

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA E IMUNOMARCAÇÃO DO  
FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR  
NO PROGNÓSTICO DOS LINFOMAS CANINOS**

**Sabrina Marin Rodigheri**  
Médica Veterinária

Jaboticabal – São Paulo - Brasil  
2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA E IMUNOMARCAÇÃO DO  
FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR  
NO PROGNÓSTICO DOS LINFOMAS CANINOS**

**Sabrina Marin Rodigheri**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck  
Co-orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal – São Paulo - Brasil  
Fevereiro de 2008

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**SABRINA MARIN RODIGHERI** – nascida em 19 de janeiro de 1978, na cidade de Suzano/SP, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR, em março de 1999, concluindo-o em março de 2004. Em fevereiro de 2004, ingressou no Programa de Residência em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais de Companhia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR), Curitiba/PR, concluindo-o em janeiro de 2006. Iniciou no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, em março de 2006.

Dedico esse trabalho a minha mãe,  
mestre no amor incondicional  
e meu eterno porto seguro.

Ao meu pai:  
“Feliz daquele que junto a ti teve a oportunidade  
de assimilar o magnífico sentido de viver”

## AGRADECIMENTOS

À minha família, mãe, irmãs, cunhados e sobrinhos, que apesar da distância, mantiveram-se sempre presentes, incentivando e apoiando todas as minhas decisões. Amores da minha vida, sem vocês nada disso seria possível !!!

Ao amigo Paulo Alves de Oliveira, que esteve por perto nos momentos mais difíceis, com palavras de conforto, abraços apertados, votos de confiança e com “aquela ajudinha” que me possibilitou seguir em frente.

Ao meu orientador, Professor Carlos Roberto Daleck, pela oportunidade, confiança e compreensão. Agradeço também às críticas e aos elogios, ambos extremamente importantes na vida de quem começa a trilhar um novo caminho.

À minha co-orientadora, Professora Renée Laufer Amorim, por nos receber de abraços abertos no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, em Botucatu. Muito obrigada por nos proporcionar dias de trabalho cercados de bom humor e extremo profissionalismo. Agradeço pelo seu carinho, confiança e imensa colaboração nesse projeto.

Agradeço também ao Professor Júlio Lopes Sequeira, pelos ensinamentos, atenção e inestimável ajuda nas avaliações histopatológicas. Aos residentes e pós-graduandos do Serviço de Patologia Veterinária, FMVZ-UNESP/Campus de Botucatu, muito obrigada pelo carinho e colaboração.

Aos queridos amigos do Serviço de Oncologia Veterinária, Jane, Andrigo, João Humberto, Fábio e Milena, muito obrigada pelo companherismo e pelos maravilhosos dias que passamos juntos. Sem dúvida, todos sempre terão um lugar muito especial no meu coração.

Às minhas novas irmãs, Sabryna e Simone, grandes companheiras de risos e choros, de muita conversa e de valiosos momentos de silêncio. Nesse período chegamos até a perder a nossa identidade, Sabrina foi Simone e Simone Sabrina. Minhas queridas amigas, eu simplesmente quero dizer: muito obrigada por tudo !!!! Amo vocês !!!

Às amigas, Thais, Thais, Jana, Carol e Carol que souberam entender que verdadeiras amizades apenas se fortalecem com a distância. Aos eternos mestres, Marconi Farias e Felipe Wouk, muito obrigada pela amizade, carinho e pelos constantes votos de confiança.

Daniel, Soraia, Kellen, Juliana, Malu, Durva, Viúva, Ricardo, Tati, Rosana, Bozo, Carmem, entre outros novos amigos de Jaboticabal, muito obrigada pelos ótimos momentos que passamos juntos. Márcio Brunetto, muito obrigada pela sua amizade, carinho e dedicação com a estatística !!!

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica, pela paciência e ajuda na realização dos exames laboratoriais.

Ao senhor Orandir, técnico do Laboratório de Histologia, pela simpatia e inestimável colaboração durante o processamento das amostras.

À Professora Rosângela Zacarias Machado e a pós-graduanda Cibele, do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária, que se dispuseram prontamente a colaborar na realização do teste de ELISA.

Aos residentes, pós-graduandos e funcionários do Hospital Veterinário, pelo companheirismo e pela luta diária a favor de uma melhor qualidade de vida aos nossos animais.

Aos proprietários e cães que participaram deste trabalho, pela colaboração, parceria e compreensão. Ao querido Skol, que trouxe muito amor e alegria à República Nutronco durante os inesquecíveis seis meses que esteve conosco. Draco, Esponja, Cocada e Paçoca, sempre estarão no meu coração. Aos meus gatos queridos, que mesmo com a distância mantiveram seu amor e fidelidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e do auxílio financeiro que possibilitaram a realização dessa pesquisa.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 LINFOMA CANINO .....	2
2.2 ANGIOGÊNESE .....	7
2.3 A ANGIOGÊNESE NO LINFOMA .....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	13
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	13
3.2.1 Grupo I .....	13
3.2.2 Grupo II .....	14
3.3 COLHEITA DE MATERIAL .....	15
3.3.1 Sangue .....	15
3.3.2 Amostra tecidual .....	15
3.4 EXAMES LABORATORIAIS . .....	16
3.4.1 Hemograma .....	16
3.4.2 Bioquímica sérica .....	16
3.4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	16
3.4.4 Histopatológico .....	16
3.4.5 Imunoistoquímica .....	17
3.4.5.1 Imunofenótipo .....	18



3.4.5.2 Expressão do VEGF .....	18
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Dados epidemiológicos .....	21
4.2 Hemograma e bioquímica sérica .....	22
4.3 Estadiamento .....	25
4.4 Grau Histológico .....	27
4.5 Imunofenótipo .....	29
4.6 Concentração sérica do VEGF .....	31
4.7 Expressão do VEGF .....	32
4.8 Sobrevida .....	33
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
5.1 Dados clínicos .....	38
5.2 Classificação morfológica e imunofenotípica .....	42
5.3 Fator de crescimento do endotélio vascular .....	44
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>Apêndices</b> .....	<b>58</b>
A – TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) .....	59
B – TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA .....	62
C – SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA .....	66
D - DADOS INDIVIDUAIS DE CÃES SADIOS E DE CÃES COM LINFOMA .....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos. Citada por VANDERHAAR & MORRISON (2002) .....	3
Tabela 2.	Estadiamento dos Linfomas Caninos proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Citado por GREENLEE et al. (1990).....	3
Tabela 3.	Sistema “Kiel” proposto para Classificação Histopatológica dos Linfomas Caninos. Citado por GREENLEE et al. (1990).....	5
Tabela 4.	Protocolo Quimioterápico da Universidade de Madison-Wisconsin (L-VCA-UW/Short) estabelecido para os Linfomas Caninos. Citado por VAIL & YOUNG (2007) .....	14
Tabela 5.	Relação dos anticorpos primários, clone, código, marca e diluição utilizada na técnica de imunistoquímica realizada em cortes de linfonodos de cães saudáveis e de linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....	17
Tabela 6.	Pontuação atribuída ao percentual de células marcadas por campo, em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....	19
Tabela 7.	Pontuação atribuída à intensidade de coloração das células marcadas por campo, em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....	19

Tabela 8.	Contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito e contagens de plaquetas de cães sadios e de cães com linfoma (FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP, 2007).....	23
Tabela 9.	Contagens ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de leucócitos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes e segmentados (NB e NS), linfócitos e monócitos de cães sadios e de cães com linfoma (FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP, 2007).....	24
Tabela 10.	Valores individuais das atividades séricas (UI/dL) de alanina aminotransferase (ALT) e do teor de creatinina (mg/dL) no soro sanguíneo de cães sadios e de cães com linfoma (FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP, 2007).....	25
Tabela 1D.	Dados individuais referentes a epidemiologia, estadiamento, grau histológico, morfologia celular, imunofenótipo e a sobrevida de cães com linfoma (FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP, 2007).....	67
Tabela 2D.	Valores individuais referentes às concentrações séricas (pg/mL) e a expressão do VEGF em cães sadios e cães com linfoma (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....	68

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Esquema simplificado da maturação linfocitária. Adaptado de PARODI et al. (1988).....4
- Figura 2. Desenho ilustrativo que evidencia a participação do VEGF-A e do VEGF-C na angiogênese e linfangiogênese tumoral, bem como de diferentes citocinas e mediadores inflamatórios presentes no microambiente tumoral. Adaptado de RUEGG (2007).....10
- Figura 3. Método de graduação para determinar o percentual de imunomarcagem para VEGF em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....18
- Figura 4. Distribuição da localização anatômica dos linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....21
- Figura 5. Cão da raça Boxer, macho, quatro anos de idade, apresentando linfoma multicêntrico caracterizado por linfadenomegalia generalizada (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....22
- Figura 6. Distribuição do estadiamento (1 – 5) e sub-estadiamento (a – b) dos linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....26
- Figura 7. Grau histológico dos linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....27
- Figura 8. Fotomicrografia de linfoma anaplásico de alto grau de malignidade. Infiltrado de linfócitos grandes e indiferenciados. Hematoxilina-

	Eosina, aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007).....	28
Figura 9.	Fotomicrografia de linfoma centrocítico de baixo grau de malignidade. Infiltrado de linfócitos pequenos, com núcleo irregular e citoplasma escasso. Hematoxilina-Eosina, aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007).....	28
Figura 10.	Imunofenótipo dos linfomas caninos (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....	29
Figura 11.	Fotomicrografia de linfoma de células T. Positividade para o anticorpo primário anti-CD3. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007).....	30
Figura 12.	Fotomicrografia de linfoma de células B. Positividade para o anticorpo primário anti-CD79a. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007).....	30
Figura 13.	Sobrevida dos cães com linfoma tratados com poliquimioterapia sistêmica baseada no protocolo da Universidade de Madison-Wisconsin. Nota-se uma elevada incidência de óbitos precoces (FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP, 2007).....	31
Figura 14.	Distribuição das médias das concentrações séricas do VEGF em cães saudáveis e cães com linfoma. Note que a média das concentrações séricas de VEGF é superior em cães com linfoma (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....	32

- Figura 15. Distribuição das médias dos escores de imunorreatividade do VEGF em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos. Note que a média de imunomarcção para VEGF é superior em cães com linfoma (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).....33
- Figura 16. Linfonodo de cão saudável. Positividade para o anticorpo primário anti-VEGF em menos de 25% dos linfócitos, caracterizando escore 1. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal,2007).....35
- Figura 17. Linfonodo de cão saudável. Moderada imunomarcção para VEGF em mais de 50% dos linfócitos, caracterizando escore 6. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007).....35
- Figura 18. Linfoma canino. Moderada imunomarcção para VEGF em mais de 75% dos linfócitos neoplásicos, caracterizando escore 8. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007).....36
- Figura 19. Linfoma canino. Forte imunomarcção para VEGF em mais de 75% dos linfócitos neoplásicos, caracterizando escore 12. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes (FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007).....36
- Figura 20. Linfoma alimentar em cão da raça Pit Bull caracterizado por linfadenomegalia mesentérica e presença de neoformação tumoral em intestino delgado (A). Fotomicrografia de amostra intestinal revelando infiltrado de linfócitos pequenos, com núcleo arredondado e citoplasma escasso, caracterizando um linfoma linfoblástico de alto

grau de malignidade (HE, 400x) (B). Imunomarcção de linfócitos B neoplásicos com o anticorpo primário anti-CD79a (IHQ, 100x) (C). Forte imunomarcção para VEGF em mais de 75% dos linfócitos neoplásicos (IHQ, 400x) (D).....37

## **CONCENTRAÇÃO SÉRICA E IMUNOMARCAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR NO PROGNÓSTICO DOS LINFOMAS CANINOS**

**RESUMO:** A angiogênese tem importante participação na patogênese das neoplasias malignas em seres humanos e animais de companhia. Estudos envolvendo a influência dos fatores pró-angiogênicos no crescimento e disseminação dos tumores sólidos têm sido amplamente realizados, porém os relacionados às neoplasias hematopoiéticas são extremamente limitados. O presente estudo objetivou investigar o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) nos linfomas caninos e sua relação com indicadores prognósticos da neoplasia. Foram avaliados 25 cães, sendo 10 sadios e 15 com linfoma. Os pacientes foram submetidos à coleta de sangue para mensuração da concentração sérica do VEGF, mediante ensaio imunoenzimático (ELISA), e biópsia de linfonodo ou de tecido neoplásico para avaliação da expressão do VEGF, pela técnica de imunistoquímica. Embora a média das concentrações séricas do VEGF nos cães com linfoma ( $88,51 \pm 121,71$ ) tenha sido superior à média dos cães sadios ( $17,93 \pm 23,34$ ), estes valores não foram considerados significativos ( $p=0,10$ ). A imunomarcagem para VEGF foi maior ( $p<0,0001$ ) em cães com linfoma ( $9,07 \pm 2,34$ ) em comparação com os cães sadios ( $2,70 \pm 2,35$ ). Não houve correlação significativa entre a concentração sérica e a marcação imunistoquímica do VEGF com a localização anatômica, estágio e sub-estádio clínico, grau histológico, imunofenótipo e a sobrevida dos cães com linfoma. O sub-estádio clínico influenciou negativamente na sobrevida dos cães com linfoma. Os resultados obtidos permitem concluir que o VEGF possui grande importância no comportamento biológico dos linfomas caninos, seja mediante estímulo da angiogênese ou da linfangiogênese tumoral. São necessários estudos com maior número de animais para determinar o valor prognóstico do estímulo à angiogênese ou linfangiogênese nos linfomas caninos.

**Palavras-chave:** angiogênese, linfoma, cão, VEGF, ELISA, imunistoquímica.



## SERUM CONCENTRATIONS AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR LABELING IN PROGNOSIS OF CANINE LYMPHOMAS

**ABSTRACT:** Angiogenesis has a major role in the pathogenesis of malignancies in human beings and companion animals. Studies involving the role of pro-angiogenic factors in growing and dissemination of solid tumors are commonly performed, but studies involving hematological malignancies are relatively limited. The present report aims to investigate the role of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in canine lymphomas and its relation with prognostic factors. Twenty five dogs were evaluated: ten healthy dogs and fifteen dogs with lymphoma. Patients were submitted to blood sample collection to VEGF serum concentration measure, by means of sandwich enzyme immunoassay. Lymph node or neoplastic tissue biopsy was accomplished in order to evaluate VEGF expression, through immunohistochemical technique. Although VEGF serum concentrations mean in dogs with lymphoma ( $88,51 \pm 121,71$ ) was found to be greater than VEGF serum concentrations in healthy dogs ( $17,93 \pm 23,34$ ), this values were not statistically significant ( $p=0,10$ ). VEGF expression was significantly higher ( $p=0,0001$ ) in dogs with lymphoma ( $9,07 \pm 2,34$ ) than VEGF expression in healthy dogs ( $2,70 \pm 2,35$ ). No significant relationship was found between VEGF serum concentration or expression and anatomical localization, clinical stage, histological grade, immunophenotype or overall survival of lymphoma affected dogs. The clinical sub-stage was the only negative prognostic factor in overall survival of dogs with lymphoma. We conclude that VEGF has an important role in biological behavior of canine lymphomas, once is involved in tumoral angiogenesis or lymphangiogenesis stimuli. Larger series of animals are needed to determine the prognostic value of angiogenesis and lymphangiogenesis in canine lymphomas.

**Keywords:** angiogenesis, lymphoma, dog, VEGF, ELISA, imunohistochemistry

## 1. INTRODUÇÃO

Linfomas são neoplasias comumente diagnosticadas no cão, sendo responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade na espécie. A localização anatômica, o estadiamento clínico, o grau histológico e o imunofenótipo dos linfomas caninos representam importantes fatores prognósticos da neoplasia e são considerados parâmetros fundamentais para o estabelecimento de terapias efetivas. Estima-se que o tempo médio de vida de um cão portador de linfoma seja de 60 dias sem tratamento quimioterápico, e de 360 dias com a utilização de poliquimioterapia sistêmica. Terapias direcionadas a alvos moleculares específicos, relacionados ao comportamento biológico da neoplasia, são necessárias para aumentar os índices de sobrevida em seres humanos e animais de companhia com linfoma.

Atualmente, a angiogênese representa um dos principais focos de pesquisa relacionados à biologia tumoral na oncologia humana e veterinária, e isto se deve a grande importância da neovascularização no crescimento e disseminação tumoral. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é o principal fator pró-angiogênico. Pesquisas recentes evidenciam tempo de sobrevida mais curto e baixos índices de resposta terapêutica em humanos portadores de tumores sólidos ou neoplasias hematopoiéticas com maior expressão tecidual ou aumento das concentrações séricas de VEGF. Em seres humanos, a utilização terapêutica de anticorpos monoclonais direcionados contra o VEGF tem demonstrado resultados promissores no tratamento de diferentes tipos de câncer.

Tendo em vista a relação do VEGF com a promoção e a progressão do câncer, objetivou-se investigar a concentração sérica e a imunomarcagem do VEGF em cães saudáveis e com linfoma, correlacionando esses parâmetros com a localização anatômica, estágio e sub-estádio clínico, grau histológico, imunofenótipo e tempo de sobrevida após quimioterapia, dos animais afetados pela neoplasia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LINFOMA CANINO

Os linfomas (linfossarcomas ou linfomas malignos) representam um variado grupo de neoplasias decorrentes da expansão clonal de células linforreticulares malignas. Órgãos linfóides primários, como timo e medula óssea, e órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos, são os principais sítios da transformação neoplásica (FAN, 2003; VAIL & YOUNG, 2007). Devido à contínua migração das células linfóides, os linfomas podem se originar em praticamente todos os tecidos do organismo (FAN, 2003).

Os linfomas são neoplasias comumente diagnosticadas no cão, representando 83% dos tumores de origem hematopoiética (VAIL & YOUNG, 2007). Ocorrem mais freqüentemente em animais entre cinco e 11 anos, mas há relatos da doença em cães com menos de um ano de idade (MOULTON & HARVEY, 1990; VAIL & YOUNG, 2007). As raças mais acometidas são Boxer, Rottweiler, Poodle, Beagle, Basset Hound, São Bernardo, Airdale terrier e Bulldog inglês (VONDERHAAR & MORRISON, 2002; DHALIWAL et al., 2003).

A etiologia do linfoma é desconhecida nos cães, mas acredita-se que seja multifatorial. A exposição crônica a campos eletromagnéticos ou a agentes químicos (herbicidas, solventes orgânicos), aberrações cromossômicas e imunossupressão crônica são consideradas causas prováveis (FAN, 2003; DHALIWAL et al., 2003). Além disso, sabe-se que mutações gênicas herdadas ou adquiridas podem levar a ativação de proto-oncogenes e/ou a inativação de genes supressores de tumor, facilitando o desenvolvimento da neoplasia (VAIL & YOUNG, 2007).

O linfoma é classificado quanto a sua localização anatômica em multicêntrico, alimentar, mediastinal, cutâneo e extranodal, sendo a forma multicêntrica a mais freqüente (Tabela 1). Os sinais clínicos associados à neoplasia são variáveis e dependem da sua extensão e localização (VONDERHAAR & MORRISON, 2002; DHALIWAL et al., 2003).

**Tabela 1** – Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos. Citada por VANDERHAAR & MORRISON (2002).

<b>FORMA</b>	<b>LOCALIZAÇÃO</b>
Multicêntrica	Linfonodos periféricos, fígado, baço e/ou medula óssea
Alimentar	Trato gastrointestinal, linfonodos mesentéricos, fígado
Mediastinal	Timo e/ou linfonodos mediastinais
Cutânea	Derme, epiderme e/ou junções mucocutâneas
Extranodal	Rins, olhos, cavidade nasal, sistema nervoso central, coração, ossos, testículos e bexiga.

O estadiamento dos linfomas caninos obedece às regras estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e tem como principal objetivo avaliar a extensão da doença (Tabela 2). É fundamentado em parâmetros clínicos (anamnese e exame físico), laboratoriais (hemograma, urinálise, bioquímica sérica e citologia), exames de diagnóstico por imagem (raio X e ultra-som) e avaliação histopatológica. Em cães, os estádios III, IV e V são os mais freqüentes, em decorrência da inabilidade dos proprietários em identificar os estádios iniciais da doença (VAIL & YOUNG, 2007). Alguns estudos demonstram que os estádios IV e V estão associados a sobrevida mais curta (DHALIWAL et al., 2003).

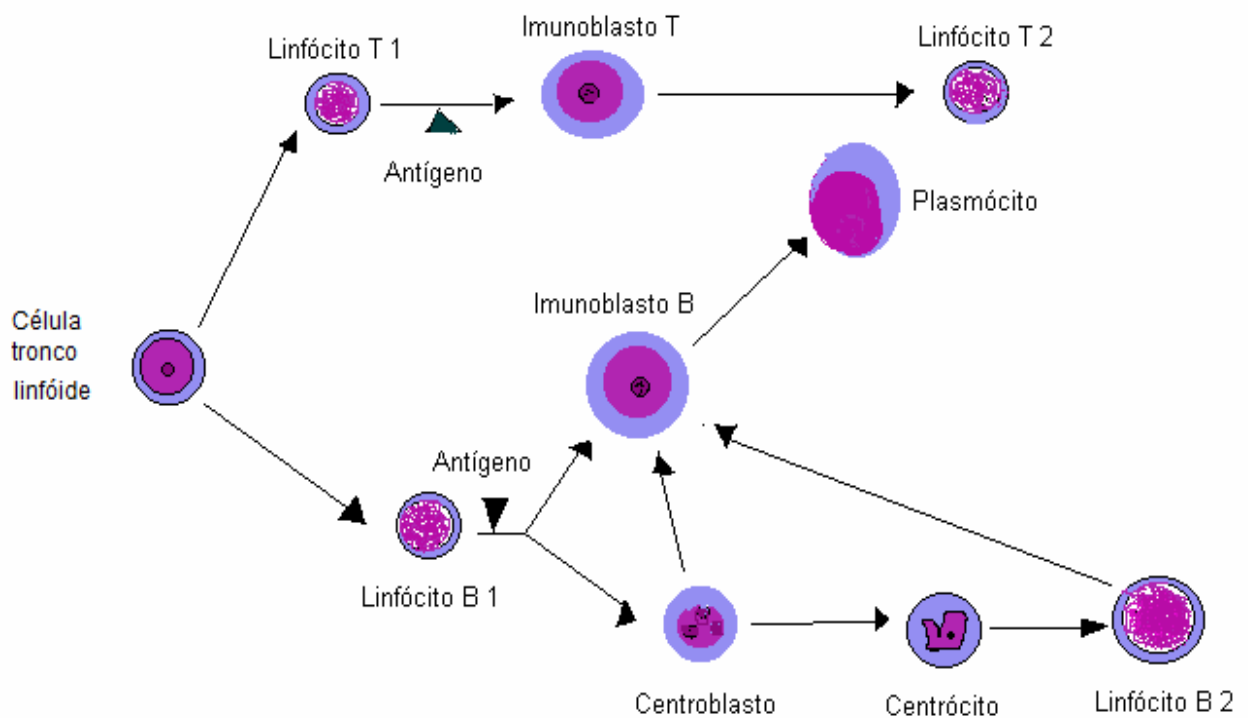
**Tabela 2** – Estadiamento do Linfoma Canino proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Citado por GREENLEE et al. (1990).

<b>ESTÁDIO</b>	<b>CRITÉRIO</b>
I	Envolvimento limitado a um único linfonodo
II	Envolvimento de vários linfonodos regionais
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

Os estádios são divididos em sub-estádios: "a" (sem sinais sistêmicos) ou "b" (com sinais sistêmicos).

Os linfomas são provenientes da expansão clonal de células linfóides com características morfológicas e imunofenotípicas distintas (VAIL & YOUNG, 2007). Como os linfomas caninos apresentam semelhanças com os linfomas não-Hodgkin humanos, esquemas de classificação morfológica utilizados em medicina humana têm sido aplicados com sucesso nos linfomas caninos (GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994; PONCE et al., 2004).

O sistema “Kiel” baseia-se na persistência de analogias morfológicas entre as células neoplásicas e os diferentes estágios de evolução das linhagens de células T e B não neoplásicas, especialmente aquelas que ocorrem durante a ativação imunológica (Figura 1).



**Figura 1** – Esquema simplificado da maturação linfocitária. Adaptado de PARODI et al. (1988).

A morfologia celular (linfocítico, linfoblástico, linfoplasmocítico, centrocítico, centroblástico, imunoblástico), o imunofenótipo (T ou B) e o grau de malignidade (alto ou baixo) são os principais parâmetros avaliados no sistema “Kiel” (PARODI et al., 1988; GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994; KIUPEL et al., 1999; VAIL & YOUNG, 2007) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Sistema “Kiel” proposto para a classificação histopatológica dos linfomas caninos. Citado por GREENLEE et al. (1990).

CATEGORIA	
BAIXO GRAU	ALTO GRAU
Linfocítico	Centroblástico
Linfoplasmocítico	Linfoblástico T
Centrocítico	Linfoblástico B
Centroblástico-Centrocítico	Imunoblástico

Existem poucos estudos correlacionando a morfologia celular com o prognóstico dos linfomas caninos, porém, sabe-se que o grau de malignidade pode ser considerado um indicador prognóstico. Os linfomas de alto grau geralmente apresentam maiores índices de remissão clínica que os de baixo grau. Entretanto, cães com linfoma de baixo grau tendem a apresentar maior tempo de sobrevivência (TESKE, 1994; VONDERHAAR & MORRISON, 2002; VAIL & YOUNG, 2007). A maioria dos estudos relacionados ao grau histológico dos linfomas caninos demonstra que apenas uma pequena porcentagem é de baixo grau (5,3 a 29%) (KIUPEL et al., 1999; VAIL & YOUNG, 2007).

Durante muito tempo a determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos foi dificultada pela falta de marcadores específicos (FERRER et al., 1992). Entretanto, atualmente as técnicas imunoistoquímicas têm sido aplicadas com sucesso em cortes histológicos de tecido incluído em parafina, utilizando o anticorpo policlonal anti-CD3 para marcar linfomas de células T, e o anticorpo

monoclonal anti-mb1 (CD79a) para os linfomas de células B (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; MOURA et al., 2001; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

A avaliação imunofenotípica é fundamental como indicador prognóstico, uma vez que existem diferenças na apresentação clínica, comportamento e resposta terapêutica entre os linfomas de células T e os de células B (KIUPEL et al., 1999). Os linfomas de células T tendem a ser biologicamente mais agressivos, resultando em remissões e tempos de sobrevida mais curtos (FAN, 2003). Aproximadamente 30% dos linfomas caninos têm derivação imunofenotípica de células T (FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

O tratamento dos linfomas baseia-se principalmente em quimioterapia antineoplásica (VONDERHAAR & MORRISON, 2002). A poliquimioterapia é a modalidade terapêutica mais efetiva, sendo a administração de ciclofosfamida, vincristina e prednisona um dos protocolos mais utilizados. Protocolos que incluem fármacos como a doxorrubicina e a l-asparaginase tendem a promover tempo de sobrevida mais longo (VAIL & YOUNG, 2007).

Cães com linfoma que não recebem tratamento quimioterápico apresentam sobrevida média de 60 dias, já os tratados com poliquimioterapia sistêmica podem apresentar até dois anos de sobrevida (MOULTON & HARVEY, 1990; VAIL & YOUNG, 2007). Atualmente, sabe-se que o comportamento biológico dos linfomas tem grande influência na evolução clínica da enfermidade e no tempo de sobrevida do paciente. Desta forma, estudos relacionados à biologia tumoral são fundamentais para o estabelecimento de fatores prognósticos precisos e terapias específicas (VAIL & YOUNG, 2007).

## 2.2 ANGIOGÊNESE

A angiogênese representa a formação de novos vasos sanguíneos a partir de um leito vascular pré-existente. É observada em processos fisiológicos, como embriogênese, proliferação endometrial, cicatrização de feridas, e em processos

patológicos, como artrite reumatóide, retinopatia diabética e neoplasias (CLIFFORD et al., 2001; FERRARA, 2004).

Durante a carcinogênese há um acúmulo progressivo de mutações em diferentes genes, que geram subpopulações celulares com características biológicas específicas. Essa instabilidade genética é responsável pela ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, proliferação celular exacerbada, perda da habilidade celular em sofrer apoptose e produção de fatores de crescimento que auxiliam na promoção e progressão tumoral (CASTRO-JÚNIOR et al., 2006).

O crescimento das neoplasias malignas é condicionado a uma vasculatura adequada. A sobrevivência das células tumorais é dependente de quantidades suficientes de oxigênio e nutrientes, bem como da habilidade celular em eliminar toxinas. Sem o recrutamento de sua própria rede vascular, um tumor não pode exceder dois milímetros de diâmetro (CASTRO-JÚNIOR et al., 2006; CHUN & THAM, 2007). A angiogênese constitui um pré-requisito não apenas para o crescimento contínuo do tumor primário, mas também para a formação de metástases (CHUN & THAM, 2007).

A regulação da angiogênese é um processo complexo resultante do equilíbrio dinâmico entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos. Os principais fatores pró-angiogênicos são o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), a angiopoietina, a angiogenina e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A angiostatina, as heparinases, a endostatina, os interferons e os retinóides são considerados inibidores da angiogênese (GILES et al., 2004; PANDYA et al., 2006). Em condições neoplásicas, os fatores pró-angiogênicos superam os antiangiogênicos, garantindo a angiogênese patológica (CHUM & THAMM, 2007). Os mecanismos pelos quais as células neoplásicas estimulam a angiogênese patológica mimetizam os utilizados pelas células normais na promoção da angiogênese fisiológica. Entretanto, a microvasculatura originária de processos neoplásicos tem sua estrutura, funcionamento e genética alterados, em



comparação a microvasculatura proveniente de condições fisiológicas (CASTRO-JÚNIOR et al., 2006).

Uma cascata de eventos biológicos acompanha o processo de interação entre as células neoplásicas e o microambiente local. Modificações homeostáticas decorrentes de hipóxia e estresse oxidativo ou mecânico atuam como potentes estimulantes da angiogênese tumoral, promovendo a expressão de múltiplos fatores pró-angiogênicos (CASTRO-JÚNIOR et al., 2006). Esses fatores de crescimento podem ser produzidos pelas células tumorais, pelo tecido adjacente ao tumor ou por células inflamatórias presentes no microambiente tumoral, principalmente macrófagos e linfócitos (PANDYA et al., 2006).

O processo de neovascularização tumoral segue as seguintes etapas: produção de fatores de crescimento pró-angiogênicos, ativação das células endoteliais, degradação da matriz extra-celular, migração e proliferação das células endoteliais, adesão celular, reorganização da matriz extra-celular e início do fluxo sanguíneo (CHUN & THAM, 2007).

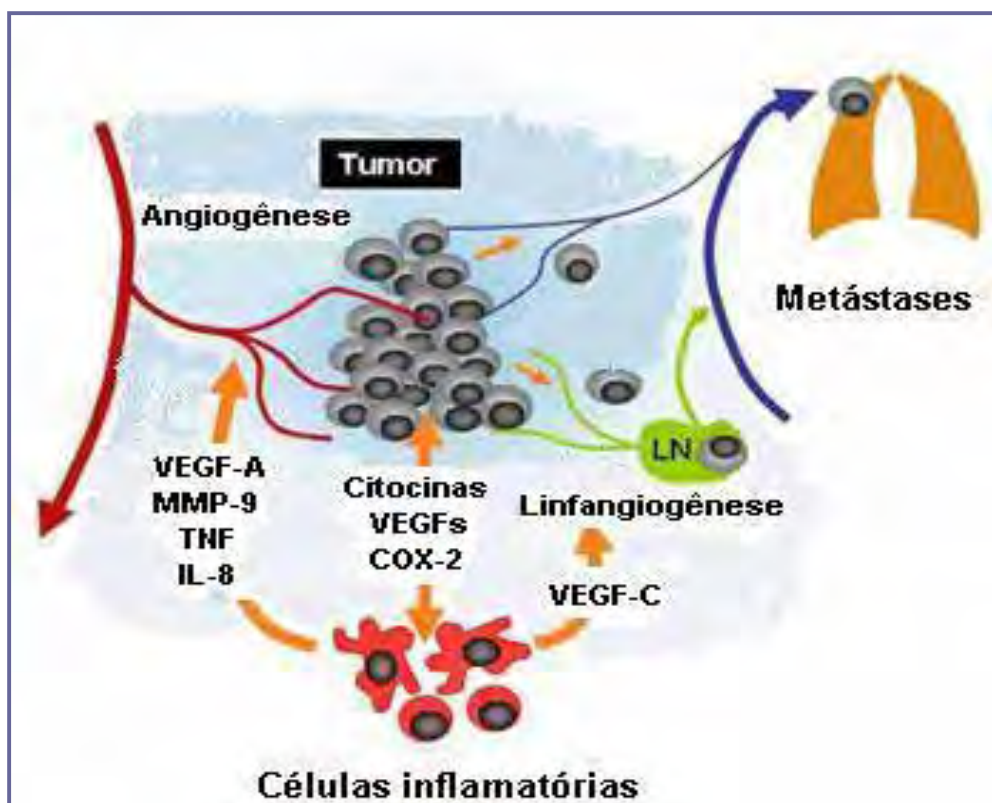
O VEGF foi identificado em 1980 como o fator pró-angiogênico predominante na maioria das neoplasias em seres humanos, sendo inicialmente denominado fator de permeabilidade vascular (PODAK & ANDERSON, 2005). Atualmente, é considerado um dos mais específicos reguladores da angiogênese tumoral (PANDYA et al., 2006). É representado por uma família de fatores de crescimento composta por seis glicoproteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fator de crescimento placentário (PlGF). O VEGF-A é o principal fator de crescimento associado a angiogênese, sendo constituído por seis isoformas distintas, classificadas de acordo com a quantidade de aminoácidos presentes na cadeia protéica (121, 145, 165, 183, 189 ou 206). Estudos recentes sugerem expressão tecidual específica dessas variantes do VEGF em determinadas etapas da angiogênese (FERRARA & DAVIS-SMITH, 1997; FERRARA, 2004).

Os efeitos angiogênicos do VEGF são mediados por suas ligações a receptores celulares específicos presentes nas células endoteliais, incluindo o

VEGFR-1, o VEGFR-2 e o VEGFR-3 (CASTRO-JÚNIOR et al., 2006). Algumas vezes, o VEGF exerce um efeito autócrino mediante estimulação direta das células tumorais (FERRARA, 2004; MILLANTA et al., 2006).

O VEGF é uma glicoproteína multifuncional, uma vez que estimula a atividade mitogênica das células endoteliais, a permeabilidade vascular, a sobrevivência celular e a produção de diferentes moléculas envolvidas no processo de neovascularização. A atuação do VEGF é observada nas células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos (GILES et al., 2004).

Estudos recentes demonstram que a linfangiogênese é tão importante na expansão tumoral quanto a angiogênese. NAGY et al. (2002) revelaram que o VEGF-A participa da linfangiogênese bem como da angiogênese em diferentes neoplasias, e que o VEGF-C e o VEGF-D influenciam na proliferação de vasos linfáticos mediante ativação do VEGFR-3 expresso nas células endoteliais linfáticas. A linfangiogênese tumoral foi associada a expressão do VEGF-C em neoplasias mamárias, carcinomas de células escamosas, mesotelioma e neoplasias pulmonares em seres humanos (KADOWAKI et al., 2005). HIRAKAWA et al. (2007) sugeriram que o VEGF-C não promove o crescimento do tumor primário, porém induz a expansão das redes linfáticas entre os linfonodos sentinelas, favorecendo as metástases e a disseminação tumoral (Figura 2).



**Figura 2** – Desenho ilustrativo que evidencia a participação do VEGF-A e do VEGF-C na angiogênese e linfangiogênese tumoral, bem como de diferentes citocinas e mediadores inflamatórios presentes no microambiente tumoral. Adaptado de RUEGG (2007).

Pesquisas revelam que as concentrações séricas de VEGF são significativamente maiores em seres humanos com diferentes tipos de câncer, incluindo tumores sólidos (carcinomas mamários, prostáticos e colorretais) e malignidades hematopoiéticas (mieloma múltiplo, leucemias e linfomas). Além disso, demonstram que as concentrações séricas elevadas estão associadas a baixos índices de resposta terapêutica e menor tempo de sobrevida (BERTOLINI et al., 1999; FERRARA, 2004).

SCHEIDEGGER et al. (1999) evidenciaram que a estrutura molecular e a função do VEGF humano e canino são idênticas em condições fisiológicas ou patológicas, o que possibilita a utilização dos mesmos métodos diagnósticos e terapêuticos em ambas as espécies.

Em cães, estudos recentes revelam maior expressão do VEGF em neoplasias mamárias malignas (RESTUCCI et al., 2002; MILLANTA et al., 2006), carcinomas espinocelulares (MAIOLINO et al., 2000), seminomas pouco diferenciados (RESTUCCI et al., 2003) e mastocitomas (REBUZZI et al., 2007), sugerindo que a angiogênese pode estar associada ao aumento da proliferação celular, invasão local e metástases. CLIFFORD et al. (2001) evidenciaram elevadas concentrações circulantes de VEGF em cães com hemangiossarcoma.

### 2.3 A ANGIOGÊNESE NO LINFOMA

Embora esteja bem estabelecido que o crescimento de tumores sólidos requer neovascularização vigorosa, a influência da angiogênese no crescimento e sobrevivência de células neoplásicas do sistema hematopoiético foi recentemente reconhecida (BERTOLINI et al. 1999; KOSTER & RAEMAEEKERS, 2005).

Em 1975, autores relataram um caso de linfoma sub-cutâneo mimetizando um neoplasma vascular, devido a extensa telangiectasia desenvolvida ao redor do tumor. Adicionalmente, observaram que fragmentos de linfoma inseridos em camundongos induziam dramática neovascularização, sugerindo a existência de um fator de crescimento produzido pelas células neoplásicas promovendo angiogênese (ORPANA & SALVEN, 2002).

GILES et al. (2004) verificaram níveis séricos elevados de VEGF em pacientes humanos com linfoma sem tratamento quimioterápico. Adicionalmente, constataram que estes níveis eram inferiores durante a quimioterapia e que o tempo de sobrevida foi significativamente maior em pacientes que apresentavam concentração de VEGF abaixo da média, antes do tratamento quimioterápico. Resultados semelhantes foram observados por SALVEN et al. (1997), SALVEN et al. (2000) e NIITSU et al. (2002).

JORGENSEN (2005) avaliou a expressão imunoistoquímica do VEGF em diferentes tipos histológicos de linfoma não-Hodgkin humano, evidenciando maior imunorreatividade em tumores mais agressivos. Outros pesquisadores

constataram correlação entre a expressão do VEGF e alguns fatores prognósticos dos linfomas não-Hodgkin humanos (HAZAR et al., 2003; KORKOLOPOULOU et al., 2005). Esses autores concluíram que a expressão do VEGF pode ser um método efetivo de avaliação do comportamento biológico desse tipo de neoplasia (HAZAR et al., 2003; KORKOLOPOULOU et al., 2005; JORGENSEN, 2005).

Os linfomas cutâneos epiteliotrópicos são caracterizados por curso clínico sub-agudo e baixa resposta terapêutica. MAZUR et al. (2004) verificaram microdensidade vascular aumentada em linfomas epiteliotrópicos, referindo influência da angiogênese no comportamento biológico desta neoplasia e a importância do uso de medicações anti-angiogênicas no tratamento do linfoma cutâneo em seres humanos.

GENTILINI et al. (2005) revelaram que a angiogênese é um importante fator prognóstico em cães com linfoma comparando os valores da concentração sérica de fatores angiogênicos de cães doentes com os valores de cães saudáveis.

O estudo da angiogênese tem recebido muita atenção na medicina, pois representa um alvo terapêutico comum para a grande maioria das neoplasias (LAMONTAGNE, 2005). Procedimentos experimentais baseados na administração de anticorpos anti-VEGF em camundongos com diferentes tipos de câncer têm demonstrado redução do crescimento neoplásico devido ao aumento da apoptose e redução da vascularização e proliferação celular (FERRARA, 2004). Diferentes trabalhos têm demonstrado efeito satisfatório das terapias anti-angiogênicas em neoplasias linfoproliferativas de camundongos e seres humanos (ORPANA & SALVEN, 2002).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram avaliados 25 animais da espécie canina, adultos, com ou sem raça definida, entre machos e fêmeas, distribuídos da seguinte forma:

- Animais com linfoma (grupo I): 15 cães atendidos no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV-UNESP/Jaboticabal), com diagnóstico de linfoma confirmado mediante avaliação citológica e/ou histopatológica.
- Animais sadios (grupo II): 10 cães clinicamente saudáveis, provenientes do Canil Municipal de Sertãozinho/SP.

#### 3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

##### 3.2.1 Grupo I

Os cães do grupo I foram submetidos aos exames de rotina realizados pelo Serviço de Oncologia Veterinária em pacientes com linfoma objetivando o estadiamento da neoplasia, conforme protocolo proposto pela Organização Mundial da Saúde. Estes exames incluíram hemograma, avaliação bioquímica sérica, radiografia torácica (incidências látero-lateral e ventro-dorsal) e ultrasonografia abdominal. Citologia aspirativa da medula óssea foi realizada em cães que apresentaram alterações hematológicas sugestivas de linfoma leucêmico.

Durante a avaliação clínica dos animais, além de coletados dados sobre raça, sexo e idade, foi procedida a classificação do linfoma quanto a sua localização anatômica (multicêntrico, alimentar, mediastinal, cutâneo ou extra-nodal).

Adicionalmente, os 15 animais foram submetidos à coleta de sangue para mensuração da concentração sérica de VEGF, como também à biópsia incisional da neoplasia para determinação do grau histológico, do imunofenótipo e da imunomarcação de VEGF.

Após a realização dos exames e colheita das amostras, todos os animais foram submetidos à quimioterapia antineoplásica baseada no protocolo de Madison-Wisconsin (L-VCA-UW/Short) (Tabela 4) e monitorados quanto ao tempo de sobrevida.

**Tabela 4** – Protocolo Quimioterápico da Universidade de Madison - Wisconsin (LVCA – UW / Short) estabelecido para os Linfomas Caninos. Citado por VAIL & YOUNG (2007).

SEMANA	QUIMIOTERÁPICO	DOSE E VIA DE ADMINISTRAÇÃO
1	L-Asparaginase Vincristina Prednisona	400 UI/Kg – IM 0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV 2 mg/kg - VO
2	Ciclofosfamida Prednisona	250 mg/m <sup>2</sup> - VO 1,5 mg/kg - VO
3	Vincristina Prednisona	0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV 1 mg/kg - VO
4	Doxorrubicina Prednisona	30 mg/m <sup>2</sup> - IV 0,5 mg/kg - VO
6	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV
7	Ciclofosfamida	250 mg/m <sup>2</sup> - VO
8	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV
9	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> - IV
11	Ciclofosfamida	0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV
13	Vincristina	250 mg/m <sup>2</sup> - VO
15	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV
17	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> - IV
19	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV
21	Ciclofosfamida	250 mg/m <sup>2</sup> - VO
23	Vincristina	0,7 mg/m <sup>2</sup> - IV
25	Doxorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> - IV

O tratamento é interrompido após a 25ª semana se houver remissão completa da neoplasia  
IM= intramuscular; IV= intravenosa; SC= subcutânea

### 3.2.2 Grupo II

Os animais do grupo II foram submetidos a exame físico completo e coleta de sangue para hemograma e avaliação bioquímica sérica objetivando a exclusão de enfermidades sistêmicas. O soro de cada animal foi reservado para mensuração da concentração sérica de VEGF. Adicionalmente, foi realizada biópsia excisional do linfonodo inguinal de todos os cães para avaliar a imunexpressão de VEGF em tecido linfóide não neoplásico.

### 3.3 COLHEITA DE MATERIAL

#### 3.3.1 Sangue

Foram obtidos 10mL de sangue/cão (grupo I e grupo II), mediante venipunção jugular utilizando seringas e agulhas descartáveis. Foi adicionado anticoagulante ácido etileno-diamino tetracético dissódico (EDTA) em 1mL de cada amostra para a confecção do hemograma. A fração restante da amostra sem anticoagulante foi mantida em tubos de ensaio, em repouso à temperatura ambiente, até a coagulação e retração do coágulo, sendo posteriormente centrifugada a 800G, durante 10 minutos, para obtenção do soro. Parte foi utilizada para a avaliação bioquímica sérica e o restante foi congelado a -20°C, durante quatro a 10 meses, para mensuração da concentração sérica de VEGF.

#### 3.3.2 Amostra tecidual

As amostras teciduais foram obtidas por biópsia incisional/excisional da neoplasia (grupo I) ou de linfonodo inguinal (grupo II), sendo este procedimento conduzido de forma asséptica e sob anestesia geral. Essas amostras foram conservadas em formol 10%, por 24 horas, desidratadas em álcool 70%, por 48 horas, e posteriormente processadas para inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ-UNESP/Botucatu), para avaliação histopatológica e imunoistoquímica.



### 3.4 EXAMES LABORATORIAIS

#### 3.4.1 Hemograma

As contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas, e a mensuração da concentração de hemoglobina e do hematócrito, foram obtidos com auxílio de um contador automático de células (Coulter ACT-8). As contagens diferenciais dos leucócitos foram efetuadas em esfregaços sangüíneos corados com May Grunwald – Giemsa. Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV – UNESP / Jaboticabal.

#### 3.4.2 Bioquímica Sérica

Foram determinados os teores de creatinina (método de Basques-Lustosa) no soro sangüíneo dos animais dos grupos I e II, e as atividades séricas da enzima alanina aminotransferase - ALT (método cinético UV). Os testes foram realizados utilizando-se conjuntos de reagentes de uso comercial LABTEST<sup>®</sup>, e as leituras das amostras efetuadas em espectrofotômetro LABQUEST<sup>®</sup>.

#### 3.4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A concentração sérica do VEGF foi mensurada com a utilização de um kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche (Human VEGF-C Immunoassay, Quantikine<sup>R</sup>, R&D Systems, Minneapolis, USA), seguindo as instruções do fabricante (Apêndice A). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A validação do teste de ELISA com anticorpo humano para a mensuração do fator de crescimento do endotélio vascular canino foi previamente confirmada por SCHEIDEGGER et al. (1999), CLIFFORD et al. (2001) e GENTILLINI et al. (2005). O protocolo experimental foi conduzido no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária, FCAV-UNESP/Câmpus de Jaboticabal.

#### 3.4.4 Histopatológico

As amostras incluídas em parafina (animais do grupo I e II) foram submetidas a cortes de cinco micrômetros e coradas com Hematoxilina e Eosina. Após a confecção das lâminas, procedeu-se à avaliação histopatológica mediante microscopia de luz objetivando a seleção dos linfonodos normais (grupo II) e a determinação do grau histológico dos linfomas caninos (grupo I). Para esta classificação foi utilizando o Sistema “Kiel” (Tabela 3), proposto para os linfomas não-Hodgkin humanos (GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994).

#### 3.4.5 Imunoistoquímica

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, os espécimes incluídos em parafina foram submetidos a cortes de três micrômetros e montados em lâminas previamente preparadas com cola líquida a base de organossilano (A3648 – SIGMA). As reações de imunoistoquímica foram realizadas de acordo com protocolos previamente estabelecidos pelo Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária, FMVZ-UNESP/Câmpus de Botucatu (Apêndices B e C). Os anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Relação dos anticorpos primários, clone, código, marca e diluição utilizados na técnica de imunoistoquímica realizada em amostras de linfonodos de cães saudáveis e linfomas caninos. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

Anticorpo	Clone	Código	Marca	Diluição
Anti-CD3	Policlonal	A0452	DakoCytomation®	1:100
Anti-CD79a	MB1	M7050	DakoCytomation®	1:50
Anti-VEGF (VEGF-A)	VG1	M7273	DakoCytomation®	1:25

Em todas as reações foram realizados controles negativos, nos quais se substituiu o anticorpo primário por imunoglobulinas (Igs) da espécie em que o anticorpo primário foi produzido (CD3-Igs de coelho; CD79a e VEGF-Igs de camundongo).

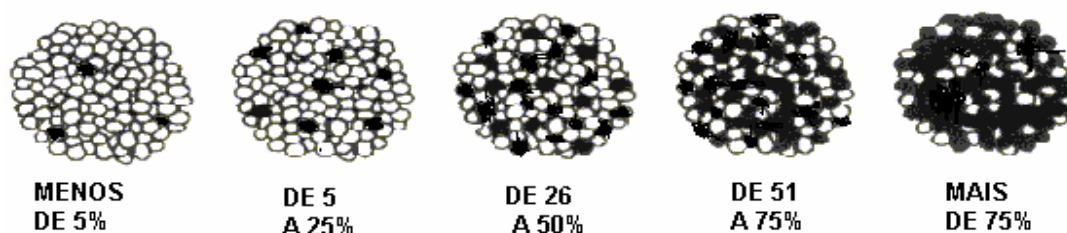
A imunorreatividade dos anticorpos foi avaliada com o auxílio de um equipamento analisador de imagens (QWin, versão 3.0). Esse equipamento consta de um microscópio (Leica) acoplado a uma câmera digital (Leica-DF500) que gera imagens em um programa computacional de análise morfológica.

#### 3.4.5.1 Imunofenótipo

O imunofenótipo dos linfomas caninos foi determinado pela marcação positiva dos linfócitos neoplásicos presentes nas amostras teciduais. A positividade ao anticorpo anti-CD3 confirmou o imunofenótipo T, e a positividade ao anticorpo anti-CD79a, o imunofenótipo B.

#### 3.4.5.2 Expressão do VEGF

Para determinar a expressão do VEGF nos espécimes dos animais do grupo I e II foram avaliados cinco campos de cada amostra analisada. Em cada campo foi mensurado o percentual de células marcadas (Figura 3 e Tabela 6) e a intensidade de coloração (Tabela 7), conforme preconizado por DE NARDI (2007). Foi estabelecida uma média dos valores determinados em cada campo.



**Figura 3** - Método de gradação para determinar o percentual de imunomarcagem para VEGF, em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

**Tabela 6** - Pontuação atribuída ao percentual de células marcadas por campo, em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos. FCAV – UNESP / Jaboticabal, SP, 2007.

Percentual de células marcadas	Pontuação
< 5%	0
5 – 25 %	1
26 – 50%	2
51 – 75%	3
> 75%	4

**Tabela 7** - Pontuação atribuída à intensidade de coloração das células marcadas por campo, em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

Intensidade de coloração	Pontuação
Fraca	1
Moderada	2
Forte	3

Ao final, estabeleceu-se um escore de 0 a 12 pontos obtido a partir do produto da pontuação do percentual de células marcadas pela pontuação da intensidade de coloração.

### 3.5 Análise Estatística

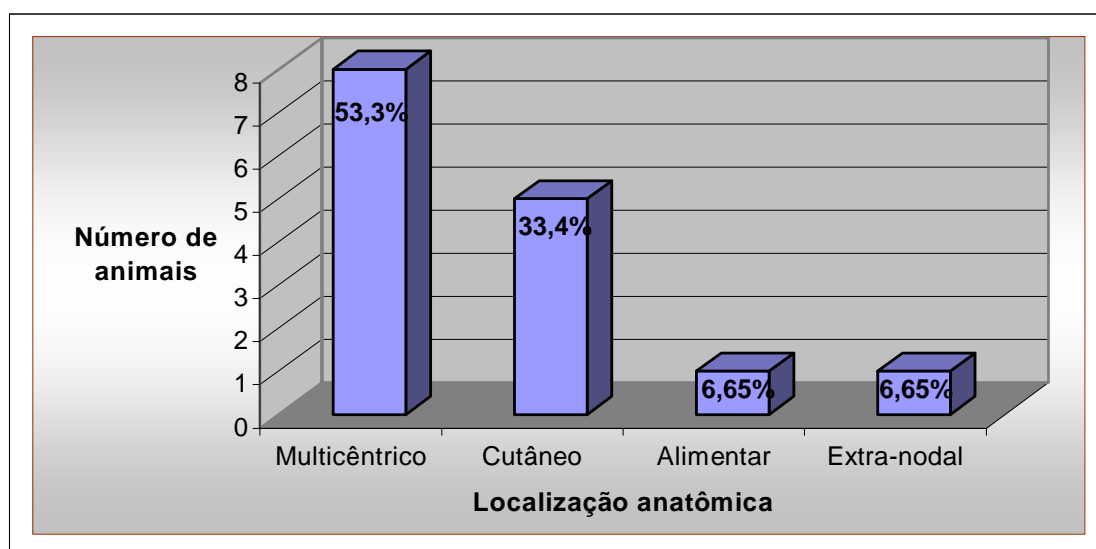
Para determinar se a concentração sérica e a expressão do VEGF diferiram entre os cães saudáveis e com linfoma, as médias foram comparadas pelo teste de Mann Withney, considerando um nível de significância de 5%. Foi realizada análise de correlação de Spearman entre as variáveis concentração sérica e expressão do VEGF, localização anatômica, estágio e sub-estágio clínico, imunofenótipo, grau histológico e sobrevida dos pacientes com linfoma,

considerando a significância de 5%. Análise descritiva dos dados foi empregada para o restante dos resultados. Utilizou-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, versão 8.2 – Institute Inc., Cary, NC, USA) para a realização destas análises.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dados epidemiológicos dos cães com linfoma

Dos 15 animais com linfoma, oito (53%) eram machos e sete (47%) fêmeas. A idade dos pacientes variou entre três e 15 anos, porém observou-se maior prevalência da neoplasia em cães com idade entre seis e 10 anos (53,3%). Em relação à distribuição racial, quatro (26,6%) cães não apresentavam raça definida, três (20%) eram da raça Poodle, dois (13,4%) da raça Rottweiler e dois (13,4%) da raça Pit bull. Os outros quatro animais pertenciam às raças Boxer, Bull terrier, Bulldog inglês e Basset hound. A localização anatômica mais freqüente foi a multicêntrica (53,3%). A forma extra-nodal ocorreu na região peri-aórtica (Figuras 4 e 5).



**Figura 4** – Distribuição da localização anatômica dos linfomas caninos. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.



**Figura 5** – Cão da raça Boxer, macho, quatro anos de idade, apresentando linfoma multicêntrico caracterizado por linfadenomegalia generalizada. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

#### **4.2 Hemograma e bioquímica sérica**

Os valores individuais obtidos no hemograma e na avaliação bioquímica sérica dos cães saudáveis e dos cães com linfoma estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10.

**Tabela 8** - Contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito e contagens de plaquetas de cães sadios e de cães com linfoma (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).

Eritrograma	Hemácias (x10 <sup>6</sup> )		Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)		Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /µL)	
	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15
Valores de referência	5,50 a 8,50		12 a 18		37 a 55		200 a 500	
Animais								
1	5,56	3,07	12,6	6,50	37	20,40	250	168
2	6,62	1,92	15,6	4,30	47	13,00	255	47
3	6,50	7,65	14,8	11,50	45	33,80	300	297
4	5,50	7,10	16,9	14,90	37	55,00	335	244
5	6,35	5,50	15,3	9,51	39	39,00	260	99
6	6,98	6,40	14,1	14,10	46	42,00	265	240
7	7,85	3,26	16,5	9,10	47	27,10	280	236
8	6,80	5,16	12,9	12,00	42	36,70	369	909
9	6,95	4,89	14,7	11,80	49	35,60	390	75
10	6,58	7,85	12,6	14,62	45	47,00	385	197
11		3,78		8,60		22,50		56
12		1,29		3,60		10,30		582
13		2,93		6,90		21,20		34
14		6,26		12,10		39,70		113
15		6,91		15,50		47,20		233

Valores de referência: GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994.



**Tabela 9** - Contagens ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de leucócitos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes e segmentados (NB e NS), linfócitos e monócitos de cães saudáveis e de cães com linfoma (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).

Leucograma	Leucócitos		Eosinófilos		NB		NS		Linfócitos		Monócitos	
	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15
Valores de referência	6,0 a 17,0		0,1 a 1,2		0,0 a 0,5		3,0 a 11,0		1,0 a 5,0		0,1 a 1,3	
Animais	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15
1	11,95	16,20	0,25	0,16	0,38	1,63	8,19	12,96	2,75	1,29	0,38	0,16
2	13,64	15,80	0,47	0,00	0,47	0,00	10,45	14,23	1,78	1,42	0,47	0,15
3	12,96	6,90	0,26	0,21	0,39	0,21	9,29	5,10	2,63	1,18	0,39	0,20
4	13,94	13,10	0,58	0,52	0,29	0,27	10,15	9,17	2,48	2,88	0,44	0,26
5	15,04	34,85	0,36	1,05	0,55	1,39	11,83	20,91	1,75	11,15	0,55	0,35
6	15,24	9,80	1,07	0,78	0,46	0,29	10,56	7,05	2,69	1,57	0,46	0,09
7	11,42	15,50	0,25	0,31	0,38	0,62	8,75	12,40	1,66	1,39	0,38	0,77
8	14,24	5,30	0,64	0,05	0,32	0,00	11,20	4,50	1,44	0,37	0,64	0,37
9	11,27	54,60	0,27	1,64	0,41	2,18	8,57	34,40	1,48	14,19	0,54	0,18
10	12,96	21,30	0,42	0,00	0,42	0,21	9,10	16,83	2,60	4,05	0,42	0,21
11		7,60		0,21		0,37		5,70		1,12		0,30
12		32,10		0,00		0,86		27,50		1,28		2,46
13		49,50		0,00		0,99		44,55		2,47		1,49
14		7,00		0,00		0,00		5,67		1,12		0,21
15		11,60		0,00		1,04		7,43		2,90		0,23

Contagens de basófilos iguais a zero em todas as amostras  
 Valores de referência: GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994.

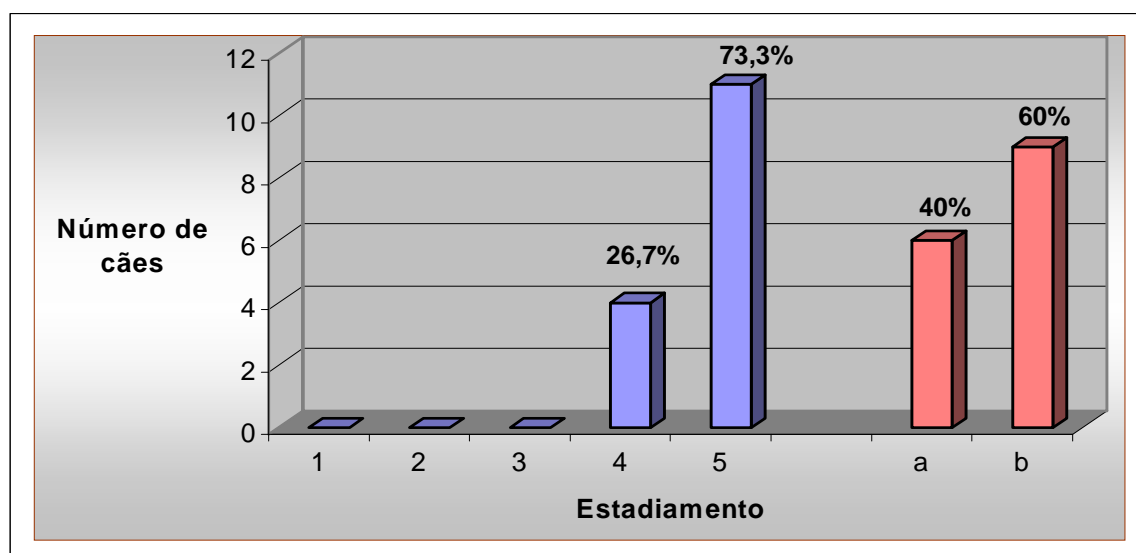
**Tabela 10** - Valores individuais das atividades séricas (UI/dL) de alanina aminotransferase (ALT) e do teor de creatinina (mg/dL) no soro sangüíneo de cães saudáveis e de cães com linfoma (FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007).

Bioquímica sérica	ALT		Creatinina	
	Valores de referência		Valores de referência	
Animais	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15
	10,0 a 88,0		0,5 a 1,5	
1	36,62	812,40	0,91	0,98
2	52,23	47,17	1,35	0,74
3	41,25	39,50	1,08	1,02
4	39,27	70,00	1,14	1,20
5	48,64	115,20	1,27	1,02
6	46,87	40,00	0,86	1,70
7	54,25	73,30	1,18	0,68
8	38,47	125,70	0,91	0,68
9	42,54	33,77	1,29	0,90
10	49,28	67,54	1,41	1,31
11		33,77		1,10
12		85,00		4,65
13		70,00		2,35
14		15,00		0,59
15		20,95		1,50

Valores de referência: MEYER et al., 1995.

Na avaliação hematológica dos cães com linfoma verificou-se anemia em sete (47%) cães e trombocitopenia em oito (53%), no diagnóstico da neoplasia. No leucograma observou-se leucocitose por neutrofilia em cinco (33%) animais e leucopenia em um (6,6%). Constatou-se linfocitose associada a presença de linfócitos atípicos circulantes em apenas um (13,3%) cão, sendo confirmada a ocorrência de linfoma leucêmico mediante avaliação citológica da medula óssea. À avaliação bioquímica sérica, evidenciou-se elevação das atividades séricas da alanina aminotransferase em três (20%) cães com linfoma, e elevação do teor de creatinina no soro sangüíneo de outros três (20%) animais.

Notou-se maior frequência de cães no estágio 5 e no sub-estádio “b”. Nenhum dos pacientes foi classificado nos estádios 1, 2 ou 3 (Figura 6).

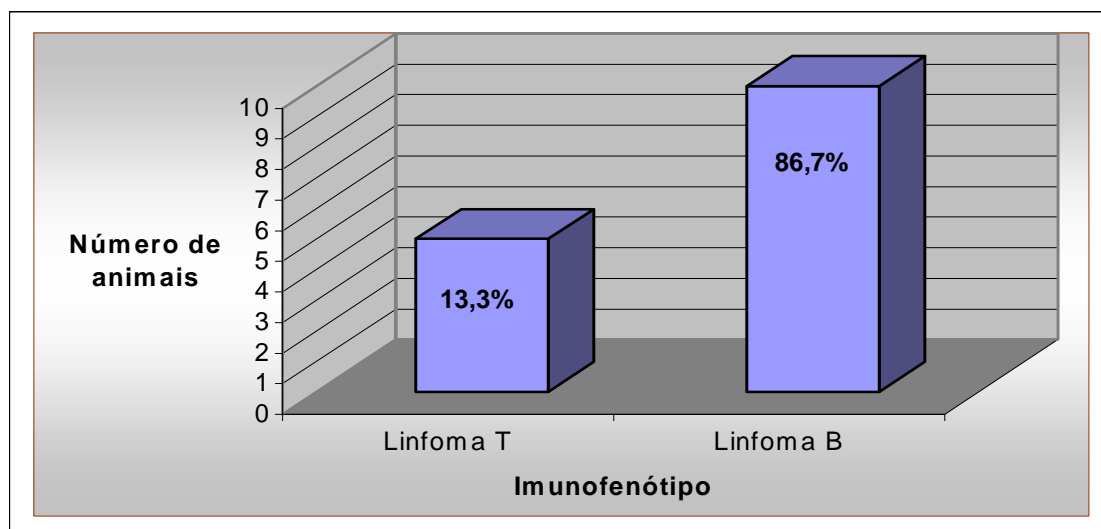


**Figura 6** – Distribuição do estadiamento (1 – 5) e sub-estadiamento (a – b) dos linfomas caninos. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

Pode-se constatar que dos 11 animais diagnosticados no estágio 5, seis (40%) encontravam-se no sub-estádio “b”. Observou-se também que 71% dos cães com anemia, 62% com trombocitopenia e 83% com alterações na avaliação bioquímica sérica encontravam-se no estágio 5.

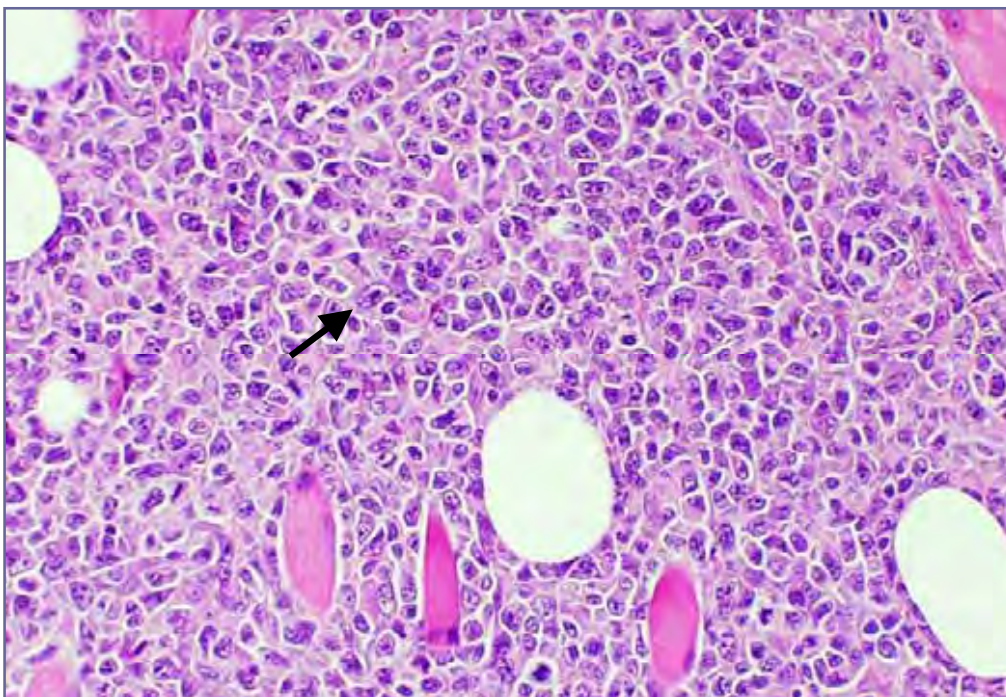
#### 4.4 Grau Histológico

Constatou-se que os linfomas de baixo grau de malignidade acometeram dois cães, sendo observado predomínio dos linfomas de alto grau de malignidade, que totalizaram 13 dos 15 casos avaliados (Figuras 7, 8 e 9).

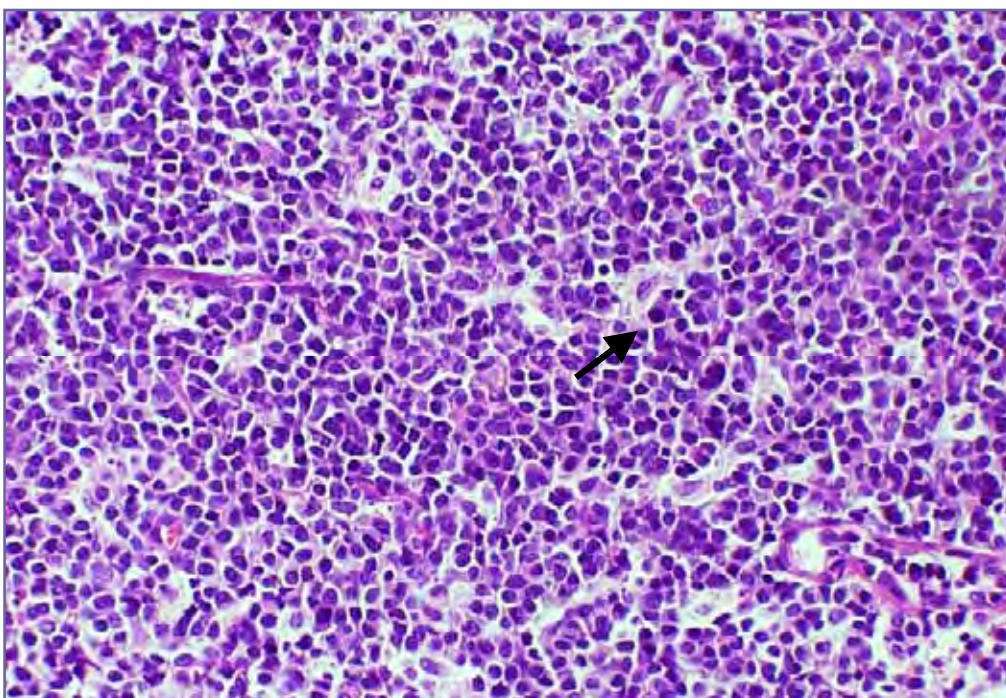


**Figura 7** - Grau fenotípico dos linfomas caníneos Notearinos avaliados nos municípios de Jaboticabal, SP, FCAV/UNESP/Jaboticabal, SP, FCAV/UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

Quanto a morfologia celular, os linfomas de baixo grau foram classificados em centrocítico (1) e centroblástico-centrocítico (1). Os linfomas de alto grau foram classificados como centroblástico (5), imunoblástico (4), linfoblástico (2) e anaplásico (2). Os linfomas de alto grau acometeram 100% dos linfomas cutâneos e 75% dos multicêntricos.



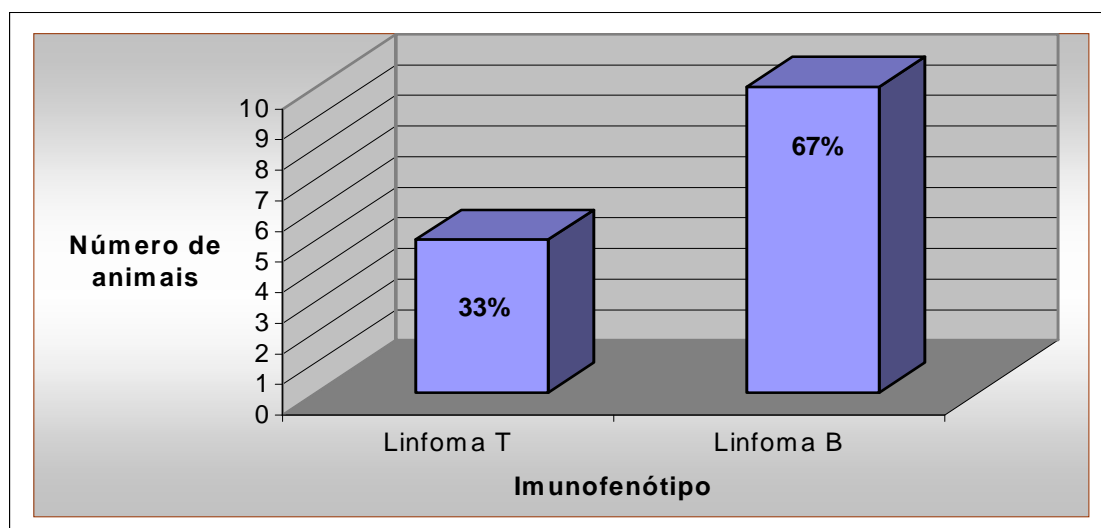
**Figura 8** - Fotomicrografia de linfoma anaplásico de alto grau de malignidade. Infiltrado de linfócitos grandes e indiferenciados. Hematoxilina-Eosina, aumento de 400 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.



**Figura 9** - Fotomicrografia de linfoma centrocítico de baixo grau de malignidade. Infiltrado de linfócitos com núcleo irregular e citoplasma escasso. Hematoxilina-Eosina, aumento de 400 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.

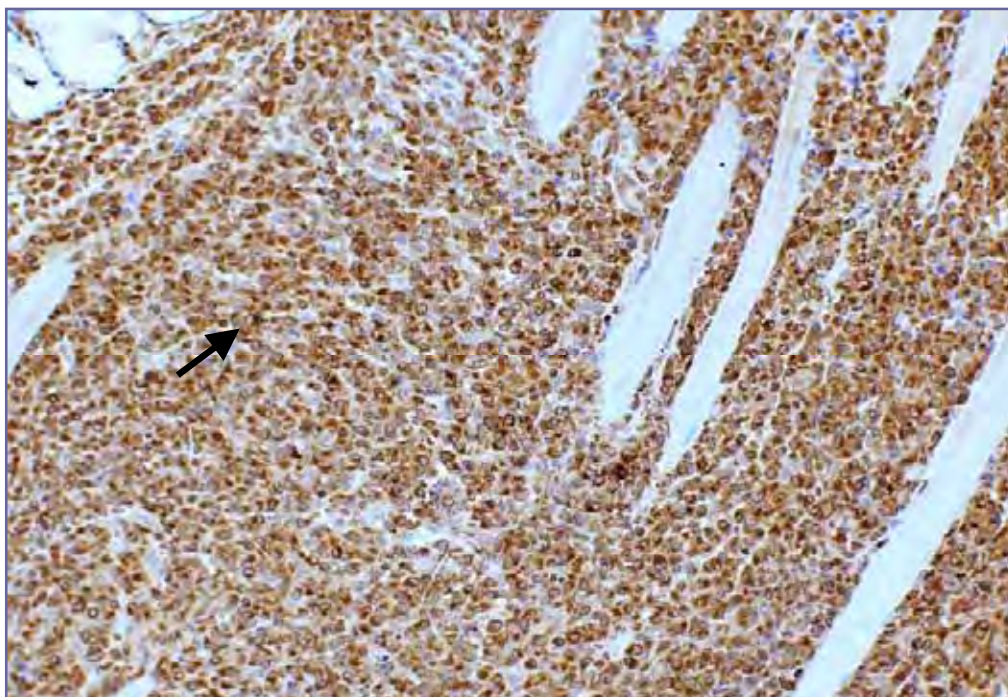
#### 4.5 Imunofenótipo

Na avaliação imunofenotípica observou-se prevalência dos linfomas de células B (Figuras 10, 11 e 12).

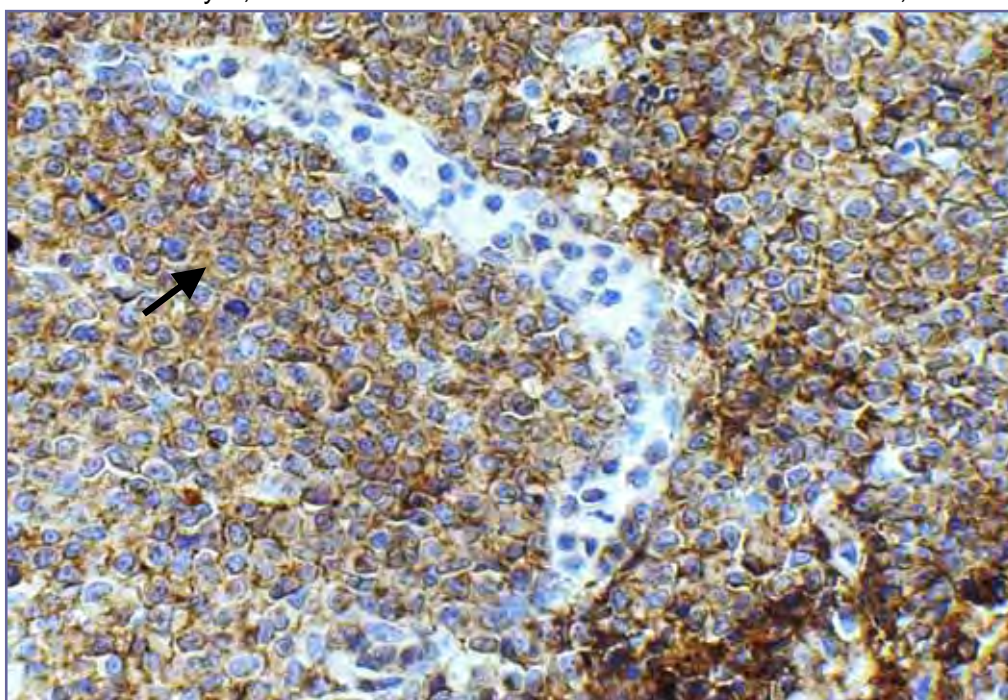


**Figura 10** - Imunofenótipo dos linfomas caninos. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

Os linfomas de células B representaram 85% dos linfomas multicêntricos e os de células T, 67% dos linfomas cutâneos. De acordo com a classificação de "Kiel", 100% dos linfomas de células T foram considerados de alto grau de malignidade, assim como 80% dos linfomas de células B.



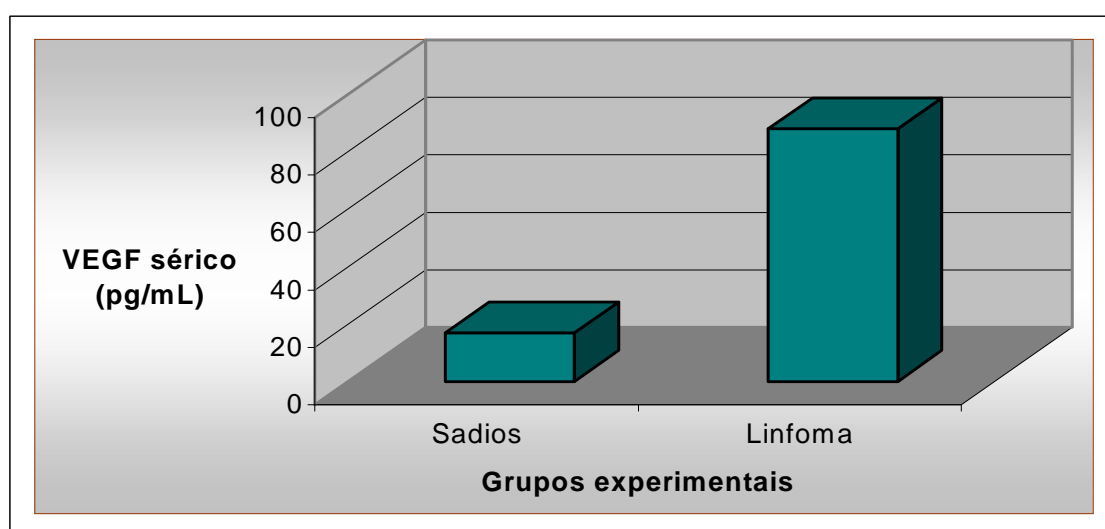
**Figura 11 -** Fotomicrografia de linfoma de células T. Positividade para o anticorpo primário anti-CD3. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer, aumento de 100 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.



**Figura 12 -** Fotomicrografia de linfoma de células B. Positividade para o anticorpo primário anti-CD79a. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer, aumento de 400 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.

#### 4.6 Concentração sérica de VEGF

No ELISA sanduíche, as concentrações séricas de VEGF variaram de 0 a 58,66pg/mL ( $17,93\pm 23,34$ ) nos cães sadios, e de 0 a 417,75pg/mL ( $88,51\pm 121,71$ ) nos cães com linfoma. Apesar de a média das concentrações séricas de VEGF em cães com linfoma ser superior à média de cães sadios, não houve diferença estatística entre os dois grupos ( $p=0,10$ ) (Figura 14). Os valores individuais da concentração sérica de VEGF em cães sadios e cães com linfoma estão demonstrados na Tabela 2, do Apêndice D.



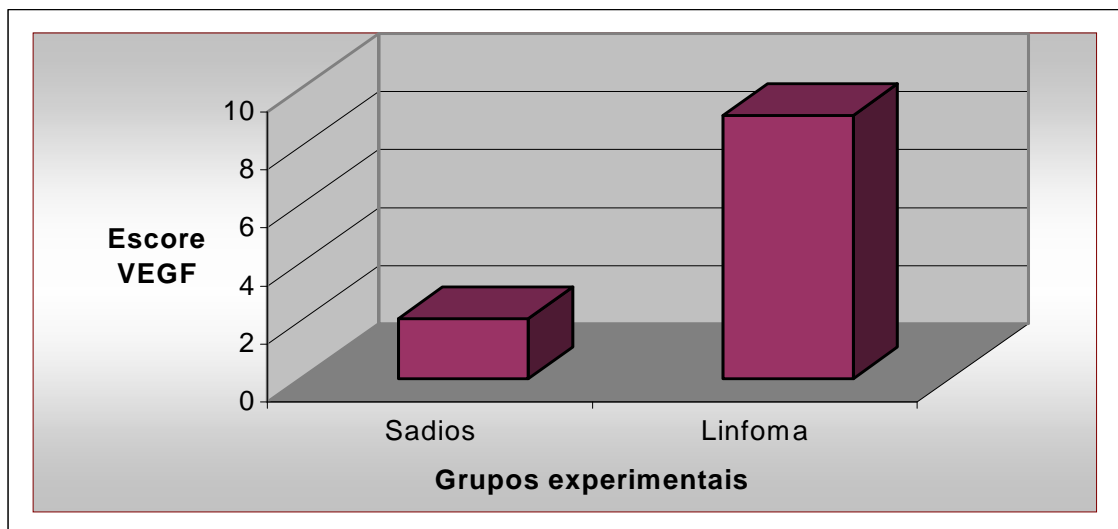
**Figura 14** – Médias das concentrações séricas de VEGF em cães sadios e cães com linfoma. FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP, 2007.

Adicionalmente, não foi evidenciada correlação significativa entre as variáveis concentração sérica de VEGF, localização anatômica ( $p=0,80$ ), estágio ( $p=0,44$ ) e sub-estádio clínico ( $p=0,73$ ), grau histológico ( $p=0,31$ ) e imunofenótipo ( $p=0,06$ ) de cães com linfoma.



#### 4.7 Expressão do VEGF

Na avaliação imunohistoquímica, o escore de imunomarcção para VEGF foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) em cães com linfoma ( $9,07 \pm 2,34$ ) quando comparado ao escore de imunomarcção para VEGF em linfonodos de cães saudáveis ( $2,70 \pm 2,35$ ) (Figura 15).

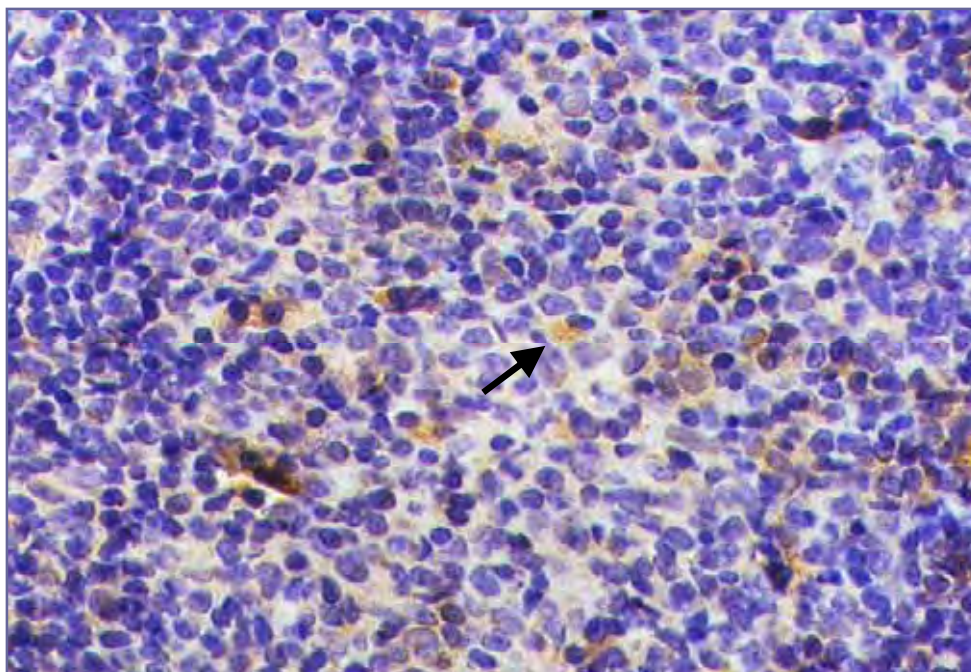


**Figura 15** – Médias dos escores de imunomarcção para VEGF em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos. FCAV – UNESP / Jaboticabal, SP, 2007.

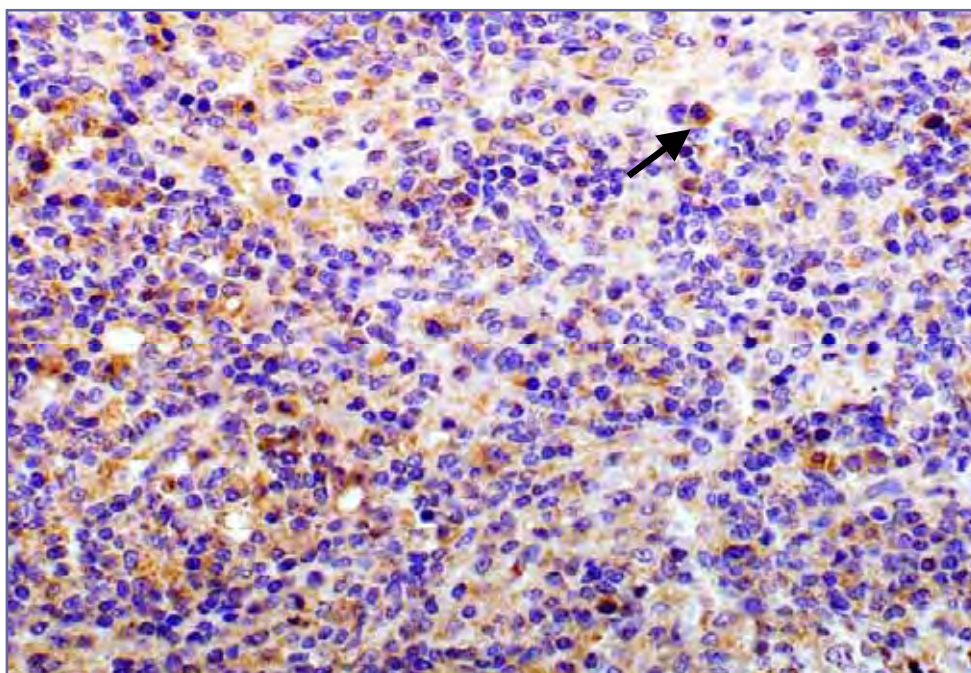
A expressão do VEGF caracterizou-se por marcação predominantemente citoplasmática difusa, tanto em linfócitos de linfonodos normais como em linfócitos neoplásicos. Nos linfonodos de cães saudáveis constatou-se imunomarcção para VEGF em 90% dos casos, ocorrendo escores entre 0 e 6. Um caso (10%) foi classificado no escore 0, três (30%) no escore 1, três (30%) no escore 2 e três (30%) no escore seis (Figuras 16 e 17). Nos cães com linfoma, constatou-se imunomarcção para VEGF em 100% dos casos, porém, nestes animais, observou-se escores entre 6 e 12. Três casos (20%) foram classificados no escore 6, cinco (33,3%) no escore 8, dois (13,4%) no escore 9 e cinco (33,3%) no escore

12 (Figuras 18 e 19). Os escores individuais referentes a expressão do VEGF em linfonodos de cães saudáveis e em linfomas caninos estão demonstrados na Tabela 2, do Apêndice D.

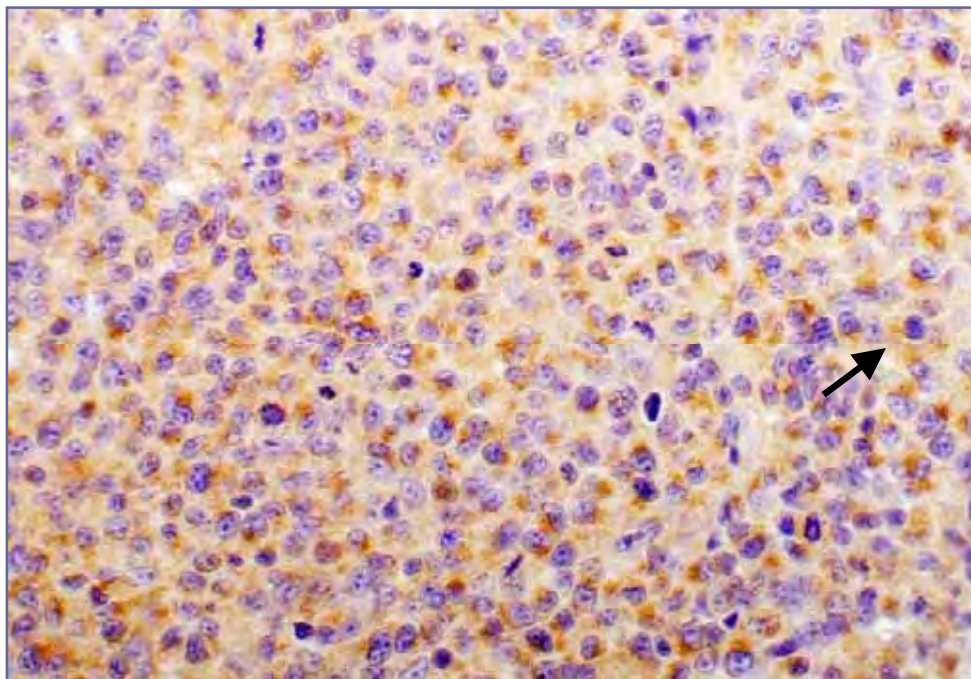
Adicionalmente, não foi evidenciada correlação significativa entre as variáveis imunomarcção de VEGF, localização anatômica ( $p=0,60$ ), estágio ( $p=0,51$ ) e sub-estágio clínico ( $p=0,24$ ), grau histológico ( $p=0,16$ ) e imunofenótipo ( $p=0,67$ ) de cães com linfoma (Figura 20).



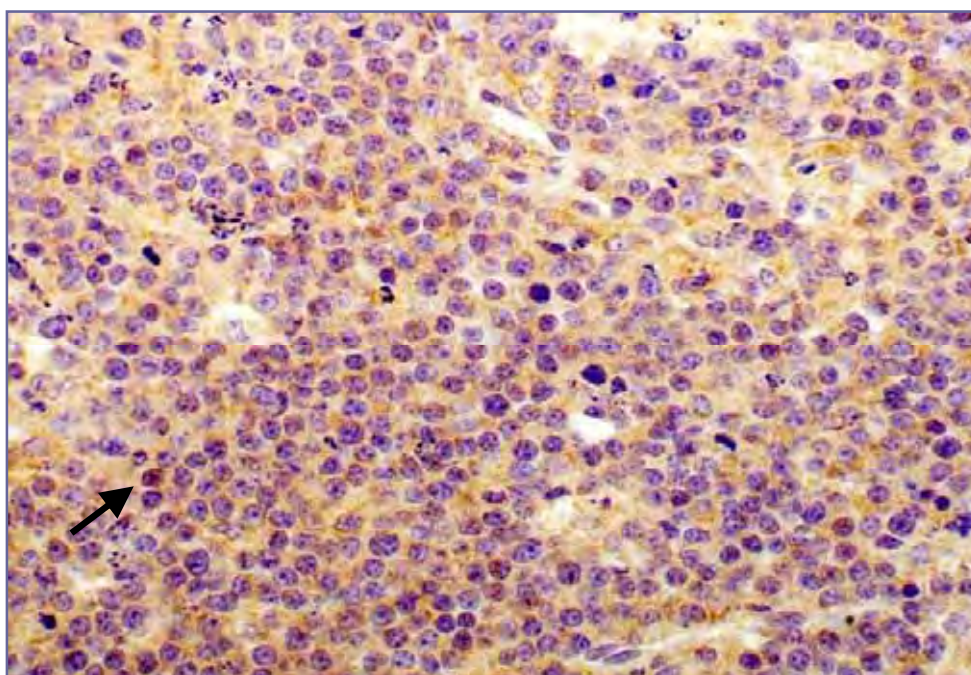
**Figura 16 -** Linfonodo de cão sadio. Positividade para o anticorpo primário anti-VEGF em menos de 25% dos linfócitos, caracterizando escore 1. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.



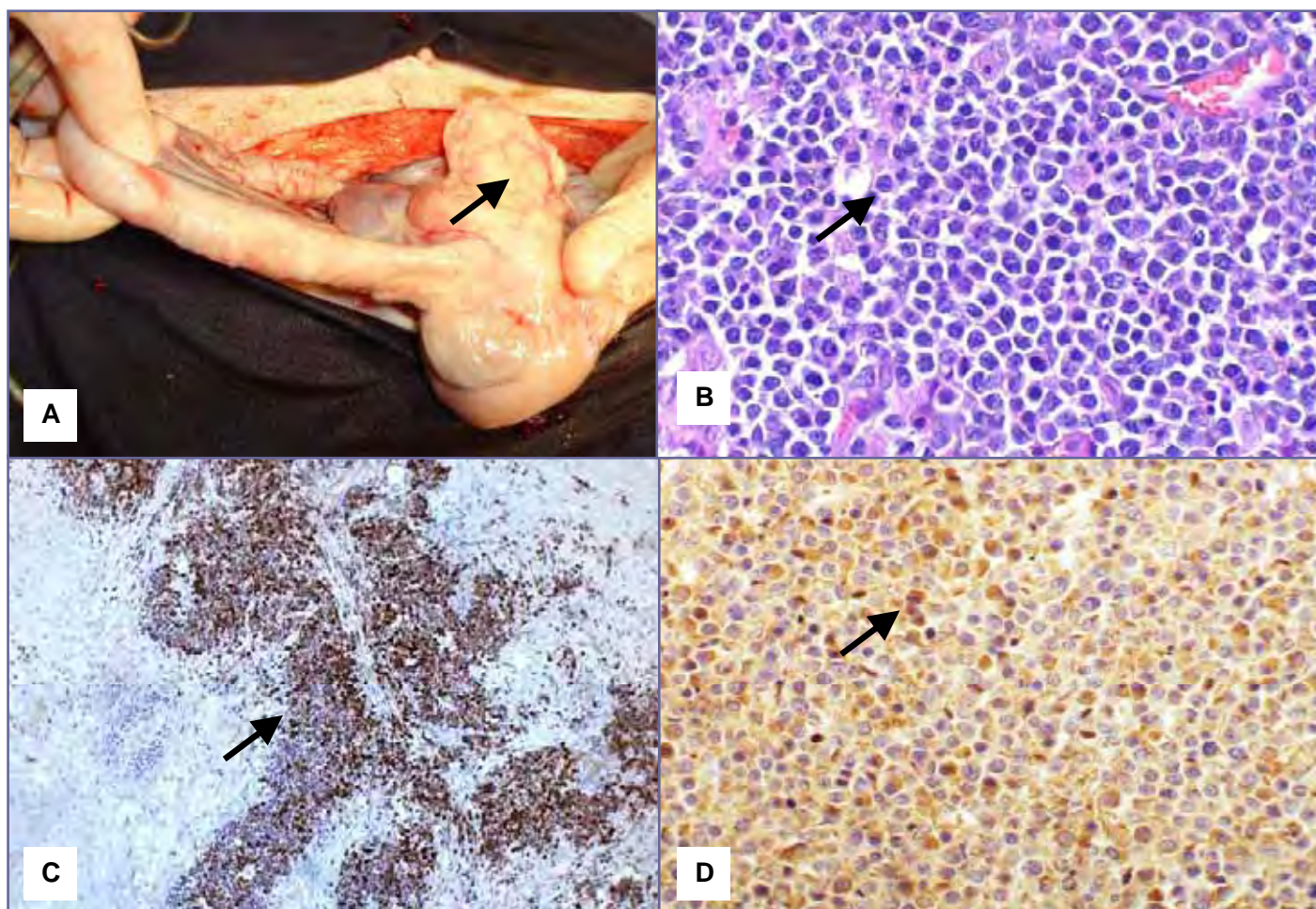
**Figura 17 -** Linfonodo de cão sadio. Moderada imunomarcção para VEGF em mais de 50% dos linfócitos, caracterizando escore 6. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.



**Figura 18** - Linfoma canino. Moderada imunomarcção para VEGF em mais de 75% dos linfócitos neoplásicos, caracterizando escore 8. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.



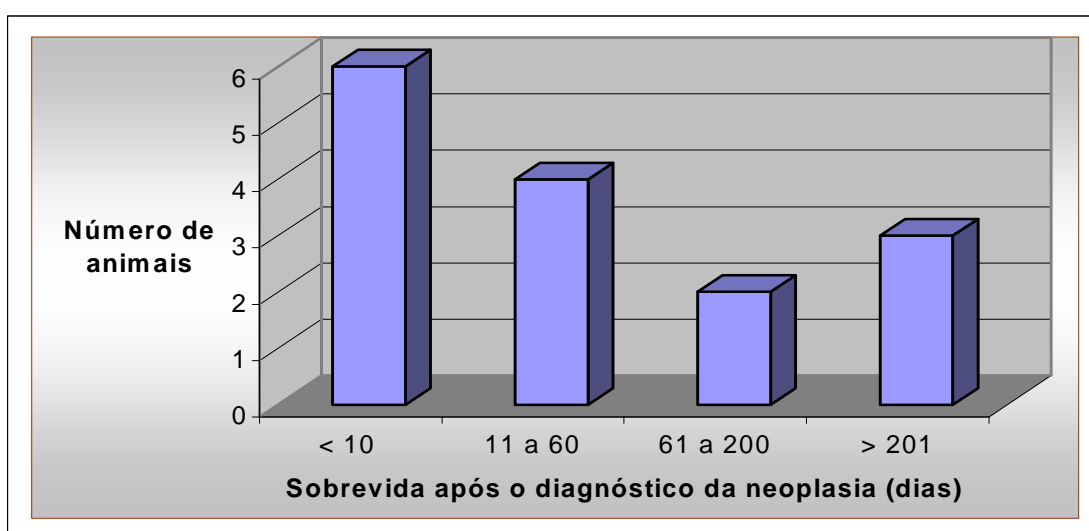
**Figura 19** - Linfoma canino. Forte imunomarcção para VEGF em mais de 75% dos linfócitos neoplásicos, caracterizando escore 12. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. Aumento de 400 vezes. FCAV-UNESP/Jaboticabal, 2007.



**Figura 20** - Linfoma alimentar em cão da raça Pit Bull, caracterizado por linfadenomegalia mesentérica e presença de uma neoforção tumoral em intestino delgado (A). Fotomicrografia de amostra intestinal revelando infiltrado de linfócitos pequenos, com núcleo arredondado e citoplasma escasso, caracterizando um linfoma linfoblástico de alto grau de malignidade (HE, 400x) (B) Imunomarcção de linfócitos B neoplásicos com o anticorpo primário anti-CD79a (IHQ, 100x) (C). Forte imunomarcção para VEGF em mais de 75% dos linfócitos neoplásicos (IHQ, 400x) (D).

#### 4.8 Sobrevida

O tempo de sobrevida dos cães com linfoma foi estabelecido pela contagem dos dias do diagnóstico da neoplasia até o óbito do paciente. Dos 15 animais avaliados, seis (40%) apresentaram sobrevida inferior a 10 dias, quatro (26,7%) sobreviveram de 11 a 60 dias, dois (13,3%) de 60 a 200 dias e três (20%) apresentaram mais de 200 dias de sobrevida (Figura 13).



**Figura 13** – Sobrevida dos cães com linfoma tratados com poliquimioterapia sistêmica baseada no protocolo da Universidade de Madison-Wisconsin. Nota-se uma elevada incidência de óbitos precoces. FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, 2007.

Não houve correlação significativa entre a localização anatômica ( $p = 0,35$ ), o estágio clínico ( $p = 0,07$ ), o grau histológico ( $p = 0,80$ ), a morfologia celular ( $p = 0,48$ ), o imunofenótipo ( $p = 0,11$ ), a concentração sérica ( $p = 0,67$ ) e a expressão ( $p = 0,34$ ) do VEGF com a sobrevida dos cães com linfoma. O sub-estádio clínico ( $p < 0,0001$ ) foi considerado um fator prognóstico negativo quanto a sobrevida dos cães com linfoma avaliados nessa pesquisa, independente do estágio clínico.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Dados Clínicos

Os linfomas podem afetar cães de diferentes raças (GREENLEE et al., 1990), porém pesquisas revelam prevalência da neoplasia em animais das raças Boxer, São Bernardo, Basset Hound, Bulldog Inglês, Beagle, Pastor Alemão e Rottweiler (VONDERHAAR & MORRISON, 2002; DHALIWAL et al., 2003; VAIL & YOUNG, 2007). Neste estudo, os linfomas foram diagnosticados em cães sem raça definida e das raças Poodle, Rottweiler, Pit Bull, Boxer, Bull Terrier, Bulldog Inglês e Basset Hound, sem prevalência significativa de nenhuma das raças. A maior frequência de cães sem raça definida pode ser explicada pelo predomínio desses animais na casuística do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

Existe grande discordância na literatura sobre a influência do sexo no desenvolvimento dos linfomas. Entre os animais avaliados, houve maior frequência de machos (53%) em relação às fêmeas (47%), corroborando com os resultados obtidos por MACEWEN et al. (1987), que identificaram 58% de machos em uma população de 62 cães. JACOBS et al. (2002) afirmam não haver predileção sexual no desenvolvimento dos linfomas caninos.

MACEWEN et al. (1987) sugeriram que a distinção entre machos e fêmeas é um importante fator prognóstico nos linfomas caninos, visto que evidenciaram que as fêmeas apresentam maiores índices de remissão clínica e tempo de sobrevida, conforme também observado em seres humanos. No presente estudo constatou-se que cinco (62%) machos apresentaram sobrevida inferior a 10 dias e nenhum acima de 200 dias. Entre as fêmeas, constatou-se que apenas uma apresentou sobrevida inferior a 10 dias e três (43%) sobreviveram mais de 200 dias. Segundo esses autores, as neoplasias linforreticulares desenvolvem-se na ausência de imunorregulação apropriada, porém a influência dos hormônios sexuais sobre o sistema imunológico é um mecanismo complexo e ainda pouco conhecido.

De acordo com VAIL & YOUNG (2007), os linfomas prevalecem em animais de meia idade, conforme observado nos cães avaliados. Segundo MACEWEN et al. (1987), a idade não representa um importante fator prognóstico para os linfomas caninos. Contudo, DHALIWAL et al. (2003) sugeriram que cães jovens apresentam menor sobrevida que cães adultos ou idosos. Em contrapartida, no presente estudo, 50% dos cães com menos de cinco anos de idade apresentaram sobrevida superior a 200 dias e 67% dos cães com idade superior a cinco anos sobreviveram menos de 30 dias.

A localização anatômica dos linfomas caninos é extremamente variável e influencia significativamente nos sinais clínicos e no prognóstico da neoplasia (FAN, 2003; DHALIWAL et al., 2003). Neste estudo, verificou-se que a forma multicêntrica foi a mais freqüente (54%), manifestando-se principalmente por linfadenomegalia regional ou generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia e/ou leucemia, sendo essas características também observadas por diferentes autores (TESKE et al., 1994; VONDERHAAR & MORRISON, 2002; VAIL & YOUNG, 2007).

O linfoma cutâneo é uma neoplasia de ocorrência rara, representando de 3 a 8% de todos os linfomas caninos (TESKE, 1994; DHALIWAL et al., 2003). Contrapondo com a literatura, no presente estudo, o linfoma cutâneo manifestou-se em 33% dos animais. A elevada freqüência dos linfomas cutâneos na população estudada pode ser explicada pela prévia seleção de determinadas formas anatômicas para o presente estudo. Essa seleção foi realizada de acordo com a possibilidade de realização da biopsia tecidual (necessária para as futuras avaliações) sem ocorrência de risco de vida para o paciente. Dessa forma, não foram incluídos neste estudo cães portadores de linfoma mediastinal, cardíaco e renal. Além disso, a seleção dos animais dependeu da aceitação dos proprietários em participar da pesquisa.



Segundo VONDERHAAR & MORRISON (2002), linfomas com envolvimento cutâneo, renal ou do sistema nervoso central possuem prognóstico negativo quanto a resposta terapêutica e o tempo de sobrevida. Corroborando com essas observações, o maior tempo de sobrevida observado nos cães com linfoma cutâneo, tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, foi de 90 dias.

O estabelecimento do estágio e sub-estádio clínico dos pacientes com linfoma auxilia no prognóstico e no planejamento terapêutico da neoplasia (VAIL & YOUNG, 2007). Neste trabalho, não foram diagnosticados pacientes nos estádios iniciais da doença (1,2 ou 3), havendo prevalência de animais no estágio 5 (73%). Esses resultados estão em concordância com GREENLEE et al. (1990), TESKE (1994), VONDERHAAR & MORRISON (2002) e VAIL & YOUNG (2007), que afirmam que o maior número de casos são diagnosticados nos estádios mais avançados da doença. DHALIWAL et al. (2003) referiram menor duração do tempo em remissão clínica em cães diagnosticados nos estádios 4 ou 5 da neoplasia. Neste estudo, não foi observada correlação significativa entre o estágio clínico e a sobrevida dos cães com linfoma, já que, pesquisas anteriores revelam não existirem diferenças no tempo de sobrevida de pacientes diagnosticados nos estádios 4 e 5 (MACEWEN et al., 1987).

VONDERHAAR & MORRISON (2002) consideraram a presença de sinais sistêmicos no diagnóstico da neoplasia (sub-estádio "b") um dos poucos fatores prognósticos realmente consistentes em relação a sobrevida de cães com linfoma. No presente estudo, o sub-estádio clínico foi o único fator prognóstico que influenciou significativamente ( $p < 0.0001$ ) na sobrevida dos cães com linfoma. Observou-se que cães diagnosticados no sub-estádio "b" apresentaram sobrevida inferior aos cães diagnosticados no sub-estádio "a".

A avaliação hematológica, bioquímica sérica, citologia da medula óssea, radiografia torácica e ultra-sonografia abdominal realizadas nos pacientes

objetivou estabelecer o estadiamento adequado dos linfomas caninos. Pode-se constatar um grande percentual de alterações hematológicas e bioquímicas em decorrência do número elevado de pacientes no estágio mais avançado da neoplasia. TESKE (1994) referiu que anemia e trombocitopenia são alterações hematológicas comuns em cães com linfoma, ocorrendo em 38 e 50% dos casos, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos nesta pesquisa, onde constatou-se anemia em 47% dos cães e trombocitopenia em 53%. A anemia em cães com linfoma decorre não somente do comprometimento da medula óssea, mas também da presença de doença inflamatória crônica, anorexia ou distúrbios imunomediados. A trombocitopenia pode ser explicada pelo comprometimento da medula óssea, seqüestro esplênico ou distúrbios imunomediados (TESKE, 1994; VAIL & YOUNG, 2007).

No presente estudo, constatou-se leucocitose por neutrofilia em 33% dos cães com linfoma. Estes resultados equívalem aos observados por TESKE (1994), que referiu ocorrência de leucocitose granulocítica em 26 a 38% dos cães com linfoma em decorrência de infiltração medular por células neoplásicas, necrose tecidual ou produção excessiva de fator estimulante de colônias granulocíticas.

A elevação das atividades séricas da alanina-aminotransferase ou do teor de creatinina no soro sanguíneo de cães com linfoma pode estar relacionada ao comprometimento do fígado ou rim pela neoplasia, ou por hepatopatia ou nefropatia concomitante ou secundária à síndromes paraneoplásicas (VAIL & YOUNG, 2007). No presente estudo constatou-se aumento da atividade sérica da alanina-aminotransferase em três cães com linfoma, nos quais se observou sinais sugestivos de comprometimento neoplásico do fígado mediante ultra-sonografia abdominal. Além disso, verificou-se elevação dos teores de creatinina no sangue de outros três animais, nos quais se diagnosticou nefropatia secundária a hipercalcemia paraneoplásica. A freqüência de hipercalcemia paraneoplásica não foi avaliada no presente estudo, porém VONDERHAAR & MORRISON (2002) referem incidência em 10 a 15% dos cães com linfoma.

## 5.2 Classificação morfológica e imunofenotípica

Recentes avanços na imunologia, genética e biologia molecular ampliaram o conhecimento do comportamento biológico dos linfomas caninos. Esses avanços, associados a adequados sistemas de classificação morfológica, têm proporcionado diagnósticos precisos e regimes terapêuticos mais efetivos (GREENLEE et al., 1990).

No presente estudo, os 15 casos de linfoma foram classificados de acordo com o esquema proposto por "Kiel", o qual revelou supremacia dos linfomas de alto grau de malignidade (86,7%), conforme também observado por diferentes autores (GREENLEE, 1990; TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997; PONCE et al., 2004). TESKE et al. (1994) enfatizam que, de acordo com a classificação de "Kiel", os linfomas de alto grau de malignidade estão associados a elevados índices de remissão clínica, porém com curto tempo de sobrevida. Nesta pesquisa não foi observada correlação significativa entre o grau histológico da neoplasia e o tempo de sobrevida dos pacientes, principalmente em decorrência do pequeno número de linfomas de baixo grau (2/15). Contudo, não há como desconsiderar uma sobrevida média de apenas 80 dias em uma população de cães com predomínio de linfomas de alto grau de malignidade.

Entre os linfomas de alto grau, os linfomas centrolblásticos (38%) e imunoblásticos (30%) foram os mais freqüentes em nossa casuística, corroborando com os resultados de pesquisas realizadas por PARODI et al. (1988), GREENLEE et al. (1990) e FOURNEL-FLEURY et al. (1997). PONCE et al. (2004) referiram que os linfomas caninos ainda são considerados como uma enfermidade única, e não uma neoplasia heterogênea com diferentes sub-tipos morfológicos. Na medicina, os oncologistas definem a modalidade terapêutica dos linfomas não-Hodgkin de acordo com a morfologia celular e o imunofenótipo, e dessa forma, prevêm respostas terapêuticas e tempos de sobrevida (PONCE et

al., 2004). No presente estudo, não foi observada correlação significativa entre a morfologia celular e a sobrevida dos cães com linfoma.

Atualmente, os marcadores imunológicos são imprescindíveis no diagnóstico dos linfomas caninos, seja na diferenciação entre as neoplasias de células redondas ou na determinação do imunofenótipo da neoplasia (FOURNEL-FLEURY et al., 1997). No presente estudo, os linfomas de células B representaram 67% dos linfomas caninos e os linfomas de células T, 60% dos linfomas cutâneos. VAIL & YOUNG (2007) relataram que 60 a 80% dos casos de linfoma são de células B. Além disso, referiram que os linfomas de células T estão associados a menores índices de remissão clínica e tempo de sobrevida. Nesta pesquisa, não foi observada correlação significativa entre o imunofenótipo e a sobrevida dos cães com linfoma. Entretanto, todos os cães com sobrevida superior a 90 dias apresentavam imunofenótipo B (5 /15).

### **5.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)**

Há mais de 35 anos, um cirurgião da Universidade de Harvard, conhecido como Judah Folkman, sugeriu que o crescimento neoplásico era dependente da neoformação vascular existente no leito tumoral. A partir desse momento, inúmeras pesquisas começaram a ser desenvolvidas em relação à angiogênese, objetivando a detecção de biomarcadores que auxiliem na detecção precoce, no prognóstico e no tratamento de diferentes neoplasias (LAMONTAGNE, 2005).

O fator de crescimento do endotélio vascular representa o principal fator de crescimento associado tanto à angiogênese quanto à linfangiogênese tumoral. A imunomarcção do VEGF, bem como o aumento de suas concentrações séricas, são considerados fatores prognósticos negativos em diferentes neoplasias sólidas e hematopoiéticas (FERRARA & DAVIS-SMITH, 1997; HIRAKAWA et al., 2007).

As concentrações séricas do VEGF têm sido mensuradas em diferentes pesquisas em seres humanos com linfoma não-Hodkin, mediante ensaio

imunoenzimático (SALVEN et al, 1997; BERTOLINI et al., 1999; NIITSU et al., 2002). Entretanto, GENTILINI et al. (2005) foram os únicos pesquisadores que avaliaram as concentrações séricas do VEGF em cães com linfoma, antecedendo o presente estudo.

As concentrações séricas do VEGF foram mensuradas em kit comercial de ELISA que utiliza o VEGF-C como anticorpo, ou seja, um dos componentes da família VEGF referido como importante indutor da linfangiogênese tumoral. Os resultados variaram de 0 a 58,66pg/mL nos cães saudáveis, e de 0 a 417,75pg/mL nos cães com linfoma. GENTILINI et al (2005) constataram variações de 0 a 23,28pg/mL em cães saudáveis e de 0 a 189,84pg/mL em cães com linfoma. Contrapondo com os resultados de GENTILINI et al (2005), verificou-se que, embora a média das concentrações séricas do VEGF em cães com linfoma (88,51pg/mL) tenha sido superior a média dos cães saudáveis (17,93pg/mL), a diferença não foi considerada estatisticamente significativa em decorrência do pequeno número de animais em ambos os grupos. Vale ressaltar que em 7 (47%) cães com linfoma, as concentrações séricas do VEGF foram superiores a maior concentração sérica detectada nos cães saudáveis (58,66pg/mL).

Recentes estudos demonstram que o VEGF circulante é encontrado nas células sanguíneas, incluindo plaquetas e linfócitos, o que indica que o VEGF detectado em amostras séricas é liberado das células sanguíneas durante o processo de coagulação (SALVEN et al., 2000). Alguns autores sugerem que pacientes com linfopenia ou trombocitopenia podem apresentar concentrações séricas inferiores de VEGF, porém SALVEN et al. (2000) e RESTUCCI et al. (2005) não evidenciaram correlações entre as concentrações de VEGF com as contagens de plaquetas e linfócitos, de forma semelhante ao presente estudo.

O VEGF circulante encontrado em pacientes com câncer pode ser originário das células neoplásicas, de células inflamatórias infiltradas no tumor ou de células inflamatórias circulantes (FREEMAN et al., 1995). Portanto, sugere-se

que o VEGF presente no microambiente tumoral possa se mobilizar para a circulação, acumulando-se em linfócitos e plaquetas (SALVEN et al., 1997). Dessa forma, podem não existir correlações entre as concentrações séricas e a expressão do VEGF em pacientes com câncer, conforme observamos no presente estudo.

SALVEN et al. (2000) demonstraram que as concentrações séricas de VEGF e bFGF são fatores prognósticos que influenciam negativamente na sobrevida de pacientes humanos com linfoma de Hodgkin. Além disso, verificaram maiores concentrações séricas de VEGF em linfomas de alto grau, especialmente linfomas imunoblásticos. NIITSU et al. (2002) verificaram que elevadas concentrações séricas de VEGF e interleucina-6 antes do tratamento quimioterápico estão associadas a baixos índices de sobrevida em seres humanos com linfoma não-Hodkin. GENTILINI et al. (2005) constataram correlação significativa entre as concentrações séricas de VEGF com o sub-estádio “b” dos linfomas caninos.

Na avaliação da concentração sérica em relação a localização anatômica, o estágio e sub-estádio clínico, o grau histológico, o imunofenótipo e a sobrevida dos linfomas caninos, não foi evidenciada nenhuma correlação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ). Entretanto, observou-se que em quatro (80%) dos cinco cães com linfoma cutâneo as concentrações séricas do VEGF-C foram indetectáveis, sugerindo que a linfangiogênese possa não ser significativa em linfomas cutâneos. Quanto a morfologia celular, os linfomas imunoblásticos revelaram a maior média de concentração sérica do VEGF (140,89pg/mL).

KADOWAKI et al. (2005) enfatizaram a importância da linfangiogênese nos linfomas, uma vez que as células linfóides neoplásicas invadem linfonodos e demais órgãos linfóides mediante vasos linfáticos. Em estudo realizado em 39 pacientes com linfoma, os resultados demonstrados por esses autores revelaram diferença significativa da microdensidade linfática entre linfomas e linfonodos normais. Além disso, evidenciaram expressão do VEGF-A em todas as amostras e

do VEGF-C em 36 espécimes, ocorrendo correlação positiva entre a microdensidade linfática e a expressão do VEGF-A e do VEGF-C. Curiosamente, não foram observadas correlações entre a microdensidade vascular e a expressão das duas isoformas do VEGF.

A imunomarcção de VEGF tem sido avaliada em um grande número de pesquisas relacionadas aos linfomas de Hodgkin's ou não-Hodgkin humanos (ORPANA & SALVEN, 2002; KORKOLOPOULOU et al., 2005), entretanto, além desta pesquisa, apenas WOLFESBERGER et al. (2007), investigaram a expressão do VEGF em linfomas caninos.

No presente estudo, 12 (80%) das 15 amostras de linfomas caninos revelaram escores elevados (8, 9 ou 12) de imunomarcção para VEGF. WOLFESBERGER et al. (2007) constataram 60% de amostras com alto nível de expressão para VEGF, utilizando apenas o percentual de imunomarcção como parâmetro de avaliação. HAZAR et al. (2003) referiram que a expressão do VEGF foi detectada em 33,8% dos pacientes humanos com linfoma não-Hodgkin, sem mencionar as características da imunomarcção.

À avaliação dos linfonodos normais, constatou-se ausência de imunomarcção para VEGF em uma (10%) das amostras e presença de 6 (60%) amostras revelando baixos escores de imunomarcção (1 e 2). Em três (30%) espécimes evidenciou-se escore de imunomarcção moderado (6). WOLFESBERGER et al. (2007) também observaram expressão do VEGF em linfonodos normais, sugerindo que a expressão do VEGF possa ser necessária para a manutenção da microcirculação fisiológica dos linfonodos.

Na técnica de imunoistoquímica empregada no presente estudo utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-VEGF-A, importante indutor da angiogênese e da linfangiogênese tumoral. Pelos resultados fica evidente que o escore de imunomarcção para VEGF-A foi significativamente maior ( $p < 0.0001$ ) nos linfomas caninos em comparação aos linfonodos saudáveis, confirmando a importância do

VEGF no comportamento biológico dos linfomas caninos. Uma vez que, não foi avaliada a mensuração da microdensidade vascular e linfática, não foi possível definir se a forte imunomarcção do VEGF-A detectada nos linfomas caninos garante a neovascularização sangüínea e/ou linfática.

Nos resultados obtidos neste estudo, evidencia-se que o anticorpo monoclonal anti-VEGF-A é eficaz na detecção do fator de crescimento do endotélio vascular em linfonodos sadios e linfomas caninos, mediante técnica imunohistoquímica. Fato também constatado por WOLFESBERGER et al. (2007). Esses resultados demonstram que o anticorpo monoclonal anti-VEGF-A pode ser utilizado em tecido canino.

HAZAR et al. (2003) evidenciaram índices de remissão tumoral significativamente maiores em pacientes com expressão negativa para VEGF. Entretanto não constataram correlações entre a expressão do VEGF, microdensidade vascular, sexo e idade do paciente, estadiamento clínico, grau histológico da neoplasia e sobrevida dos pacientes.

Na avaliação da expressão do VEGF em relação a localização anatômica, o estágio e sub-estádio clínico, o grau histológico, o imunofenótipo e a sobrevida dos linfomas caninos, não foi evidenciada nenhuma correlação estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), de forma semelhante aos resultados obtidos por HAZAR et al. (2003). Quanto a morfologia celular, os linfomas imunoblásticos e centroblásticos foram os que revelaram maiores escores de imunomarcção para VEGF.

É importante ressaltar que este trabalho não corresponde a um estudo retrospectivo, o que promove uma dependência da casuística da enfermidade na rotina hospitalar e da aceitação dos proprietários em participar da pesquisa.

Todavia, é importante salientar que entre os 15 animais avaliados, observou-se prevalência significativa de animais diagnosticados no estágio 5, portadores de linfomas de alto grau de malignidade e com elevada expressão do



VEGF, o que justifica a curta sobrevida dos pacientes, mesmo utilizando o protocolo de Madison-Wisconsin, um dos protocolos quimioterápicos mais recomendados pela literatura. Além disso, a presença de concentrações séricas elevadas e imunomarcação significativa do VEGF nos linfomas caninos, sugere a necessidade da utilização de terapias anti-angiogênicas associadas aos protocolos quimioterápicos, visando melhorar a resposta terapêutica e o tempo de sobrevida dos animais.

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente estudo, foi possível concluir que:

- Cães com linfoma apresentam média das concentrações séricas de VEGF superior a cães saudáveis.
- A média do escore de imunomarcagem para VEGF é significativamente maior nos linfomas caninos em comparação a linfonodos normais
- Não foi constatada correlação significativa entre a concentração sérica e a expressão do VEGF com a localização anatômica, estágio e sub-estádio clínico, grau histológico, imunofenótipo e a sobrevivência dos cães com linfoma.
- O VEGF é um importante biomarcador dos linfomas caninos e deve ser reavaliado em estudos posteriores com maior número de animais.
- O sub-estádio “b” apresenta correlações significativas com um menor tempo de sobrevivência em cães com linfoma.

## 7. REFERÊNCIAS (ABNT 6023, Ago/2002)

BERTOLINI, F.; PAOLUCCI, M.; PACCATORI, F.; CINIERI, S.; AGAZZI, A.; FERRUCCI, P. F.; COCOROCCHIO, E.; GOLHIRSCH, A.; MARTINELLI, G. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 106, n. 2, p. 504-509, 1999.

CASTRO JÚNIOR, G.; PUGLISI, F.; AZAMBUJA, E.; EL SAGHIR, N. S.; AWADA, A. Angiogenesis and Cancer: a cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 59, p. 40-50, 2006.

CLIFFORD, C. A.; HUGHES, D.; BEAL, M. W.; MACKIN, A. J.; HENRY, C. J.; SHOFER, F. S.; SORENMO, K. U. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 2, p. 131-135, 2001.

CHUN, R.; THAMM, D. H. Targeting angiogenesis and tumor vasculature. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. cap. 14, p. 259-266.

DE NARDI, A. B. **Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, p53 e caspase nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007. 92p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 2007.

DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; MESSICK, J. B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium**, v. 25, n. 8, p. 572-582, 2003.

FAN, T. M. Lymphoma updates. **The Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, p. 455-471, 2003.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL, R.; RAMIS, A. Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, p. 311-314, 1992.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

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

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 35-59, 1997.

FREEMAN, M. R.; SCHNECK, F. X.; GAGNON, M. L.; CORLESS, C.; SOKER, S.; NIKNEJAD, K.; PEOPLES, G. E.; KLAGSBRUN, M. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. **Cancer Research**, v.55, p. 4140-4145, 1995.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1994. 168 p.

GENTILINI, F.; CALZOLARI, C.; TURBA, M. H.; AGNOLI, C.; FAVA, D.; FORNI, M.; BERGAMINI, P. F. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. **Leukemia Research**, v. 29, p. 1263-1269, 2005.

GILES, F. J.; VOSE, J. M.; DO, K. A.; JOHNSON, M. M.; MANSOURI, T.; BOCIEK, G.; BIERMAN, P. J.; O' BRIEN, S. M.; KANTARJIAN, H. M.; ARMITAGE, J. O.; ALBITAR, M. Clinical relevance of circulating angiogenic factors in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's lymphoma. **Leukemia Research**, v. 28, p. 595-604, 2004.

GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A. K.; CALVANO, S. E.; MATUS, R. E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A. I.; LIEBERMAN, P. H. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic and clinical study. **Cancer**, v. 66, p. 480-490, 1990.

HAZAR, B.; PAYDAS, S.; ZORLUDEMIR, S.; SAHIN, B. TUNCER, I. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-Hodgkin's lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 44, n. 12, p. 2089-2093, 2003.

HIRAKAWA, S.; KODAMA, S.; KUNSTFELD, R.; KAJIYA, K.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes metastasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1089-1099, 2005.

HIRAKAWA, S.; BROWN, L. F.; KODAMA, S.; PAAVONEN, K.; ALITALO, K.; DETMAR, M. VEGF-C induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1010-1017, 2007.

JORGENSEN, J. M. The role of angiogenesis in non-Hodgkin lymphoma. **Danish Medical Bulletin**, v. 52, n. 4, p. 254, 2005.

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

KADOWAKI, I.; ICHINOHASAMA, R.; HARIGAE, H.; ISHIZAWA, K.; OKITSU, Y.; KAMEOKA, J.; SASAKI, T. Accelerated lymphangiogenesis in malignant lymphoma: possible role of VEGF-A and VEGF-C. **British Journal of Haematology**, v. 130, p. 869-877, 2005.

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

KORKOLOPOULOU, P.; THYMARA, I.; KAVANTZAS, N.; VASSILAKOPOULOS, T. P.; ANGELOPOULOU, M. K.; KOKORIS, S. I.; DIMITRIADOU, E. M.; SIAKANTARIS, M. P.; ANARGYROU, K.; PANAYIOTIDIS, P.; TSENGA, A.; ANDROULAKI, A.; DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU, I. A.; PATSOURIS, E.; PANGALIS, G. A. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. **Leukemia**, v. 19, p. 894-900, 2005.

KOSTER, A.; RAEMAEKERS, J. M. M. Angiogenesis in malignant lymphoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 17, p. 611-616, 2005.

LAMONTAGNE, K. Antiangiogenesis: new frontiers in therapeutic development. **Angiogenesis**, v. 8, p. 285-287, 2005.

MACEWEN, E. G.; HAYES, A. A.; MATUS, R. E.; KURZMAN, I. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147

cases (1978-1981). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 5, p. 564-568, 1987.

MAIOLINO, P.; DE VICO, G.; RESTUCCI, B. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell tumours and in squamous cell carcinomas of canine skin. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, p. 141-145, 2000.

MAZUR, G.; WOZNIAK, Z.; WROBEL, T.; MAJ, J.; KULICZKOWSKI, K. Increased angiogenesis in cutaneous T-cell lymphomas. **Pathology Oncology Research**, v. 10, n. 1, p. 34-36, 2004.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinária – Interpretação e Diagnóstico**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1995.

MILLANTA, F.; SILVESTRI, G.; VASELLI, C.; CITI, S.; PISANI, G.; LORENZI, D.; POLI, A. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 350-357, 2006.

MOEHLER, T. M.; NEBEN, K.; HO, A. D.; GOLDSCHMIDT, H. Angiogenesis in hematologic malignancies. **Annals in Haematology**, v. 80, p. 695-705, 2001.

MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J. E. Tumors in domestic animals. 3. ed. California: University of California Press, 1990. cap. 6, p. 231-307.

MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; AMORIM, R. L.; BANDARRA, E. P. Immunophenotyping of canine lymphoma in paraffin embedded tissue. **Continuous Education Journal**, v. 4, n. 3, p. 71-75, 2001.

NAGY, J. A.; VASILE, E.; FENG, D.; SUNDBERG, C.; BROWN, L. F.; DETMAR, J.; LAWITTS, J. A.; BENJAMIN, L.; TAN, X.; MANSEAU, E.L.; DVORACK, A. M.; DVORACK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 11, p. 1497-1506, 2002.

NIITSU, N.; OKAMOTO, M.; NAKAMINE, H.; YOSHINO, T.; TAMARU, J.; NAKAMURA, J.; HIGASHIHANA, M.; HIRANO, M. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **European Journal of Haematology**, v. 68, p. 91-100, 2002.

ORPANA, A.; SALVEN, P. Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies. **Leukemia & Lymphoma**, v. 43, n. 2, p. 219-224, 2002.

PANDYA, N. M.; DHALLA, N. S.; SANTANI, D. D. Angiogenesis: a new target for future therapy. **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 265-274, 2006.

PARODI, A. L.; DARGENT, F.; CRESPEAU, F. Histological classification of canine malignant lymphomas. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 35, p. 178-192, 1988.

PODAK, K.; ANDERSON, K. C. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1383-1396, 2005.

PONCE, F.; MAGNOL, J. P.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of – morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 158-166, 2004.



REBUZZI, L.; WILLMANN, M.; SONNECK, K.; GLEIXNER, K. V.; FLORIAN, S.; KONDO, R.; MAYERHOFER, M.; VALES, A.; GRUZE, A.; PICKL, W. F.; THALHAMMER, J. G.; VELENT, P. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, n. 3-4, p. 320-333, 2007.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 488-493, 2002.

RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; PACIELLO, O.; MARTANO, M.; DE VICO, G.; PAPPARELLA, S. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, n. 4, p. 252-259, 2003.

RUEGG, C. Role of COX-2 and inflammatory cells in tumor angiogenesis and tumor progression. Disponível em: [www.nccr-oncology.ch](http://www.nccr-oncology.ch). Acesso em: 23 de setembro de 2007.

SALVEN, P.; TEERENHOVI, L.; JOENSUU, H. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v. 90, n. 8, p. 3167-3172, 1997.

SALVEN, P.; ORPANA, A.; TEERENHOVI, L.; JOENSUU, H. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma: a single institution study of 200 patients. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3712-3718, 2000.

SCHEIDEGGER, P.; WEIGLHOFER, W.; SUAREZ, S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. **Biological Chemistry**, v. 380, p. 1449-1454, 1999.

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

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. cap. 31, p. 699-722.

VONDERHAAR, M. A.; MORRISON, W. B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats**. 2. ed. Wyoming: Teton New Media, 2002. cap. 45, p. 641-665.

WOLFSBERGER, B.; GUIJA DE ARESPOCHAGA, A.; WILLMANN, M.; GERNER, W.; MILLER, I.; SCHWENDENWEIN, I.; KLEITER, M.; EGERBACHER, E.; THALHAMMER, J. G.; MUELLAUER, L.; SKALICKY, M.; WALTER, I. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 1, p. 30-40, 2007.

## APÊNDICES

## **A. TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA):**

As amostras de soro sanguíneo congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante quatro a 10 meses, foram utilizadas para a mensuração da concentração sérica do fator de crescimento do endotélio vascular utilizando o método de ensaio imunoenzimático em sanduíche, do kit comercial Quantikine – Human VEGF-C (R&D Systems).

O kit utilizado consta dos seguintes itens:

- Microplaca composta por 96 poços revestidos com o anticorpo monoclonal anti-VEGF-C;
- Conjugado: 21mL de anticorpo policlonal anti-VEGF-C conjugado a moléculas de peroxidase e agentes preservativos;
- Padrão: 70ng de VEGF-C recombinante humano em uma solução tampão liofilizada com preservativos;
- Diluente RD1W: 11mL de solução tampão com base protéica e preservativos;
- Diluente calibrador concentrado RD6U: 21mL de soro animal com preservativos;
- Concentrado tampão de lavagem: 21mL de solução concentrada de surfactante tamponado com preservativos;
- Reagente colorido A: 12,5mL de peróxido de hidrogênio;
- Reagente colorido B: 12,5mL de cromógeno (tetrametilbenzidina);
- “Stop solution”: 6 mL de ácido sulfúrico (2N).

A técnica de ELISA em sanduíche utilizada (conforme as recomendações do fabricante) está descrita na seqüência:

1. Preparar os reagentes, amostras e solução padrão conforme as recomendações do fabricante:

- Deixar todos os reagentes em temperatura ambiente antes da sua utilização;
  - Solução tampão: diluir 20mL da solução tampão concentrada em 480mL de água destilada;
  - Solução substrato: Misturar os reagentes coloridos A e B 15 minutos antes da sua utilização. Proteger a solução final da luz;
  - Diluente calibrador RD6U: diluir 10mL do diluente calibrador em 10mL de água destilada;
  - Diluir 40 $\mu$ L de cada amostra de soro descongelado com 160 $\mu$ L do diluente calibrador RD6U previamente diluído;
  - Amostras padrão: reconstituir o padrão com 1mL de água destilada, de forma a produzir uma solução de estoque com 70,000pg/mL. Pipetar 900 $\mu$ L do diluente calibrador juntamente com 100 $\mu$ L da solução de estoque, de forma a obter uma solução com 7000pg/mL. Pipetar 500 $\mu$ L desta solução no próximo frasco e realizar o mesmo procedimento nos frascos subsequentes de forma a produzir soluções de 3500pg/mL, 1750pg/mL, 875pg/mL, 438pg/mL, 219pg/mL e 109pg/mL. O padrão de 7000pg/mL representa a concentração máxima e o diluente calibrador a concentração mínima (0pg/mL).
2. Adicionar 10 $\mu$ L do diluente RD1W em cada poço da microplaca;
  3. Adicionar 50 $\mu$ L do padrão e das amostras a cada poço e incubar em temperatura ambiente, durante 2 horas, em um “shaker” horizontal para microplacas (50rpm);
  4. Aspirar o conteúdo de cada poço e lavar quatro vezes com a solução tampão. Remover o excesso da solução tampão invertendo a microplaca contra um papel toalha;

5. Adicionar 200 $\mu$ L do conjugado em cada poço e incubar em temperatura ambiente, durante duas horas, em um “shaker” horizontal para microplacas (50rpm);
6. Aspirar o conteúdo de cada poço e lavar quatro vezes com a solução tampão. Remover o excesso da solução tampão invertendo a microplaca contra um papel toalha;
7. Adicionar 200 $\mu$ L da solução substrato em cada poço e incubar em temperatura ambiente, durante 30 minutos, sob proteção da luz;
8. Adicionar 50 $\mu$ L da “stop solution” em cada poço. A cor da solução presente em cada poço deve mudar de azul para amarelo. Após 30 minutos, determinar a densidade óptica em um leitor de microplacas com capacidade de mensurar absorbância de 450nm.
9. A concentração sérica do VEGF deve ser determinada mediante análise de regressão linear.

## **B. TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA:**

Cortes histológicos com três micrômetros de espessura foram depositados em lâminas de vidro previamente preparadas com cola líquida a base de organossilano (A3648 – SIGMA), objetivando reduzir os riscos de perda de material durante a técnica de imunistoquímica. As lâminas permaneceram em estufa a 60°C durante 24 horas e posteriormente foram submetidas aos processos descritos na seqüência:

### 1- Desparafinização:

- Passagem em xilol I, durante 30 minutos, em temperatura ambiente;
- Passagem em xilol II, durante 20 minutos, em temperatura ambiente.

### 2- Hidratação:

- Passagem em álcool absoluto I / II / III, 3 minutos em cada etapa;
- Álcool a 95%, durante 3 minutos;
- Álcool a 85%, durante 3 minutos;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

### 3- Recuperação antigênica:

- Passar as lâminas em água destilada levemente aquecida;
- Imergir as lâminas em solução de EDTA (pH 8,0), em banho-maria (95°C), durante 30 minutos (anticorpos primários CD3 e CD79a);
- Imergir as lâminas em solução de EDTA (pH 9,0), em banho-maria (95°C), durante 30 minutos (anticorpo primário VEGF-A);
- Deixar esfriar em temperatura ambiente durante 20 minutos;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

### 4- Bloqueio da peroxidase endógena:

- Imergir as lâminas em água oxigenada 10 volumes, durante 20 minutos;

- Lavar em água destilada (10 vezes)

5- Lavar duas vezes em solução tampão de TRIS, durante 5 minutos.

6- Incubação com o Anticorpo primário:

- Diluir o anticorpo primário em solução diluidora de anticorpo (Dako) (Tabela 5 – página 17);
- Cobrir os cortes com o anticorpo
- Deixar as lâminas em câmara úmida durante 18hs a 4°C (geladeira);
- Lavar com solução tampão de TRIS;
- Remover o excesso de TRIS.

7- Incubação com anticorpo secundário conjugado a um polímero e moléculas de peroxidase do kit EnVision Dual-link (Dako – K4063):

- Cobrir os cortes com o anticorpo secundário;
- Deixar as lâminas em temperatura ambiente, durante 30 minutos (recomendação do fabricante);
- Lavar com solução tampão de TRIS. Tempo: 5 minutos.

8- Revelação com o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, pronto para uso – Dako - código K34466)

- Cobrir os cortes com o DAB;
- Tempo de DAB: 5 minutos, ao abrigo da luz
- Passar em solução tampão de TRIS;
- Lavar em água destilada (10 vezes).

9- Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer:

- Imergir as lâminas no corante;
- Tempo: 3 minutos;
- Lavar em água corrente durante 10 minutos;



- Lavar em água destilada (uma vez).

10- Desidratação dos cortes e montagem das lâminas:

- Passagem em álcool 85° e 95°;
- Passagem em álcool absoluto I / II / III – 3 minutos em cada etapa;
- Passagem em xilol I e II – 3 minutos em cada etapa;
- Montar as lâminas com resina sintética e lamínulas.

**C. SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA:****EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético):**

- 1000mL de água destilada
- 0,3722g de EDTA
- Acertar o pH em 8,0 ou 9,0 (de acordo com o anticorpo primário)

**TRIS solução tampão:**

- 1000mL de água destilada
- 6,0g Trizma base (Sigma – código T1503).
- 8,5g cloreto de sódio
- Acertar o pH em 7,4

### D. DADOS INDIVIDUAIS DE CÃES SADIOS E DE CÃES COM LINFOMA

Tabela 1D. Dados individuais referentes a epidemiologia, estadiamento, grau histológico, morfologia celular, imunofenótipo e a sobrevida de cães com linfoma (FCAV – UNESP / Jaboticabal, SP, 2007).

<b>Animais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Localização Anatômica</b>	<b>Estádio clínico</b>	<b>Sub-estádio</b>	<b>Grau Histológico</b>	<b>Morfologia celular</b>	<b>Imunofenótipo</b>	<b>Sobrevida (dias)</b>
1	Macho	7	Multicêntrico	5	b	Baixo	Misto	B	9
2	Macho	10	Extra-nodal	5	b	Alto	Imunoblástico	B	0
3	Macho	10	Multicêntrico	5	b	Alto	Imunoblástico	T	1
4	Fêmea	3	Multicêntrico	5	a	Alto	Imunoblástico	B	240
5	Macho	4	Multicêntrico	5	b	Alto	Anaplásico	T	4
6	Macho	9	Cutâneo	5	b	Alto	Centroblástico	B	90
7	Fêmea	4	Alimentar	5	b	Alto	Linfoblástico	B	0
8	Macho	7	Cutâneo	5	a	Alto	Anaplásico	T	30
9	Fêmea	4	Multicêntrico	4	a	Baixo	Centrofítico	B	330
10	Fêmea	4	Multicêntrico	4	b	Alto	Centroblástico	B	30
11	Fêmea	5	Multicêntrico	4	a	Alto	Centroblástico	B	330
12	Fêmea	15	Multicêntrico	4	b	Alto	Imunoblástico	B	30
13	Macho	6	Cutâneo	5	b	Alto	Linfoblástico	T	1
14	Fêmea	7	Cutâneo	5	a	Alto	Centroblástico	T	30
15	Macho	6	Cutâneo	5	a	Alto	Centroblástico	B	90

Tabela 2D. Valores individuais referentes às concentrações séricas (pg/mL) e a expressão do VEGF em cães saudáveis e cães com linfoma (FCAV – UNESP / Jaboticabal, SP, 2007).

Animais	Concentração sérica de VEGF (pg/mL)		Expressão do VEGF	
	Sadios n=10	Linfoma n=15	Sadios n=10	Linfoma n=15
1	30,16	0,00	6	6
2	58,66	161,26	1	8
3	7,36	0,00	2	8
4	0,00	149,86	1	12
5	0,00	13,06	6	8
6	0,00	7,36	1	12
7	52,96	417,75	2	12
8	0,00	0,00	2	9
9	30,16	35,86	6	8
10	0,00	58,66	0	8
11		172,66		6
12		252,46		12
13		58,66		6
14		0,00		12
15		0,00		12