta pelo *National Cancer Institute – Working Formulation* (NCI - WF, 1982).

Quando utilizada a classificação de Kiel, foi observada a predominância dos linfomas de alto grau de malignidade, em 29 casos (Tabela 10) e de acordo com a WF, a maioria das neoplasias também foi classificada como de alto grau de malignidade, em 22 casos seguidos pelos linfomas de grau intermediário em 14 casos e quatro animais com linfomas de baixo grau (Tabela 11).

TABELA 10: Grau de malignidade 40 casos de linfomas caninos de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

KIEL	Nº DE CASOS	%
Grau Alto	29	72,5
Grau Baixo	11	27,5
TOTAL	40	100

TABELA 11: Grau de malignidade 40 casos de linfomas caninos de acordo com a classificação Working Formulation (NCI-WF, 1982).

WF	Nº DE CASOS	%
Grau Alto	22	55
Grau Intermediário	14	35
Grau Baixo	4	10
TOTAL	40	100

Os linfomas de alto e baixo grau de acordo com a classificação de Kiel foram ainda classificados em tipos de acordo com as características celulares (Tabela 12).

TABELA 12: Linfomas de baixo e alto grau de malignidade de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

KIEL	Nº DE CASOS	%
Centrocíptico	02	5
Centrocíptico-Centroblástico	02	5
Linfocítico	02	5
Linfoplasmacítico	02	5
Linfoma T pleomórfico	03	7,5
Imunoblástico	20	47,5
Centroblástico	06	15
Linfoblástico	03	7,5
TOTAL	40	100

Os casos classificados como linfomas linfocíticos se caracterizavam pela presença de células pequenas, de núcleos redondos e pequenos. A cromatina apresentava padrão denso com pequenos agregados mais grosseiros, não sendo observados nucléolos. O citoplasma era sempre escasso. Estas neoplasias também são denominadas Linfomas linfocíticos na WF, de baixo grau de malignidade.

Os Linfomas linfoplasmacíticos eram compostos por linfócitos ora com citoplasma escasso semelhantes aos Linfomas linfocíticos, ora por células pequenas com citoplasma abundante, basófilico e núcleo excêntrico. Na WF este tipo de linfoma é classificado como linfoma linfocítico, também de baixo grau de malignidade.

Nos linfomas centrocípticos o tipo celular predominante caracterizava-se pelo seu tamanho pequeno, núcleo pequeno e clivado, com aspecto irregular e cromatina densa. O citoplasma era sempre escasso. Este tipo de linfoma equivale ao Linfoma de Pequenas Células Clivadas na classificação WF, sendo considerado de grau intermediário nesta classificação.

Os linfomas centrocíptico-centroblástico eram constituídos por uma população celular bimórfica na qual estavam presentes células pequenas com núcleo irregular ou clivado e células grandes com núcleo não clivado. Este tipo de neoplasia corresponde ao Linfoma Misto de Pequenas e Grandes Células na WF, sendo considerado como linfoma de grau intermediário (Figura 1).

Os linfomas de células T pleomórfico eram compostos por células pequenas, citoplasma escasso e pálido. Os núcleos eram irregulares de aspecto ora serrilhado ora liso, cromatina densa, sendo possível observar nucléolo único e pequeno. Estas células apresentavam pleomorfismo celular. Esta entidade não recebe uma denominação específica na WF, então foi agrupada com os Linfomas Difusos de Pequenas Células Clivadas devido às semelhanças citomorfológicas (TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

Os linfomas centrolblásticos se caracterizavam pela presença de células grandes, com núcleos redondos, cromatina vesicular e nucléolos múltiplos e periféricos. As figuras de mitose eram freqüentes e o citoplasma podia ser escasso ou abundante. Este tipo de linfoma equivale ao Linfoma de Grandes Células não-Clivadas na WF, sendo considerado de grau intermediário de malignidade nesta classificação (Figura 2).

Os linfomas do tipo imunoblástico eram constituídos por células de tamanho médio ou grande, cromatina vesicular e nucléolo proeminente e central. O citoplasma era variável e figuras de mitoses eram freqüentes (Figura 3).

A composição celular dos linfomas linfoblásticos se caracterizava por pequenas células, com núcleo de forma redonda ou oval. Nestas células a distribuição da cromatina era uniforme, não permitindo a observação de nucléolos. As figuras de mitose eram freqüentes. Na maioria das células o citoplasma era escasso e fracamente basofílico (Figura 4).

4.3 Imunofenotipagem

Os linfomas T e os linfomas B, neste estudo tiveram a mesma freqüência, ocorrendo em 17 casos (42,5%) cada, seguidos pelos Linfomas T/B em seis casos (15%) (Tabela 13) (Figuras 5 e 6).

De acordo com a classificação de Kiel, todos os 13 casos de linfomas T de grau alto de malignidade, foram classificados como Imunoblásticos e as neoplasias de baixo grau foram três casos de linfoma T pleomórfico.

Dentre os 17 casos de linfomas B, 11 casos são de grau alto de malignidade e 6 casos são de baixo grau de malignidade, sendo cinco centrolblásticos, quatro Imunoblásticos, dois Linfoblásticos, dois centrocíticos-

centroblásticos, dois centrocíticos, um linfocítico e um linfoplasmacítico (Tabela 14).

TABELA 13: Imunofenotipagem dos linfomas caninos.

IMUNOFENÓTIPO	Nº DE CASOS	%
Linfoma T	17	42,5
Linfoma B	17	42,5
Linfoma T/B	06	15
TOTAL	40	100

TABELA 14: Relação entre o imunofenótipo e a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

KIEL	LINFOMA T	LINFOMA B	LINFOMA T/B
Centroblástico	---	05	01
Imunoblástico	13	04	03
Linfoblástico	---	02	01
Centrocítico	---	02	---
Centrocítico-Centroblástico	---	02	---
Linfocítico	01	01	---
Linfoplasmacítico	---	01	01
Linfoma T pleomórfico	03	---	---
TOTAL	17	17	06

4.4 Índice de proliferação celular pelo método do AgNORs

Dentre os 40 casos de linfomas, em apenas 28 casos foi realizada a contagem de AgNOR, sendo 21 de alto grau de malignidade e sete casos de baixo grau de malignidade. Nos outros casos o material foi inadequado para esta técnica. No presente estudo as AgNORs apresentavam-se, na grande maioria das células, como pontos escuros dispersos pelo núcleo, correspondendo ao tipo II de padrão de distribuição descrito por VALDOVICH et al., 2004 (Figura 7 e 8). Assim sendo, obtivemos uma média de número de pontos de NORs por núcleo de células neoplásicas.

Quando utilizada a classificação de Kiel, entre as neoplasias de alto grau de malignidade a média foi de $1,37 \pm 0,32$, e nos casos de baixo grau de $0,98 \pm 0,36$, resultado estatisticamente significativo ($P < 0,05$) (Tabela 15). Entre os diferentes imunofenótipos, embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), a média do número de NORs por núcleo foi maior nos linfomas T ($1,43 \pm 0,28$), seguido dos linfomas T/B ($1,24 \pm 0,39$) e linfomas B ($1,07 \pm 0,31$).

Quando a classificação utilizada foi a Working Formulation (NCI-WF, 1982), os resultados do número médio de AgNORs por núcleo de células neoplásicas foram, entre as 22 neoplasias de alto grau de malignidade de $1,43 \pm 0,34$, entre as de grau intermediário, $1,17 \pm 0,26$ e entre as de baixo grau, $0,78 \pm 0,25$, resultado sem significância estatística.

TABELA 15: Número de casos, média e desvio-padrão do número de AgNORs nas células neoplásicas, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

AgNOR	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
ALTO GRAU	21	1,37a	0,32
BAIXO GRAU	07	0,98b	0,36

Médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente, ao nível de 5%, pelo teste t (Student)

4.5 Índice de Proliferação Celular pelo método do Ki-67 (MIB-1)

De acordo com a classificação de Kiel, nas neoplasias de alto grau de malignidade a média de células em proliferação marcadas pelo Ki-67 foi de $43,19\% \pm 19,01$, e nos casos de baixo grau de $14,09\% \pm 11,74$, resultado estatisticamente significativo ($P < 0,01$) (Tabela 16). Ainda de acordo com a classificação de Kiel, (LENNERT & FELLER, 1990), comparando os diferentes imunofenótipos, a média do número de células positivas para o marcador Ki-67 foi maior nos linfomas B ($38,45\% \pm 26,68$), seguido dos linfomas T ($35,45\% \pm 18,83$) e linfomas T/B ($25,23\% \pm 9,00$) (Figuras 9 e 10).

Quando analisados os linfomas de alto grau de malignidade entre os diferentes imunofenótipos e os de baixo grau entre os diferentes imunofenótipos houve diferença estatisticamente significativa somente entre os

linfomas B e linfomas T/B de alto grau de malignidade, sendo que a média deste último grupo foi maior que das neoplasias com imunofenótipo B ($P < 0,05$).

O percentual de células positivas para o Ki-67 entre os linfomas de baixo grau variou entre 1,67 a 34,5%, sendo que o tipo de linfoma com o percentual mais alto (34,5%) foi um centrocítico e mais baixo (1,67%), um linfocítico. Analisando as neoplasias de alto grau de malignidade, essa variação foi de 24,4 a 80,53%, sendo o mais alto (80,53%) classificado como linfoblástico e o com menor percentagem (24,4%), um caso de linfoma imunoblástico.

Quando utilizada a classificação de Working Formulation (NCI-WF, 1982), entre as 22 neoplasias de alto grau de malignidade a média de células em proliferação marcadas pelo Ki-67 foi de $41,50\% \pm 19,91$ seguidos pelos de grau intermediário, $31,80\% \pm 28,60$ e os casos de baixo grau de $14,87\% \pm 9,79$, o que também foi significativamente diferente ($P < 0,05$).

TABELA 16: Número, média e desvio-padrão do índice de proliferação celular utilizando anticorpo anti-Ki-67 (MIB 1), de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

Ki-67	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
ALTO GRAU	29	43,19a	19,01
BAIXO GRAU	11	14,09b	11,74

Médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente, ao nível de 1%, pelo teste t (Student)

4.6 Índice de apoptose pelo método da Caspase-3

Quando utilizada a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), obtivemos entre as neoplasias de alto grau de malignidade a média de $6,82 \pm 6,47$, e nos casos de baixo grau de $6,67\% \pm 5,06$ (Tabela 17). Entre os diferentes imunofenótipos, a média da caspase-3 foi maior nos linfomas T ($6,29\% \pm 7,21$), seguido dos linfomas B ($7,87\% \pm 5,15$) e linfomas T/B ($5,93\% \pm 5,26$) (Tabela 18), nas duas análises o resultado não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$).

Quando empregada a classificação da Working Formulation (NCI-WF, 1982), os resultados da média pelo método da caspase-3 foram os seguintes: entre as 23 neoplasias de alto grau de malignidade a média foi de 6,70% \pm 6,13 entre as de grau intermediário, 6,54% \pm 5,97 e os entre linfomas de baixo grau de 7,26% \pm 1,73, o que também não apresentou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Todas as amostras apresentaram marcação citoplasmática difusa, não sendo observada marcação citoplasmática puntiforme (Figura 11 e 12).

TABELA 17: Número, média e desvio-padrão do índice de apoptose utilizando anticorpo anti-caspase-3, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

CASPASE - 3	N	MÉDIA	DESvio PADRÃO
ALTO GRAU	19	6,82a	6,47
BAIXO GRAU	11	6,67a	5,06

Médias com letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente, ao nível de 5%, pelo teste t (Student)

TABELA 18: Número, média e desvio-padrão do índice de apoptose utilizando anticorpo anti-caspase-3 nos linfomas de alto e baixo grau de malignidade, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

ALTO GRAU	N	MÉDIA	DESvio PADRÃO
LINFOMAS T	13	6,40a	7,45
LINFOMAS B	11	7,84a	5,66
LINFOMAS T/B	05	5,69a	6,40
BAIXO GRAU			
LINFOMAS T	04	8,88a	6,98
LINFOMAS B	06	5,11a	3,90

Médias com letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente, ao nível de 5%, pelo teste t (Student)

4.7 Expressão de p53

Analisando os 40 casos de linfomas, 29 casos apresentaram expressão da proteína p-53 mutante (Figuras 13 e 14), de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) os linfomas de imunofenótipo T e B apresentaram 12 casos positivos e cinco negativos, o que corresponde a 70,59% e 29,41% respectivamente. Entre os seis linfomas com imunofenótipo T/B, apenas um (16,67%) não apresentou expressão da proteína p 53 mutante.

Entre as neoplasias de alto grau de malignidade, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) a média de células positivas foi de $2,38\% \pm 2,73$, e nos casos de baixo grau de $2,27\% \pm 3,31$, resultado não significativo estatisticamente ($P > 0,05$) (Tabela 19). Entre os diferentes imunofenótipos, a média do número de células que expressaram a proteína p53 mutante foi maior nos linfomas T/B ($4,10\% \pm 3,97$), seguido dos linfomas T ($2,12\% \pm 3,12$) e linfomas B ($1,97\% \pm 1,82$), porém estas médias também não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

Dos 29 casos de linfomas de alto grau de malignidade, 22 apresentaram reatividade para este anticorpo e em sete casos a reação imunoistoquímica foi negativa. Nos 11 linfomas de baixo grau sete foram positivos e quatro negativos para a expressão de p 53.

Quando foi usada a classificação de Working Formulation (NCI-WF, 1982), obtivemos uma média do percentual de células que expressa a proteína p-53 entre as 22 neoplasias de alto grau de malignidade foi de $2,10\% \pm 2,86$, entre as de grau intermediário foi de $2,82\% \pm 3,19$ e as de baixo grau de $1,71\% \pm 1,91$, resultados estatisticamente não significativos ($P > 0,05$).

TABELA 19: Número de casos positivos, média e desvio-padrão da expressão de p-53, de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

p- 53	N	CASOS NEGATIVOS	CASOS POSITIVOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
ALTO GRAU	29	07	22	2,38a	2,73
BAIXO GRAU	11	04	07	2,27a	3,31

Médias com letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente, ao nível de 5%, pelo teste t (Student).

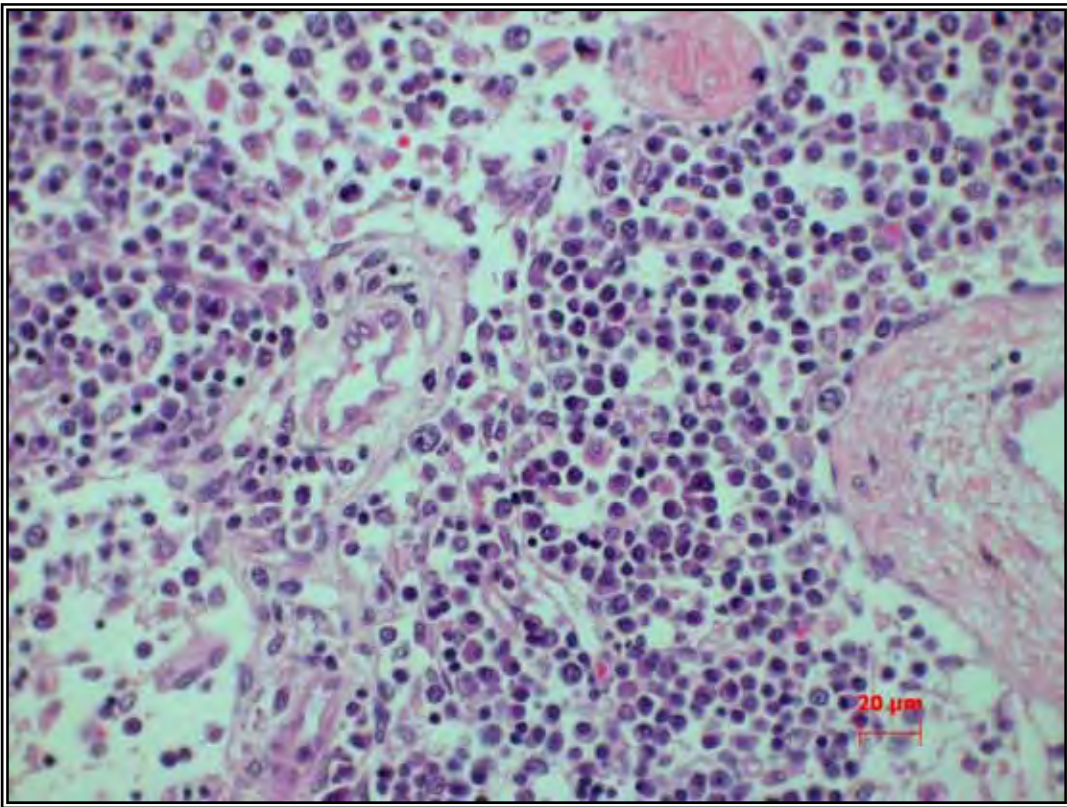


Figura 1: Linfoma Centrocítico-centroblástico (Kiel), a população de células neoplásicas apresenta-se às vezes pequenas com núcleo clivado e outras grandes com núcleolos múltiplos. HE.

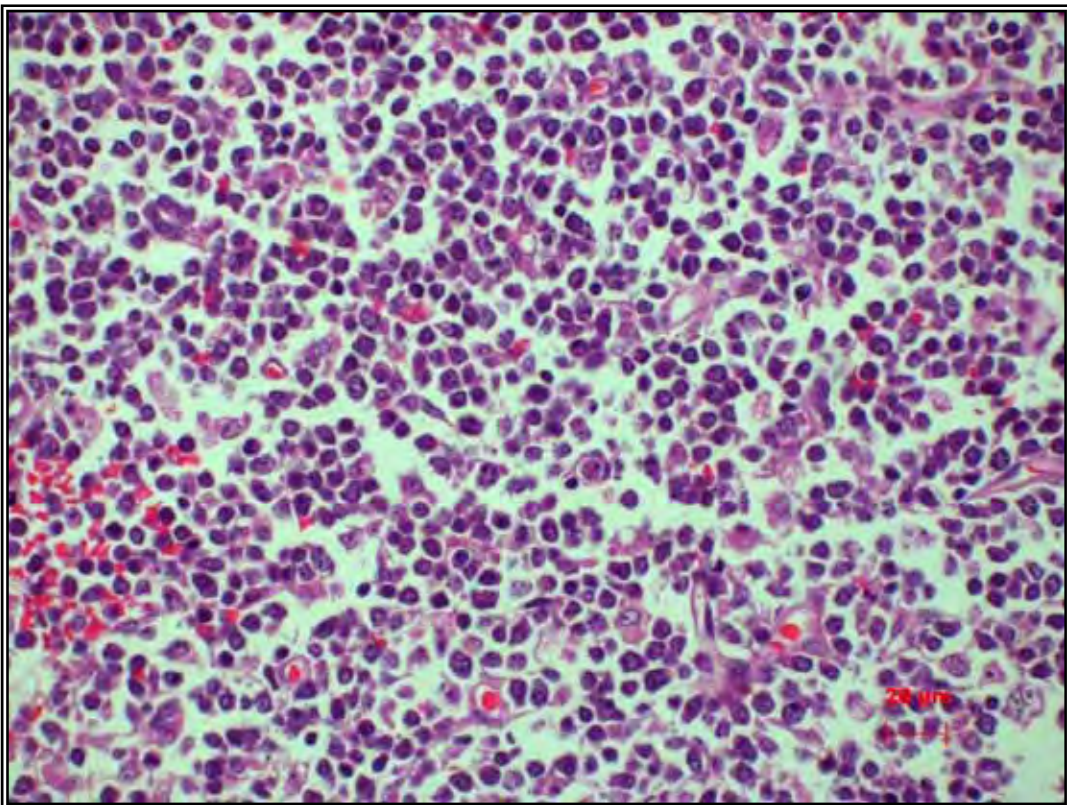


Figura 2: Linfoma Centroblástico (Kiel). As células neoplásicas apresentam nucléolos múltiplos e periféricos. HE.

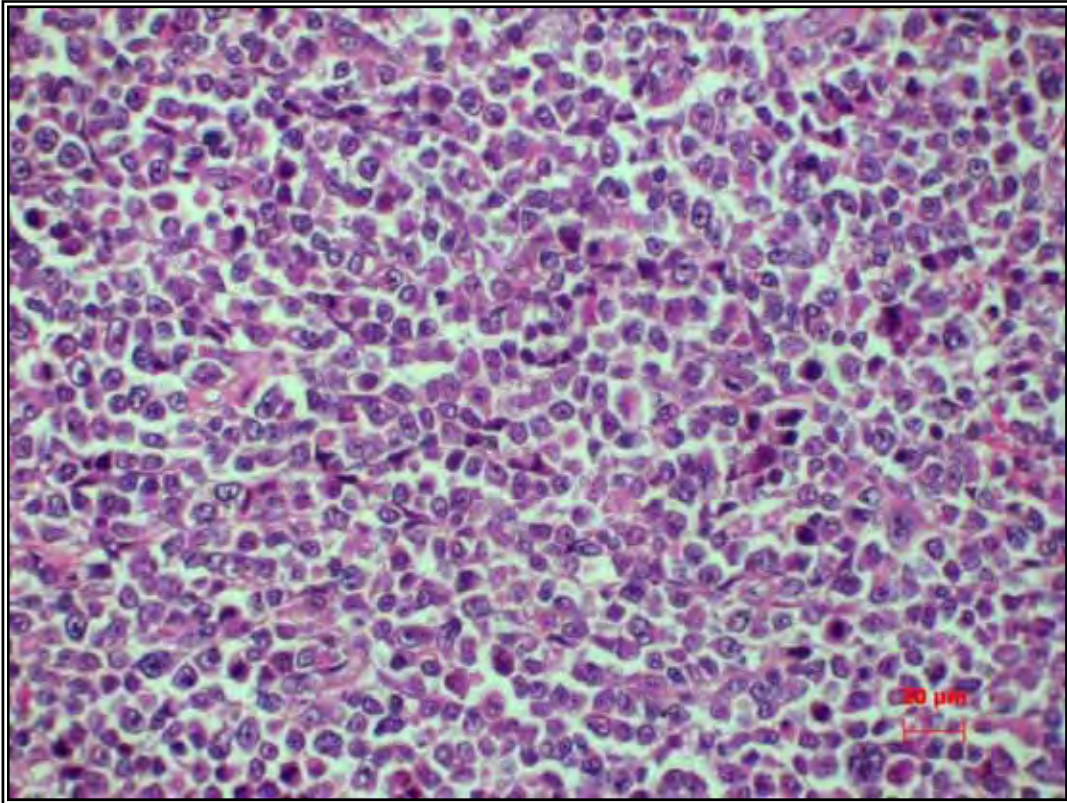


Figura 3: Linfoma Imunoblástico (Kiel). As células apresentam núcleo redondo com um único nucléolo central. HE

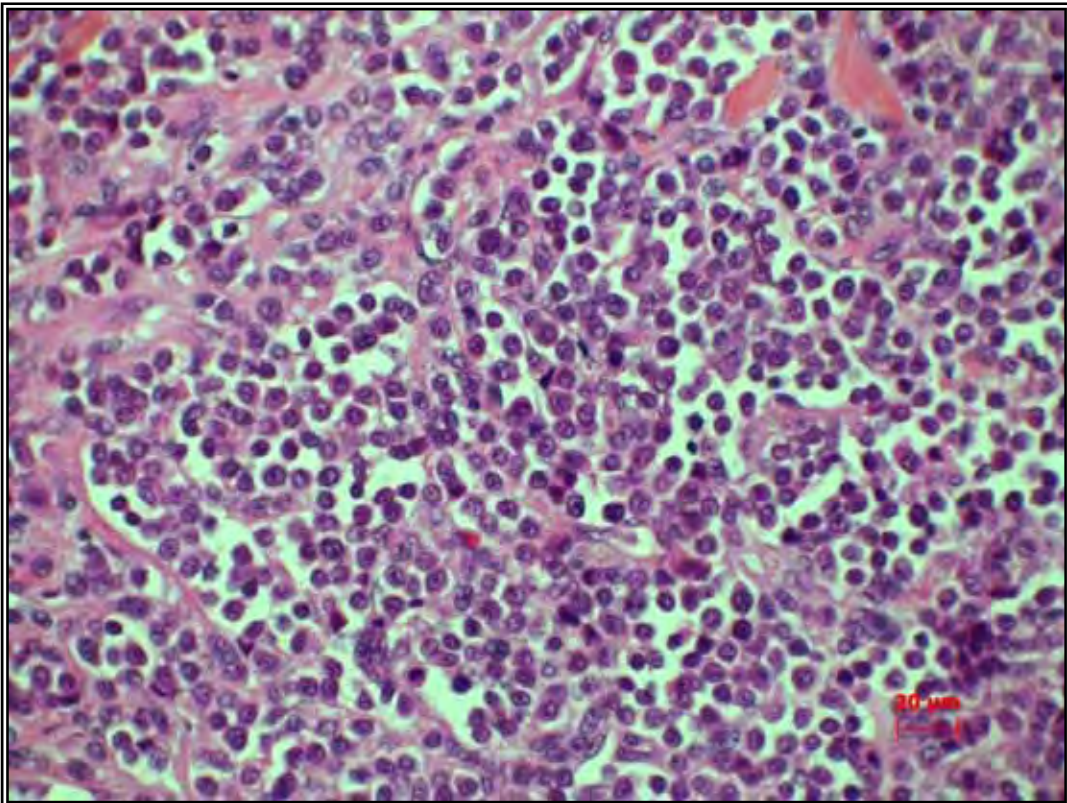


Figura 4: Linfoma Linfoblástico (Kiel). Presença de células médias, núcleo redondo e sem nucléolos evidentes. HE.

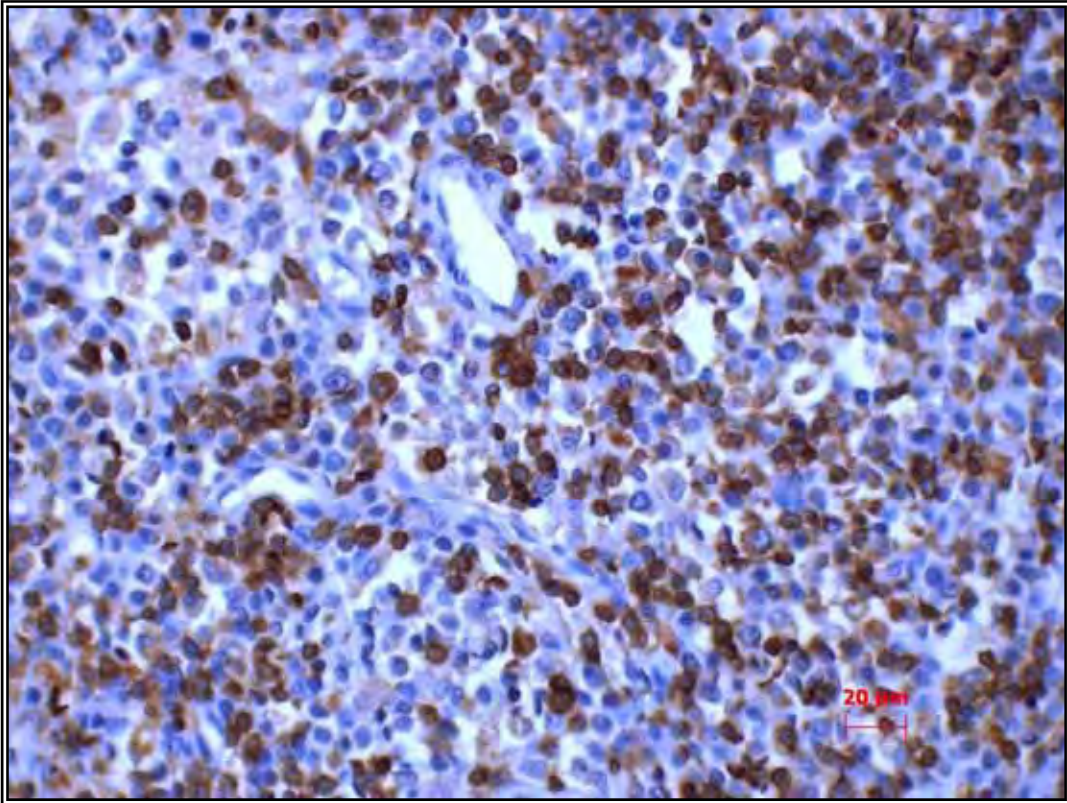


Figura 5: Linfoma T. Positividade para o anticorpo primário anti-CD3, ABC, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.

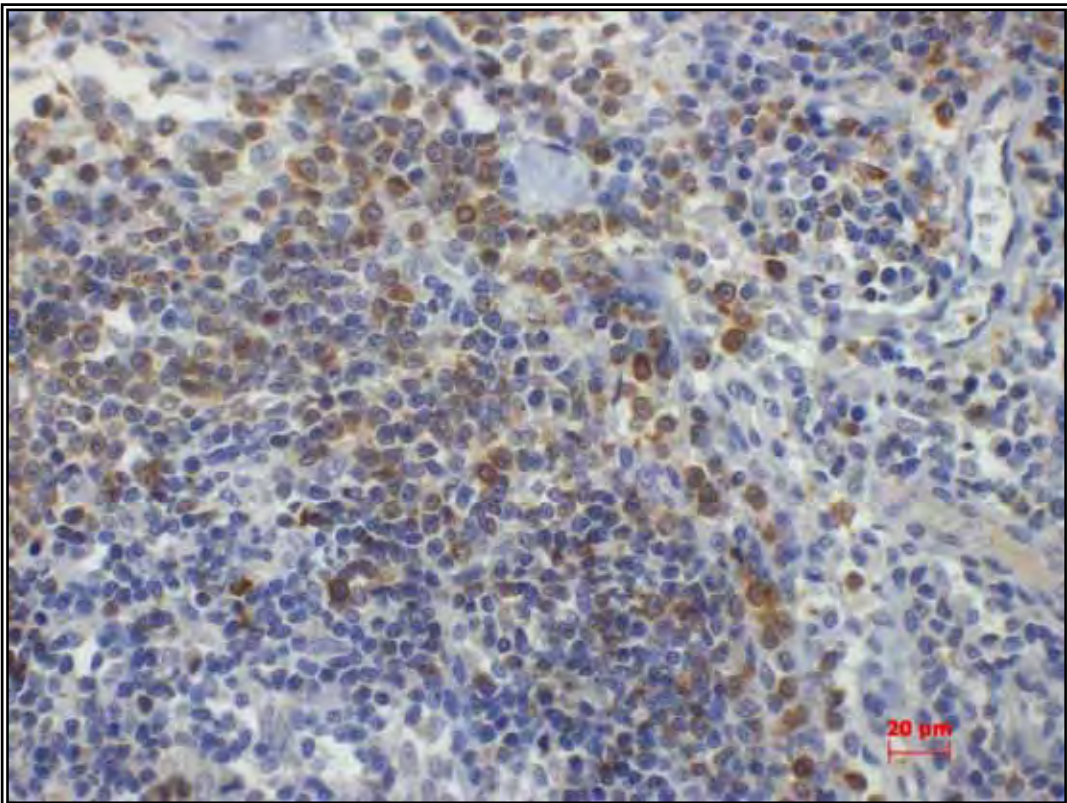


Figura 6: Linfoma B. Positividade para o anticorpo primário anti-CD79a, ABC, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.

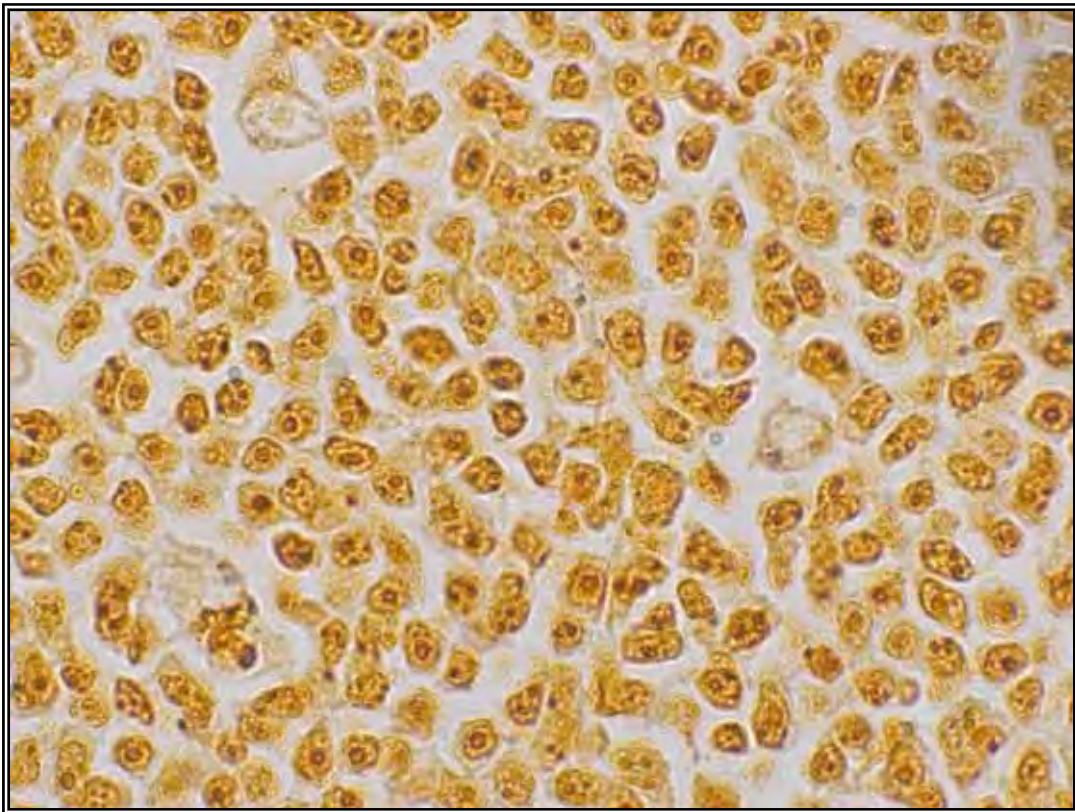


Figura 7: Linfoma Imunoblástico – múltiplos AgNORs distribuídos pelo núcleo das células neoplásicas e algumas células apresentando um único ponto nuclear (1000x).

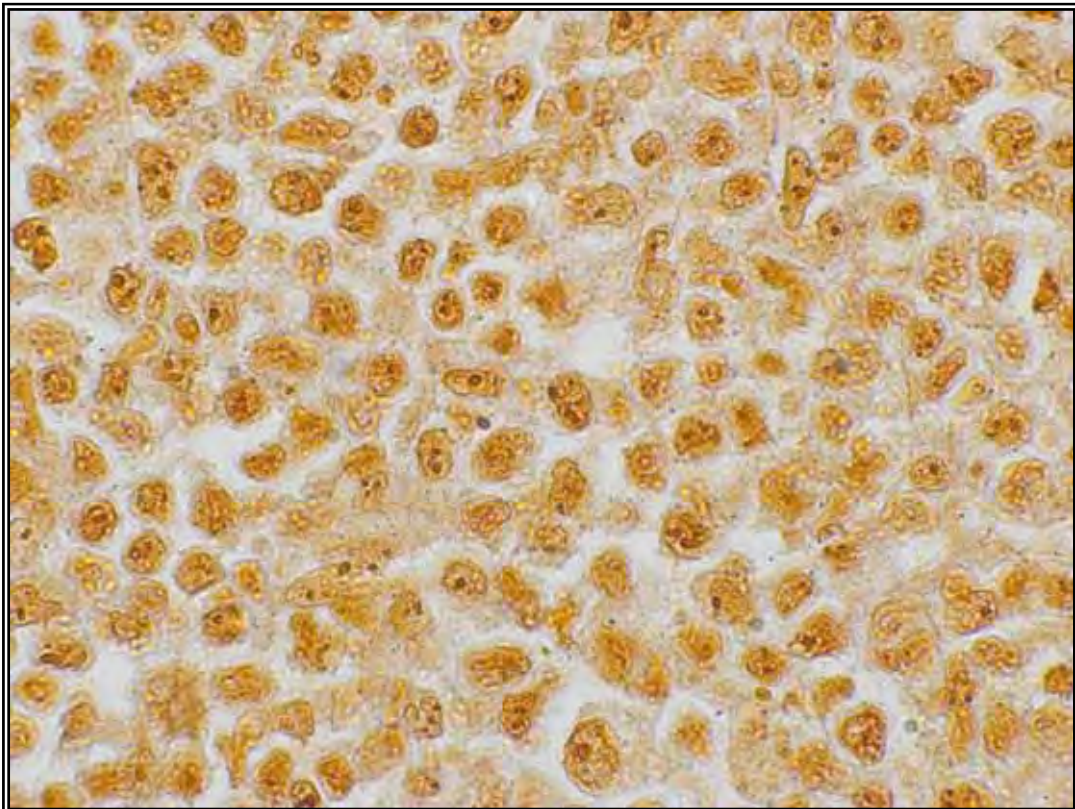


Figura 8: Linfoma Imunoblástico – múltiplos AgNORs distribuídos pelo núcleo das células neoplásicas e algumas células apresentando um único ponto nuclear (1000x).

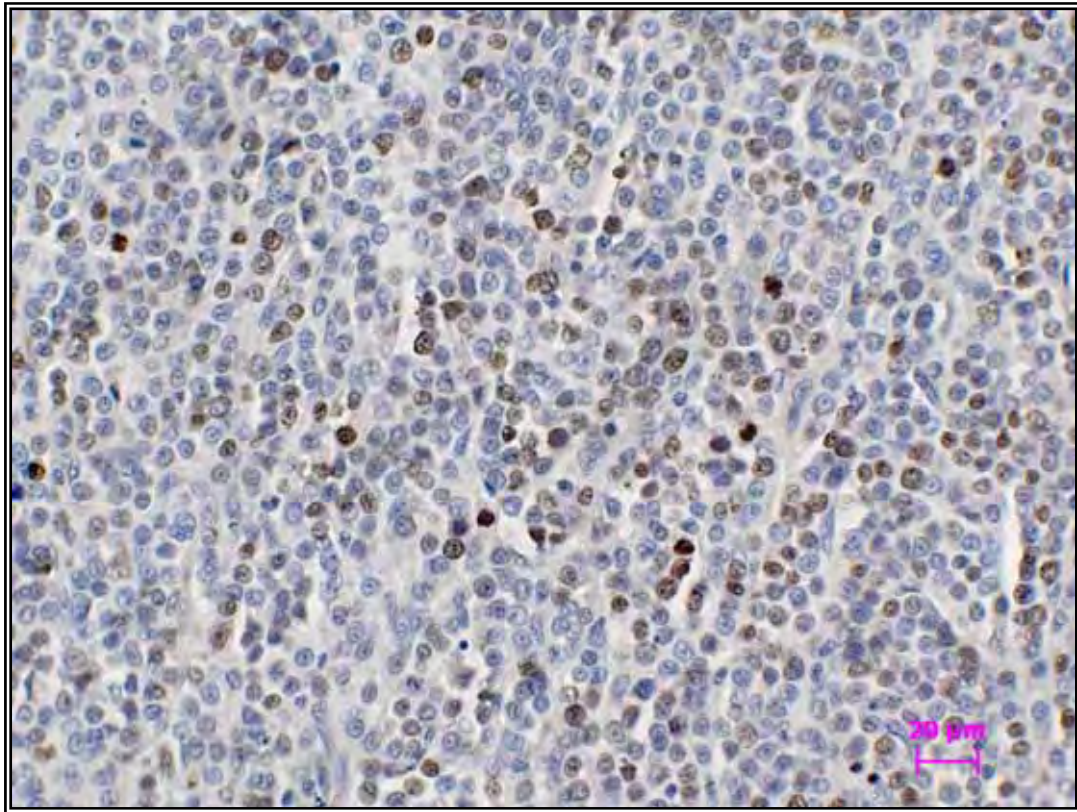


Figura 9: Linfoma Imunoblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti-Ki-67 (MIB 1), EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris..

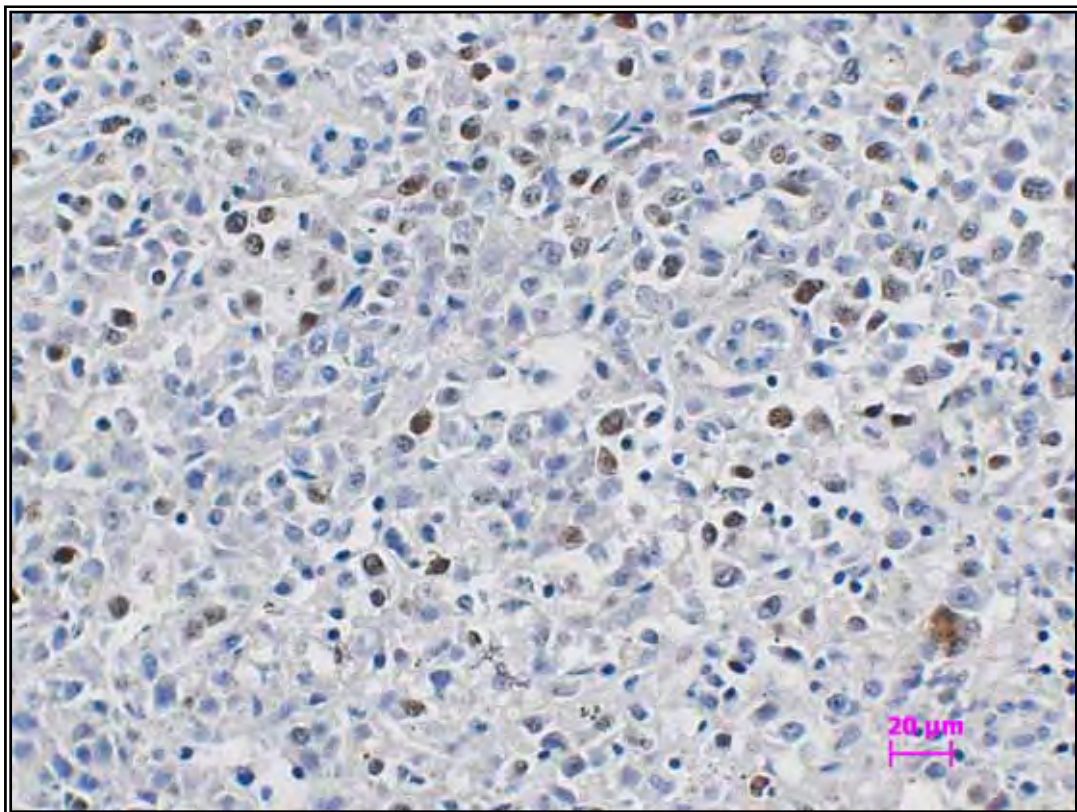


Figura 10: Linfoma T pleomórfico (Kiel) – positividade para anticorpo anti-Ki -67 (MIB 1), EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.

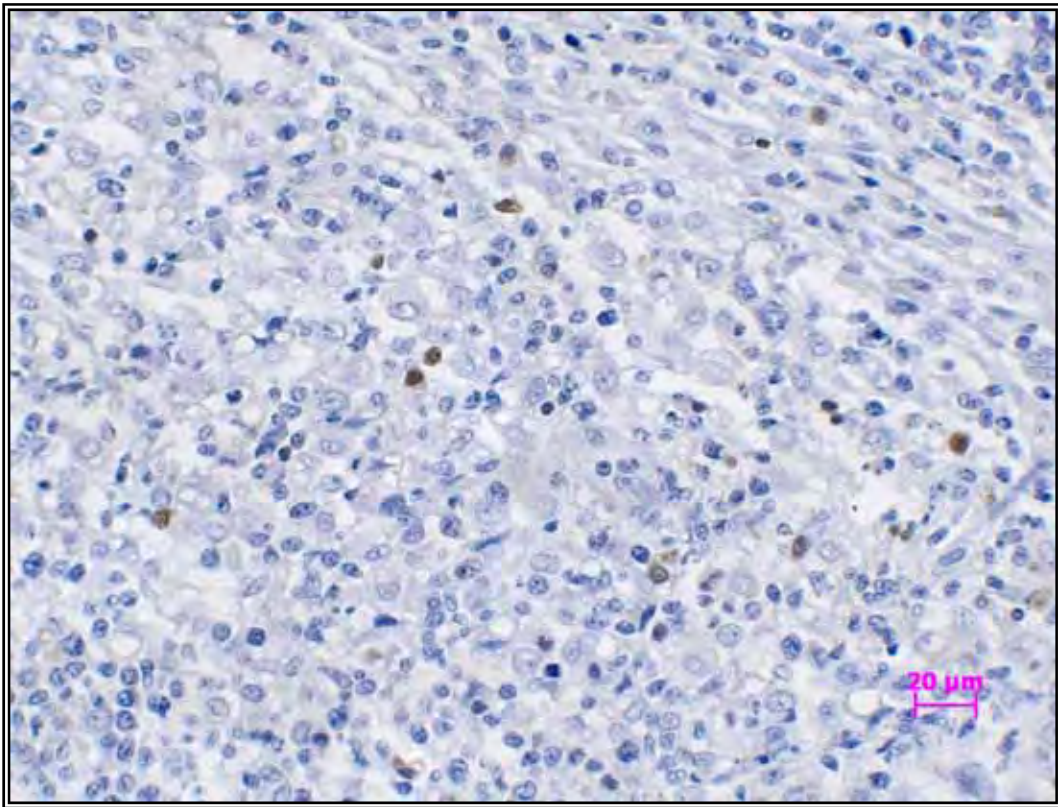


Figura 11: Linfoma Imunoblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti-caspase-3, EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.

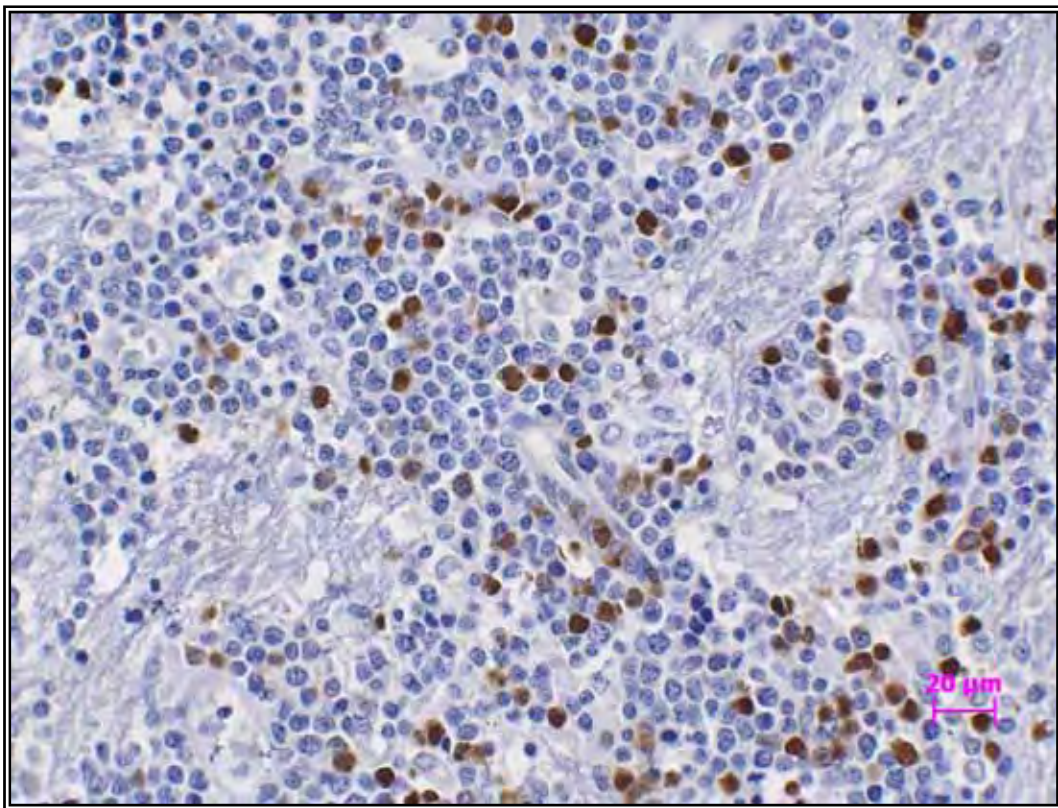


Figura 12: Linfoma Centroblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti-caspase-3, EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.

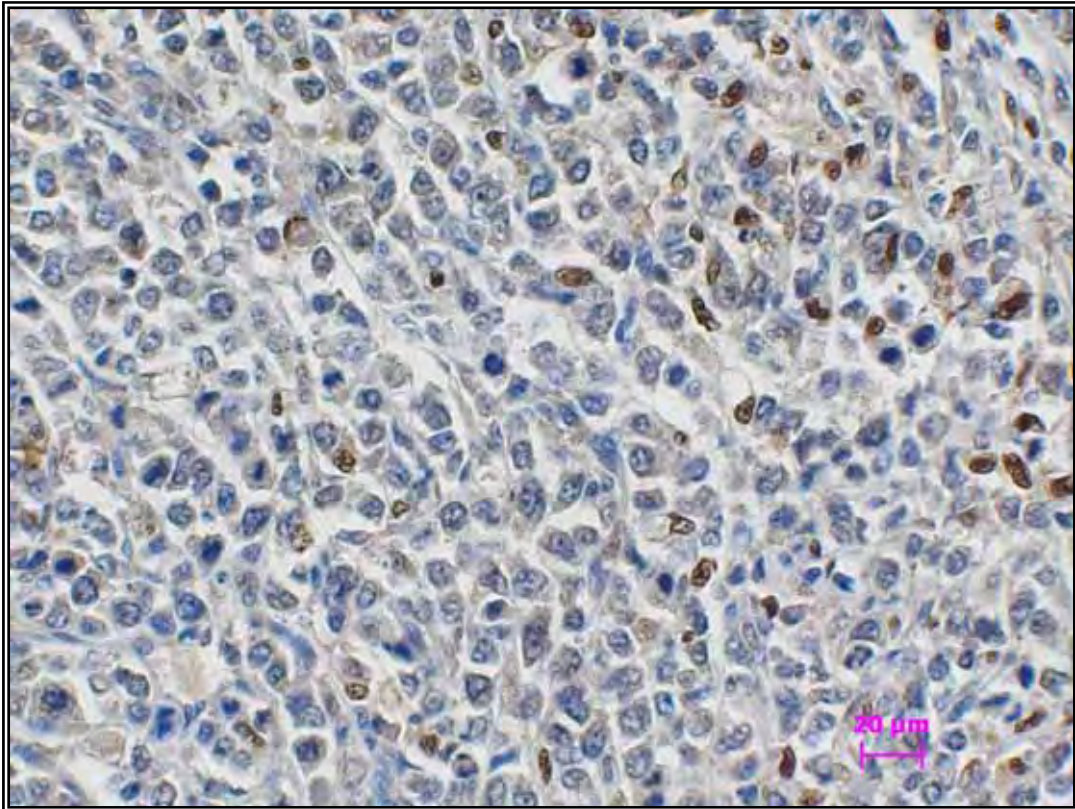


Figura 13: Linfoma Imunoblástico (Kiel) – positividade para anticorpo anti- p53, EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.

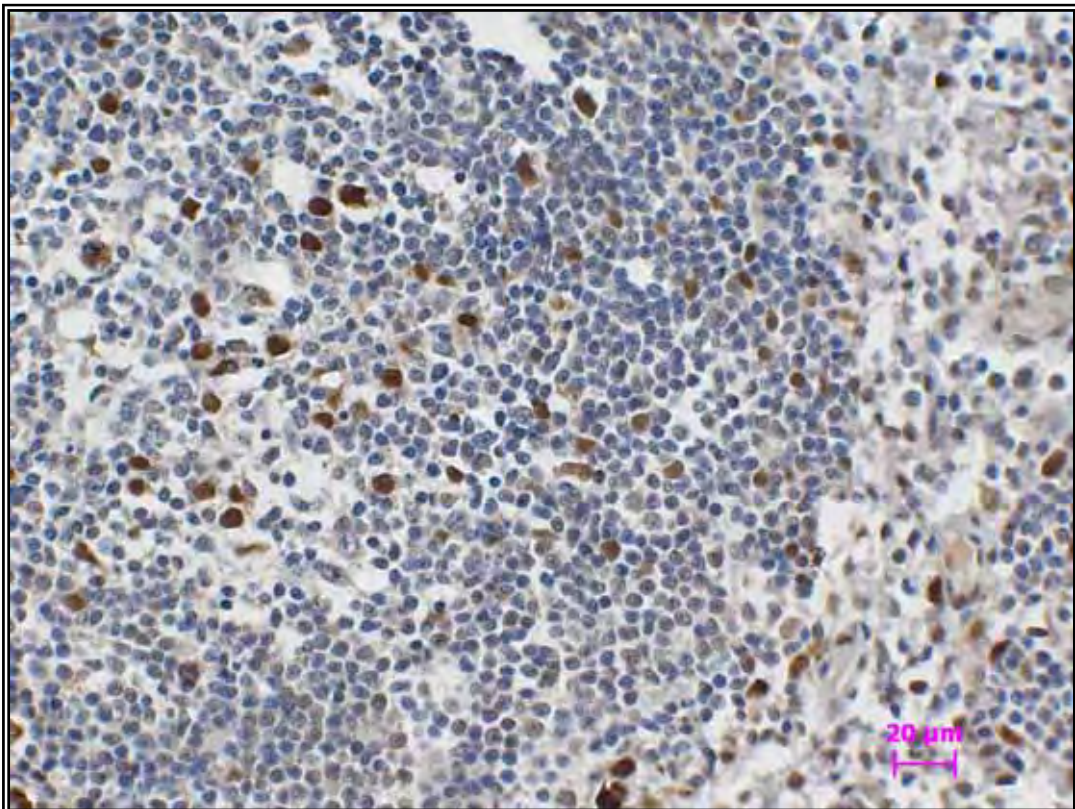


Figura 14: Linfoma Linfoplasmacítico (Kiel) – positividade para anticorpo anti- p53, EnVision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris.

5. DISCUSSÃO

5.1 Dados Clínicos

Segundo a literatura, a predisposição racial neste tipo de neoplasia é um assunto controverso e já foi relatada por diversos autores para cães da raça Boxer, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier, Chow Chow, Pastor Alemão, Poodle, São Bernardo, Beagle, Golden Retriever e Bulldog (TESKE et al., 1994b; VONDERHAAR & MORRISON, 1998 e JACOBS et al., 2002).

Os animais portadores de linfomas no presente estudo eram predominantemente sem raça definida (SRD) (12 casos), seguido dos animais da raça Pastor Alemão (nove casos), animais da raça Boxer (cinco casos) e animais da raça Rottweiler (cinco casos). Os outros nove animais pertenciam a outras raças.

De acordo com SEQUEIRA et al. (1999) não existem dados sobre a composição racial da população dos cães da região de Botucatu. Provavelmente, a frequência encontrada esteja mais relacionada à proporção de cada raça na população canina do que à predisposição racial para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia.

A maioria dos animais, com raça definida, acometida pela neoplasia neste estudo, pertencia ao grupo das raças de grande ou médio porte. Este resultado está de acordo com o trabalho realizado por SEQUEIRA et al. (1999), que observaram 50%, dos 34 animais avaliados, pertencente às raças de grande ou médio porte.

Em relação à idade dos animais portadores de linfoma, neste trabalho observou-se uma maior ocorrência da neoplasia (52,5%) em cães com idade entre quatro e sete anos, seguido dos animais com idade superior a oito anos (32,5%) e animais de até três anos (15%). Os dados observados neste trabalho estão de acordo com SEQUEIRA & FRANCO (1992) que afirmam haver maior ocorrência desta neoplasia nos animais adultos entre quatro a 13 anos. SEQUEIRA et al. (1999), observaram que 80% dos animais apresentaram idade acima de quatro anos e nos trabalhos realizados por TESKE (1994a) e TESKE et al. (1994b) a idade média dos cães acometidos pela neoplasia foi de 6,4 e 7,7 anos respectivamente.

Entre os animais utilizados neste estudo encontravam-se 26 machos (65%) e 14 fêmeas (35%). Existe grande discordância na literatura sobre a influência do sexo no aparecimento dos linfomas caninos. TESKE et al. (1994b), obtiveram uma prevalência maior em fêmeas, porém RALLIS et al. (1992) e SEQUEIRA et al. (1999) observaram maior número de cães machos. Já JACOBS et al. (2002) afirmam que não existe influência do sexo do animal.

No presente estudo foi realizado o estadiamento clínico dos linfomas nos 40 animais, destes, 18 estavam no estágio IV da doença, 16 se apresentaram no estágio V e seis foram classificados como estágio III. Estes dados concordam com SEQUEIRA et al. (1999) e com Moreno, 2005 que verificaram que a maior parte dos portadores de linfoma (94%) encontrava-se nos estádios mais avançados da doença (III, IV e V), o que piora o prognóstico e dificulta a determinação de um protocolo para o tratamento da neoplasia.

DOBSON et al. (2001) observaram que a maioria dos pacientes estudados encontrava-se nos estádios III e IV da doença no momento do diagnóstico, embora em alguns destes animais não tenha sido avaliada a medula óssea. O comprometimento da medula óssea implica na mudança do estadiamento clínico para o estágio V.

Os mesmos autores afirmam que embora o estadiamento clínico não interfira na resposta tumoral à quimioterapia, modifica o tempo de sobrevivência do animal. Os animais que se apresentam na fase adiantada da doença apresentam uma menor sobrevivência quando tratados em relação aos animais com a neoplasia em fase inicial.

Um inconveniente da avaliação clínica da doença é que o estadiamento é realizado com base no exame clínico e de alguns exames complementares, não havendo muitas vezes a confirmação histológica ou citológica do envolvimento dos órgãos. Disto podem resultar classificações equivocadas (DOBSON et al., 2001).

Dos 40 animais avaliados, 35 foram classificados como linfomas multicêntricos, três casos como linfomas tímicos e dois linfomas solitários.

Estes dados estão de acordo com a literatura consultada. A forma multicêntrica é considerada como a mais frequentemente observada, sendo

seguida pelas formas digestiva, tímica, cutânea e solitária (TESKE, 1994; MILNER et al., 1996 e VONDERHAAR & MORRISON, 1998 e JACOBS, et al., 2002). SEQUEIRA et al. (1999), em sua casuística, observaram 91,2% de linfomas multicêntricos, 5,9% de linfomas tímicos e 2,9% de linfomas digestivos.

5.2 Classificação Morfológica

Os 40 casos de linfoma utilizados neste trabalho, foram classificados de acordo com a Classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e Working Formulation (NCI, 1982). Vários autores utilizam estas classificações propostas para os linfomas não-Hodgkin do homem para diagnosticar os linfomas dos cães (APPELBAUM et al., 1984; CARTER et al., 1986; GREENLEE et al., 1990; TESKE 1994; FURNEL-FLEURY et al., 1997).

No presente estudo, quando utilizada a classificação de Kiel, predominaram os linfomas de grau alto (72,5%) em relação aos linfomas de grau baixo (27,5%). Este resultado é semelhante ao obtido por TESKE & VAN HEERDER (1996) e SUZANO, 2004, que utilizaram esta mesma classificação em material colhido pelo método da Punção Aspirativa por Agulha Fina e este mesmo predomínio se verifica quando esta mesma classificação foi aplicada ao exame histológico da neoplasia (APPELBAUM et al., 1984; PARODI et al., 1988; GREENLEE et al., 1990; PONCE et al. 1994; TESKE 1994; FURNEL-FLEURY et al., 1997).

Os linfomas imunoblásticos (47,5%) foram os mais freqüentes em nossa casuística, resultado diferente de diversos autores que obtiveram um predomínio dos linfomas centrolásticos quando utilizaram essa mesma classificação (PARODI et al., 1988; GREENLEE et al., 1990; TESKE 1994; TESKE & VAN HEERDE, 1996; FURNEL-FLEURY et al., 1997; SUZANO, 2004).

A utilização da classificação da Working Formulation em nossa série de linfomas mostrou prevalência maior para os linfomas de grau alto (55%), seguidos dos linfomas de grau intermediário (35%) e dos linfomas de grau baixo (10%), FURNEL-FLEURY et al., (1997) utilizando esta classificação observaram o predomínio dos linfomas de grau intermediário, resultados

semelhante aos descrito por Suzano, em 2004, em exames citológicos. O tipo citológico mais freqüente foi o Linfoma Imunoblástico em 55% dos animais. A literatura consultada indica diferença significativa na freqüência dos tipos citológicos entre os diferentes autores que utilizaram esta classificação, tanto em exames citológicos como nos histológicos. APPELBAUM et al, (1984) e CARTER et al. (1986), obtiveram prevalência maior para os linfomas imunoblásticos com 37,5% e 24,9%, respectivamente. No entanto, os linfomas de Grandes Células não-Clivadas foram apontados como os mais freqüentes por GREENLEE et al. (1990), RALLIS et al. (1992) e FOURNEL-FLEURY et al. (1997), em 48,3%, 36,8% e 40,2% dos casos, respectivamente.

A classificação morfológica dos linfomas caninos, bem como na medicina humana, tem grande importância na determinação do prognóstico, tempo de vida do paciente e principalmente na escolha do tratamento mais adequado a cada tipo de neoplasia (CARTER et al., 1986; FISHER et al., 1995 e DOBSON et al., 2001). De acordo com a literatura os tumores de grau alto respondem melhor ao tratamento quimioterápico, porém aumentam os índices de recidiva.

5.3 Imunofenotipagem

Os marcadores imunológicos podem ser de grande utilidade no diagnóstico dos linfomas, seja na sua diferenciação de outras neoplasias de células redondas, na determinação do imunofenótipo das células que o compõem ou mesmo para a diferenciação entre os processos reacionais e as neoplasias de grau baixo (ROBEY et al., 1987).

No homem, uma vez feito o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin é obrigatório que seja realizada a imunofenotipagem, sendo raros os casos nos quais este procedimento pode ser dispensado (SOARES e ARIAS, 1999).

O uso de marcadores para determinar o imunofenótipo dos linfomas caninos ainda é limitado, pois a maioria dos marcadores disponíveis comercialmente, além do alto custo, não são específicos para a espécie canina (KIUPPEL et al., 1999).

Alguns anticorpos humanos apresentam reação cruzada com antígenos semelhantes encontrados nos cães e foram utilizados na marcação

de epítomos de superfície de leucócitos nesta espécie (CHABANNE et al., 1994).

No que diz respeito à determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos o emprego dos anticorpos CD3 e CD79a, marcadores de células T e células B, respectivamente, tem permitido a utilização de material fixado em formol e incluído em parafina (MILNER et al., 1996; DE MOURA, 2000; PESSOA, 2005).

Os 40 casos deste estudo tiveram seu imunofenótipo determinado. A determinação da origem T ou B dos linfomas não-Hodgkin tem valor prognóstico e não pode ser definida pela morfologia celular (APPELBAUM et al., 1984 e DOBSON et al., 2001). Os cães portadores de Linfomas T respondem menos ao tratamento quimioterápico e têm tempo de sobrevivência menor do que os cães portadores de linfomas B (DOBSON et al., 2001). Portanto, a classificação imunoistoquímica dos linfomas torna-se um procedimento importante para a definição do comportamento clínico da neoplasia e sua resposta ao tratamento quimioterápico (TESKE et al, 1994a; TESKE et al, 1994b, FOURNEL-FLEURY et al., 1994; FISHER et al., 1995; FOURNEL-FLEURY et al., 1997; DOBSON et al., 2001 e FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

Na determinação do imunofenótipo dos linfomas a avaliação da população celular que apresenta reação positiva deve ser cuidadosa. As neoplasias com imunofenótipo B podem mostrar células positivas para marcadores de células T, que representam células remanescentes da população original do órgão linfóide ou mesmo uma reação imunológica do organismo à neoplasia. Do mesmo modo, nos linfomas T podem estar presentes células que apresentam marcação positiva para linfócitos B, que na verdade representam células normais não neoplásicas (CANIATTI et al., 1996). No presente estudo, foram tomados todos os cuidados para que se evitassem erros na determinação do imunofenótipo da neoplasia. A principal medida para se realizar com segurança esta determinação é a classificação morfológica do linfoma e a identificação da positividade do tipo celular que compõe a neoplasia.

Deve-se ressaltar que a marcação de linfócitos normais em meio aos linfócitos neoplásicos, embora possa dificultar, em alguns casos, a classificação imunofenotípica da neoplasia, pode também funcionar como um controle interno positivo da reação imunoistoquímica (CANIATTI et al., 1996).

Na casuística utilizada neste trabalho foi observado o mesmo número de casos com imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e imunofenótipo B (CD3-/CD79a+), sendo 17 casos (42,5%) de cada imunofenótipo seguido pelos linfomas de imunofenótipo T/B (CD3+/CD79+) em 15% dos casos, resultados semelhantes aos encontrados por Pessoa em 2005, com os mesmos anticorpos. Em trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório com material incluído em parafina (DE MOURA, 2000) e em material citológico (SUZANO, 2004), detectaram a predominância dos linfomas de imunofenótipo T. MILNER et al. (1996), referem o mesmo tipo de achado, utilizando um painel mais amplo de anticorpos. A freqüência encontrada por estes autores foi de 60% de Linfomas T e 40% de linfomas B.

No entanto, a maioria dos autores que trabalharam com imunofenotipagem dos linfomas caninos relata a predominância dos linfomas B em suas casuísticas, embora também ocorra grande variação nas freqüências encontradas e na metodologia usada (TESKE et al., 1994a; TESKE et al., 1994b; FOURNEL-FLEURY et al., 1994; CANIATTI et al., 1996; TESKE et al., 1996; FOURNEL-FLEURY et al., 1997 e FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

A freqüência de linfomas B variou de 55,1% a 77,7% nas casuísticas dos autores que verificaram o predomínio deste imunofenótipo utilizando painéis de anticorpos amplos em material citológico ou incluído em parafina (CANIATTI et al., 1996; TESKE, et al., 1996; FOURNEL-FLEURY et al., 1997). Deve-se ressaltar que mesmo com o predomínio do imunofenótipo B, a freqüência dos linfomas T pode ser alta, chegando a 42% dos casos (TESKE, et al., 1996).

5.4 Correlação entre a Classificação Morfológica e o Imunofenótipo

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que existe correlação entre a classificação morfológica e o imunofenótipo dos linfomas. Entre os 17 casos de linfomas T o tipo mais freqüente foi o linfoma imunoblástico (12 casos). Alguns autores citam o linfoma linfoblástico como o tipo citológico predominante nesta categoria imunofenotípica (APPELBAUM et al., 1984; FOURNEL-FLEURY et al., 2002). No presente trabalho, considerando-se a classificação de Kiel, os Linfomas T mostraram-se, na maioria dos casos, como neoplasias de grau alto. Este resultado é corroborado por APPELBAUM et al. (1984).

Todos os linfomas centroblasticos (cinco casos) apresentaram imunofenótipo B, seguidos pelos linfomas imunoblásticos (quatro casos). Estes resultados confirmam vários relatos da literatura, que observaram a predominância destes tipos citológicos entre os linfomas de imunofenótipo B (APPELBAUM et al., 1984; GREENLEE et al., 1990; FOURNEL-FLEURY et al., 1997).

Segundo LENNERT & FELLER (1990), a morfologia das células que constituem as neoplasias linfóides pode indicar a sua origem T ou B. As bases da classificação de Kiel permitem a incorporação dos conhecimentos da imunologia experimental no estudo das neoplasias do sistema imune. Entre os Linfomas B deve-se esperar uma maior freqüência de Linfomas Centroblasticos, por ser este tipo celular relacionado com o sistema B. Isto foi confirmado no presente estudo.

5.5 Índice de proliferação celular pelo método do AgNORs

Em nosso estudo, a média de número de AgNORs intranuclear nos linfomas de alto grau de malignidade foi estatisticamente maior que nos linfomas de baixo grau, o que corrobora os dados presentes na literatura consultada (CROKER et a., 1987; VAIL et al., 1996; VALDOVICH et al., 2004).

Embora o número maior de AgNORs nos linfomas de alto grau de malignidade que nos de baixo grau concorde com vários autores, as médias

encontradas no presente trabalho foram mais baixas que as da literatura consultada. Os linfomas de baixo grau apresentaram uma média de $0,98 \pm 0,36$ e os de alto grau, $1,37 \pm 0,32$. Croker et al., em 1987, utilizando o mesmo tipo de material, encontraram para os linfomas de baixo grau, um AgNOR por núcleo em média e nos de alto grau, cinco AgNORS por núcleo. Já Valdovich e et al., em 2004, usando tanto material histológico como citológico para contagem dos AgNORs obtiveram nas amostras histológicas, a variação foi de 2,2 a 3,0 nos linfomas de baixo grau e 2,6 a 3,7 nos de alto grau. Estes mesmos autores relatam que estas diferenças nas médias de diversos trabalhos podem ocorrer devido a alterações durante o processamento do material, desde a fixação, o processamento histológico e até mesmo durante a coloração pela prata. A técnica utilizada para corar os linfomas deste estudo seguiu o mesmo padrão descrito por PLOTON et al. (1986) No entanto, os tempos de fixação do material, desparafinização e desidratação não foram padronizados naqueles casos resgatados do arquivo. Estas variações podem interferir na impregnação da prata, formando grandes agregados ao invés de pequenos pontos, isso leva a um excesso de prata intranuclear e reduz o número de pontos contados nos núcleos interferindo na média de AgNORs (VALDOVICH et al., 2004).

Quando comparados os resultados deste trabalho com outro realizado no mesmo laboratório por Pessoa em 2005, também nota-se que mesmo havendo diferenças entre os graus de malignidade, as médias deste autor foram maiores que no presente estudo. Esta diferença pode ser devido ao tipo de material utilizado por Pessoa (2005), que trabalhou com amostras colhidas por meio de citologia aspirativa. Segundo Valdovich et al., em 2004, que utilizaram amostras citológicas e histológicas dos mesmos casos, obtiveram números maiores de AgNORs nos exames citológicos. De acordo com estes autores, as células nas amostras citológicas apresentam-se íntegras e não fatiadas pelo micrótomo como nas preparações histológicas, por isso o número de AgNORs seria maior e os NORs pequenos seriam mais facilmente reconhecidos. Mesmo assim, o método de contagem do AgNORs, é de grande eficácia na determinação do grau de malignidade dos linfomas caninos, tanto nas amostras histológicas como naquelas colhidas pela citologia aspirativa.

Quando analisados os linfomas de alto grau, CROKER et al., em 1987, relataram que os linfomas centroblasticos apresentavam a maior média no número de AgNORs, no presente trabalho, os tipos de neoplasia que mostraram as maiores quantidades de pontos intranucleares foram os linfomas imunoblasticos, seguidos pelos centroblasticos.

O padrão de distribuição encontrado em todos casos de linfoma nesta pesquisa, corresponde ao tipo II, que apresenta vários aglomerados de NORs no núcleo. Em 1996, LORAND-METZE & METZE, verificaram, estudando pacientes com leucemias crônicas, que o prognóstico de leucemia progressiva estava relacionado com um número maior de aglomerados de NORs e as amostras com NORs únicos, os pacientes eram considerados estáveis. O número de AgNORs nas células malignas é maior que nas hiperplásicas ou benignas e está associado com a alta taxa de proliferação celular (CROKER et al., 1987; TRERÈ 1994; DERENZINI & PLOTON, 1991; RABENHORST et al., 1994; VALDOVICH et al., 2004). Estes últimos autores obtiveram cerca de 80% das neoplasias classificadas no padrão de distribuição II e o padrão em todas as amostras de linfonodos normais ou reativos foi I, que possui apenas um agregado pequeno.

5.6 Índice de Proliferação Celular pelo método do Ki-67 (MIB-1)

Quando analisada a marcação com Ki-67 para proliferação celular, pudemos notar diferença significativa dos índices de proliferação entre os grupos de alto grau e baixo grau de malignidade e este resultado está de acordo com a literatura, tanto para linfomas caninos como linfomas não-Hodgkin dos seres humanos (KIUPEL et al., 1999; FOUNEL-FLEURY et al., 1997; PHILLIPS et al., 2000; WANG et al., 2005; MADEWELL, 2001).

Fournel-Fleury et al., em 1997, analisando 92 casos de linfomas caninos, observaram que os linfomas de baixo grau de malignidade possuíam índices de proliferação entre 3 e 16% e os de grau alto, entre 39 e 60%. Levando em consideração estas taxas de proliferação, os autores estabeleceram um percentual de 21% como o limite entre os tumores de alto grau e de baixo grau de malignidade. No presente trabalho, a variação da proliferação entre os linfomas de baixo grau estava entre 1,67 e 34,5% e considerando os de alto grau, esta variou entre 24,4 e 80,53%. Ainda no

mesmo trabalho, os autores relatam que dentre os linfomas de baixo grau, dois casos, apresentaram média maior que os 21%, sendo o maior, um linfoma Centrocítico com 30% de células positivas para o marcador Ki-67. Todos os linfomas de alto grau apresentaram índice proliferativo maior que o limite de 21%. Utilizando esta taxa de 21% como parâmetro para dividir as neoplasias de acordo com o grau de malignidade, obtivemos 3 casos de baixo grau com percentual maior que o limite, sendo o maior também um linfoma Centrocítico com 34,5% de células marcadas e todos os linfomas de alto grau apresentaram o índice de proliferação maior que 21%, sendo o menor, um linfoma Imunoblástico com 24,4%.

Este mesmo parâmetro de percentual de células em proliferação nos linfomas de alto e baixo grau foi estabelecido nos seres humanos em diversos trabalhos com valores de 20%, 25% e 26% determinados por Hall et al., (1988), Schrape et al. (1987) e Gerdes et al. (1991), respectivamente.

Os valores observados, na literatura consultada, para os índices proliferativos demonstram que em alguns tipos citológicos podem ocorrer discrepâncias quanto a este parâmetro e, portanto, somente a classificação cito-histológica dos linfomas pode não estabelecer o padrão de comportamento biológico da neoplasia. Os linfomas de alto grau de malignidade, humanos e caninos, com um alto índice de proliferação celular tendem a responder melhor a quimioterapia (FOUNEL-FLEURY et al., 1997; PHILLIPS et al., 2000). Assim sendo, os índices proliferativos devem ser considerados, principalmente, na análise de casos individuais da rotina de diagnóstico.

5.7 Índice de apoptose pelo método da Caspase-3

Quando analisados os resultados do índice de apoptose pelo método da expressão da caspase-3, não obtivemos diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os linfomas de alto e baixo grau, bem como entre os diferentes imunofenótipos. Obtivemos resultados semelhantes nos linfomas de alto grau (6,82%) e nos de baixo grau de malignidade (6,67%). Deve-se ressaltar, no entanto, que nos linfomas difusos de células B em seres humanos, já foi observado que os tumores de alto grau apresentam índices

apoptóticos maiores que os linfomas de baixo grau de malignidade (DONOGHUE et al., 1999; DUKERS et al., 2002).

O índice de apoptose determinado pela expressão de caspase-3 apresentou desvio padrão elevado o que indica uma grande variação na percentagem de células positivas entre os casos. Dukers et al., em 2002, afirmaram que os linfomas difusos de grandes células B, nos seres humanos, apresentam grande variação na marcação para este anticorpo, a média de percentual de células marcadas destes linfomas foi de 5,8% podendo variar de 1 a 27% e os linfomas de baixo grau, apresentavam menos de 1% de células em apoptose.

No presente estudo, os linfomas de alto grau apresentaram variações entre 0,28% a 28,71% de células positivas para a marcação da caspase-3 e os de baixo grau entre 0,35% e 19,2%, resultado que concorda com a literatura. Dukers et al., em 2002, afirmam que além de uma grande variação no índice de apoptose pela caspase-3, há variações individuais de alguns tumores, o que pode estar relacionado à expressão da proteína p-53 mutante, e em última análise influenciaria a resistência a quimioterapia. Estas variações também podem ser devido às áreas de necrose que são comuns nos linfomas de alto grau, pois não existe marcação de caspase-3 nas áreas necróticas (DUKERS et al., 2002).

Quanto ao padrão de marcação citoplasmática do anticorpo anti-caspase-3, em todos os casos deste trabalho a marcação foi citoplasmática difusa. Arai et al., em 2005, avaliando linfomas B primários de sistema nervoso central, também não relataram presença da marcação citoplasmática puntiforme nas neoplasias linfóides. O padrão puntiforme de positividade está relacionado a um melhor prognóstico, pois este é característico de folículos linfóides normais ou hiperplásicos ou a uma neoplasia em estágio inicial e indica uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico e remissão completa da doença (DONOGHUE et al., 1999). Deve-se considerar que a maioria dos casos de linfoma utilizados no presente estudo encontravam-se em estágios avançados, o que poderia explicar o tipo de marcação encontrada.

A caspase-3 tem sido considerada um dos melhores métodos de determinação do índice de apoptose, esta percentagem é mais correta que a contagem de corpos apoptóticos. As células apoptóticas reconhecidas por sua

morfologia, representam um índice menor que o valor real, pois várias células, já em apoptose, podem ainda não apresentar alterações morfológicas visíveis na microscopia óptica (DUKERS et al., 2002).

Ainda não existem dados na literatura veterinária sobre a marcação pela caspase-3, uma vez que não existe relato de sua utilização nos linfomas caninos, nem em outra neoplasia nesta espécie, por isso todos os resultados apresentados foram comparados aos dados de linfomas não Hodgkin's dos seres humanos.

5.8 Expressão de p53

Entre os 40 casos de linfomas deste estudo, 29 (72,25%) apresentaram reação positiva para expressão de p53. Os resultados encontrados na literatura mostram algumas variações. Sueiro et al., em 2004, encontraram 59% de positividade, Veldhoen et al., (1998) relataram que 60% dos linfomas apresentaram expressão da proteína mutante e Gamblin et al., em 1997, tiveram 40% de casos positivos. Deve-se ressaltar que todos os autores citados empregaram o mesmo clone do anticorpo utilizado no presente estudo.

Apesar de não haver diferença estatística entre as médias de células que expressaram o p53 mutante, no que diz respeito aos graus de malignidade e imunofenótipo, os linfomas de alto grau de malignidade apresentaram maior número de células positivas (2,38%) que os linfomas de baixo grau (2,27%) e os linfomas com imunofenótipo T/B apresentaram maior número de células que expressam p-53 (4,10 %) que os linfomas T (2,12%), que por sua vez apresentaram positividade maior do que os linfomas B (1,97%), resultados semelhantes aos encontrados em outros estudos desta mesma neoplasia em cães (SOKOLOWSKA, et al., 2005)

Sueiro et al., em 2004, apesar de não encontrarem diferença estatisticamente diferente entre os linfomas T e B, relataram um percentual de células positivas discretamente mais alto nos linfomas T, e ainda encontraram diferença entre as neoplasias de alto e baixo grau de malignidade.

Os linfomas T com estadiamento clínico avançado, geralmente apresentam um percentual maior de células positivas para o p-53 (SUEIRO et al., 2004). Pacientes portadores destas neoplasias possuem um tempo de sobrevivência menor que aqueles com linfomas B (GREENLE et al., 1990; TESKE et al., 1994b).

No presente estudo pode-se perceber que os casos com mais de 10% de células expressando p53 mutante, todos apresentaram idade acima dos seis anos, resultado semelhante ao encontrado por Sueiro et al., 2004, que obtiveram a média de idade de 7 anos entre os animais com 10% ou mais de células positivas.

Sokolowska et al., em 2005, avaliaram a expressão de p53 em linfomas caninos, apesar de todos os linfomas apresentarem expressão da proteína mutante, com índice de positividade variando entre 0,87% a 3,46%. Estes autores não encontraram amostras com mais de 10% de células positivas. No presente estudo, 72,25% dos linfomas apresentaram positividade para p53 e foram classificados dois casos com mais de 10% de células marcadas, mais especificamente um linfoma imunoblástico de alto grau e um linfoma de células T pleomórficas de baixo grau de malignidade. Nosso percentual de positividade para a expressão de p53 foi mais próximo do encontrado por Sueiro et al., 2004 (60%), porém não detectamos diferença nesta expressão quando consideramos o grau de malignidade da neoplasia, como afirmam os mesmos pesquisadores.

De acordo com os estudos mais recentes sobre os linfomas, tanto na espécie humana como nos cães, o diagnóstico, a escolha do tratamento e o prognóstico estão relacionados não só com a morfologia celular, mas também com o imunofenótipo, com os índices de proliferação celular e de apoptose e em alguns casos com a expressão de p-53 mutante.

Os linfomas não-Hodgkin's humanos, de alto grau de malignidade apresentam uma alta taxa de células em proliferação e um índice de apoptose maior que os de baixo grau. Isso faz com que haja, nos casos de linfoma de alto grau, uma resposta mais rápida ao tratamento quimioterápico. Nos linfomas caninos, as pesquisas mais recentes comprovam um comportamento biológico semelhante às neoplasias humanas.

Outro parâmetro importante na classificação neoplásica é o índice de células em apoptose. Um dos melhores marcadores para estas células é a caspase-3. O percentual de células que expressam esta enzima geralmente é maior nos linfomas de alto grau de malignidade e este resultado está relacionado a um melhor prognóstico para os pacientes (DONOGHUE et al., 1999).

Ainda não existem dados na literatura veterinária sobre o comportamento das neoplasias em relação a este marcador, porém esta pesquisa mostrou um percentual ligeiramente mais alto nos linfomas de alto grau, semelhante ao que acontece na espécie humana. Entre os linfomas de mesmo grau de malignidade, pode-se observar grandes diferenças individuais em relação a sensibilidade do tumor ao tratamento e alguns autores associam este fato a mutação do gene p-53 (IMAMURA et al., 1994).

A mutação da proteína p-53 não parece ser uma mutação importante nos linfomas humanos nem nos cães (IMAMURA et al., 1994), mas quando as células neoplásicas expressam essa proteína alterada, o tratamento é ineficiente, seja ele quimioterápico ou radioterápico (SOHN et al., 2003). Segundo nossos resultados, não existe relação entre a marcação do p-53 e o grau de malignidade das neoplasias, mas os tumores em fases mais avançadas mostram uma maior quantidade de células positivas para o anticorpo anti-p-53.

Nos estudos mais recentes sobre linfomas, na espécie humana bem como nos cães, a classificação morfológica e o imunofenótipo não são mais suficientes para determinarem o diagnóstico e o prognóstico. Além destas classificações, são necessários dados sobre os índices de proliferação celular e apoptose individuais de cada neoplasia. Assim sendo, poderemos determinar o tratamento mais adequado e aumentar a sobrevida dos pacientes, possibilitando ainda comparar os resultados obtidos nos cães, estabelecendo, desta forma, o linfoma canino como modelo experimental da doença dos seres humanos.

6. CONCLUSÕES

1. O índice proliferativo, avaliado pelo método do AgNOR e da expressão do Ki-67 (MIB-1) foi maior nos linfomas de alto grau do que nos linfomas de baixo grau, não havendo diferença entre os imunofenótipos das neoplasias.
2. O índice apoptótico pode ser avaliado pela expressão da caspase-3 utilizando a técnica de imunohistoquímica com o anticorpo primário anti-caspase-3.
3. O índice apoptótico dos linfomas caninos mostra grande variação, não havendo diferenças entre os graus e imunofenótipos das neoplasias.
4. A expressão do p-53 mutante nos linfomas caninos não é rara, não havendo diferenças entre os graus e imunofenótipos das neoplasias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*.

ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. 1 ed. São Paulo: sociedade Brasileira de Patologia., 1999, 270p.

APPELBAUM, F.R.; SALE, G.E.; STORB, R.; CHARRIER, K.; DEEG, H.J.; GRAHAM, T.; WULFF, J.C. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. **Hematol. Oncol.**, v.2, p.151-168, 1984.

AOYAGI, K.; KOHJUJI, K.; YANO, S.; MURAKAMI, N.; MIYAGI, M.; TAKAEDA, J.; SHIROUZU, K. The expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, p21, and apoptosis in primary gastric lymphoma. **Surg.** n.123, p.20-26, 2002.

ARAI, M; SASAKI, A.; SAITO, N.; NAKAZATO, Y. Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 detects high level os apoptosis frenquently in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. **Pathol. Internat.** v. 55, p.122-129, 2005.

ASTER, J.; KUMAR, V. White Cells, Lymph Nodes, spleen and Thymus. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: W.B. Sauders Company, 1999, p.645-695.

CANIATTI, M.; ROCCABIANCA, P; SCANZIZNI, E.; PALTRINIERI, S; MOORE, P.F. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine needle aspiration biopsy. **Vet. Pathol.**, v.33, p.204-212, 1996.

*.ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:informação e documentação- Referências- Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p

CAPURRO, C.; BURACCO, P.; ROSSI, L. Lymphoma in Dogs . **Europ. J. Com. An. Pract.** v.4, p.15-29, 1992.

CARTER, R.F.; VALLI, V.E.O.; LUMSDEN, J.H. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to Nacional Cancer Institute Working Formulation. **Cancer J. Vet. Res.** v.50, p.154-164, 1986.

CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; KAPLANSKI, C.; FOURNEL, C.; MAGNOL, J.P.; MONIER, J.C.; RIDAL, D. Screening of 78 monoclonal antibodies directed against human leukocyte antigens for cross-reactivity with surface markers on canine lymphocytes. **Tissue Antigens**, v.43, p.202-205, 1994.

CROKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* v. 151, p. 111-118, 1987.

CROCKER, J., BOLDY, D.A., EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standarzed approach. **J. Pathology**, v. 158, p. 185-188, 1988

DE MOURA, V.M.B.D.; SEQUEIRA, J.L.; BANDARRA, E.P. Linfoma canino. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v.2, n.2, p.29-33, 1999.

DE MOURA, V.M.B.D. Classificação Citohistológica e Imunofenotipagem dos Linfomas Caninos. Botucatu, 2000. 107p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **Review Intern. Exp. Pathol.** v.32, p. 149-192, 1991.

DOBSON, J.M.; BLACKWOOD, L.B.; MCINNES, E.F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T.M.; TOM, B.D.M. Prognosyic variables in canine multicentric lymphossarcoma. **J. Small Anim. Pract.** v.42, p. 377-384, 2001.

DONOGHUE, S.; BADEN, H.S.; LAUDER, I.; SOBOLEWSKI, S.; PRINGLE J.H. Immunohistochemical localization of Caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphoma. **Can. Res.** v.59, p.5386-5391, 1999.

DUKERS, D.F.; OUDEJANS, J.J.; VOS, W.; BERGE, R.L.; MEIJER, C.J.L.M. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. **J. Pathol.** v.196, p.307-315, 2002.

FISHER, D.J.; NAYDAN D.; WERNER, L.L.; MOORE P.F. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy sample. **Vet. Clin. Pathol.** v.24, n.4, p.118-123, 1995.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; CHABANNE, L.; GHERNATI, I., MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of Ki-67 antigen. **J. Comp. Path.** v.117, n.1, p.61-72, 1997.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOYTHOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell Lymphoma: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Vet. Pathol.** v.32, p.92-109, 2002.

GAMBLIN R.M.; SAGARTZ, J.E.; COUTO, C.G. Overexpression of p53 protein in spontaneously arising neoplasm of dogs. **AJVR.** v.58, n.8, p.857-863, 1997.

GAVAZZA, A.; PRESCIUTTINI, S.; BARALE, R.; LUBAS, G.; GUGLIUCCI, B. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and of chemicals by dog owners. **J. Vet. Intern. Med.** v.15, p.190-195, 2001.

GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRM, I.; KLOTH, S.; BRANT, E.; FLAD H.D.

Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Pathol.** v.138, p.867-873, 1991.

GINN, P.E.; FOX, L.E.; BROWER, J.C.; GASKIN, A.; KURZMAN, I.D.; KUBILIS, P.S. Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous Mast Cell Tumors. **Vet. Pathol.** v.37, n.1, p.33-39, 2000.

GRAY, K.N.; RAULSTON, G.L.; GLEISER, C.A.; JARDINE, J;H. Histologic classification as an indication of therapeutic response in malignant lymphoma of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 184, p. 814-17, 1984.

GREENLEE, P.G.; FILIPPA, D.A.; QUIMBY, F.W. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic and clinical study. **Cancer.**, v.66, p.480-490, 1990.

GRIFFEY, S.M.; KRAEGEL, S.A; MADEWELL, B.R. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), ki-67 (MIB-1) and Mitotics counts. **J. Comp. Pathol.** v.120, p.321-332, 1999.

HALL, P.A.; RICHARDS, M.A.; GREGORY, W.M.; D' ARDENNE, A.J.; LISTER, T.A. STANSFIELD, A.G. The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. **J. Pathol.** v.154, p.223-235, 1988

HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., STEIN H., BANKS, P.M., CHAN, J.K.C., CLEARY, M.L., DESLOL, G., WOLF-PEETERS, C., FALINI, B., GATTER, K.C., GROGAN, T.M., ISAACSON, P.G., KNOWLES, D.M., MASON, D.Y., MULLER-HERMELINK, H., PILERI, S.A., PIRIS M.A., RALFKIAER, E., WARNKE, R.A. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood.** v.84, n.5, p.1361-1392, 1994.

HAYES, H.M.; TARONE, R.E.; CANTOR, K P. On the association between canine malignant lymphoma and opportunity for exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Environ. Res.** v.70, n.2, p.119-125, 1995

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, n.29, p.577-580, 1981.

IMAMURA, J.; MIYOSHI, I.; KOEFFLER, H.P. p53 in hematologic malignancies. **Blood.** v.84, p.2412-2421, 1994.

JACOBS, R.M.; MESSICK, J.B.; VALLI, V.E. Tumors of the Hemolymphatic system. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4ed. Iowa: Iowa State Press, 2002, p.19-198

JAFFE, M.H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H.W.; KERWIN, S.C.; HEDLUND, C.S.; LOPEZ, M.K.; DAVIDSON, J.R.; MILLER, D.M.; PARANJPE, M. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous Mast Cell tumours. **Vet. Pathol.** v.37, n.1, p.40-49, 2000.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. **World Health Organization Classification of Tumors – Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. IARC Press: Lyon, 2001, 351p.

JONES, C.J.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Veterinary pathology**, 6.ed., Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997, p.1009-42.

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

LENNERT, K.; FELLER, A.C. **Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas**, 2 ed. Berlim: Springer-Verlag, 1990, 312p.

MADEWELL, B.R. Cellular Proliferation in Tumors: A Review of Methods, Interpretation, and Clinical Applications. **J. Vet. Intern. Med.** v.15, p.334-340, 2001.

MELLANBY, R.J.; HERRTAGE, M.E.; DOBSON, J.M. Treatment of canine lymphoma by veterinarians in first opinion practice in England. **J. Small Anim. Pract.** v.43, p.198-202, 2002.

MILITO, C.B.; MORAIS, J.C.; NUCCI, M.; PULCHERI, W.; SPECTOR, N. Classificação dos linfomas não-Hodgkin: estudo morfológico e imunoistoquímico de 145 casos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.38, n.4, p.315-324, 2002.

MILNER, R.J.; PEARSON, J.; NESBIT, J.W.; CLOSE, P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. **Onderstepoort J. Vet. Res.** v.63, p.309-313, 1996.

MORENO, K. Linfoma Canino: aspectos epidemiológicos, clínicos, morfológicos e fenotípicos. **Londrina, 2005. 69p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina.**

Nacional Cancer Institute. Sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a Working Formulation for a clinical usage. **Cancer**, v.48, p.2112-2135, 1982.

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

PARODI, A.L.; DARGENT, F.; CRESPEAU, F. Histological classification of canine malignant lymphomas. **J. Vet. Med. – A Animal Physiology, Pathology and Clinical Veterinary Medicine.**, v.35, p.178-192, 1988.

PESSOA, A.W.P Classificação Cito-histológica , Imunoistoquímica, Lesão de DNA, Morfometria e Índice de proliferação celular nos linfomas caninos Botucatu, 2005. 187p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.

PHILLIPS B.S.; KASS P.H.; NAYDAN D.K.; WINTHROP M.D.; GRIFFEY S.M.; MADEWELL B.R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.12, n.2, p.111-117, 2000.

PIRIS, M.A.; PEZELLA, F.; MARTINEZ-,ONTERO, J.C.; ORRADRE, J.L.; VILLUENDRAS, R.; SANCHES-BEATO, M.; CUENA, R.; CRUZ, M.A.; MARTINEZ, B.; GARRIDO, M.C.; GATTER, K.; AIELLO, A.; DELIA, D.; GIARDINI, R.; RILKE, F. p 53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. **Br. J. Cancer**, v.69, p.337-341, 1994.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem. J.** v.18, p.5-14, 1986.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHIMITT, F.C.L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Res. Brás. Cancerol.** v.40, p. 3, p. 141-147, 1994.

RALLIS, T.; KOUTINAS, A.; LEKKAS, S.; PAPADIAMANTIS, C. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma) in the dog. **J. Small An Pract.** v.33, p.590-596, 1992

ROBERT, M.; FRIEDLANDER, M.D. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. **N. Engl. J. Med.** v.348, p.1365-1375, 2003.

ROESL S, S.; TILMANT, R.; DUCATELLE R. PCNA and KI-67 Proliferation Markers as Criteria for Prediction of Clinical Behaviour of Melanocytic Tumours in Cats and Dogs. **J. Comp. Pathol.** v.121, p.13-24, 1999.

SEQUEIRA, J.L.; FRANCO, M. Características dos linfomas caninos. **J. Anatomopatol.** v.7, n.2, p.6-8, 1992.

SEQUEIRA, J.L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E.P.; FIGUEIREDO, L.M.A.; ROCHA, N.S. Características anatomoclinicas dos linfomas caninos na região de Botucatu/SP. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, n.3, p.245-249, 1999.

SETOGUCHI, A.; SAKAI, T.; OKUDA, M.; MINEHATA, K.; YAZAWA, M.; ISHIZAKA, T.; WATARI, T.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **Am. J. Vet. Res.** v.62, n.3, p.433-439, 2001.

SONH, S.K.; JUNG, J.T.; KIM, D.H.; KIM, J.G.; KWAK, E.K.; PARK, T.; SHIN, D.G.; SOHN, K.R.; LEE, K.B. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. **Am. J. Hematol.** n.70, p.101-107, 2003.

SOARES, F.A.; ARIAS, V.E.A. Linfomas Não Hodgkin de Células T. In: ALVES, V.A.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-histoquímica.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p.141-151.

SOKOLOWSKA, J.; CYWINSKA, A.; MALICKA, E. p53 Expression in Canine Lymphoma. **J. Vet. Med.** v.52, p.172-175, 2005.

SUEIRO, F.A.R.; ALESSI, A.C.; VASSALO, J. Canine Lymphomas: a Morphological and Immunohistochemical Study of 55 cases, with Observations on p53 Immunoexpression. **J Comp Pathol.** v.131, p.207-213, 2004

SUZANO, S.M.C. Classificação Citológica e Imunocitoquímica dos Linfomas Caninos. Botucatu, 2004. 110p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

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

TESKE, E.; HEERDE, P.; RUTTEMAN, G.R.; KURZMAN, I.D.; MOORE, P.F.; MACWEN, E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **JAVMA**, v.205, n.12. p.1722-1728, 1994b.

TESKE, E.; Van HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. **The Veterinary Quarterly**, v.18, n.3, p.112-115, 1996

TRERÈ, D. AgNORs staining and quantification. **Micron.** v.31, p.127-131, 2000.

VAIL D.M.; KISSEBERTH, W.C.; OBRADOVICH J.E.; MOORE, F.M. Assessment of potential doubling time (T_{pot}), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. **Exp. Haematol.** v.24, p. 807-8015, 1996.

VALDOVICH, P.; PSÁDER, R.; TÓTH, Z.A.; PERGE E. Use of the Nucleolar Region Method for Cytologic and Histologic Examination of the Lymph Nodes in Dogs. **Vet. Pathol.** v.41, p.338-345, 2004.

VALLI, V.E.O. The hematopoietic system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**, 4.ed., New York: Academic Press, 1993. v.3, p.149-153.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**. v.16, p.249-255, 1998.

VONDERHAAR, M.A.; MORRISON, W.B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats**. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1998. p.667-695.

WANG, S.A.; WANG, L.; HOCHBERG, E.P.; MUZIKANSKY, A.; HARRIS, N.L.; HASSERJIAN, R.P. Low Histologic Grade Follicular Lymphoma with High Proliferation Index: Morphologic and Clinical Features. **Am. J. Surg. Pathol.** v.29, p. 1490-1496, 2005.

WOLF, J.C.; GINN, P.E.; HOMER, B.; FOX, L.E.; KURZMAN, I.D.
immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumours. **Vet Pathol**. v.34, p.394-404, 1997.

8. TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO: “BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH AND ANIMAL SCIENCE”

PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS LINFOMAS CANINOS

Autores: Sara Maria de Carvalho e Suzano ¹

Julio Lopes Sequeira ²

Adriana Wanderley de Pinho Pessoa ³

Camila Dias Porto ¹

Deílson Elgui de Oliveira ⁴

1. Pós-graduanda do Curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu;
2. Docente do Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu;
3. Docente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará;
4. Docente do Departamento de Patologia da FMB – UNESP, Campus de Botucatu

Endereço para correspondência:

Julio Lopes Sequeira

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – Unesp

Distrito de Rubião Júnior, s/n

CEP 18618-000

PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS LINFOMAS CANINOS

PROLIFERATION IN CANINE LYMPHOMA

RESUMO: O estudo dos linfomas caninos além de abordar a classificação morfológica e imunofenotípica necessita ser ampliado para que se tenha a avaliação da cinética celular. Esta verificação só pode ser feita com segurança quando são avaliados os parâmetros que indicam a taxa de proliferação celular. No homem, estes fatores têm influência no prognóstico e no tratamento dos linfomas. Os 40 linfomas utilizados neste trabalho foram classificados de acordo com a classificação de Kiel e a imunofenotipagem utilizou CD3 (linfócitos T) e CD79a (linfócitos B). A proliferação celular foi avaliada pelos métodos de contagem dos AgNORs e Ki-67 (MIB-1) De acordo com a classificação de Kiel os linfomas de alto grau foram os mais frequentes. Quando avaliada a proliferação celular houve diferença significativa entre os linfomas de alto e baixo grau tanto pelo método do AgNOR como do KI-67.(MIB-1), porém não foram estatisticamente entre os imunofenótipos Entre as neoplasias de alto grau de malignidade a média de número de NORs por núcleo de célula neoplásica foi de $1,37 \pm 0,32$, e nos casos de baixo grau de $0,98 \pm 0,36$, de acordo com o KI-67 a média do percentual de células positivas foi de $43,19\% \pm 19,01$, e $14,09\% \pm 11,74$ nos casos de alto e baixo grau, respectivamente.

ASBSTRCT: Lymphoma studies deals with morphological classification and immunophenotypic features and they have to be amplified for cellular kinetics evaluation. This evaluation can only be safely made, when the proliferative index are evaluated. In men the proliferation index have, most of the time, important influence in the neoplasia prognosis and treatment In this work it was used 40 canine lymphomas that were classified according to Kiel methods and immunophenotype was achieved with CD3 (T lymphocyte) and CD79a (B lymphocyte). Cellular proliferation was evaluated by AgNORs and Ki-67 (MIB-1) According to Kiel classification system, high grade lymphomas were more frequent. When cellular proliferation was evaluated, there was a significant difference between high grade and low grade lymphomas by AgNOR and Ki-67 (MIB-1) methods, but did not differ when comparing immunophenotype. Among high grade malignancy lymphomas the NORs medium number per cell nucleoli was 1.37 ± 0.32 and in low grade was 0.98 ± 0.36 , concerning Ki-67 the positive cellular percentual was $43.19\% \pm 19.01$, e $14.09\% \pm 11.74$ in high and low grade, respectively

INTRODUÇÃO

Os linfomas estão entre as neoplasias mais frequentes na espécie canina, (CAPURRO *et al.*, 1992; TESKE 1994a e 1994b; MILNER *et al.*, 1996; VONDEHAAR & MORRISON, 1998). A classificação cito-histológica deste tipo de neoplasia tem auxiliado na determinação do grau de agressividade, do melhor tipo de tratamento e no prognóstico dos cães. No entanto, em estudos recentes tem-se verificado que a associação deste tipo de avaliação com métodos de determinação da proliferação celular permite caracterizar com maior fidelidade o comportamento biológico das neoplasias (KIUPEL *et al.*, 1999; ROELS, *et al.*, 1999).

Existem vários métodos de avaliação da proliferação celular, entre estes estão as técnicas histoquímicas para a contagem dos AgNORs (Argyrophil Nucleolar Organizer Regions) ou ainda a avaliação imunoistoquímica, utilizando-se a marcação do antígeno Ki-67 (MIB-1).

Os AgNORs são estruturas presentes nos núcleos celulares, relacionadas com a síntese de proteínas nas células em proliferação. O grande número de AgNORs reflete um alto índice de proliferação. Esses parâmetros têm sido utilizados com grande eficácia nos linfomas do homem e do cão. As neoplasias de grau alto de malignidade possuem um número maior de AgNORs

intranucleolares e estes apresentam-se distribuídos difusamente enquanto os tumores de grau baixo de malignidade possuem AgNORs agregados dentro dos nucléolos (CROCKER *et al.*, 1987).

Métodos imunistoquímicos têm sido empregados para a detecção de proteínas associadas à proliferação celular tanto nas neoplasias humanas como na Medicina Veterinária (ALVES *et al.*, 1999; ROELS *et al.*, 1999). O principal marcador da células em proliferação é o antígeno Ki-67 (MIB-1) (FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; KIUPEL *et al.* 1999).

O antígeno Ki-67 (MIB-1) pode ser detectado em todas as fases do ciclo celular menos na G₀ (GERDES *et al.*, 1991). Este tem relação direta com a fração de crescimento de uma população celular e é considerado, atualmente, como o melhor marcador imunistoquímico de proliferação celular (ALVES *et al.*, 1999). E esta determinação tem valor prognóstico nos linfomas não-Hodgkin humanos, pois a análise desse índice pode estabelecer um fator independente para cada caso (HALL *et al.*, 1988).

Na espécie canina, a quantificação do antígeno Ki-67 (MIB-1) nos diferentes grupos de linfomas, pode resultar em um aumento na acurácia das classificações dos linfomas caninos. Fournel-Fleury *et al.*, (1997), observaram uma correlação positiva entre a proporção de células positivamente marcadas pelo Ki-67, a morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade.

O objetivo do presente estudo é determinar o índice de proliferação celular nos linfomas caninos utilizando o método histoquímico de AgNOR e a expressão da proteína Ki-67 (MIB-1), correlacionando-o com o grau de malignidade segundo a classificação de Kiel.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 casos de linfomas caninos, fixados em formalina 10% e submetidos ao processamento histológico de rotina, corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE) e classificados de acordo com a classificação morfológica de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

A técnica do AgNOR utilizada foi descrita por PLOTON *et al.*, (1986) e segue o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP.

Para a determinação do imunofenótipo, foram empregados marcadores linfóides para linfócitos T, o anticorpo policlonal anti-CD3 (Dako) na diluição de 1:100 e para linfócitos B, o anticorpo monoclonal anti-CD79a (Dako) na diluição de 1:50. Para determinação do índice de proliferação celular o anticorpo anti Ki-67 clone MIB-1, monoclonal (DAKO) na diluição de 1:50. Todas as amostras foram submetidas a recuperação antigênica com solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0, em forno de microondas durante 15 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de água oxigenada a 10 volumes por 15 minutos e o anticorpo primário foi incubado durante 18 horas na temperatura de 4 °C. O sistema de detecção utilizado foi o kit EnVision Dual link (Dako) . Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3'diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 DakoCytomation) durante cinco minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, por 35 segundos. A recuperação antigênica para s anticorpos anti-CD3 e anti

CD-79a foi realizada com EDTA pH 8,0 em “steamer” durante 20 minutos e o anticorpo secundário foi do Kit ABC (Dako).

A avaliação quantitativa de AgNORs e da expressão de Ki-67 (MIB) foi realizada utilizando-se analisador de imagens semi-automático modelo ZEISS com programa de morfometria *Pro-Image* 1.0, acoplado a microscópio de luz Imager. A1- Zeiss e captação de imagem por câmera Axiocam MRC - Zeiss.

A avaliação quantitativa de AgNORs, foi realizada por meio da contagem direta dos pontos de AgNORs presentes nos núcleos de 100 células em cada caso analisado. As lâminas foram observadas em objetiva de imersão, obtendo-se a média do número de pontos de NORs por núcleo de célula neoplásica.

Para determinação do índice de proliferação celular pela expressão de Ki-67 (MIB) foi realizada a contagem de todas as células presentes em cinco campos aleatórios em objetiva de 40x do microscópio. Nestes mesmos campos aleatórios foram também contadas as células positivas. Estes valores foram transformados em percentual de células positivas e submetidos à análise estatística.

Os resultados de ambas as contagens foram submetido ao teste t (student) a fim de verificar a diferença entre as médias de acordo com os graus de agressividade das neoplasias segundo a classificação de Kiel. Considerando o grau de significância $P < 0,05$.

RESULTADOS

Quando utilizada a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), foi observado a predominância dos linfomas de alto grau de malignidade, em 29 casos (72,5%) seguido por 11 casos de linfomas de baixo grau (27,5%).

No presente estudo obteve-se a mesma frequência de linfomas T e linfomas B, ocorrendo em 17 casos (42,5%), seguidos pelos Linfomas T/B em seis casos (15%). Os 13 casos de linfomas T classificados como de grau alto de malignidade, foram classificados como Imunoblásticos e as neoplasias de baixo grau, foram três casos de linfoma T pleomórfico e um linfocítico. Dentre os 17 casos de linfomas B, 11 casos são de grau alto de malignidade e 6 casos são de baixo grau de malignidade, sendo cinco centroblasticos, quatro Imunoblásticos, dois Linfoblásticos, dois centrocíticos-centroblasticos, dois centrocíticos, um linfocítico e um linfoplasmacítico

Dentre os 40 casos de linfomas a contagem dos AgNORs foi realizada em 28 casos, sendo 21 de alto grau e 7 casos de baixo grau. Entre as neoplasias de alto grau de malignidade a média foi de $1,37 \pm 0,32$, e nos casos de baixo grau de $0,98 \pm 0,36$. A distribuição dos pontos foi dispersa pelo núcleo, correspondendo ao tipo II de padrão de distribuição descrito por (CROKER & EGFAN, 1988). De acordo com teste t (student) foi observada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os grupos de alto e baixo grau de malignidade.

Entre neoplasias de alto grau de malignidade a média de células em proliferação marcadas pelo Ki-67 (MIB-1) foi de $43,19\% \pm 19,01$, e nos casos de baixo grau de $14,09\% \pm 11,74$, sendo observada diferença estatisticamente significativa pelo teste t (student) ($P < 0,01$) entre os grupos.

DISCUSSÃO

Os 40 casos de linfoma utilizados neste trabalho, foram classificados de acordo com a Classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), havendo predominância dos linfomas de grau alto

(72,5%) em relação aos linfomas de grau baixo (27,5%). Este resultado é semelhante ao obtido nos trabalhos que utilizaram esta mesma classificação em material colhido pelo método da Punção Aspirativa por Agulha Fina (TESKE & VAN HEERDER, 1996; SUZANO, 2004), ou material incluído em parafina (APPELBAUM et al., 1984; PARODI et al., 1988; GREENLEE et al., 1990; TESKE 1994; FURNEL-FLEURY et al., 1997).

No que diz respeito à determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos, o emprego dos anticorpos CD3 e CD79a, marcadores de células T e células B, respectivamente, tem permitido que esta determinação seja feita em material fixado em formol e incluído em parafina (MILNER et al., 1996; DE MOURA, 2000; PESSOA, 2005). A classificação imunocitoquímica dos linfomas torna-se um procedimento importante na medida em que auxilia na definição do comportamento clínico da neoplasia e sua resposta ao tratamento quimioterápico (TESKE et al., 1994a; TESKE et al., 1994b, FURNEL-FLEURY et al., 1994; FISHER et al., 1995; FURNEL-FLEURY et al., 1997; DOBSON et al., 2001 e FURNEL-FLEURY et al., 2002). Os cães portadores de Linfomas T respondem menos ao tratamento quimioterápico e têm tempo de sobrevivência menor do que os cães portadores de Linfomas B (DOBSON et al., 2001).

Na casuística utilizada neste trabalho foram utilizados 17 casos de linfoma que apresentaram imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e 17 casos que apresentaram imunofenótipo B (CD3-/CD79a+), e três linfomas de imunofenótipo T/B (CD3+/CD79+).

Quando analisada a marcação com Ki-67 para proliferação celular, pudemos notar diferença significativa dos índices de proliferação entre os grupos de alto grau e baixo grau de malignidade e este resultado concorda com a literatura, tanto para linfomas caninos como linfomas não-Hodgkin dos seres humanos (KIPEL et al., 1999; FURNEL-FLEURY et al., 1997; PHILLIPS et al., 2000; WANG et al., 2005; MADEWELL, 2001).

Furnel-Fleury et al., em 1997, analisando 92 casos de linfomas caninos, observaram que os linfomas de baixo grau de malignidade possuíam índices de proliferação entre 3 e 16% e os de grau alto, entre 39 e 60%. Levando em consideração estas taxas de proliferação, os autores estabeleceram um percentual de 21% como o limite entre os tumores de alto grau e de baixo grau de malignidade. No presente trabalho, a variação da proliferação entre os linfomas de baixo estava entre 1,67 e 34,5% e considerando os de alto grau, esta variou entre 24,4 e 80,53%. Ainda no mesmo trabalho, os autores relatam que dentre os linfomas de baixo grau, dois casos, apresentaram média maior que os 21%, sendo o maior, um linfoma Centrocítico com 30% de células positivas para o marcador Ki-67. Todos os linfomas de alto grau apresentaram índice proliferativo maior que o limite de 21%. Utilizando esta taxa de 21% como parâmetro para dividir as neoplasias de acordo com o grau de malignidade, obtivemos 3 casos de baixo grau com percentual maior que o limite, sendo o maior também um linfoma Centrocítico com 34,5% de células marcadas e todos os de alto grau apresentaram o índice de proliferação maior que 21%, sendo o menor, com 24,4% um linfoma Imunoblástico.

Este mesmo parâmetro de percentual de células em proliferação de divisão dos linfomas foi estabelecido nos seres humanos em diversos trabalhos com valores de 20%, 25% e 26% determinados por Hall et al., (1988), Schrape et al., (1987) e Gerdes et al., em 1984, respectivamente.

Os valores observados, na literatura consultada, para os índices proliferativos demonstram que em alguns tipos citológicos podem ocorrer discrepâncias quanto a este parâmetro e, portanto, somente a classificação cito-histológica dos linfomas pode não estabelecer o padrão de comportamento da neoplasia. Os linfomas de alto grau de malignidade, humanos e caninos, com um alto índice de proliferação celular tendem a responder melhor a quimioterapia (FOUNEL-FLEURY et al., 1997; PHILLIPS et al., 2000). Assim sendo, os índices proliferativos devem ser considerados, principalmente, na análise de casos individuais da rotina de diagnóstico.

Em nosso estudo, a média de número de AgNORs intranuclear nos linfomas de alto grau de malignidade foi estatisticamente maior que nos linfomas de baixo grau, o que corrobora os dados presentes na literatura consultada (CROKER et al., 1987; VAIL et al., 1996; VALDOVICH et al., 2004).

Embora o número maior de AgNORs nos linfomas de alto grau de malignidade que nos de baixo grau concorde com vários autores, as médias encontradas no presente trabalho foram mais baixas que as da literatura consultada. Os linfomas de baixo grau apresentaram uma média de $0,98 \pm 0,36$ e os de alto grau, $1,37 \pm 0,32$. Croker et al., em 1987, utilizando o mesmo tipo de material, encontraram para os linfomas de baixo grau, um AgNOR por núcleo em média e nos de alto grau, cinco AgNORS por núcleo. Já Valdovich e et al., em 2004, usando tanto material histológico como citológico para contagem dos AgNORs obtiveram nas amostras histológicas, a variação foi de 2,2 a 3,0 nos linfomas de baixo grau e 2,6 a 3,7 nos de alto grau. Estes mesmos autores relatam que estas diferenças nas médias de diversos trabalhos podem ocorrer devido a alterações durante o processamento desde a fixação do material, processamento histológico até mesmo durante a coloração pela prata. A técnica AgNOR utilizada para os linfomas deste estudo seguiu o mesmo padrão descrito por diversos autores. No entanto, os tempos de fixação do material, desparafinização e desidratação não foram padronizados naqueles casos resgatados do arquivo. Estas variações podem interferir na impregnação da prata, formando grandes agregados ao invés de pequenos pontos, isso leva a um excesso de prata intranuclear e reduz o número de pontos contados nos núcleos interferindo na média de AgNORs (VALDOVICH et al., 2004).

Quando comparados os resultados deste trabalho com outro realizado no mesmo laboratório por Pessoa em 2005, também nota-se que mesmo havendo diferenças entre os graus de malignidade, as médias deste autor foram maiores que no presente estudo. Esta diferença pode se dever ao tipo de material utilizado por Pessoa (2005), que utilizou amostras colhidas por meio de citologia aspirativa. Valdovich et al., em 2004, que utilizaram amostras citológicas e histológicas dos mesmos casos, obtiveram números maiores de AgNORs nos exames citológicos. De acordo com estes autores, as células nas amostras citológicas apresentam-se íntegras e não fatiadas pelo micrótomo como nas preparações histológicas, por isso o número de AgNORs seria maior e os NORs pequenos seriam mais facilmente reconhecidos. Mesmo assim, o método de contagem do AgNORs, é um método eficaz na determinação do grau de malignidade dos linfomas caninos, tanto nas amostras histológicas como naquelas colhidas pela citologia aspirativa.

Segundo CROKER et al.(1987), os linfomas Centrobásticos apresentam a maior média no número de AgNORs. No presente trabalho, os tipos de neoplasia que mostraram as maiores quantidades de pontos intranucleares foram os linfomas Imunoblásticos, seguidos pelos Centrobásticos.

Amostras de linfonodos normais ou reativos mostram agregados de forma homogênea dentro do nucléolo com cada nucléolo apresentando apenas um NOR, o que corresponde ao padrão I, sendo o padrão II, caracterizado pela presença de vários agregados somente dentro do nucléolo, observado em cerca de 80% das neoplasias (VALDOVICH et al., 2004). O padrão de distribuição encontrado em todos os casos de linfoma nesta pesquisa, corresponde ao tipo II. LORAND-METZE & METZE (1996), verificaram, estudando pacientes com leucemias crônicas, que o prognóstico de leucemia progressiva estava relacionado com um número maior de aglomerados de NORs, pois as amostras com NORs únicos correspondiam aos pacientes considerados estáveis. O número de AgNORs nas células malignas é maior que nas hiperplásicas ou benignas e está associado com a alta taxa de proliferação celular (CROKER et al., 1987; TRERÈ 1994; DERENZINI & PLOTON, 1991; RABENHORST et al., 1994; VALDOVICH et al., 2004).

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o método de AgNOR e a expressão da proteína Ki-67 (MIB-1) permitem estabelecer o índice proliferativo dos linfomas caninos e tem relação com os graus das neoplasias determinados pela classificação de Kiel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. Manual de Imuno-histoquímica. 1 ed. São Paulo: sociedade Brasileira de Patologia., 1999, 270p.
- APPELBAUM, F.R.; SALE, G.E.; STORB, R.; CHARRIER, K.; DEEG, H.J.; GRAHAM, T.; WULFF, J.C. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. *Hematol. Oncol.*, v.2, p.151-168, 1984.
- CAPURRO, C.; BURACCO, P.; ROSSI, L. Lymphoma in Dogs . *Europ. J. Com. An. Pract.* v.4, p.15-29, 1992.
- CROKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* v. 151, p. 111-118, 1987.
- CROCKER, J., BOLDY, D.A., EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J. Pathology*, v. 158, p. 185-188, 1988
- DE MOURA, V.M.B.D. Classificação Citohistológica e Imunofenotipagem dos Linfomas Caninos. Botucatu, 2000. 107p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.
- DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Review Intern. Exp. Pathol.* v.32, p. 149-192, 1991.
- DOBSON, J.M.; BLACKWOOD, L.B.; MCINNES, E.F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T.M.; TOM, B.D.M. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J. Small Anim. Pract.* v.42, p. 377-384, 2001.
- FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; CHABANNE, L.; GHERNATI, I., MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of Ki-67 antigen. *J. Comp. Path.* v.117, n.1, p.61-72, 1997.

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 Lymphoma: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.* v.32, p.92-109, 2002.

GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRMER, I.; KLOTH, S.; BRANT, E.; FLAD, H.D. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* v.138, p.867-873, 1991.

GREENLEE, P.G.; FILIPPA, D.A.; QUIMBY, F.W. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic and clinical study. *Cancer.* v.66, p.480-490, 1990.

HALL, P.A.; RICHARDS, M.A.; GREGORY, W.M.; D'ARDENNE, A.J.; LISTER, T.A. STANSFIELD, A.G. The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Pathol.* v.154, p.223-235, 1988

LENNERT, K.; FELLER, A.C. *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990, 312p.

MADEWELL, B.R. Cellular Proliferation in Tumors: A Review of Methods, Interpretation, and Clinical Applications. *J. Vet. Intern. Med.* v.15, p.334-340, 2001.

MILNER, R.J.; PEARSON, J.; NESBITT, J.W.; CLOSE, P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *Onderstepoort J. Vet. Res.* v.63, p.309-313, 1996.

PARODI, A.L.; DARGENT, F.; CRESPEAU, F. Histological classification of canine malignant lymphomas. *J. Vet. Med. – A Animal Physiology, Pathology and Clinical Veterinary Medicine.* v.35, p.178-192, 1988.

PESSOA, A.W.P. *Classificação Citohistológica, Imunoistoquímica, Lesão de DNA, Morfometria e Índice de proliferação celular nos linfomas caninos* Botucatu, 2005. 187p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.

PHILLIPS B.S.; KASS P.H.; NAYDAN D.K.; WINTHROP M.D.; GRIFFEY S.M.; MADEWELL B.R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* v.12, n.2, p.111-117, 2000.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* v.18, p.5-14, 1986.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHIMITT, F.C.L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Res. Brás. Cancerol.* v.40, p. 3, p. 141-147, 1994.

ROESL S, S.; TILMANT, R.; DUCATELLE R. PCNA and KI-67 Proliferation Markers as Criteria for Prediction of Clinical Behaviour of Melanocytic Tumours in Cats and Dogs. *J. Comp. Pathol.* v.121, p.13-24, 1999.

SUZANO, S.M.C. *Classificação Citológica e Imunocitoquímica dos Linfomas Caninos*. Botucatu, 2004. 110p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

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

TESKE, E.; HEERDE, P.; RUTTEMAN, G.R.; KURZMAN, I.D.; MOORE, P.F.; MACWEN, E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *JAVMA*, v.205, n.12. p.1722-1728, 1994b.

TESKE, E.; Van HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. *The Veterinary Quarterly*, v.18, n.3, p.112-115, 1996

TRERÈ, D. AgNORs staining and quantification. *Micron*. v.31, p.127-131, 2000.

VAIL D.M.; KISSEBERTH, W.C.; OBRADOVICH J.E.; MOORE, F.M. Assessment of potential doubling time (T_{pot}), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp. Haematol.* v.24, p. 807-8015, 1996.

VALDOVICH, P.; PSÁDER, R.; TÓTH, Z.A.; PERGE E. Use of the Nucleolar Region Method for Cytologic and Histologic Examination of the Lymph Nodes in Dogs. *Vet. Pathol.* v.41, p.338-345, 2004.

VONDERHAAR, M.A.; MORRISON, W.B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W.B. *Cancer in dogs and cats*. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1998. p.667-695.

WANG, S.A.; WANG, L.; HOCHBERG, E.P.; MUZIKANSKY, A.; HARRIS, N.L.; HASSERJIAN, R.P. Low Histologic Grade Follicular Lymphoma with High Proliferation Index: Morphologic and Clinical Features. *Am. J. Surg. Pathol.* v.29, p. 1490-1496, 2005.

São Paulo, 30 de Março de 2007.

Prezado Autor

Recebemos o artigo intitulado **“Proliferação Celular nos Linfomas Caninos (Proliferation in Canine Lymphoma)”**.

de autoria de **“Sara Maria de Carvalho e Suzano, Júlio Lopes Siqueira, Adriana**

Wanderley de Pinto Pessoa, Camila Dias Porto, Deilson Elgui de Oliveira”.

de Artigo completo, cadastrado com o número **037/07**.

Qualquer informação a respeito deste artigo pode ser solicitada diretamente à Seção de Publicação da FMVZ/USP, com as funcionárias da FUMVET, Sra. Vânia de Almeida dos Santos e ou Cristiane Santos Torralba Orbêa
Telefones: 011 – 3091 – 7636/ 1230

Pelos e-mails: vania@fumvet.com.br, cristiane@fumvet.com.br

Atenciosamente,

*Cristiane Santos Torralba Orbea
Secretária da Seção de Publicação do periódico
Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science
Fones: 55 11 3091 7636/1230
Fax: 55 11 3091 1231*