

ADRIANA WANDERLEY DE PINHO PESSOA

CLASSIFICAÇÃO CITOISTOLÓGICA,
IMUNOISTOQUÍMICA, LESÃO DE DNA,
MORFOMETRIA E ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR DOS LINFOMAS EM CÃES

BOTUCATU
2005

ADRIANA WANDERLEY DE PINHO PESSOA

CLASSIFICAÇÃO CITOISTOLÓGICA,
IMUNOISTOQUÍMICA, LESÃO DE DNA,
MORFOMETRIA E ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR DOS LINFOMAS EM CÃES

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista "Julio
de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária.

Orientador: **Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira**

Botucatu
2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Pessoa, Adriana Wanderley de.

Classificação citoistológica, imunoistoquímica, lesão de DNA,
Morfometria e índice de proliferação celular dos linfomas em cães /
Adriana Wanderley de Pinho Pessoa. – 2005.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu, 2005.

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Assunto CAPES: 50501062

1. Câncer em cão 2. Cão - Doenças

CDD 636.7089665

Palavras-chave: AgNOR; Cão; Imunoistoquímica; Linfoma; Teste do
cometa

À minha mãe, exemplo de perseverança e força e
uma das pessoas responsáveis pela oportunidade de
vir a este mundo.

AGRADECIMENTOS

Inteligência Suprema e Causa Primeira de Todas as Coisas – **DEUS!**. *“E onde encontrar a prova da existência de Deus? Num axioma científico: não há efeito sem causa. Procurai a causa de tudo que não é obra do homem, e vossa razão vos responderá*”*.

Torna-se difícil agora traduzir, em forma de palavras, todos os momentos e experiências compartilhadas com as pessoas que fizeram parte de minha vida durante estes quatro anos - pois mais importante que o fim é o processo, o meio pelo qual se chega a esse fim. Com certeza, esses encontros não foram casuais. De qualquer forma, fica registrada minha eterna gratidão por tudo que recebi de cada um de vocês.

Meu sincero obrigado ao meu orientador Prof. Julio Lopes Sequeira. Mais que experiência profissional e ética, um ser humano íntegro, bom e que busca sempre o lado melhor das pessoas. Obrigada por toda paciência, incentivo e carinho durante essa importante etapa de minha vida.

À Profa. Noeme Sousa Rocha, exemplo de força, persistência, dedicação profissional e amiga querida.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, em especial aos docentes (e ex-docentes) do Serviço de Patologia – Prof. Julio Lopes Sequeira, Profa. Noeme Sousa Rocha e Profa. Renée Laufer Amorim, Prof. Enio Pedone Bandarra, Profa. Laura Álvares de Figueirêdo, pelos ensinamentos, carinho e agradável convivência desde

* KARDEC, A . O livro dos Espíritos, Cap.I, p.45

meus primeiros passos na patologia. Porque a gente está sempre aprendendo!

Aos funcionários do Serviço de Patologia: Sr. Noel, meu contemporâneo dos primeiros passos e Maury Raul. Obrigada pelo apoio e ajuda sempre nas horas certas.

À Universidade Estadual do Ceará, em especial a Faculdade de Veterinária, minha casa de trabalho, por permitir e estimular o intercâmbio e aprimoramento técnico-científico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio a pesquisa e à CAPES/PICD pela concessão da bolsa.

Agradecimento muito especial a Dra. Daisy Fávero Salvadori, modelo de generosidade e seriedade profissional - sempre nos auxiliando nos momentos críticos da execução do trabalho - e aos funcionários e pós-graduandos do Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN) da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu.

Aos Residentes (que são ou serão pós-graduandos) na Patologia. Porque nestes quatro anos de convivência diária, os vi crescer (e cresci com eles também): Louisiane, Osimar, Sara, Celmira, Fabinho, Camilinha, Leandro, Marcela e Arlete e também as meninas da ornito Mércia, Edna, Aline e Silvinha. Obrigada pela força, convivência agradável e amizade.

À Anne Marie e Gaspari (e sua creche), amigos queridos de percurso, meus sinceros agradecimentos e porque existem sentimentos que as palavras são insuficientes para exprimir o significado.

À Sandrinha (quase-minha-afilhada), uma jóia rara. Uma pessoa carinhosa e dedicada aos amigos.

À Sara Maria, minha irmã por parte de orientador, pela convivência e ajuda nos momentos difíceis do desenvolvimento dos nossos trabalhos.

Agradeço também ao Fábio, sempre disposto a nos ajudar, até mesmo quando tem muitas tarefas designadas pela sua orientadora a cumprir.

À minha família botucatuense de coração, D. Édera e Eliana - sempre afetuosas e solidárias - e D. José e Luciano, por sempre me proporcionarem o "cheiro" do clima familiar, mesmo há mais de três mil km de casa.

Ao casal de amigos querido, Arnold e Neide, exemplos de amor e dedicação ao que fazem. Nossas almas conseguem **ver** o tamanho da minha gratidão.

Ao pessoal do Centro Cristão-Espírita "Amor e Luz", pelos preciosos momentos de aprendizado, paz e alegria compartilhados.

Aos residentes das outras áreas da FMVZ, aos estagiários e demais docentes desta instituição, meu muito obrigado pela ajuda direta ou indireta. Ninguém faz nada sozinho.

Ao meu tio César, sempre incentivando, torcendo e me ajudando nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos Cláudia e Fabiano, além do Tio Tarcizo e Iolanda. Muito obrigada pelas vibrações positivas e torcida para conclusão deste trabalho.

E, é claro, não podia deixar de expressar minha profunda veneração e reverência aos animais utilizados nesta e em todas as pesquisas em desenvolvimento. Chegará o dia em que o respeito a eles será tão natural quanto respirar. E neste dia nos tornaremos mais humanos.

*" Você,
Lua,
A luz nas várzeas desertas
Do sertão que sou."*

(Paulo Petrola)

RESUMO

Os linfomas estão entre as neoplasias mais freqüentemente observadas no cão. Do ponto de vista etiológico, epidemiológico, clínico, morfológico e imunofenotípico essa neoplasia apresenta muitas semelhanças com os linfomas não Hodgkin humano. O presente estudo tem como objetivos investigar as características citomorfológicas (utilizando-se as classificações de Kiel, *Working Formulation* e de FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1994), imunofenotípicas (usando marcadores CD3, CD79a, CD4 e CD8), proliferação celular pela técnica citoquímica do AgNor e freqüência de danos do DNA por meio do teste do cometa. Dos 53 casos estudados, predominaram os linfomas de grau alto, independente da classificação utilizada. A freqüência de imunorreatividade para os linfomas de origem B (CD79a+/CD3-) e de origem T (CD3+/CD79a-) foi a mesma (41,5%). O imunofenótipo (CD4+CD8-) foi observado em 12 casos (22,64%) e do imunofenótipo (CD8+CD4-) em dez casos (18,86%). O índice proliferativo determinado pelo método de AgNor foi superior nos linfomas de grau alto nas variáveis estudadas. O índice de dano do DNA avaliado pelo teste do cometa não se alterou quando foram considerados os graus de

malignidade das neoplasias. No entanto houve correlação entre os danos de DNA do sangue e os danos do DNA da massa neoplásica no mesmo animal ($P < 0,05$).

Palavras-chave: Linfomas caninos, imunohistoquímica, AgNor, Teste do Cometa.

ABSTRACT

Malignant lymphoma are one of the most common neoplasia of the dogs. Several aspects like etiology, epidemiology, clinical signs, morphology and, immunophenotypy are quite similar between human and canine non-Hodgkin's lymphomas. The aim of this study was to investigate the citohistomorphologic grade (by Kiel, Working Formulation's and Fournel-Fleury classifications), immunophenotype expression (using CD3, CD79a, CD4 and, CD8 markers), proliferation index (argyrophil nucleolar organizer regions [AgNOR]) and the DNA damage (Comet Test) in fifth three cases of canine lymphomas. The high grade tumors predominate in the Kiel, Working Formulation's and Fournel-Fleury classifications. The frequency of T lymphomas (CD3+/CD79a-) and B lymphomas(CD3-/CD79a+) was the same, 41,5% each one. Among the T subtypes the CD4+/CD8- phenotype predominates, 22,64% (twelve cases) and, while the CD4-/CD8+ phenotype was less common, 18,86% (ten cases). The proliferation index determined by AgNOR method was larger in the high grade lymphomas. DNA damage did not correlate with the lymphoma cytomorphological grade, but the blood DNA damage and tumoral mass DNA damage shows correlation when compared in each animal ($P < 0,05$).

Key words: canine lymphoma, immunohistochemical, AgNOR, comet assay.

ÍNDICE

1. Introdução	18
2. Revisão da Literatura	22
2.1. Caracterização dos linfomas	22
2.2. Estudos histomorfológicos	29
2.3. Correlação clínico-patológica	33
2.4. Estudos Citomorfológicos	35
2.5. Imunofenotipagem dos linfomas	37
2.6. Avaliação da proliferação celular nos linfomas caninos utilizando-se a técnica do AgNor	44
2.7. Teste do Cometa	53
3. Material e Método	60
3.1. Origem das amostras	60
3.2. Estadiamento clínico e classificação anatômica dos linfomas	61
3.3. Técnica citopatológica e processamento das amostras	61
3.4. Processamento histológico	63
3.5. Imunofenotipagem dos linfomas	64
3.5.1. Bloqueio da peroxidase endógena	65
3.5.2. Recuperação antigênica	66
3.5.3. Sistema de detecção e amplificação de sinais/anticorpo secundário	67
3.5.4. Revelação e contracoloração	68
3.6. Técnica de coloração pela prata AgNors	70
3.6.1. Avaliação quantitativa de Agnors	71
3.7. Estudo morfométrico	73
3.8. Avaliação do dano de DNA	74

3.8.1. Teste do cometa	74
3.9. Análise estatística	77
4. Resultados	79
4.1. Sobre os dados clínicos e achados de necropsia	80
4.2. Estadiamento dos linfomas dos cães	82
4.3. Emprego das classificações de Kiel, <i>Working Formulation</i> e de FURNEL-FLEURY <i>et al.</i> , (1994) nos linfomas não Hodgkin dos cães	90
4.3.1. Características citomorfológicas dos tipos de linfoma, segundo a classificação de Kiel e seus correspondentes nas classificações <i>Working Formulation</i> e de FURNEL-FLEURY <i>et al.</i> , (1994) nos linfomas não Hodgkin dos cães	91
4.3.1.1. Linfomas de grau baixo	91
4.3.1.2. Linfomas de grau alto	95
4.4. Imunofenotipagem dos linfomas	102
4.5. Avaliação qualitativa e quantitativa do AgNor	111
4.5.1. Área média por ponto de AgNor	114
4.5.2. Área média de AgNor no núcleo	117
4.5.3. Área média relativa de AgNor no núcleo	119
4.5.4. Área média do núcleo	121
4.5.5. Média do número de pontos de AgNor por célula	123
4.6. Estudo morfométrico	125
4.7. Teste do cometa para avaliar danos de DNA nas células dos linfomas dos cães	132
5. Discussão	133
5.1. Estadiamento dos linfomas	135

5.2. Emprego das classificações de Kiel, <i>Working Formulation</i> e de FOURNEL-FLEURY <i>et al.</i> , (1994) nos linfomas não Hodgkin dos cães	139
5.3. Imunofenotipagem dos linfoma	141
5.4. Avaliação do índice de proliferação celular utilizando-se a técnica e AgNor	148
5.5. Estudo morfométrico	153
5.6. Teste do cometa	155
6. Conclusões	162
7. Referências Bibliográficas	164
8. Anexos	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento clínico dos linfomas caninos proposto pela <i>World Health Organization</i> (WHO; <i>TNM Classification of Tumors in Domestic Animals</i> , Geneva, 1980)	26
Tabela 2	Classificação anatômica dos linfomas caninos segundo JACOBS <i>et al.</i> , 2002	27
Tabela 3	Freqüência dos tipos histiocitológico de linfomas diagnosticados de acordo com a classificação de Kiel	32
Tabela 4	Freqüência dos tipos histiocitológico de linfomas diagnosticados de acordo com a classificação da WF	33
Tabela 5	Painel dos anticorpos e etapas da técnica de imunistoquímica no utilizadas para imunofenotipagem dos linfomas dos cães	69
Tabela 6	- Fórmulas utilizadas para mensurações de AgNors	72
Tabela 7	– Estadiamento clínico dos cães com linfoma de acordo com os padrões estabelecidos pela <i>World Health Organization</i> (WHO; <i>TNM Classification of Tumors in Domestic Animals</i>)	82
TABELA 8	Classificação anatômica dos 53 tipos de linfoma de acordo com JACOBS <i>et al.</i> , 2002	84
Tabela 9	Classificação e distribuição por sexo dos 53 casos de linfomas de cão	86
Tabela 10	Distribuição racial dos 53 animais portadores de linfoma	87
Tabela 11	Faixa etária e média de idade dos 53 casos de linfoma	88

Tabela 12 Resultados das classificações citoistológicas dos linfomas estabelecidos de acordo com os critérios de Kiel e FF	89
Tabela 13 Resultados das classificações citoistológicas dos linfomas estabelecidos de acordo com os critérios da WF	90
Tabela 14 Correlação entre os graus de malignidade e imunofenotipagem dos 53 linfomas caninos utilizando-se a classificação de Kiel e FF	102
Tabela 15 Correlação entre os graus de malignidade e imunofenotipagem dos 53 linfomas caninos utilizando-se a classificação da WF	104
Tabela 16 Correlação citomorfológica e expressão dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 dos 53 linfomas caninos utilizando-se a classificação de Kiel	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Achados macroscópicos de cães com linfoma.	81
Figura 2	Estadiamento clínico dos cães com linfoma de acordo com os padrões estabelecidos pela <i>World Health Organization</i> (WHO; <i>TNM Classification of Tumors in Domestic Animals</i>).	84
Figura 3	Classificação anatômica dos linfomas caninos segundo JACOBS <i>et al.</i> , 2002.	86
Figura 4	Classificação e distribuição por sexo dos 53 casos de linfomas de cão.	87
Figura 5	Distribuição por raça dos 53 animais portadores de linfoma	88
Figura 6	Faixa etária e média de idade dos 53 casos de linfoma	89
Figura 7	Linfoma Linfocítico de grau baixo (Kiel e FF) equivalente ao linfoma linfocítico também de grau baixo na WF. H&E.	97
Figura 8	Linfoma Centrocítico de grau baixo (Kiel e FF) equivalente ao linfoma difuso de pequenas células clivadas de grau intermediário na WF. H&E.	97
Figura 9	Linfoma Centrocítico-centroblástico de grau baixo (Kiel e FF) equivalente linfoma difuso de pequenas células clivadas de grau intermediário na WF. H&E.	98
Figura 10	Linfoma de células T pleomórficas de grau baixo (Kiel e FF) equivalente linfoma difuso de pequenas células clivadas de grau intermediário na WF. H&E.	98

Figura 11	Linfoma linfoplasmacítico (Kiel e FF) equivalente ao linfoma linfoplasmocitóide de grau baixo na WF. H&E.	99
Figura 12	Linfoma de zona T (Kiel e FF) equivalente ao linfoma difuso misto de pequenas e grandes células de grau intermediário na WF. H&E.	99
Figura 13	Linfoma Imunoblástico de grau alto nas classificações de Kiel, Fournel-Fleury <i>et al.</i> (1994) e <i>Working Formulation</i> . Infiltração na medula óssea. Megacariócito (seta). H&E.	100
Figura 14	Linfoma Centrobástico de grau alto (Kiel e FF) equivalente ao linfoma de grandes células não-clivadas de grau intermediário na WF. H&E.	100
Figura 15	Linfoma Linfoblástico de grau alto nas classificações de Kiel, Fournel-Fleury <i>et al.</i> (1994) e <i>Working Formulation</i> . Grande número de mitoses. (setas). H&E.	101
Figura 16	Linfoma de Grandes Células Anaplásicas de grau alto (Kiel e FF) equivalente ao linfoma imunoblástico de grau alto na WF. H&E.	101
Figura 17	Distribuição dos imunofenótipos e graus de malignidade dos 53 casos de linfoma de acordo com a classificação de Kiel e FF	104
Figura 18	Distribuição dos imunofenótipos e graus de malignidade dos 53 casos de linfoma de acordo com a classificação da WF	107
Figura 19	Linfoma de células T pleomófico de grau baixo (Kiel e FF) apresentando intensa imunomarcção de membrana CD3+	109

Figura 20	Linfoma Linfoplasmacítico de grau baixo (Kiel e FF). Manguito perivascular no sistema nervoso central com imunomarcção de membrana CD79a+.	109
Figura 21	Linfoma Imunoblástico de grau alto (Kiel e FF). Subpopulações de linfócitos T neoplásicos apresentando imunomarcção de membrana CD4+	110
Figura 22	Linfoma de Zona T de grau baixo (Kiel e FF). Subpopulações de linfócitos T neoplásicos apresentando imunomarcção de membrana CD8+	110
Figura 23	PAAF. Linfoma Imunoblástico de grau alto (Kiel e FF). Múltiplos AgNors (padrão de distribuição tipo II) espalhados nos núcleos das células neoplásicas.	113
Figura 24	PAAF. Linfoma Imunoblástico de grau alto (Kiel e FF). Múltiplos AgNors (padrão de distribuição tipo II) espalhados nos núcleos das células neoplásicas.	113
Figura 25	Área média por ponto de AgNor (μm^2) observada nos exames citológicos dos 29 cães portadores de linfoma, de acordo com a classificação de Kiel e FF.	115
Figura 26	Área média por ponto de AgNor (μm^2) observada nos exames citológicos dos 29 cães portadores de linfoma, de acordo com a classificação da WF.	116
Figura 27	Área média de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação de Kiel e FF.	117
Figura 28	Área média de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação da WF	118

Figura 29	Área média relativa de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação Kiel e FF	119
Figura 30	Área média relativa de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação da WF.	120
Figura 31	Área média do núcleo (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação Kiel e FF.	121
Figura 32	Área média do núcleo (μm^2) avaliado no exame citológico dos 29 cães com linfoma de acordo com a classificação da WF na coloração pelo AgNor.	122
Figura 33	Área média do número de pontos de AgNor por célula avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação Kiel e FF.	123
Figura 34	Área média do número de pontos de AgNor por célula avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação da WF.	124
Figura 35	Área média do núcleo e citoplasma (μm^2) das células neoplásicas de acordo com a classificação de Kiel e FF.	126
Figura 36	Área média do núcleo e citoplasma (μm^2) das células neoplásicas de acordo com a classificação da WF.	127
Figura 37	Média do diâmetro nuclear e citoplasmático das células neoplásicas de acordo com a classificação de Kiel e FF.	128

Figura 38 Média do diâmetro nuclear e citoplasmático das células neoplásicas de acordo com a classificação da WF.	129
Figura 39 Relação núcleo:citoplasma das células neoplásicas de acordo com a classificação de Kiel e FF.	130
Figura 40 Relação núcleo:citoplasma das células neoplásicas de acordo com a classificação da WF.	131
Figura 41 Distribuição das amostras de sangue e de massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com Kiel e FF.	133
Figura 42 Distribuição das amostras de sangue e da massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com WF.	133
Figura 43 Distribuição das amostras de sangue e da massa tumoral proveniente dos cães portadores de linfoma e utilizadas no teste do cometa, classificados de acordo com os esquemas de Kiel e WF.	135
Figura 44 Avaliação de dano no DNA ou <i>Tail moment</i> (TM) das amostras de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com Kiel e FF.	136

- Figura 45 Avaliação de dano no DNA ou *Tail moment* (TM) das amostras de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo da WF. **137**
- Figura 46 Avaliação de dano no DNA ou *Tail moment* (TM) das amostras pareadas de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com Kiel e FF **138**
- Figura 47 Avaliação de dano no DNA ou *Tail moment* (TM) das amostras pareadas de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com a classificação da WF. **139**
- Figura 48 Linfoma linfoblástico de grau alto (Kiel e FF). Células neoplásicas de linfonodo visualizadas em microscópio de fluorescência formando cometas com tamanhos diferentes de cauda. **140**
- Figura 49 Células individualizadas do sangue de cão portador de linfoma visualizadas em microscópio de fluorescência. As formações das caudas de cometa são incipientes. **140**

"Amar-te é cultivar flores
Todo dia nascem
Cada dia fenecem.

Amar-te é cultivar flores
E renascer cada dia

Amar-te é cultivar flores
É serviço de jardineiro
A construção desta casa
Não é obra de arquitetos
Não é obra de engenheiro.

Envolver a vida e você
Num só sentimento do mundo
Amar-te é cultivar flores
E um sentimento sem fundo."

(Paulo Petrola)

"O que vemos, não é o que vemos, senão
aquilo que somos"

(Fernando Pessoa)

Agradecimento Especialíssimo!

Aos meus queridos amigos: **Julinho e Cris.**

Porque há amigos que são mais que irmãos!

".....

E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências. A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida.....mas é delicioso que eu saiba e sinta que os adoro, embora não declare e não os procure sempre..."

(Vinícius de Moraes)

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela capacidade que as células transformadas possuem de escaparem dos mecanismos de controle do crescimento celular, invadirem os tecidos adjacentes e se espalharem pelo organismo. O comportamento das células neoplásicas é determinado por alterações genéticas as quais conferem as essas células a capacidade de ignorar os rígidos controles dos mecanismos de crescimento. Entretanto, o comportamento agressivo das células tumorais não somente refletem sua constituição genética mas também sua interação com o hospedeiro, estabelecendo que o microambiente do tumor é um fator regulador importante para o comportamento das células (WALTERS, 1998).

Existem fortes evidências que o aparecimento de neoplasias nos animais domésticos vêm aumentando significativamente. De acordo com PRIESTER, (1980), dentre os fatores que contribuem para essa incidência está a maior expectativa de vida desses animais bem como o estreitamento de laços afetivos entre estes e o homem. Além disso, o avanço nas técnicas de diagnóstico e tratamento induzem a necessidade da educação continuada dos profissionais, particularmente dos patologistas e clínicos veterinários, com objetivo de estabelecer critérios seguros de classificação e estadiamento dos tumores.

Estudos de Patologia Comparada, particularmente na área de oncologia, vem ganhando cada vez mais espaço, pois existe grande interesse em correlacionar etiologia e características das neoplasias nos animais e no homem (GREENLEE *et al.*, 1990). O linfoma não-Hodgkin na espécie canina e humana é um exemplo disso. As semelhanças desse tipo de linfoma nestas espécies são suficientes para fundamentar a asserção de utilizar o cão como modelo experimental no estudo e descoberta de novas terapias e procedimentos clínico-cirúrgicos a ser implementados para o homem, beneficiando ambas as espécies (GREENLEE *et al.*, 1990, TESKE, 1994, FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997 e FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

Para se estabelecer o protocolo de tratamento dos linfomas não-Hodgkin (LNH) na espécie humana é obrigatória a combinação do diagnóstico morfológico com a imunofenotipagem (Soares & Arias, 1999). Na medicina veterinária, a imunofenotipagem não é realizada como rotina devido ao alto custo dos anticorpos e da limitada quantidade de marcadores específicos para os tecidos do cão.

A Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) é um método de investigação diagnóstica baseado na morfologia celular. Dentre as vantagens deste método estão seu baixo custo, rapidez e de uso ambulatorial (ROCHA *et al.*, 2001a; ROCHA *et al.*, 2001b). Estudo recente

elaborado por SUZANO (2004) aliou o uso da PAAF e imunocitoquímica para classificação e diagnóstico dos linfomas dos cães.

Com base nessas considerações preliminares, o presente estudo tem como objetivos:

- Determinar as características citoistológicas e prevalência dos tipos celulares dos linfomas não-Hodgkin (LNH) dos cães classificados de acordo com os esquemas de Kiel e *Working Formulation - Nacional Cancer Institute* (WF-NCI) para os LNH humanos e sua correlação com a classificação para os linfomas nos cães proposta por Fournel-Fleury (1997);
- Efetuar a imunofenotipagem dessas neoplasias no material fixado em parafina, estabelecendo a origem T, B, ou misto dessas células;
- Avaliar a eficiência da citologia por aspiração com agulha fina (CAAF) associada aos métodos de classificação citológica e de imunofenotipagem como critério de diagnóstico rápido e seguro dos LNH dos cães;
- Estabelecer a caracterização citomorfométrica dos LNH nos cães como um indicador seguro de malignidade;

- Investigar o índice de proliferação das células malignas nos diversos tipos de linfomas utilizando a técnica citoquímica do AgNors;
- Avaliar os danos no DNA nas células neoplásicas e do sangue dos cães portadores de linfoma através do teste do cometa.

2. Revisão de Literatura

2.1 Caracterização dos Linfomas Caninos

Linfoma é uma das neoplasias mais freqüentes na espécie canina. Também chamado de linfossarcoma e linfoma maligno, representa cerca de 7 a 24% de todas as neoplasias caninas e 83% dos tumores de origem hematopoiética. (CAPURRO *et al.*, 1992; TESKE, 1994 e TESKE *et al.*, 1994; MILNER *et al.*, 1996; VONDEHAAR & MORRISON, 1998).

Na espécie canina a incidência é de seis a trinta casos em cada 100.000 cães/ano (VONDEHAAR & MORRISON, 1998), sendo maior que na espécie humana (APPELBAUM *et al.*, 1984; GREENLEE *et al.*, 1990; JACOBS *et al.*, 2002). Ocorre mais freqüentemente em animais entre cinco e 11 anos, mas há relatos de casos em cães com menos de um ano e acima de 12 anos (VALLI, 1993; JONES *et al.*, 1997; JACOBS *et al.*, 2002).

Apesar de não haver predileção por sexo, há evidências de predisposição racial envolvendo, principalmente, animais das raças

Boxer, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier, Chow Chow, Pastor Alemão, Poodle, São Bernardo, Beagle, Golden Retriever e Bulldog. Raças como Dachshund e Cocker Spaniel são pouco acometidas (TESKE, 1994; VONDEHAAR & MORRISON, 1998).

A etiologia deste tipo de neoplasia é desconhecida. A presença de agentes virais não foi comprovada na espécie canina ao contrário do que acontece nos seres humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas (SEQUEIRA & FRANCO, 1992; TESKE, 1994a e SEQUEIRA *et al.*, 1999). Fatores ambientais, como exposição crônica a substâncias químicas, são citados como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma nos cães (HAYES *et al.*, 1991). Recentemente, GAVAZZA *et al.* (2001), relacionam o aparecimento precoce da neoplasia em cães que habitam áreas industriais, com alta poluição ambiental, e com o uso de produtos químicos como tintas e solventes pelos proprietários.

Os sinais clínicos relacionados aos linfomas dos cães são, na maioria das vezes, inespecíficos e dependem do órgão ou órgãos envolvidos. Entretanto linfadenopatia indolor, perda de peso

progressiva, caquexia, edema local ou generalizado, apatia e emese são os mais comumente encontrados. Anatomicamente, os linfomas caninos são classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário ou extranodal, sendo a forma multicêntrica a mais freqüente (SEQUEIRA & FRANCO, 1992; JACOBS *et al.*, 2002).

Alterações hematológicas são comuns, podendo ocorrer anemia, trombocitopenia, leucopenia ou leucocitose, e linfopenia ou linfocitose. Infiltração na medula óssea e leucemização raramente ocorrem. Hipercalcemia é uma síndrome paraneoplásica que pode ocorrer em cães com linfoma devido à produção, pelas células neoplásicas, de uma substância de ação semelhante ao paratormônio (TESKE 1994; VONDEHAAR & MORRISON, 1998). Segundo FOURNEL-FLEURY *et al.*, (2002), há uma maior incidência de hipercalcemia nos linfomas de origem T.

O estadiamento clínico dos linfomas caninos é realizado durante o diagnóstico clínico e serve como guia para o prognóstico e tratamento da neoplasia (DOBSON *et al.*, 2001). Este estadiamento, estabelecido inicialmente para linfomas nos seres

humanos, é também utilizado para a espécie canina (SEQUEIRA & FRANCO, 1992), e segue o protocolo proposto pela Organização Mundial de Saúde (*WHO; TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*, Geneva, 1980). Grande parte dos casos de linfoma canino apresenta-se em estágio clínico avançado (IV ou V) no momento diagnóstico (DOBSON & GORMAN, 1993), o que indica uma pior resposta ao tratamento e menor sobrevida do animal (DOBSON *et al.*, 2001).

De acordo com a classificação anatômica, a forma multicêntrica, frequentemente envolve linfonodos periféricos e profundos, além de órgãos como fígado, baço, rins, pulmão, coração, trato gastrintestinal e medula óssea. Na forma digestiva, as lesões envolvem órgãos do trato gastrintestinal e linfonodos regionais, podendo, entretanto, haver comprometimento de outros órgãos abdominais como o fígado, baço e rins. O linfoma tímico usualmente acomete o timo e linfonodos regionais. O linfoma cutâneo ocorre como massas solitárias ou múltiplas na pele, podendo ser uma lesão tardia de um envolvimento sistêmico como

o que ocorre no linfoma multicêntrico. A forma solitária é aquela que envolve apenas um órgão não linfóide (JACOBS *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Estadiamento Clínico dos Linfomas Caninos proposto pela Organização Mundial de Saúde (*WHO*; *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*, Geneva, Owen, 1980)

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

Os estádios são ainda subdivididos em A (sem sinais sistêmicos) ou B (com sinais sistêmicos), segundo GREENLEE et al. (1990).

Tabela 2 - Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos segundo JACOBS *et al.* (2002)

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

Os linfomas não-Hodgkin (LNH) do homem apresentam várias características em comum com os linfomas dos cães, particularmente com relação à epidemiologia, etiologia, clínica, morfologia e fenotipagem. Graças a essas semelhanças, os esquemas para classificação morfológicos propostos para os LNH – como as de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e *Working Formulation* (NCI, 1982) – são utilizadas com sucesso por diversos autores para diagnosticar os linfomas da espécie canina. De acordo com ASTER & KUMMAR, (1999); MILITO *et al.*, (2002) e MELLANY *et al.*, (2002) as características morfológicas dos LNH do homem servem como base para o estabelecimento do prognóstico e de protocolos de tratamento. No cão, o tipo celular determinado pela classificação de Kiel foi um importante fator prognóstico para indicar o tempo de remissão da doença em animais tratados, enquanto que a classificação dos linfomas pela *Working Formulation* teve maior importância com relação ao prognóstico do tempo de sobrevivência desses animais (TESKE, 1994).

No homem, uma vez estabelecido o diagnóstico de linfoma, procura-se determinar além da morfologia celular, a linhagem à qual pertencem as células neoplásicas, o que geralmente é de

importância terapêutica e diagnóstica. Em termos práticos, nos seres humanos, os linfomas de células T são mais agressivos e de pior prognóstico que os linfomas de células B (WAKAMATSU *et al.*, 1995).

Os estudos comparativos dos linfomas não-Hodgkin nas espécies humana e canina evidenciaram semelhanças suficientes para embasar a proposição de se empregar a espécie canina como modelo experimental para estudo dessa doença, inclusive para teste de terapias e procedimentos clínico-cirúrgicos contra os linfomas não-Hodgkin na espécie humana (PARODI *et al.*, 1988; GREENLEE *et al.*, 1990; RALLIS *et al.*, 1992; TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997 e FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

2.2. Estudos Histomorfológicos

Nos linfomas, a população polimorfa de linfócitos maduros dos linfonodos é substituída por proliferação celular nonomórfica ou bimórfica, constituída por células menos diferenciadas (MILLS, 1989). O diagnóstico histopatológico dessas neoplasias, portanto,

na maioria das vezes não é difícil. Frequentemente, quando os animais são encaminhados à necropsia, o diagnóstico já foi feito mediante PAAF ou biopsia (MILLS, 1989).

São poucos os estudos no cão que relacionam o tipo morfológico do tumor linfóide com sua progressão. Eles assumem importância quando visamos não só o diagnóstico do processo, mas também o estabelecimento de parâmetros para orientação clínica quanto ao prognóstico e tratamento, como é frequentemente feito nos linfomas humanos.

Diferentes tipos de classificações têm sido propostas para os linfomas não-Hodgkin humanos, nas quais são considerados o padrão de crescimento (folicular ou difuso), constituição celular (células pequenas ou grandes, clivadas ou não clivadas, diferenciação plasmocitária) e grau de malignidade (baixo, médio ou alto). Atualmente as classificações mais utilizadas para os linfomas humanos são a Kiel, *Working Formulation*, Real e WHO. Para os animais domésticos uma das primeiras tentativas de unificação da terminologia para tumores linfóides foi proposta por

JARRET & MACKEY (1974). Os tumores foram denominados linfossarcoma e classificados quanto à distribuição das lesões (multicêntrica, digestiva, tímica e outras) e quanto às características histocitológicas (pouco diferenciado, linfoblástico, linfocítico, pró-linfocítico, histicocítico, histioblástico e histiolinfocítico).

Alguns autores têm utilizado as classificações propostas para os linfoma não-Hodgkin do homem para os cães, com objetivo de averiguar se existe o mesmo tipo de correlação entre o tipo histiocitológico e o comportamento da neoplasia. Utilizando o sistema de classificação de Kiel, APPELBAUM *et al.*, (1984), PARODI *et al.*, (1988) e GREENLEE *et al.*, (1990), obtiveram os resultados evidenciados na tabela abaixo. Na casuística desses autores predominaram os tipos mais agressivos de linfomas.

Tabela 3. Freqüência dos tipos histiocitológico de linfomas diagnosticados de acordo com a classificação de Kiel

Tipo de Linfoma	Freqüência (%) na casuística de:		
	Applebaum <i>et al.</i> , (1984)	Parodi <i>et al.</i> , 1988	Greenlee <i>et al.</i> , (1990)
Centroblástico	12,5%	51,3%	47,3%
Imunoblástico	37,5%	27%	25,6%
Centroclítico-centroblástico	37,5%	5,4	10,2%

Os autores que utilizaram a classificação da WF (APPELBAUM *et al.*, 1984, CARTER *et al.*, 1986; BARON *et al.*, 1990; GREENLEE *et al.*, 1990; RALLIS *et al.*, 1992) relataram a presença de arranjo arquitetural difuso na maioria dos casos. A freqüência de linfomas variou nas casuísticas e os tipos mais freqüentes podem ser observados nas tabela 4.

Tabela 4. Freqüência dos tipos histiocitológico de linfomas diagnosticados de acordo com a classificação da WF

Tipo de Linfoma	Freqüência (%) da casuística de:				
	Appelbaum <i>et al.</i> , (1984)	Carter <i>et al.</i> , (1986)	Baron <i>et al.</i> , (1990)	Greenlee <i>et al.</i> , (1990)	Rallis <i>et al.</i> , (1992)
imunoblástico	37,5	24,9	0,0	25,6	0,0
Céls. peq. não-clivadas	0,0	24,2	0,0	3,2	8,8
Difuso céls grandes	12,5	20,0	0,0	48,3	36,8
Linfoblástico	7,5	17,2	57,1	0,6	0,0
Linfocítico peq. céls.	2,5	4,9	42,9	10,2	16,5

Nas casuística predominaram os linfomas imunoblásticos e difuso de grandes células, de alto grau e grau intermediário, respectivamente.

2.3. Correlação clínico-patológica

Remissões espontâneas de linfomas caninos não têm sido relatadas. Como os tumores são diagnosticados em fases tardias de evolução (estádios III, IV e V), a estimativa de sobrevida para os animais não tratados é de 2 a 6 meses (BLOOM & MEYER, 1945; SQUIRE *et al.*, 1973; MACÉWEN *et al.*, 1987; GREENLEE *et al.*, 1990).

Os sistemas de classificação utilizados para os linfomas humanos fornecem subsídios para o prognóstico, o que nem sempre é verdadeiro para os cães (GREENLEE *et al.*, 1990). É importante ressaltar que os protocolos quimioterápicos utilizados para o homem são muito mais agressivos do que o dos cães, o que pode explicar as diferenças verificadas na correlação entre morfologia e comportamento clínico. Entretanto, como no homem,

os cães que apresentam tumores de alto grau tendem a responder melhor ao tratamento quimioterápico, exibindo período de remissão mais longo e tempo de sobrevida maior (GREENLEE *et al.*, 1990)

Alguns dados da literatura demonstram esse fato. Cães que receberam tratamento quimioterápico e que apresentavam linfoma difuso histiocítico mostraram período de remissão mais longo do que os portadores de linfoma nodular histiocítico e difuso linfocítico pouco diferenciado (WELLER *et al.*, 1980). Linfomas difusos de grandes células, centroblasticos e imunoblasticos, tipos comuns entre os cães, mostraram comportamento semelhante aos equivalentes humanos, apresentando bons índices de remissão após terapêutica quimioterápica (GREENLEE *et al.*, 1990)

Recentemente foi publicada por VALLI, (2002) a classificação da WHO para tumores hematopoiéticos nos animais domésticos. Essa classificação é baseada na classificação da WHO humana para esse mesmo tipo de tumor. Os linfomas dos cães são subdivididos por imunofenótipo e graus e tendem a mimetizar sua contrapartida humana em termos de comportamento biológico e resposta a terapia. Entretanto, o valor prognóstico dessa classificação ainda

não foi validada por estudos clínicos e nem amplamente adotada pelos laboratórios de patologia veterinária (DOBSON, 2004).

2.4. Estudos Citomorfológicos

A maioria dos estudos citomorfológicos dos linfomas caninos utiliza material incluído em parafina, sendo escassos os trabalhos que empregam métodos de diagnóstico citológicos (FISHER *et al.*, 1995; TESKE & VAN HEERDE, 1996).

A Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) tem sido empregada, tanto no homem quanto nos animais, como método de diagnóstico de lesões das mais diversas origens, inclusive neoplásicas (OERTEL *et al.*, 1988; SNEIGE *et al.*, 1990, ROCHA *et al.*, 2001). As vantagens deste método estão relacionadas à rapidez do diagnóstico, ao baixo custo e à sua eficácia (RASKIN & NIPPER, 1992; ROCHA *et al.*, 1998). Além disso, causa desconforto mínimo ao paciente, permitindo que se realizem múltiplas colheitas e amostragens em série, particularmente interessantes quando

surgem resultados inconclusivos ou quando existe suspeita de recidiva da lesão (VERNAU *et al.*, 2001). Nos casos de linfadenopatia, este exame permite a diferenciação rápida entre processos reacionais benignos e neoplásicos (FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1994). Quando há suspeita de lesão ou alteração em órgãos internos, como vísceras abdominais ou torácicas, a PAAF também pode ser realizada com auxílio da ultra-sonografia (CIVARDI *et al.*, 2001).

Segundo FISHER *et al.* (1995), existe uma excelente correlação entre os resultados obtidos pela PAAF e por biopsias, tanto na classificação morfológica como na imunofenotipagem dos linfomas.

Os métodos de obtenção para exame citológico, particularmente a PAAF, apresentam como principal limitação a impossibilidade de serem obtidos dados sobre a arquitetura da lesão. No entanto, nos linfomas dos cães, este tipo de exame tem sido aceito como uma eficiente técnica de diagnóstico, visto que a grande maioria dos tumores, nesta espécie, apresenta a forma difusa, sendo a forma folicular bastante rara (CARTER *et al.*, 1986).

CARTAGENA *et al.* (1992), sugeriram como principais indicações da PAAF: punções em massas internas de pacientes com grandes riscos cirúrgicos, que não apresentem massas superficiais uma vez que esta técnica não necessita de qualquer tipo de sedação do paciente, nas avaliações de novas massas e no estadiamento da doença. A acurácia da PAAF nos casos de linfomas não-Hodgkin chega a 85% e quando combinada a citomorfometria com outros exames como, por exemplo, imunocitoquímica, esta eficácia chega a 91%.

2.5. Imunofenotipagem dos Linfomas Caninos

A classificação imunomorfológica dos linfomas caninos é feita empregando-se técnicas de imunoistoquímica, utilizando-se marcadores celulares específicos para cada caso. Em Medicina Veterinária, esta técnica é ainda pouco utilizada devido ao alto custo e à ausência de marcadores específicos em alguns casos (CHABANNE *et al.*, 1994; FISHER *et al.*, 1995; MILNER *et al.*, 1996).

O comportamento biológico do linfoma é o fator determinante para resposta terapêutica. Algumas diferenças observadas no comportamento biológico tem sido atribuída a fatores como a localização anatômica, grau histológico e imunofenotipagem (TESKE *et al.*, 1994). A imunofenotipagem identifica um grupo seletivo de glicoproteínas de superfície conhecidas como *clusters of differentiation* (CD). Para identificação desses antígenos é necessário o uso de anticorpos específicos. As glicoproteínas de superfície dos linfócitos apresentam múltiplas funções incluindo a sinalização intracelular, comunicação célula a célula e tráfego de linfócitos. Para a imunofenotipagem dos linfomas são utilizados dois tipos de anticorpos: o anti-CD3 e o anti-CD79a. O CD3 é um complexo de cinco peptídeos associados com o receptor de células T (TCR). A demonstração do antígeno CD3 em linfócitos malignos identifica o linfoma como de origem T. Similarmente, o CD79 se caracteriza por um heterodímero associado com o receptor de célula B (BCR). A demonstração desse antígeno nos linfócitos malignos representa que a população linfóide do tumor é de origem B (JEGLUN *et al.*, 1987; TESKE *et al.*, 1994b; MOORE *et al.*, 1996; MORRISSON & NEUBERGER, 2001). Raramente o linfoma não expressa

o CD3 ou CD79. Quando isso ocorre, a origem das células não pode ser determinada e esse tipo de linfoma é classificado como sendo formado por células "nulas" (MOORE *et al.*, 1996; MORRISSON & NEUBERGER, 2001).

Estudos demonstram que os linfomas de origem T tendem a ser biologicamente mais agressivos que os linfomas de origem B e resultam em menor tempo de remissão e sobrevida (GREELEE *et al.*, 1990; TESKE, *et al.*, 1994a)

Os primeiros trabalhos de pesquisa que procuraram caracterizar as populações de linfócitos que constituíam os linfomas caninos esbarraram em algumas dificuldades relacionadas à metodologia utilizada. Nestes estudos pioneiros, as células que apresentavam capacidade de formar rosetas com hemácias humanas eram classificadas como T (HOLMBERG *et al.*, 1976; ONIONS, 1977). Esta metodologia mostrou-se inadequada, já que 40% a 60% das células com esta capacidade também eram **SIg+**, ou seja, possuía imunoglobulinas de superfície, característica associada às células B (ATKINSON *et al.*, 1980). Na realidade, ainda não havia

anticorpos Anti-Ia que pudessem ser empregados nos linfomas caninos, ou mesmo nos linfomas humanos para os quais eram de importância capital (APPELBAUM *et al.*, 1984).

Posteriormente, a utilização de um painel de anticorpos, incluindo aqueles capazes de identificar células B (SIg) e células T (McAb DT2), empregando-se técnicas de citofluorimetria, demonstrou que a frequência de neoplasias T e B, em cães, eram muito próximas às das encontradas no homem (APPELBAUM *et al.* 1984).

GREENLEE *et al.*, (1990), efetuaram a imunofenotipagem de linfomas caninos empregando o método de citometria de fluxo ampliando o painel de anticorpos pela inclusão de anticorpos pan-T (LQ1, DT-2 E Thy-1), marcadores de linfócitos T supressores (T811) e linfócitos T ativados (Anti-Tac) e marcadores de imunoglobulinas de superfície para a caracterização de células B como o SIg+ B (Goat-F ab 2 antidog) e o SIg M+ B (IgM).

A utilização de um painel de anticorpos amplo e as técnicas de imunoperoxidase em cortes de congelação foi relatada por TESKE *et al.*, (1994c). De acordo com estes autores os linfomas foram considerados como de células B quando apresentavam positividade para CD21, anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA e negatividade para os marcadores de células T. Os linfomas foram considerados como de células T quando apresentavam positividade para CD3, CD4, CD8, Thy-1, CD49 e negatividade para os marcadores de células B. A maioria dos linfomas (58%) foi caracterizado como de células B. O emprego de técnicas imunológicas no estudo e classificação das desordens linfoproliferativas tem se mostrado particularmente importante no estabelecimento de um diagnóstico preciso (CANIATTI *et al.*, 1996 e DOBSON *et al.*, 2001).

As determinações do imunofenótipo T ou B e do grau de maturação das células linfóides neoplásicas auxiliam no diagnóstico dos linfomas e no monitoramento da recidiva destes tumores na espécie humana. Atualmente a imunofenotipagem é indispensável para determinar o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin de acordo

com as classificações mais atuais, Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), Real (HARRIS *et al.*, 1994) e WHO (JAFTE *et al.*, 2001).

Durante muito tempo a determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos foi dificultada pela falta de marcadores específicos. Entretanto, os métodos imunistoquímicos têm sido aplicados 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 marcar linfomas de células B (MILNER *et al.*, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002). Em trabalho de pesquisa recente, tivemos a oportunidade de padronizar a marcação imunofenotípica de linfomas caninos utilizando material incluído em parafina e os mesmos anticorpos citados acima (DE MOURA *et al.*, 2000).

Nos cães, assim como no homem, o imunofenótipo T dos linfomas tem sido associado a um prognóstico ruim, com sobrevida menor e períodos de remissão mais curtos, quando comparado aos linfomas de células B (KIUPEL *et al.*, 1999; DOBSON *et al.*, 2001). No

entanto, algumas diferenças ocorrem dentro de cada um destes grupos no que diz respeito à apresentação clínica, resposta ao tratamento e prognóstico (KIUPEL *et al.*, 1999).

A utilização de métodos imunológicos nos estudos histopatológicos deu um grande incremento ao diagnóstico das neoplasias humanas e atualmente está definitivamente incorporado à rotina dos laboratórios de patologia (SOARES & ARIAS, 1999).

A definição do imunofenótipo dos linfomas, por métodos imunocitoquímicos, auxilia na tipificação da neoplasia e permite estabelecer protocolos clínicos de tratamento de maneira rápida e eficiente (CANIATTI *et al.*, 1996).

São escassos os estudos em que se associam métodos citológicos — como a PAAF — e imunocitoquímicos na avaliação dos linfomas caninos, no entanto, estes exames podem se mostrar eficazes na identificação do tipo citológico e do imunofenótipo das neoplasias, assim como é realizado para os casos humanos (Suzano, 2004).

De acordo com estudos já realizados, os linfomas caninos apresentam muitas semelhanças com os linfomas não Hodgkin humanos, do ponto de vista epidemiológico, morfológico e imunofenotípico. Portanto, aplicar as classificações citoistológicas e imunofenotípicas nos linfomas caninos, além de adicionar dados aos estudos dessa neoplasia canina — relacionando-as com a clínica para melhor determinar o tratamento, prognóstico e tempo de vida dos animais (CARTER *et al.*, 1986; FISHER *et al.*, 1995; KIPEL *et al.*, 1999) — permitirá que estes resultados possam ser incorporados ao modelo experimental da doença humana.

2.6. Avaliação da Proliferação Celular nos Linfomas Caninos utilizando a técnica citoquímica de AgNor

A capacidade para avaliar o prognóstico de uma doença neoplásica através de técnicas simples como a cito e histopatologia é de fundamental importância. Entretanto não é uma tarefa fácil.

Vários autores têm sugerido que a coloração pela prata para observar as regiões organizadoras nucleolares (AGNOR) dos núcleos é adequado para este fim (VAJDOVICH *et al.*, 2004). A técnica de coloração das Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNor) através da prata tem sido utilizada nas últimas décadas como um marcador tumoral eficiente na medicina humana (DERENZINI & PLOTON, 1991).

Segundo PLOTON (1994), as AGNORs são definidas como sítios onde estão localizados genes rRNA durante a interfase e durante a mitose. As AGNORs são alças de DNA que ocorrem no nucléolo das células e possuem genes RNA ribossomais (DERENZINI *et al.*, 1994). Esses genes RNA ribossomais possuem papel importantes durante a síntese protéica, crescimento e diferenciação celular e também na transformação maligna (EGAN & CROCKER, 1988). O número de AGNORs, de acordo com DERENZINI *et al.*, (1994), reflete a atividade proliferativa da célula. Assim, quanto mais elevada a frequência de AGNORs, maior a atividade de proliferação das células. As AgNors são ainda responsáveis pelo desenvolvimento do RNA nucleolar (UNDERWOOD & GIRI, 1988). Os segmentos de rRNA estão associados

a proteínas com alta afinidade pela prata, daí ser chamadas de proteínas AgNors e a coloração que permite visualizá-las é também denominada de AgNors (CROCKER *et al.*, 1989). Segundo DERENZINI & PLOTON, (1991), a maior expressão e AgNors está relacionada única e diretamente com a proliferação celular e esta é uma característica mais marcante das células neoplásicas.

O nucléolo é a organela mais visível no núcleo de uma célula em interfase o que, para PLOTON, (1994), significa a expressão morfológica da transcrição e processamento do rRNA. O nucléolo é uma estrutura complexa. É formado por frações de DNA ocupadas pelos genes RNA, as quais associam-se às proteínas para processamento, compactação e formação final de partículas pré-ribossômicas. Em síntese, o nucléolo é uma organela contendo alças de DNA que emergem de vários cromossomos, cada um dos quais contém um agrupamento de genes rRNA e cada grupamento representa uma AGNOR (ALBERTS *et al.*, 1997).

De acordo com VERDUN, (1983) e GOENSSSENS, (1984), pode-se distinguir pelo menos cinco regiões no nucléolo: o centro fibrilar; o

denso fibrilar; o granuloso; o interstício nucleolar e a cromatina nucleolar. A região centro fibrilar é composta por pequenas quantidades de DNA e de proteínas AgNors; o componente denso fibrilar é formado por fibras associadas à região centro fibrilar que contém moléculas de pré-RNA (AgNORs positiva) e de pequenas quantidades de proteínas associadas as AGNORs.

A impregnação pela prata é a técnica citoquímica que permite a visualização dos componentes centro fibrilares na interfase, os quais representam a contrapartida das AGNORs na metáfase (DERENZINI & PLOTON, 1991; DERENZINI & TRERÈ, 1994). Para revelação das AGNORs pela prata, é necessário que as proteínas argirofílicas associem-se aos sítios de cromatina ribossômica, onde é inicializada a produção de grânulos ribossomais (DERENZINI & PLOTON, 1991; PLOTON, 1994). Diversas técnicas têm permitido identificar proteínas AgNors positivas, dentre elas destacam-se a RNA-polimerase I, uma enzima localizada no centro fibrilar e necessária para a transcrição gênica do rRNA em moléculas de rRNA, a topoisomerase I que está localizada na região denso fibrilar e tem a propriedade de atuar na redução da fita de DNA permitindo

a leitura pela enzima RNA-polimerase. Por último temos a nucleolina ou proteína C₂₃, uma fosfoproteína de maior expressão na fase de crescimento celular associada ao processamento de pré-RNA e a proteína B₂₃ ou numatrina, que também participa da biossíntese ribossomal e foi uma das primeiras proteínas identificadas como associadas às AGNORs. Assim, a técnica de impregnação pela prata marca somente as proteínas relacionadas aos genes ribossomais que estão localizadas nas AGNORs em atividade de transcrição (DERENZINI & PLOTON, 1991)

As células neoplásicas apresentam nucléolo com significativas alterações quanto a sua forma, coloração e tamanho. Entretanto, essas características não são suficientes para diferenciar células malignas das benignas. RÜSHOFF *et al.*, (1989) E DERENZINI & PLOTON, (1991) observaram que a medida do tamanho, distribuição e quantidade das AgNors no nucléolo revelou-se um bom indicador para diferenciar neoplasias benignas das malignas. Entretanto, conforme afirmam DERENZINI & TRERÉ, (1994), em alguns tipos de neoplasias, como as do endométrio, tireóide e algumas neoplasias de mama, não se percebem diferenças entre lesões benignas e

malignas, mas a maior parte dos relatos mostram que a determinação do número de AgNors nas células malignas foi superior ao das benignas e das células de tecidos normais (TRERÉ, 1993).

CROCKER & NAR (1987) estudaram o uso da técnica de AgNor em linfomas, linfonodos reativos e em tonsilas. Esses autores encontraram significativa diferença entre o número de AgNor no núcleo dos linfomas de grau alto e de grau baixo e concluíram que esse método é de grande aplicabilidade no campo da histopatologia dos tumores.

TRERÉ *et al.*, (1989) compararam o uso de AgNors com outros marcadores de proliferação (Ki-67, PCNA, Timidina e Bromodeoxy-Uridina) e encontraram forte correlação entre quantidade de AgNors e duplicação celular bem como entre AgNors e tempo de duplicação da população de células neoplásicas. Para CROCKER *et al.*, (1988); DERENZINI & PLOTON, (1991); DERENZINI & TRERÉ, (1991b); DERENZINI & TRERÉ, (1994) esses resultados indicam que a

proliferação celular é a causa primária do efeito das variações dos parâmetros de AgNors.

Ao tentar estabelecer a correlação entre a morfologia do linfoma de Hodgkin com o antígeno de proliferação celular (PCNA) e o AgNor, FREEMAN (1993), encontrou, em média, mais de 15 AgNors nos núcleos das células de Reed-Sternberg e em torno de sete a 10 AgNors por núcleo nas células mononucleares de Hodgkin. Estes dados, segundo o autor, suportam a idéia de que a doença de Hodgkin pode ser designada como um linfoma de grau alto e que as células de Hodgkin e de Red-Sternberg encontravam-se em alta atividade proliferativa.

Ao estudar a contagem de AgNor e de PCNA em animais portadores de linfoma com e sem tratamento quimioterápico, com objetivo de estabelecer o prognóstico, KIUPEL *et al.*, (1998) concluíram que o valor prognóstico do AgNor é mais importante do que o valor observado com o PCNA.

Mais recentemente, VAJDOVICH *et al.*, (2004) avaliaram e compararam a técnica de AgNors em espécimes citológicos e histológicos de linfonodos de cães saudáveis e portadores de linfoma. A contagem de AgNors nos linfomas das amostras citológicas foi mais alta que nas amostras histológicas. Do mesmo modo, o resultado da contagem de AgNors nos linfomas de grau baixo e de grau alto foram significativamente diferentes quando se utilizou amostras citológicas e histológicas, além de ser maior nos linfomas de grau alto. Os autores concluíram que embora tenha ocorrido diferença na contagem de AgNors entre as duas técnicas, a média dos valores de AgNors obtidos revelam sensibilidade suficiente para diferenciar os graus de linfomas.

A técnica de coloração de AgNors é altamente específica e pode ser utilizada em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina, frescos ou de arquivo, tecidos congelados, esfregaços citológicos e preparados citocentrifugados (CROCKER, 1992a). A formação de precipitados inespecíficos é um problema frequente e é intensificado quando há nas amostras a presença de extensas áreas de necrose e abundante colágeno (CROCKER, 1992a).

Vários experimentos têm demonstrado que o número de AgNors é significativamente maior nos tumores malignos que nos processos fisiológicos, reativos ou benignos. Foi demonstrado ainda que o número de AgNors por núcleo pode ser considerado como um indicador de proliferação e que a média da contagem de AgNors é um excelente indicador do grau de malignidade para os linfomas não-Hodgkin humanos (SPECTOR, *et al.*, 1984; MOURAD, *et al.*, 1992; FREEMAN, *et al.*, 1993; BETHWAITE *et al.*, 1995).

A literatura está repleta com descrições de resposta aos diferentes tratamentos de cães com linfoma e outros tipos de neoplasia. Clinicamente, essas respostas são ainda confusas devido a falta de critérios de prognósticos confiáveis (CAPURRO *et al.*, 1990). Atualmente a coloração pelo AgNors vem sendo amplamente utilizada como marcador de proliferação celular nos tumores e de importância significativa na graduação dos mastocitomas e dos linfomas dos cães (SIMÕES *et al.*, 1994; VAIL *et al.*, 1996).

Na medicina veterinária, os benefícios do uso de AgNOR no prognóstico de tratamento de cães com linfoma são indiscutíveis. Os estudos com esta técnica demonstram que não somente o número de AgNOR, mas também a média da área de AgNor têm importância no prognóstico. Isso indica a importância e a necessidade do uso do analisador de imagens para avaliação desta técnica citoquímica. Ademais, características qualitativas de AgNor tais como seu tipo podem fornecer uma ferramenta simples para avaliação prognóstica dos linfomas na rotina laboratorial (KIUPEL *et al.*, 1999).

2.7. Teste do Cometa

Com frequência o DNA sofre agressões tanto por substâncias endógenas como exógenas. Entretanto, as células são portadoras de potentes sistemas enzimáticos capazes de promover o reparo da grande maioria desses danos. Embora esses sistemas sejam eficientes, algumas lesões ou mesmo erros espontâneos durante a replicação do DNA, não conseguem ser reparados, resultando em um evento mutagênico. Esse evento pode corresponder à etapa de

iniciação de um processo carcinogênico (RAMEL, 1984; TUCKER & PRESTON, 1996). A iniciação ocorre pela ação de um agente cancerígeno genotóxico, capaz de provocar danos irreversíveis na molécula de DNA (mutações). Caso estes danos resultem na ativação de oncogenes e/ou perda ou inativação de genes supressores de tumor, células normais tornam-se iniciadas, isto é, potencialmente neoplásicas.

A promoção, por outro lado, envolve a proliferação das células iniciadas, por mecanismo epigenético, acelerando o crescimento celular e possibilitando, eventualmente, a ocorrência de alterações genéticas adicionais. A célula iniciada pode permanecer em latência por longos períodos até sofrer exposição a um agente promotor e, a partir disso, evoluir para uma neoplasia. A progressão é caracterizada morfológicamente por anaplasia e biologicamente por crescimento autônomo (PITOT, 1989). Quando as células adquirem a capacidade de invadir e metastatizar e todas essas alterações forem evidenciadas clinicamente, ter-se-á a última etapa – a manifestação.

A correlação observada entre mutagenicidade e a carcinogenicidade é consistente com a teoria de que o câncer seja causado por mutações somáticas. Substâncias provenientes do meio ambiente pode interagir com o sistema genético do homem e de animais, levando às mutações. Os três tipos principais de alterações genéticas pode ocorrer por: (1) alterações no DNA, conhecidas como mutações de ponto; (2) alterações da estrutura de cromossomos, tais como quebras e arranjos e (3) separação desigual dos cromossomos durante a divisão celular conhecida como aneuploidias (ZAKRZEWSKY, 1997, COHEN & ELLWEIN, 1991).

Uma vez que os danos induzidos ao DNA são freqüentemente célula e tecido-específicos, e que as células divisíveis no estado quiescente, isto é, células com longo ciclo intermitótico, podem sobreviver por anos ou décadas na presença de vários tipos de dano ao DNA (KREJA *et al.*, 1995) é de suma importância a utilização de metodologias que permitam a detecção de danos em uma única célula (TICE, 1995). Assim, o teste do cometa tem sido amplamente empregado em estudos de mecanismos de mutagênese e carcinogênese, por se tratar de uma técnica que

pode ser utilizada em estudos de reparo de DNA, de toxicogenética, monitoramento ocupacional e ambiental e de epidemiologia humana.

O teste do cometa é bastante sensível para a detecção de agentes genotóxicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (HARTAMAN & SPEIT, 1997). Essa técnica apresenta uma série de vantagens que inclui a possibilidade de utilização tanto de células sanguíneas como de outros tecidos (SASAKI et al., 1997); é altamente sensível, de fácil reprodutibilidade e simplicidade, além de utilizar amostras celulares extremamente pequenas, permitindo a verificação de danos em células individuais (FARBAIN et al., 1994; TICE, 1995, ROJAS et al., 1999).

Levando-se em consideração que a maioria dos agentes genotóxicos induz mais quebra de fita única e lesões álcali-lábeis do que quebra de fita dupla, SINGH et al., (1988) utilizaram a técnica do microgel empregando eletroforese sob condições alcalinas (pH>13), o que permitiu detectar quebras de cadeia única e sítios álcali-lábeis no DNA de uma célula individualizada. O teste do

cometa baseia-se, portanto, na lise, eletroforese e marcação fluorescente do DNA de pequena quantidade de células suspensas em uma fina camada de agarose e colocadas sobre uma lâmina de microscópio. A corrente elétrica faz com que os fragmentos de DNA do núcleo migrem mais rapidamente para um dos pólos, resultando em imagens com aparência de "cometas", as quais são medidas a fim de determinar a extensão do dano (SPEIT *et al.*, 1996).

A detecção de danos pelo teste do cometa parte do princípio de que o DNA das células eucarióticas encontra-se organizado em estruturas espiraladas e que tanto as quebras de fita simples quanto as de fita dupla causam uma desorganização molecular, levando ao relaxamento na estrutura da cromatina. Assim, a eletroforese permitiria que essas estruturas pudessem ser distendidas em direção ao pólo positivo (FAIRBAIN *et al.*, 1995).

O tamanho da cauda do cometa é proporcional à quantidade de danos (TICE, 1995). Entretanto, a sensibilidade dessa medida pode ser aumentada pelas condições de realização da eletroforese. Entre as variáveis metodológicas mais freqüentes que afetam a

sensibilidade e o poder do teste destacam-se a concentração da agarose, composição da solução de lise, a composição e o pH do tampão de eletroforese e as condições de voltagem, amperagem e duração da eletroforese. Como quaisquer combinações dessas variáveis são possíveis, a seleção do método a ser utilizado depende do objetivo do estudo, ou seja, do tipo de célula e do tipo de dano a ser avaliado (FAIRBAIN *et al.*, 1995).

A técnica utilizada para quantificar os danos detectados pelo teste do cometa envolve a utilização de *softwares* específicos para análise de imagens de células individuais, permitindo a avaliação da proporção de DNA que migra para formar a cauda do cometa (FAIRBAIN *et al.*, 1995; KLAUDE *et al.*, 1996).

Segundo TICE (1995), os agentes mutagênicos podem formar caudas distintas pela sua atuação sobre a molécula de DNA. Embora o comprimento da cauda do cometa seja uma medida válida, a maioria dos estudos tem utilizado o parâmetro de *tail moment* (TM) ou quantidade de DNA na cauda, que é obtido multiplicando-se o comprimento da cauda pela intensidade de sua

fluorescência. O TM considera as duas principais variações na medida do cometa, ou seja, quando a cauda se apresenta curta com alto conteúdo de DNA e quando o cometa apresenta cauda longa com baixa quantidade de fragmentos. Nesses casos, a leitura somente do comprimento da cauda conduziria a erros na avaliação de danos causados por agentes genotóxicos (ASHBY *et al.*, 1995).

O dano no DNA tem sido amplamente detectado nas células humanas, normais ou não, usando-se o teste do cometa. Entretanto, essa tecnologia tem sido pouco aplicada na medicina veterinária. A literatura sobre o assunto é ainda escassa.

HEATON & RANSLEY, (2001) utilizaram o teste do cometa para avaliação dietética de cães e gatos. Segundo esses autores, existem evidências do envolvimento de radicais livres no desenvolvimento de dano oxidativo do DNA, o qual tem sido implicado na etiologia de várias desordens degenerativas como o câncer e artrites. Esses autores demonstraram que a redução de dano no DNA foi observada após enriquecimento da dieta de gatos com antioxidantes e que o monitoramento e correção dessas dietas

utilizando-se o teste do cometa pode reduzir a suscetibilidade desses animais a doenças degenerativas, inclusive do envelhecimento, através da redução do dano e potencialização dos níveis de reparo do DNA.

ALVES (2001) e ALVES *et al.*, (2004) utilizaram o teste do cometa para detectar dano de DNA nas células epiteliais obtidas por lavado vesical de cães com cistite bacteriana com objetivo de estabelecer correlação entre processo inflamatório, genotoxicidade e carcinogênese. Concluíram que o dano do DNA observado nas células dos lavados vesicais de cães não estava associados ao processo inflamatório causado por bactéria nesses animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA), protocolo nº 13/2002-CEEA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu/SP, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA).

3.1. Origem das Amostras

As amostras estudadas foram provenientes de 53 cães, sem restrição quanto a idade, raça ou sexo, diagnosticados como portadores de linfoma mediante punção aspirativa por agulha fina (PAAF) realizado pelo Serviço de Patologia do Hospital Veterinário (HV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP- Campus de Botucatu. As coletas foram realizadas durante o período de março de 2001 a julho de 2004. Dados clínicos e exames complementares foram obtidos dos prontuários dos animais e anotados em fichas individuais (anexo 01).

3.2. Estadiamento Clínico e Classificação Anatômica dos Linfomas

Foi adotado o protocolo estabelecido pela *World Health Organization* (WHO; *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*, Geneva, 1980), para o estadiamento dos linfomas e a classificação anatômica instituída foi a estabelecida por JACOBS *et al.*, (2002). Os dados de identificação, forma anatômica, estadiamento, imunofenótipo e graus de malignidade de todos os animais estudados encontram-se no anexo 02.

3.3. Técnica Citopatológica e Processamento das Amostras

Os preparados citológicos obtidos pelo método da PAAF dos cães diagnosticados com linfoma foram utilizadas para classificação citológica e imunocitoquímica dos linfomas caninos (SUZANO, 2004), bem como para estudo morfométrico, determinação do índice de proliferação celular por meio da técnica citoquímica de AgNor e lesão do DNA através do teste do cometa.

Para tais procedimentos, foram utilizadas seringas de 10ml e agulhas descartáveis de até 22G, acopladas ao citoaspirador de Valeri. Após a anti-sepsia da região, foi realizada a punção local seguida da aplicação de pressão negativa, fazendo-se o reposicionamento da agulha "em leque" sem que a mesma saísse do tecido. Ato contínuo, a pressão negativa era relaxada e a agulha retirada da massa e desacoplada da seringa, aspirando para dentro da mesma volume de ar suficiente para expulsar o conteúdo da agulha sobre lâminas de microscopia com extremidade fosca, procedendo-se a extensão do material (COWEL & TYLER, 1989). Imediatamente após a PAAF, pelo menos 10 lâminas ainda úmidas eram imersas em etanol 95% para coloração pelo método de Shorr, AgNor, enquanto outras duas eram deixadas secar ao ar, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa, para a diagnóstico citomorfológico.

Uma segunda punção era realizada e a amostra celular obtida era suspensa em *ependorf* contendo 1,5ml de PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} . Foi também colhido 1ml de sangue em *vacutainers* contendo EDTA. Todo esse material era imediatamente acondicionado em gelo e protegido da luz, requisitos fundamentais e necessários para confecção das lâminas para o teste do cometa.

3.4. Processamento Histológico

Os fragmentos colhidos e devidamente identificados foram fixados em formalina neutra tamponada a 10%. Em seguida foram submetidos aos procedimentos de rotina histológica e incluídos em parafina. Os cortes com espessura de 3 μ m foram corados pelo método de Hematoxilina & Eosina (LUNA, 1968) e examinados ao microscópio óptico.

As amostras da medula óssea foram retiradas da crista ilíaca. Esse material foi fixado em formol neutro tamponado 10% por 48h e posteriormente submetido ao processo de descalcificação em ácido fórmico. Uma vez descalcificadas, as amostras foram processadas seguindo os mesmos procedimentos anteriores.

Todos os casos de linfomas foram classificados de acordo com o esquema proposto por Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), pela classificação elaborada pelo *Nacional Cancer Institute - Working Formulation* (NCI-WF, 1982) e com a Classificação apresentada por FOURNEL-FLEURY, *et al.*, (1994) para os linfomas dos cães.

3.5. Imunofenotipagem dos linfomas

Os estudos da linhagem celulares dos linfomas foram realizados utilizando-se as técnicas padronizadas no Laboratório do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, baseada na metodologia descrita por Hsu *et al*, (1981), com algumas modificações e utilizando-se o seguinte painel de anticorpos: Anti-CD3¹, Anti-CD4², Anti-CD8³, Anti-CD79a⁴. Para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foi utilizado o protocolo descrito por Costa, (2000). Todos os anticorpos, com exceção do anticorpo anti-CD3, foram diluídos em solução de 1% de albumina bovina⁵ em solução tampão de Tris⁶ (BSA).

Todos os anticorpos foram testados e padronizados em linfonodo reativo de cão. A padronização obedeceu aos critérios descritos abaixo e foram os mesmos para os casos de linfoma.

Um bloco de cada caso foi selecionado e cortes de 3µm de espessura foram colocados sobre lâminas previamente desengorduradas

¹ Anti-CD3, policlonal, código A0452, Dako Co, EUA

² Anti-CD4, anti-cão, monoclonal, código DH29A, VMRD Pullman, USA

³ Anti-CD8³, anti-cão, monoclonal, código CAD046A, VMRD Pulman, USA

⁴ Anti-CD79a⁴, monoclonal, código HM57, Dako Co, USA

⁵ albumin bovine, Sigma, código A-7906, 100g

⁶ TRIZMA base, D5637, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA

e tratadas com solução de organossilano⁷ em álcool absoluto. Os cortes foram mantidos em estufa a 58^oC, por 24 horas e submetidos à desparafinação em xilol seguida de reidratação através da imersão das lâminas em gradiente decrescente de álcool, até a concentração de 70%. Cada passagem ou banho foi feito com duração de cinco minutos, até lavagem final com água corrente por 10 minutos e dois banhos em água destilada com duração de cinco minutos cada.

3.5.1. Bloqueio da Peroxidase Endógena

Foram utilizados três tipos de bloqueios: o primeiro foi imersão do material em peróxido de hidrogênio 3% em metanol, em duas etapas com 15 minutos de duração cada, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e dois banhos com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,6. Este tipo de bloqueio foi utilizado por COSTA, (2000) para uso dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8. O segundo tipo foi a utilização do peróxido de hidrogênio (20 volumes), diluído 1:1, em água destilada na hora do uso e ao abrigo da luz; e o terceiro utilizou-se peróxido de hidrogênio (10 volumes), puro, em dois banhos de 15 minutos cada, ao abrigo da luz, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos. Os resultados obtidos com os três tipos de bloqueio foram semelhantes

⁷ 3-aminopropiltrietoxissilano, SIGMA, St. Louis, MO, USA, código A3648

para todos os anticorpos testados e devido à praticidade da operação, optou-se pela utilização do peróxido de hidrogênio (10 volumes).

Dois tipos de solução tampão para o banho das lâminas foram utilizados: o tampão fosfato salino pH 7,6 (PBS), utilizado por COSTA, (2000), e o tampão Tris, pH 7,2. A lavagem foi feita com tampão PBS para os anticorpos CD4 e CD8 (COSTA, 2000) e tampão Tris para os anticorpos CD3 e CD 79a.

3.5.2. Recuperação Antigênica

Para a recuperação antigênica foi utilizada a solução de EDTA 10 μ M, pH 8,0, previamente aquecida a 95^oC, em banho-maria, durante 30 minutos. Após bloqueio da peroxidase endógena e lavagem em água corrente e solução tampão, as lâminas acondicionadas em berços histológicos eram colocadas em cubas contendo água destilada pré-aquecida (1min 50Seg. ao micro-ondas, potência máxima), para evitar o choque térmico. Em seguida, os berços foram imersos em EDTA, pH 8,0 e deixado em banho-maria durante 30 minutos.

Retirado do banho-maria, o material foi resfriado à temperatura ambiente por 20 minutos, submetido à lavagem em água corrente por 10 minutos e duas lavagens com tampão, cinco minutos cada. Em seguida, para evitar marcações inespecíficas, os cortes foram incubados com o bloqueador de avidina-biotina⁸, em câmara úmida a 37°C, durante 15 minutos cada etapa. Após incubação por 18h (*overnight*) em geladeira (4°C), o material foi lavado com tampão em dois banhos de cinco minutos.

3.5.3. Sistema de Detecção e Ampliação de Sinais/anticorpo secundário

Para os anticorpos utilizados neste trabalho, foram testados os seguintes sistemas: LSAB⁹, CSA¹⁰ e o EnVision¹¹.

⁸ DAKO Biotin Blocking System, código X0590, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

⁹ DAKO LSAB+ kit, peroxidase, código K0690. Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

¹⁰ Catalyzed Signal Amplification (CSA) System, código K1500. DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca

3.5.4. Revelação e contracoloração

Para a revelação e visualização da reação utilizou-se o cromógeno 3'-3' diaminobenzidina¹² líquido, na diluição recomendada pelo fabricante, com tempo variando entre 30 segundos a 1 minuto (Tabela 6), ao abrigo da luz, seguindo-se a lavagem das lâminas durante dez minutos em água corrente. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris por um minuto, seguindo-se de lavagem em água corrente, desidratação progressiva em álcoois, diafanização em xilol e montagem em Permount¹³.

¹¹ DakoCytomation EnVision + Dual Link System, Peroxidase. Código K4061. Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

¹² DAB líquido Dako. DakoCytomation. Carpinteria, CA, USA.

¹³ Fischer, EUA.

TABELA 5 - Painel dos anticorpos e etapas da técnica de imunistoquímica no utilizadas para imunofenotipagem dos linfoma dos cães

ANTICORPO	ANTI-CD3	ANTI-CD4	ANTI-CD8	ANTI-CD79a
CLONE/CÓDIGO	N1580	DH29A	CA046A	HM57
TIPO	policlonal	monoclonal	monoclonal	monoclonal
CONCENTRAÇÃO	Pré-diluído	1:500	1:500	1:50
<i>BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA (ÁGUA OXIGENADA 10 VOLUMES)</i>				
TEMPO	2x15 minutos	2x15 minutos	2x15 minutos	2x15 minutos
<i>RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA</i>				
TAMPÃO	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA
PH	8,0	8,0	8,0	8,0
LOCAL	Banho-maria	Banho-maria	Banho-maria	Banho-maria
TEMPO	30 minutos	30 minutos	30 minutos	30 minutos
<i>BLOQUEIO DA AVIDINA/BIOTINA</i>				
AVIDINA/BIOTINA	2 x 15 min, cada			
LOCAL	Câmara úmida	Câmara úmida	Câmara úmida	Câmara úmida
TEMPERATURA	37°C	37°C	37°C	37°C
<i>INCUBAÇÃO</i>				
TEMPO	<i>overnigth</i>	<i>overnigth</i>	<i>overnigth</i>	<i>overnigth</i>
TEMPERATURA	4°C	4°C	4°C	4°C
<i>SISTEMA DE DETECÇÃO E AMPLIFICAÇÃO</i>				
	EnVision	CSA	CSA	EnVision
<i>CROMÓGENO (DAB)</i>				
TEMPO	1 minuto	30 segundos	30 segundos	1 minuto

3.6. Técnica de coloração pela prata (AGNORS) para obtenção do índice de proliferação celular dos linfomas

As lâminas obtidas pela PAAF e armazenadas em etanol 95% foram submetidas à hidratação progressiva por imersão em etanol 70% durante 15 minutos, seguido por imersão em água deionizada por 10 minutos. Para a solubilização das proteínas citoplasmáticas e melhoria da qualidade da coloração, as lâminas foram imersas em uma solução de triton X-100¹⁴ a 0,5% em PBS, durante 15 minutos em temperatura ambiente e após, lavadas durante 10 minutos em água corrente, adaptação modificada de VIDAL E MELO (1995). Este procedimento foi acrescentado ao protocolo de coloração como uma medida para facilitar a análise morfométrica, uma vez que a solubilização de algumas proteínas citoplasmáticas produz um fundo mais claro e com maior contraste e definição das proteínas AgNors, além de tornar os núcleos das células mais limpos e permeáveis à prata (Vidal, 1995).

As lâminas foram coradas pelo método da prata coloidal descrito por PLOTON *et al.* (1986). Esta técnica consiste da mistura de duas partes de uma solução aquosa de prata¹⁵ a 50% com uma parte de uma

¹⁴ SIGMA-Aldrich. St. Louis, MO, USA.

¹⁵ Merck, código 1.01512.0100, 100g, Alemanha

solução aquosa de gelatina¹⁶ a 2% em água deionizada com ácido fórmico a 1%. Para a diminuição dos depósitos inespecíficos de prata sobre o material, adotou-se a coloração com lâminas invertidas. Um mililitro da solução de prata coloidal era depositado sobre uma bandeja de coloração de polipropileno e as lâminas, com a face do material voltada para baixo, eram depositadas sobre o corante. A bandeja era mantida em estufa a 37°C por 12 a 15 minutos. Após serem retiradas da estufa, as lâminas eram lavadas rapidamente em água corrente para tirar o excesso da prata e colocadas em cubas com álcool etílico absoluto por cinco minutos. Em seguida, o material foi lavado em água corrente por cinco minutos e imerso no corante metil green por mais cinco minutos. Em seguida, dois banhos de dois minutos cada em álcool isopropílico, novamente mergulhados em álcool etílico absoluto por 40 segundos, diafanizadas em xilol para montagem com lamínula e resina sintética¹⁷.

3.6.1. Avaliação Quantitativa de AgNors

A avaliação quantitativa de AgNors, foi realizada por meio da contagem direta dos pontos e da área de AgNors presentes no núcleo de 100 células em cada caso analisado, utilizando-se o programa KS

¹⁶ Gelatina em pó, Vetec, código 628, 500g.

300¹⁸. Para tal, as lâminas foram observadas em microscópio óptico Leica DMLD sob objetiva de imersão (100x), acoplado a uma câmara de vídeo (Sony - DXV151A), que envia as imagens para o monitor (Siemens – Scenic Pro) equipado com software de análise de imagens Zeiss: KS 300. A avaliação morfométrica foi realizada contornando-se manualmente os pontos correspondentes aos AgNors presente no núcleo utilizando-se caneta específica, em mesa digitalizadora¹⁹.

Os pontos de AgNors dispersos no núcleo foram contados e a sua área medida, sendo determinado o número médio de AgNors por núcleo, a área média de AgNor nuclear em cada uma das amostras. As fórmulas utilizadas para as medidas do AgNors se encontram descritas na tabela 7.

TABELA 6 - Fórmulas utilizadas para mensurações de AgNors

MEDIDA	RÓTULO	FÓRMULA
Área média por ponto de AgNors	$\hat{A}pNor$	$\Sigma \text{área AgNors nuclear} / \Sigma \text{pontos de AgNors}$
Área média de AgNors/núcleo	$\hat{A}NorNu$	$\Sigma \text{área AgNors nuclear} / \text{número de núcleos}$
Área média do núcleo	$\hat{A}Nu$	$\Sigma \text{área nuclear} / \text{número de núcleos}$
Área relativa de AgNors nuclear	$\hat{A}rNorNu$	$\text{Área média de AgNors nuclear} / \text{área média nuclear}$

¹⁷ Permout. Fisher Scientific, Fair Lawn, NS, USA.

¹⁸ Media Cybernetics. Silver Spring, MD, USA.

¹⁹ Genius – Wizard Pen Series

3.7. Estudo Morfométrico

Avaliação morfométrica foi realizada nos preparados citológicos obtidos pela PAAF e corados pelo método de May - Grünwald - Giemsa (MGG). Foram medidas em células tumorais por caso selecionadas aleatoriamente e aferidos: tamanho e diâmetro do núcleo e índice de circunferência nuclear; tamanho e diâmetro do citoplasma e índice de circunferência do citoplasma e relação núcleo:citoplasma.

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico Leica DMLD sob objetiva de imersão (100x), acoplado a uma câmera de vídeo (Sony - DXV151A), que envia as imagens para o monitor (Siemens – Scenic Pro) equipado com software de análise de imagens Zeiss: KS 300. A avaliação morfométrica foi realizada contornando-se manualmente o núcleo e o citoplasma das células neoplásicas utilizando-se caneta específica, em mesa digitalizadora²⁰.

²⁰ Genius – Wizard Pen Series

3.8. Avaliações de Danos no DNA

3.8.1. Teste do Cometa

A técnica do teste do cometa utilizada no presente trabalho é a descrita por SINGH *et al.* (1988), com modificações introduzidas por SPEIT *et al.* (1996) e HARTMANN & SPEIT (1997).

Para avaliação dos casos de linfoma, o teste foi realizado utilizando-se 1ml do sangue periférico com EDTA e do conteúdo obtido do aspirado de células neoplásicas dos linfonodos e/ou massas extranodais dos animais acometidos pela neoplasia. O material colhido foi imediatamente acondicionado em gelo e ao abrigo da luz, condições necessárias para evitar dano no DNA das células por manuseio inadequado.

O sangue utilizado para as lâminas controle foi proveniente de cães adultos clinicamente sadios e sem qualquer histórico de neoplasia, colhido com anticoagulante²¹, e acondicionado da mesma maneira descrita para as células neoplásicas. A determinação da viabilidade das amostras foi feita misturando-se 10µl da suspensão de células com 10µl do corante azul de tripan, seguindo-se a observação em câmara de *newbauer*. Foi considerada viável a amostra que apresentou índice

²¹ EDTA.

superior a 75% de células claras (sem absorção do corante). Todo detalhamento da técnica encontra-se no Anexo 04.

Após a colheita das células e sua suspensão em PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} gelado e ao abrigo da luz, a amostra foi homogeneizada e 7,5 μl da suspensão são misturados a 120 μl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), misturados delicadamente, estendidos sobre lâmina de vidro pré-revestida com agarose normal, cobertos com lamínula e mantido a 4°C por cinco minutos para solidificação. Após este período, a lamínula foi gentilmente retirada e as células foram lisadas através da imersão em solução de lise contendo NaCl_2 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM pH 10 e sarcosinato de sódio 2% (com Triton X-100 1% e DMSO 10% adicionados imediatamente antes do uso) por um período entre 24 horas e até sete dias a 4°C.

Após o período mínimo de 24 horas na solução de lise, as lâminas foram colocadas na cuba horizontal de eletroforese e deixadas em repouso em solução alcalina (pH > 13) durante 20 minutos. Após este período foram imediatamente submetidas à eletroforese por mais 20 minutos. Em cada corrida de eletroforese, além das lâminas contendo material proveniente dos animais com linfoma foram acrescentadas duas lâminas utilizadas para controle negativo e positivo contendo sangue do animal sadio.

O controle positivo das lâminas contendo sangue dos animais sadios foi conseguido mediante indução do dano no DNA das células sangüíneas por meio do tratamento da lâmina com água oxigenada 100 μ M a 4°C e deixada em repouso na geladeira durante cinco minutos para posterior corrida.

Após a eletroforese, as lâminas foram submetidas a três banhos com solução de neutralização com duração de cinco minutos cada, fixadas em etanol absoluto, coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência.

Foram analisadas cinquenta células por amostra de cada animal em microscópio de fluorescência²², e as imagens dos cometas obtidas foram avaliadas através de análise de imagem digitalizada²³, no Laboratório do Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Unesp, Campus de Botucatu.

²² Axiophot-Carl Zeiss, filtro de 516-560nm, barreira de filtro de 590nm e aumento total de 400X)

²³ Comet Assay II, Perceptive Instruments, UK.

3.9. Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Botucatu, São Paulo.

As aferições das médias de AgNor, avaliação morfométrica das células neoplásicas em seus respectivos graus de malignidade foram comparadas com a morfologia celular usando-se o teste não-paramétrico de comparação por *ranks* Kruskal-Wallis, com nível de significância $p < 0,05$ e de Mann-Whitney, com nível de significância $p < 0,05$.

Para as variáveis quantitativas como o teste do cometa, os grupos foram comparados em média pela utilização de análise de variância com a aplicação do teste de Tukey (ZAR, 1996), de Mann-Whitney e o teste de Spearman, com nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Durante o período de março de 2001 a novembro de 2004, foram selecionados 66 casos com diagnóstico inicial de linfoma obtido através da PAAF. Após realização dos testes imunoistoquímicos, 13 casos foram classificados como tumores de células redondas de origem mesenquimal e foram excluídos de nossa casuística por não apresentarem imunomarcção para os anticorpos testados.

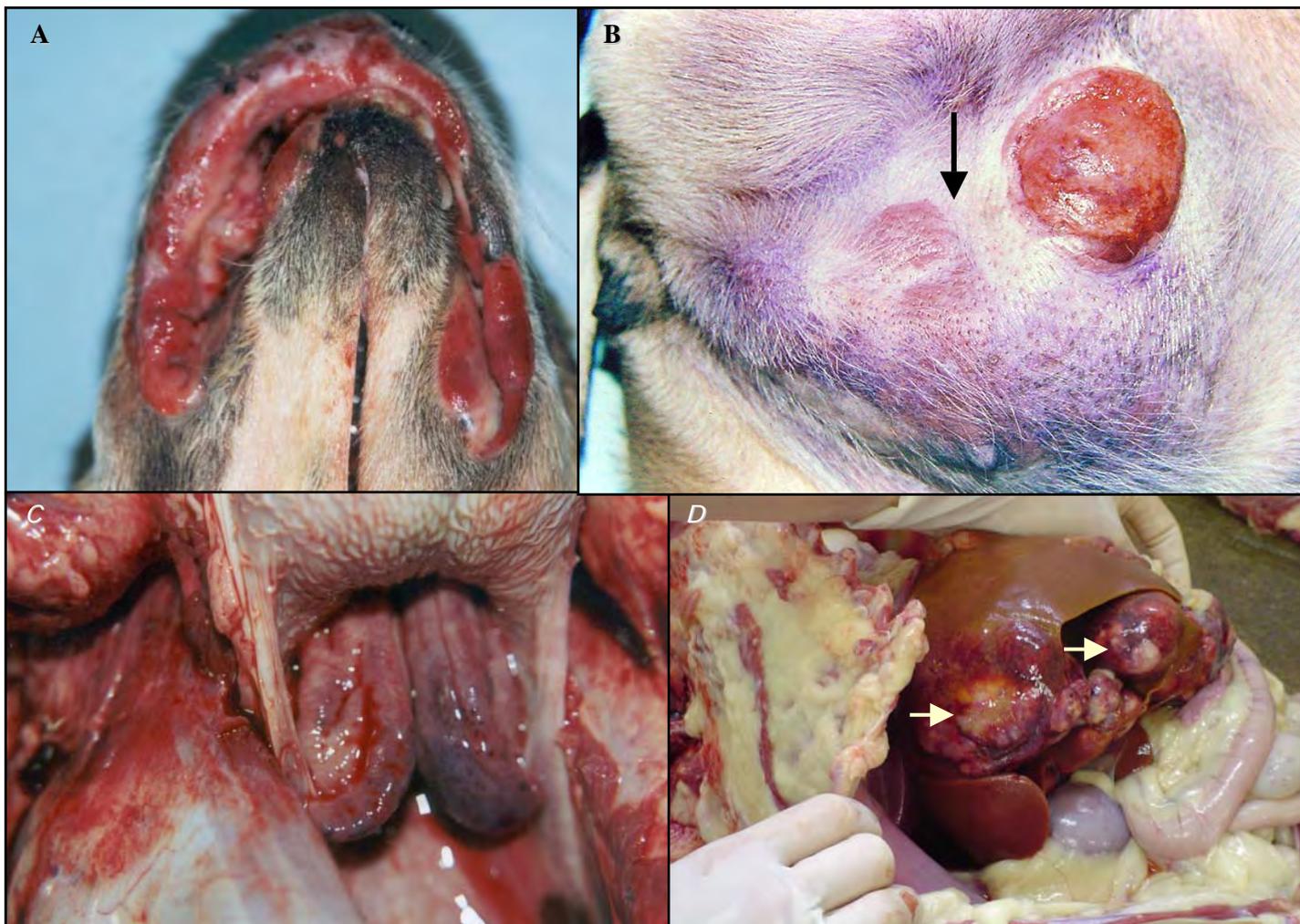
Destes 53 casos incluídos em nosso trabalho, 25 casos (47,16%) foram inicialmente utilizados por SUZANO (2004) em seu estudo sobre a classificação citológica e imunocitoquímica dos linfomas nos cães. Ao compararmos os resultados obtidos entre diagnóstico citológico e histológico, verificou-se que houve coincidência quanto à classificação citomorfológica em 14 casos (56%). Quando se comparou o índice de acerto para o grau de malignidade dos linfomas, este índice atingiu 100% de acerto nos casos estudados.

4.1. Sobre os dados clínicos e achados de necropsia

Ao analisarmos os dados nas fichas dos animais, verificou-se que a frequência de linfadenopatia, localizada ou generalizada, encontrava-se presente em 43 animais (81,13%); 28 cães (52,83%) apresentaram hepatomegalia e em 30 casos (56,60%) ficou constatada esplenomegalia.

O comprometimento do mediastino ficou constatado em 21 animais (39,62%) e foi caracterizado por aumento somente do timo nos casos de linfoma tímico (quatro casos). Nos outros animais essa alteração podia ser observada através do aumento dos linfonodos mediastínicos e/ou efusão torácica.

Em 14 animais (26,41%) foi observada presença de nódulos cutâneos e subcutâneos, ulcerados ou não somente à necropsia, após verificarmos o comprometimento dos linfonodos internos, concluímos tratar-se de linfoma multicêntrico com manifestação cutânea. Em dois casos que nos chamou atenção, verificou-se múltiplas nodulações na pele e infiltração de células neoplásicas no globo ocular em um; e no outro, essas nodulações foram observadas concomitantemente na pele e na musculatura cardíaca. Algumas alterações macroscópicas podem ser observadas na figura 1 (A a D).



A: Cão, macho, SRD, oito anos. Linfoma na junção mucocutânea. Aumento de volume e ulceração dos lábios.

B: Cão, fêmea, SRD, quatro anos. Pele. Linfoma multicêntrico com manifestação cutânea na região inguinal. A neoplasia apresenta-se em forma de placa (seta) e em forma de nódulo avermelhado e alopecico.

C: Cão, macho, pastor alemão, cinco anos. Tonsilas. Linfoma multicêntrico. Acentuado aumento de volume, congestão e hemorragia das tonsilas.

D: Cão, macho, SRD, cinco anos Fígado. Linfoma multicêntrico. Disseminação da neoplasia em forma de nodulações múltiplas branco-amareladas (setas).

Nos chamou também atenção o grau de comprometimento da musculatura. Em 15 animais (28,30%), o linfoma apresentou-se disseminado em vários grupos musculares como os dos membros anteriores e posteriores, intercostais, diafragma, língua e masseter.

O perfil hematológico dos animais estudados apresentava variações diversas e inexpressivas, exceto em dois casos (3,77%) nos quais foi patente a presença de linfócitos atípicos no sangue.

4.2. Estadiamento dos Linfomas

Os dados clínicos e o resultados de exames auxiliares foram extraídos dos prontuários de cada animal e utilizados para estabelecer o estadiamento clínico e a classificação anatômica dos tumores de acordo com o protocolo recomendado pela *World Health Organization* (WHO; *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*, Geneva, 1980) e por JACOBS *et al.*, (2002), respectivamente.

Para realizar tal intento fez-se necessário efetuar exame físico, perfil hematológico, diagnóstico por imagem e punção de medula óssea. Quando estes dados apresentavam-se incompletos nos

prontuários, tanto o estadiamento como a classificação anatômica foi realizada durante a necropsia.

Dos 53 animais utilizados no trabalho, foi possível o estadiamento clínico em 42 animais (79,24%). Nos 11 animais restantes (20,76%), os dados foram obtidos durante a necropsia.

Nos chamou atenção a inclusão de 15 animais (28,30%), antes inseridos principalmente nos estágios três ou quatro, após a necropsia, passarem para o estágio cinco por constatarmos a presença de células neoplásicas na medula óssea (tabela 7 e figura 2).

Tabela 7 – Estadiamento clínico dos cães com linfoma de acordo com os padrões estabelecidos pela *World Health Organization* (WHO; *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*)

<i>ESTADIAMENTO</i>	<i>NÚMERO DE CASOS</i>	<i>(%)</i>
I	01	1,88
II	01	1,88
III	09	16,99
IV	22	41,51
V	20	37,74
TOTAL	53	100

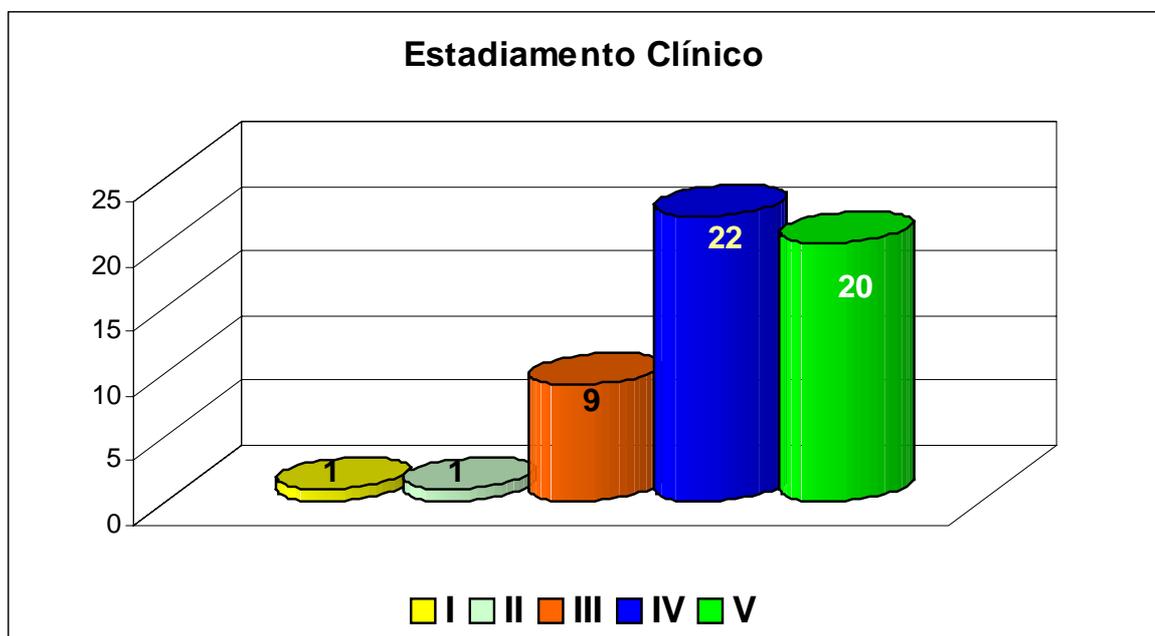


Figura 2 - Estadiamento clínico dos cães com linfoma de acordo com os padrões estabelecidos pela *World Health Organization* (WHO; *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*).

Com relação à classificação anatômica, 46 animais (86,79%) apresentaram a forma multicêntrica, três (5,66%) mostraram acometimento de apenas um órgão – a forma solitária – com nodulação única ou múltipla, localizada no rim, saco escrotal e baço. E, por último, tivemos quatro casos (7,54%) de localização tímica (tabela 8 e figura 3).

Tabela 8 – Classificação anatômica dos cães com linfoma de acordo com os padrões estabelecidos por JACOBS *et al.* (2002)

<i>Forma anatômica</i>	<i>Número de casos</i>	<i>(%)</i>
Multicêntrica	46	86,79
Tímica	04	7,55
Solitária	03	5,66
TOTAL	53	100

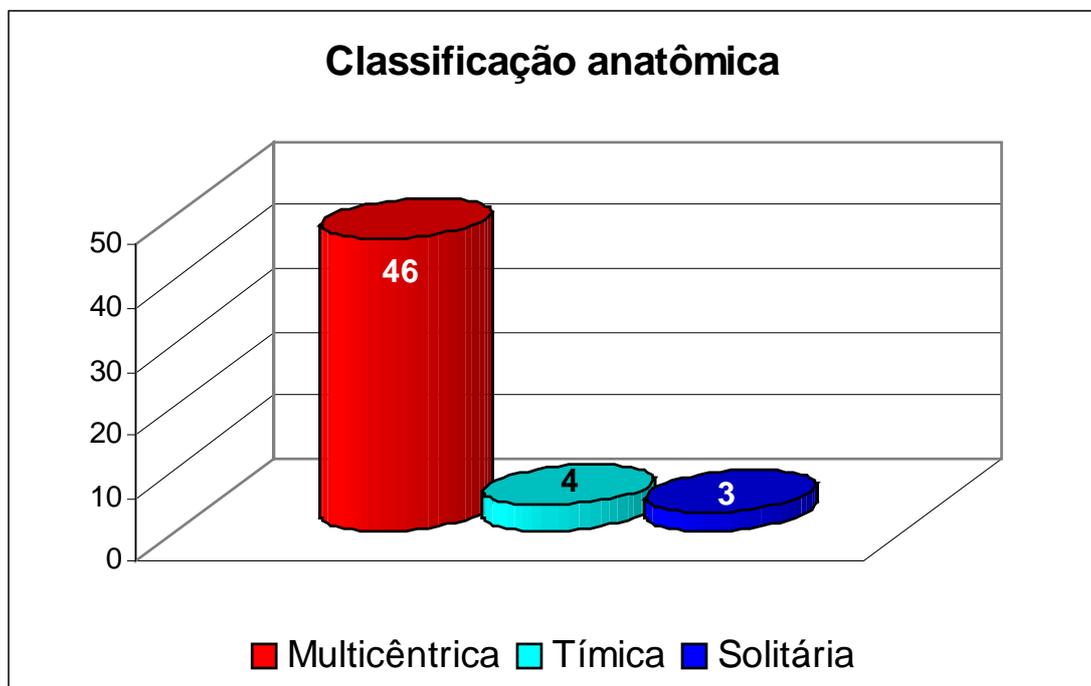


FIGURA 3 - Classificação anatômica dos cães com linfoma, de acordo com JACOBS *et al.*, (2002)

Quanto a distribuição dos animais por sexo pode ser melhor evidenciada na tabela 9 e figura 4.

TABELA 9 – Classificação e distribuição dos cães com linfoma quanto ao sexo

<i>SEXO</i>	<i>Número de casos</i>	<i>(%)</i>
Fêmeas	20	37,74%
Machos	33	62,26%
TOTAL	53	100

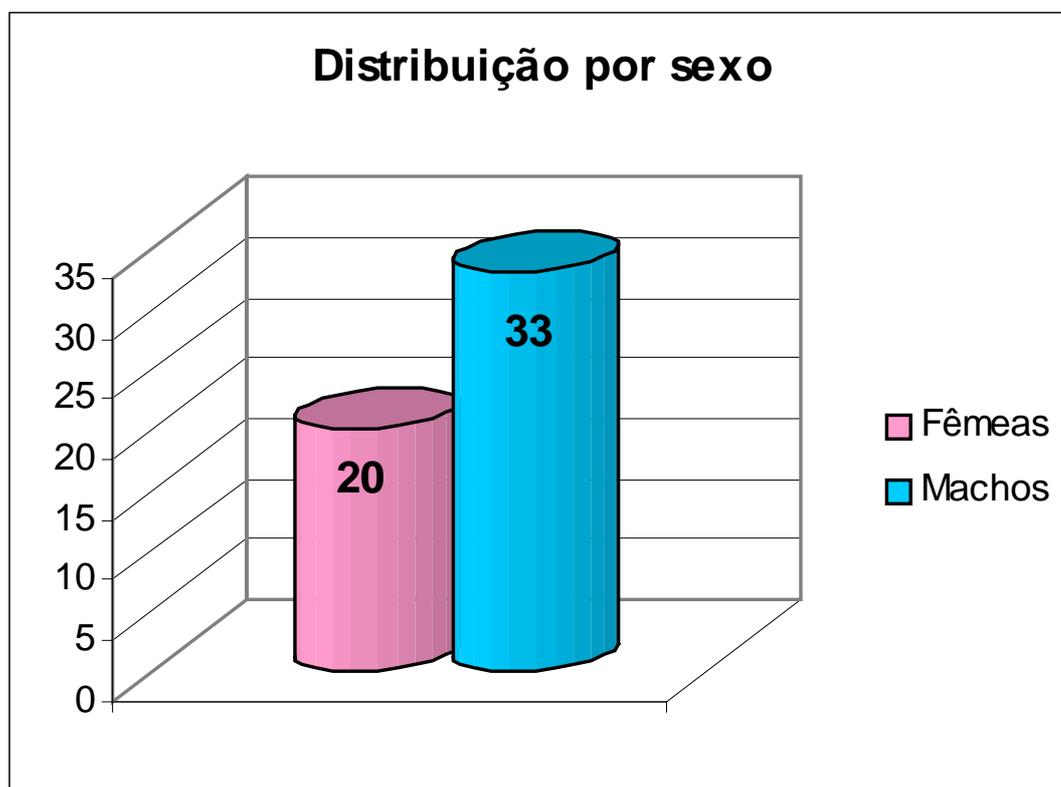


Figura 4 - Classificação e distribuição dos cães com linfoma quanto ao sexo

Em nosso estudo, o maior número de animais pertencia ao grupo de animais sem raça definida - SRD (tabela 10 e figura 5).

TABELA 10 – Distribuição por raça dos cães com linfoma

RAÇA	NÚMERO DE CASOS	(%)
SRD	19	35,85
Pastor Alemão	09	16,99
Rottweiler	08	15,09
Boxer	06	11,32
Fila Brasileiro	02	3,77
Dog Alemão	02	3,77
Outras	07	13,21
TOTAL	53	100

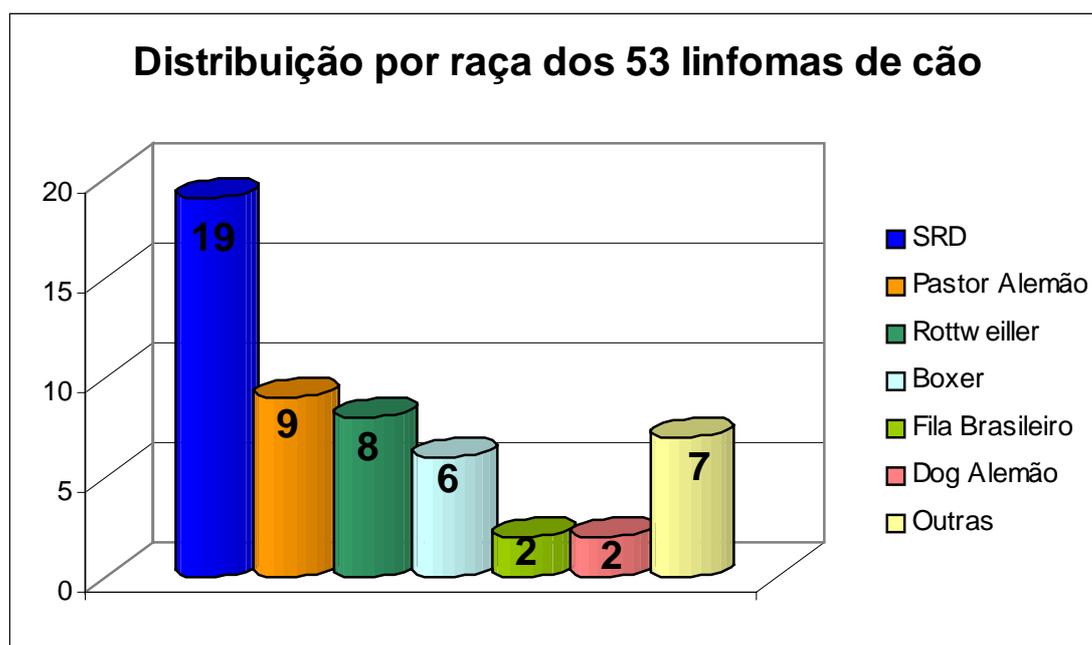
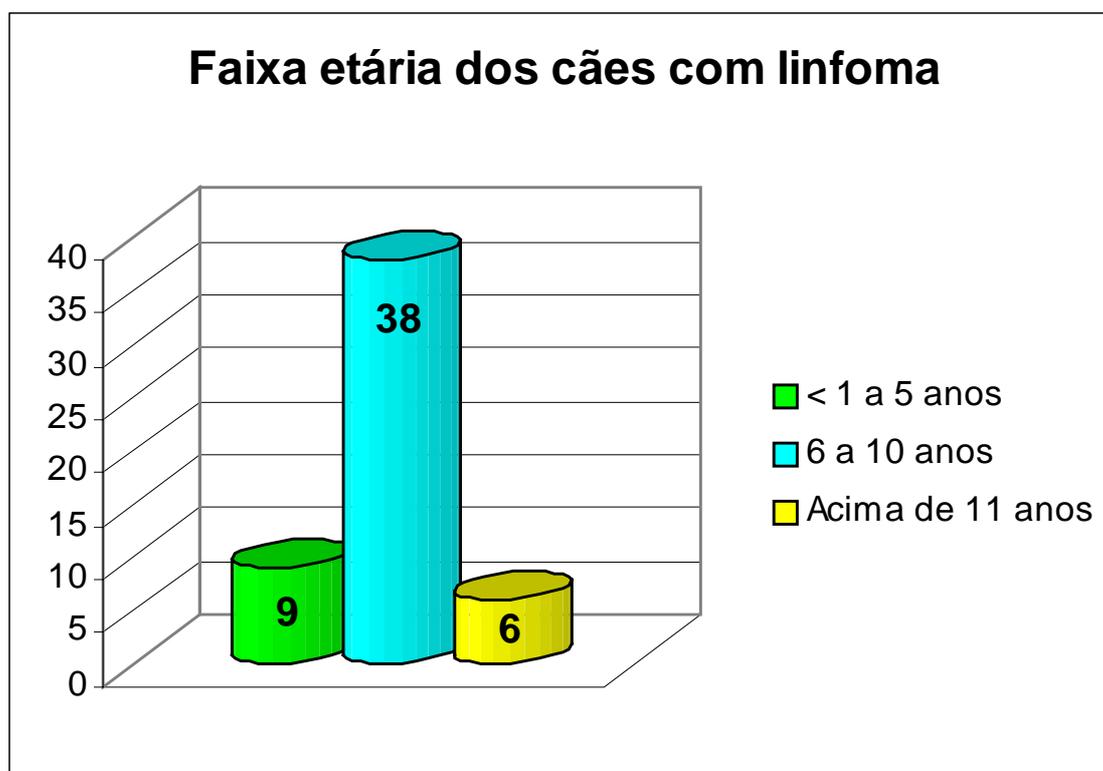


Figura 5 - Distribuição por raça dos cães com linfoma.

Considerando-se a idade, a maior frequência de linfoma (71,69%) foi observada nos animais entre seis a 10 anos (tabela 11 e figura 6).

Tabela 11 – Faixa etária e idade média dos animais diagnosticados com linfoma

<i>FAIXA ETÁRIA</i>	<i>Número de casos</i>	<i>(%)</i>
< 1 a 5 anos	09	16,98
6 a 10 anos	38	71,70
Acima de 11 anos	06	11,32
TOTAL	53	100
Média de idade dos animais	5,5 anos	

**Figura 6** - Faixa etária dos cães com linfoma

4.3. Emprego das classificações de Kiel e *Working Formulation* (WF) e de Fournel-Fleury *et al.*(1994) nos 53 casos de linfomas não-Hodgkin nos cães.

Todos os casos de linfoma foram classificados de acordo com o esquema proposto por Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), *Working Formulation* do *National Cancer Institute* (NCI-WF, 1982) e a classificação para os linfomas dos cães apresentados por Fournel-Fleury, *et al.*, (1994).

Ao se utilizar as classificações de Kiel e de FF para diagnósticos das neoplasias estudadas foi observado a supremacia dos linfomas de grau alto de malignidade (64,15%). Quando a classificação da WF foi aplicada a essas mesmas neoplasias, verificou-se a também predominância para os linfomas de grau alto (56,60%) seguido pelos linfomas de grau intermediário (33,96%) (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 –Resultados das classificações citoistológicas dos linfomas estabelecidos de acordo com os critérios de Kiel e FF

KIEL	<i>n</i>	(%)
GRAU BAIXO	19	35,85
GRAU ALTO	34	64,15
TOTAL	53	100

Tabela 13 – Resultados das classificações citoistológicas dos linfomas estabelecidos de acordo com os critérios da WF

WF	<i>n</i>	(%)
GRAU BAIXO	05	9,44
GRAU INTERMEDIÁRIO	18	33,96
GRAU ALTO	30	56,60
TOTAL	53	100

4.3.1. Características citomorfológicas dos linfomas dos cães estudados, descritas de acordo com os padrões estabelecidos pela classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1980) e seus correspondentes nas classificações da *Working Formulation* (WF - NCI, 1982) e FURNEL-FLEURY *et al.* (1994 - FF)

4.3.1.1. Linfomas de Grau Baixo

- **Linfoma Linfocítico:** os linfócitos malignos são pequenos, núcleo arredondado, cromatina densa e grosseira e citoplasma escasso. Entre essa população de pequenos linfócitos malignos pode aparecer células linfocitoides maiores (pró-linfócitos), cuja cromatina é mais abundante e o citoplasma é pálido (Figura 7).

WF: linfoma linfocítico de baixo grau

FF: Linfoma Linfocítico

- **Linfoma Centrocítico:** composto por células de pequeno a médio porte com núcleos irregulares e alguns clivados, cromatina delicada e o nucléolo pequeno. O citoplasma não é visível (Figura 8).

WF: Essa entidade não apresenta contrapartida na classificação *Working Formulation*. Foi agrupada no grupo dos linfomas difusos de pequenas células clivadas de grau intermediário levando-se em consideração a semelhança das suas características citomorfológicas com este tipo de linfoma (TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

FF: Linfoma Centrocítico

- **Linfoma Centrocítico-Centroblástico:** normalmente são compostos por dois tipos de células encontradas nos centros germinais. O primeiro tipo e o predominante na neoplasia são células de tamanho pequeno a médio com núcleo anguloso ou alongado ou ainda clivado, nucléolo não evidente e citoplasma escasso e pálido - centrócitos. O segundo tipo, mas em minoria, são os centroblastos. Caracterizam-se por serem arredondadas ou

ovais, cromatina vesiculosa apresentando um a três nucléolos nas margens da membrana nuclear (Figura 9).

WF: linfoma difuso de pequenas células clivadas de grau intermediário.

FF: Linfoma Centrocítico-Centroblástico

- **Linfoma de Células T pleomórfico:** apesar de ser composto por células pleomórficas, as células neoplásicas apresentam aspecto relativamente monótono. As células são geralmente pequenas com citoplasma escasso e pálido. Os núcleos são irregulares e revelam um lado côncavo de aspecto serrilhado e o lado convexo liso. A cromatina é moderadamente densa e o nucléolo é pequeno e único (Figura 10).

WF: Essa entidade não apresenta contrapartida na classificação *Working Formulation*. Foi agrupada no grupo dos linfomas difusos de pequenas células clivadas de grau intermediário levando-se em consideração a semelhança das suas características citomorfológicas com este tipo de linfoma (TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

FF: Linfoma de Células T pleomórfico

- **Linfoma Linfoplasmacítico:** também conhecido como imunocitoma, é composto por maioria de linfócitos (até 90%) e o restante por células linfoplasmocitóides ou plasmócitos que apresentam citoplasma basofílico mais abundante (Figura 11).

WF: linfoma linfocítico plasmocitóide de baixo grau

FF: Linfoma Linfoplasmacítico

- **Linfoma de Zona T:** caracterizada por excessiva proliferação de linfócitos T e de imunoblastos T em meio variável padrões celulares de transição entre esses dois tipos de células. Os núcleos dos linfócitos são na maioria monomórficos com pequeno nucléolo evidente. O citoplasma é escasso. Por vezes, estes linfócitos apresentam citoplasma abundante e transparente (*Clear Cells*) e se agrupam em pequenas áreas facilmente distinguíveis dos outros linfócitos (Figura 12).

WF: linfoma difuso misto de pequenas e grandes células de grau intermediário.

FF: Linfoma de Zona T

4.3.1.2. Linfomas de Grau Alto

- **Linfoma Immunoblástico:** a grande maioria das células tumorais são imunoblastos grandes e basofílicos com núcleo redondo ou oval, nucléolo central grande e único, podendo também ser observados nucléolos múltiplos de tamanhos médios (Figuras 13).

WF: linfoma imunoblástico de grau alto

FF: Linfoma Immunoblástico

- **Linfoma Centrobástico:** o tipo celular predominante se caracteriza por possuir núcleo pálido e arredondado com cromatina delicada podendo apresentar de dois a quatro nucléolos de tamanho médio e localização periférica. O citoplasma pode ser escasso ou abundante e palidamente basofílico. Observa-se grande número de figuras de mitoses (Figura 14).

WF: linfoma de grandes células não clivadas de grau intermediário.

FF: Linfoma Centrobástico

- **Linfoma Linfoblástico:** são compostos por células blásticas de tamanhos médios com citoplasma escasso e basofílico e com grande número de figuras de mitoses. Os núcleos com

cromatina delicada podem apresentar-se arredondados, indentados ou convolutos e podem mostrar de um a três nucléolos de tamanhos médios e basofílicos (Figura 15).

WF: linfoma linfoblástico de grau alto.

FF: Linfoma Linfoblástico

- **Linfoma de Grandes Células Anaplásico:** o tumor é formado por células que variam de grande a gigantes com citoplasma abundante. O núcleo varia de arredondado a irregular e a cromatina é fina a moderadamente densa e pode conter poucos nucléolos polimórficos (Figura 16).

WF: Essa entidade não apresenta contrapartida na classificação *Working Formulation*. Foi agrupada no grupo dos linfomas imunoblásticos de grau alto levando-se em consideração a semelhança das suas características citomorfológicas com este tipo de linfoma (TESKE, 1994; FURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; FURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

FF: Linfoma de Grandes Células Anaplásico

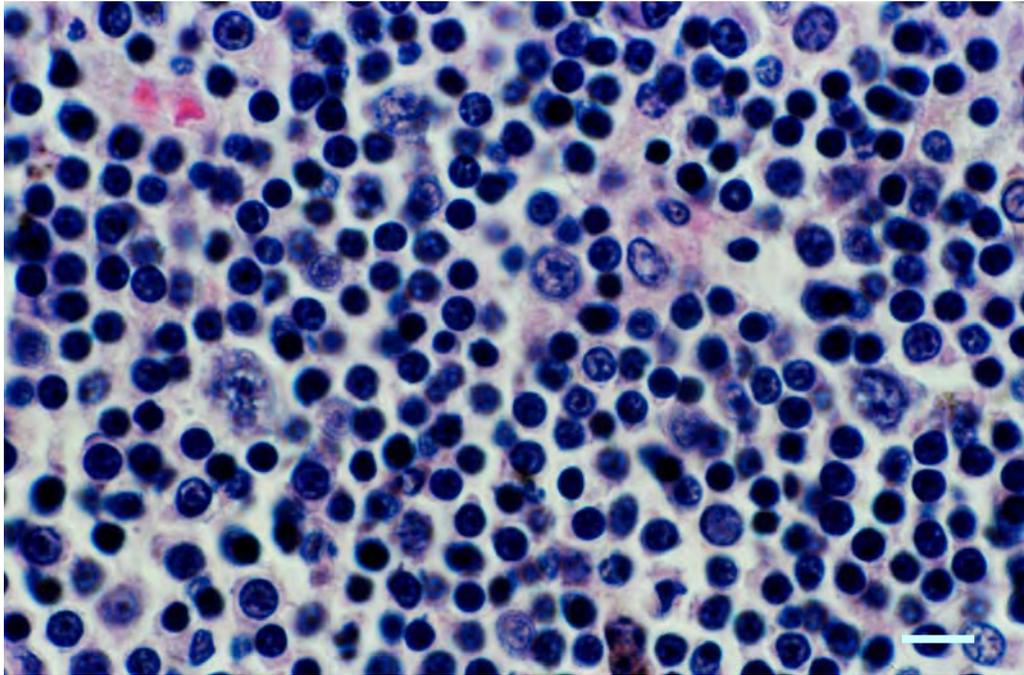


Figura 07 – Linfoma Linfocítico de grau baixo (Kiel e FF) equivalente ao linfoma linfocítico também de grau baixo na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

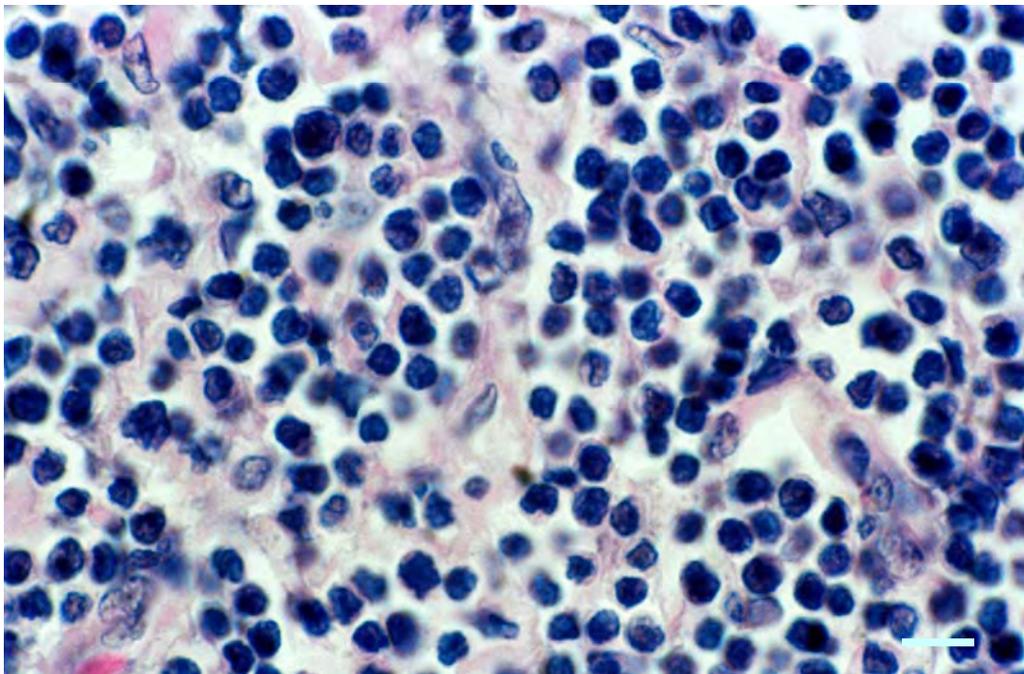


Figura 08 – Linfoma Centrocítico de grau baixo (Kiel e FF) equivalente ao linfoma difuso de pequenas células clivadas de grau intermediário na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

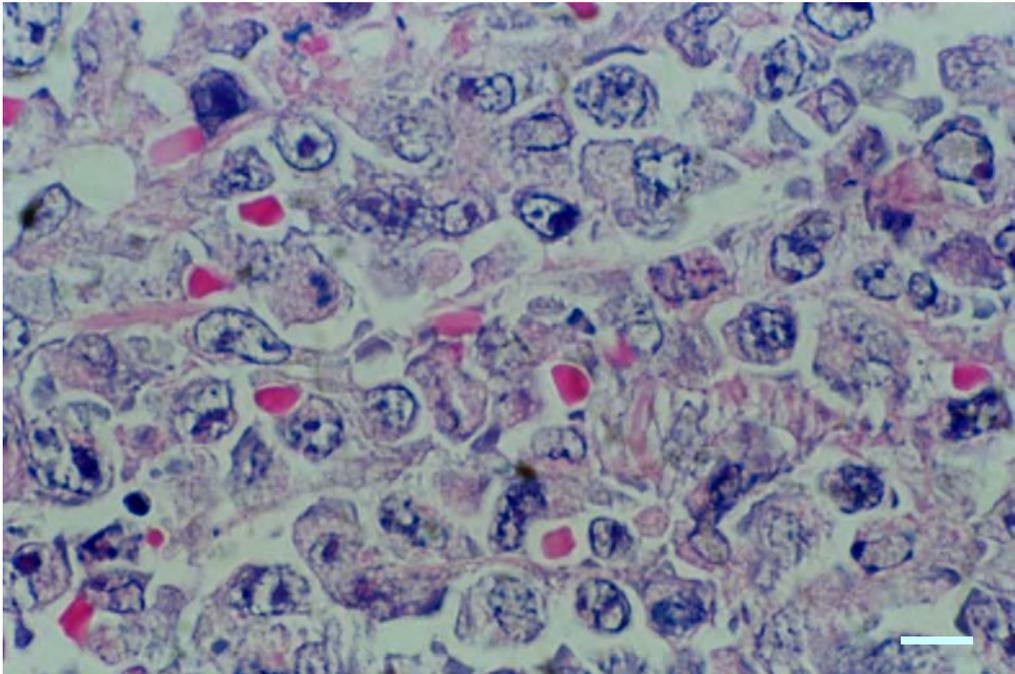


Figura 09 – Linfoma Centrocítico-centroblástico de grau baixo (Kiel e FF) equivalente linfoma difuso de pequenas células clivadas de grau intermediário na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

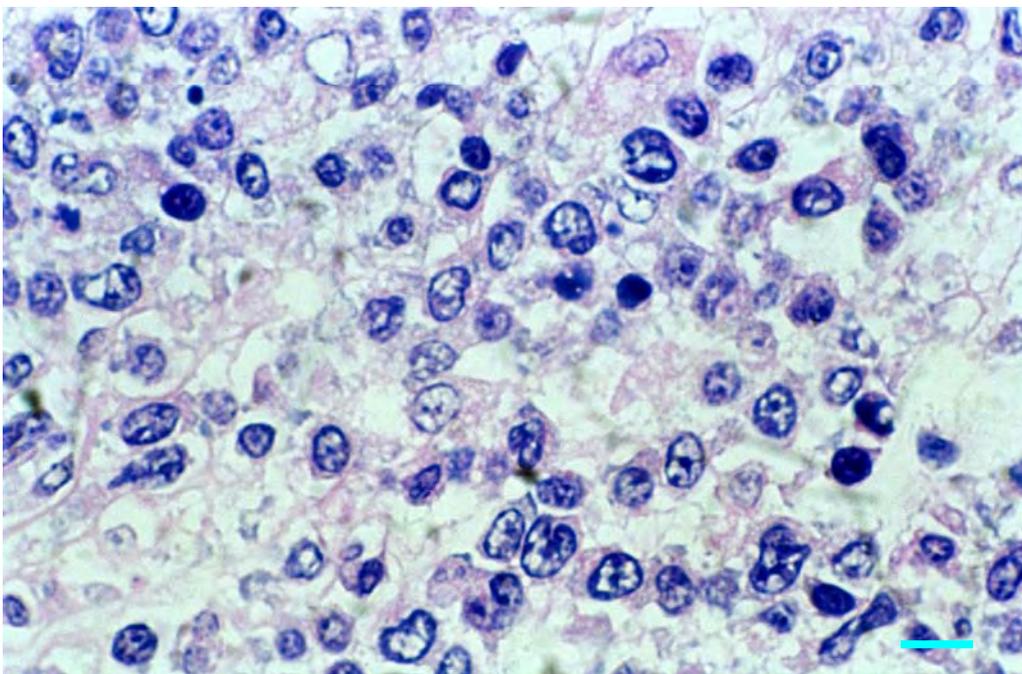


Figura 10 – Linfoma de células T pleomórficas de grau baixo (Kiel e FF) equivalente linfoma difuso de pequenas células clivadas de grau intermediário na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

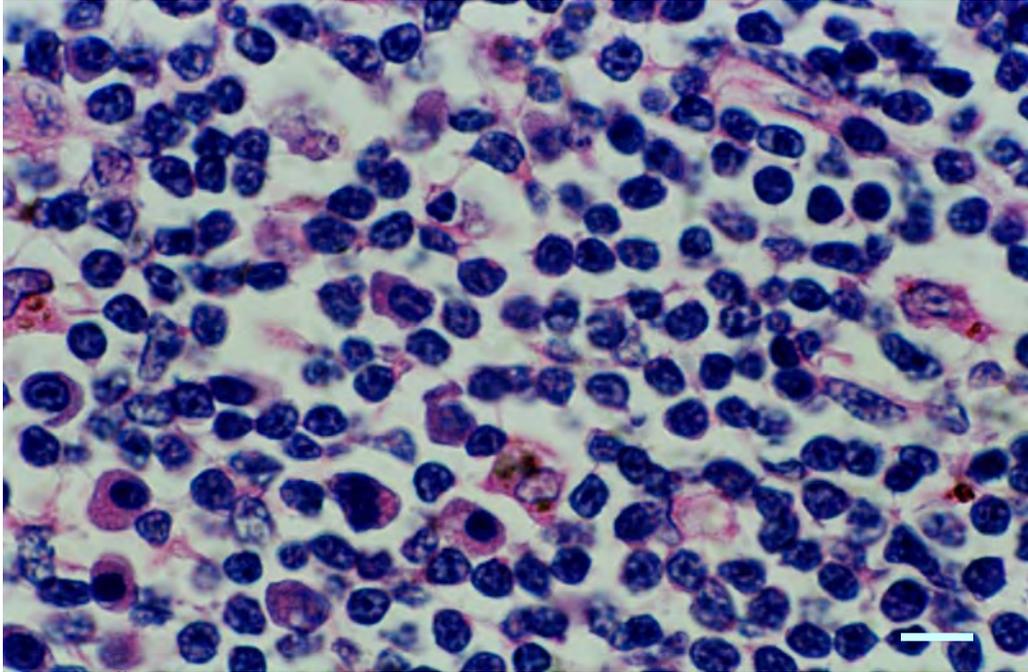


Figura11 – Linfoma linfoplasmacítico (Kiel e FF) equivalente ao linfoma linfoplasmocitóide de grau baixo na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

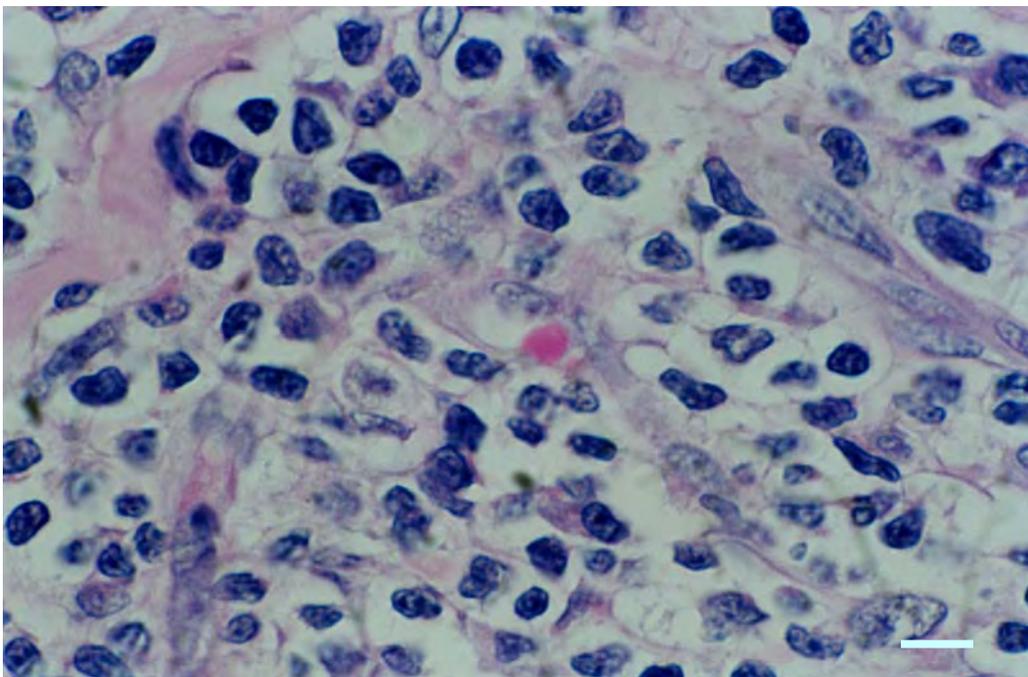


Figura 12 – Linfoma de zona T (Kiel e FF) equivalente ao linfoma difuso misto de pequenas e grandes células de grau intermediário na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

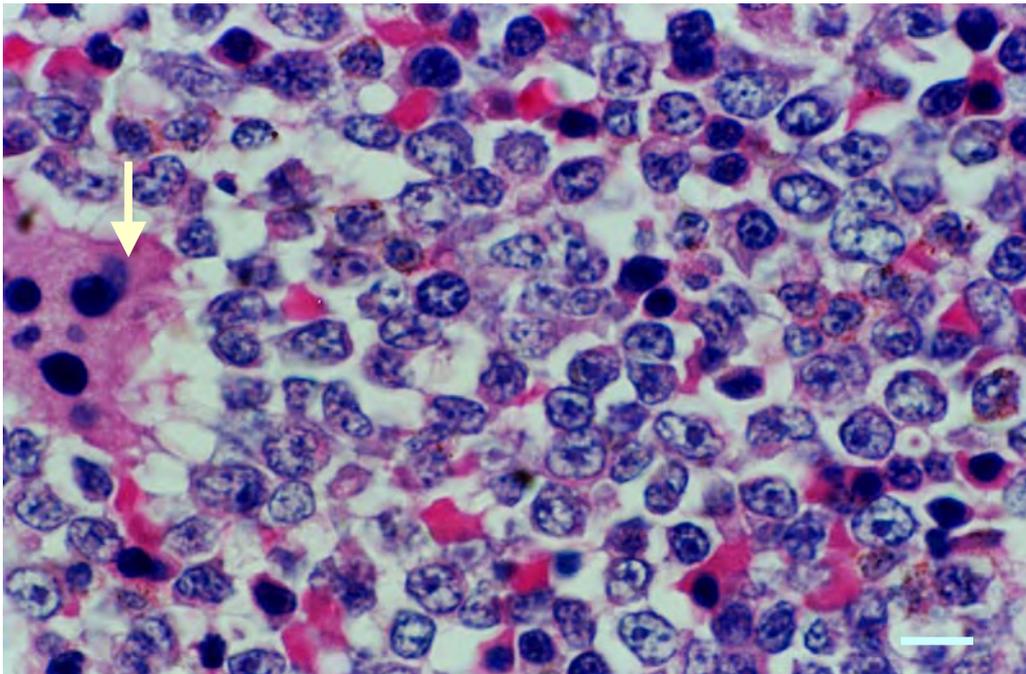


Figura 13 – Linfoma Imunoblástico de grau alto nas classificações de Kiel, Fournel-Fleury *et al.* (1994) e *Working Formulation*. Infiltração na medula óssea. Megacariócito (seta). (H&E. Barra = 10 μ m).

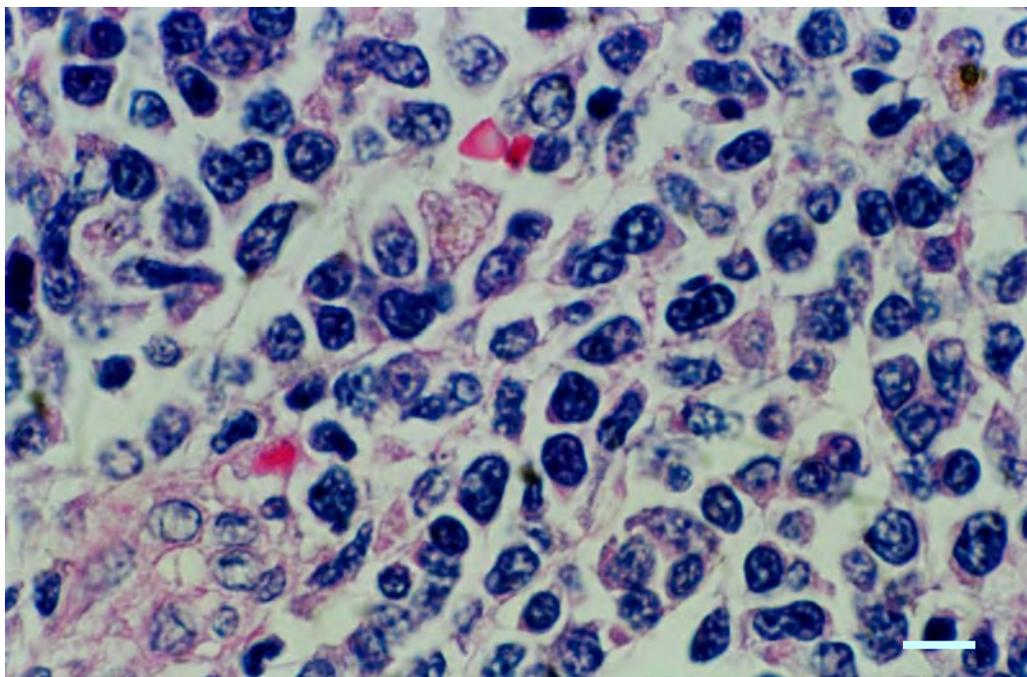


Figura 14 – Linfoma Centroblástico de grau alto (Kiel e FF) equivalente ao linfoma de grandes células não-clivadas de grau intermediário na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

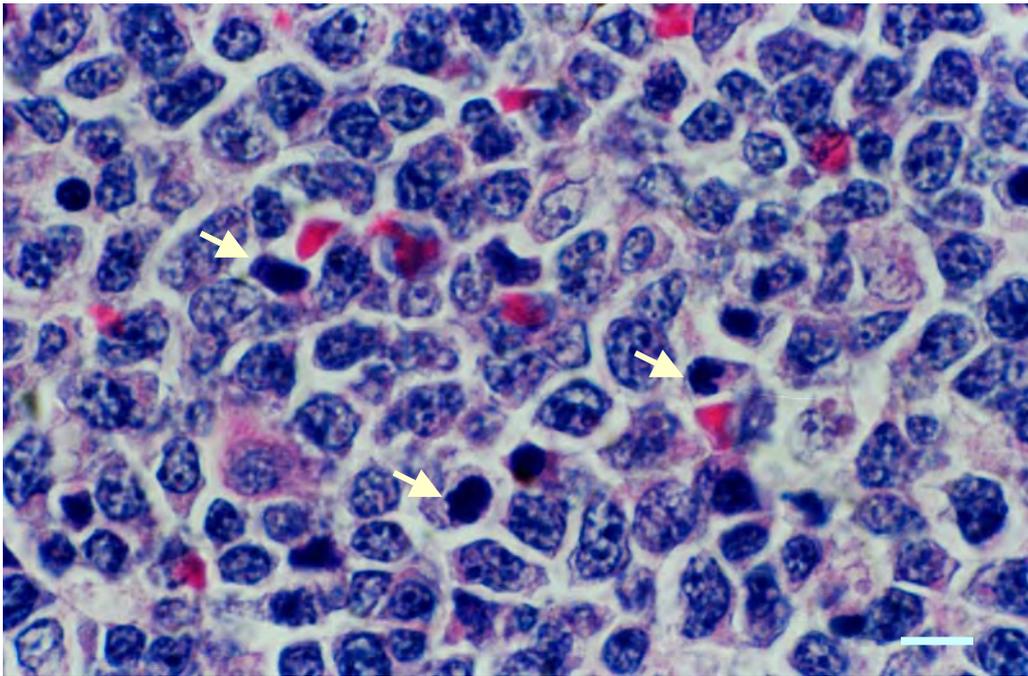


Figura 15 – Linfoma Linfoblástico de grau alto nas classificações de Kiel, Fournel-Fleury *et al.* (1994) e *Working Formulation*. Grande número de mitoses. (setas). (H&E. Barra = 10 μ m).

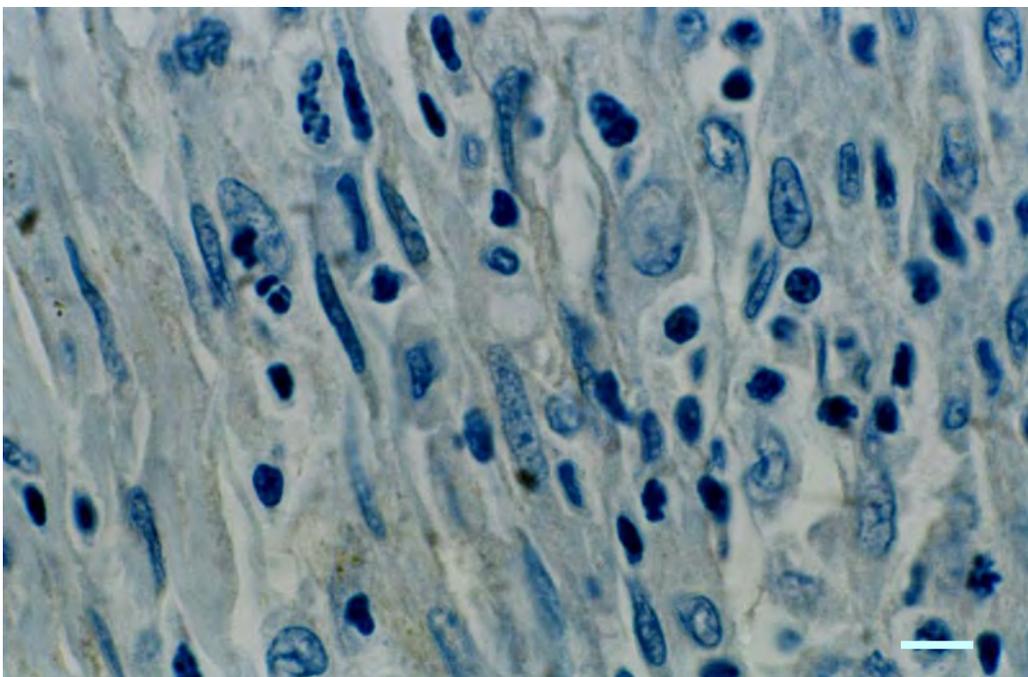


Figura 16 – Linfoma de Grandes Células Anaplásico de grau alto (Kiel e FF) equivalente ao linfoma imunoblástico de grau alto na WF. (H&E. Barra = 10 μ m).

4.4. Imunofenotipagem dos Linfomas

Após a marcação imunoistoquímica dos 53 animais portadores de linfomas, 22 casos (41,5%) apresentaram imunorreatividade B (CD79a+/CD3-), o mesmo número observado para os linfomas com imunofenótipo T (CD3+/CD79-). O número de tumores apresentando imunorreatividade tanto para B como para T (CD3+/CD79a+) foi observada em nove casos (16,98%). Os detalhes destes resultados utilizando-se as classificações propostas encontram-se nos Anexos 09, 10 e 11.

Utilizando-se os esquemas de **Kiel e FF**, os resultados do grupo de linfomas de grau baixo, foram os seguintes: dos 53 casos de linfomas, 19 (35,84%) revelaram este tipo de padrão de malignidade. Destes, sete (36,84%) são de imunofenótipo B (CD79a+/CD3-), nove (47,37%) com imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e três (15,79%) mostraram dupla imunomarcação T/B (CD3+/CD79a+).

O tipo mais freqüente de linfoma classificado como de grau baixo, foi o linfoma de células T pleomórfico, aparecendo em cinco casos todos, lógico, expressando o imunofenótipo T (CD3+/CD79a-), seguido do tipo centrocítico, observado em quatro casos, sendo que três desses casos expressando imunorreatividade B (CD79a+/CD3-) e

um caso com imunexpressão mista T/B (CD3+CD79a+). Esses resultados podem ser observados na tabela 14.

Tabela 14- Correlação entre os graus de malignidade e imunofenotipagem dos cães com linfoma utilizando-se a classificação de Kiel e FF

GRAUS MALIGNIDADE	N^oCASOS	LINFOMA B	LINFOMA T	LINFOMA T/B
Grau baixo	19	07	09	03
Grau alto	34	15	13	06
Total	53	22	22	09

Ainda quando observamos os 53 casos de linfoma estudados neste trabalho, pode-se verificar que 34 casos (64,15%) são linfomas de grau alto, destes 15 casos (44,12%) com imunofenótipo B (CD79a+/CD3-), 13 casos (38,24%) apresentando imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e seis casos (17,64%) com ambos tipos de imunorreatividade (CD79a+/CD3+) (tabela 14).

O tipo citológico de linfoma de grau alto mais freqüente entre os 53 casos estudados, de acordo com Kiel, foi o tipo imunoblástico, aparecendo em 26 casos, sendo que nove expressaram o imunofenótipo B (CD79a+/CD3-), 13 casos com imunofenótipo T (CD3+/CD79a-); e quatro casos expressando ambos imunofenótipos T/B (CD79a+/CD3+), seguido do linfoma tipo centroblástico, observado em quatro casos, sendo que três

expressaram imunofenótipo B (CD79a+/CD3-) e um demonstrando imunomarcção B e T (CD3+/CD79a+) (figura 17).

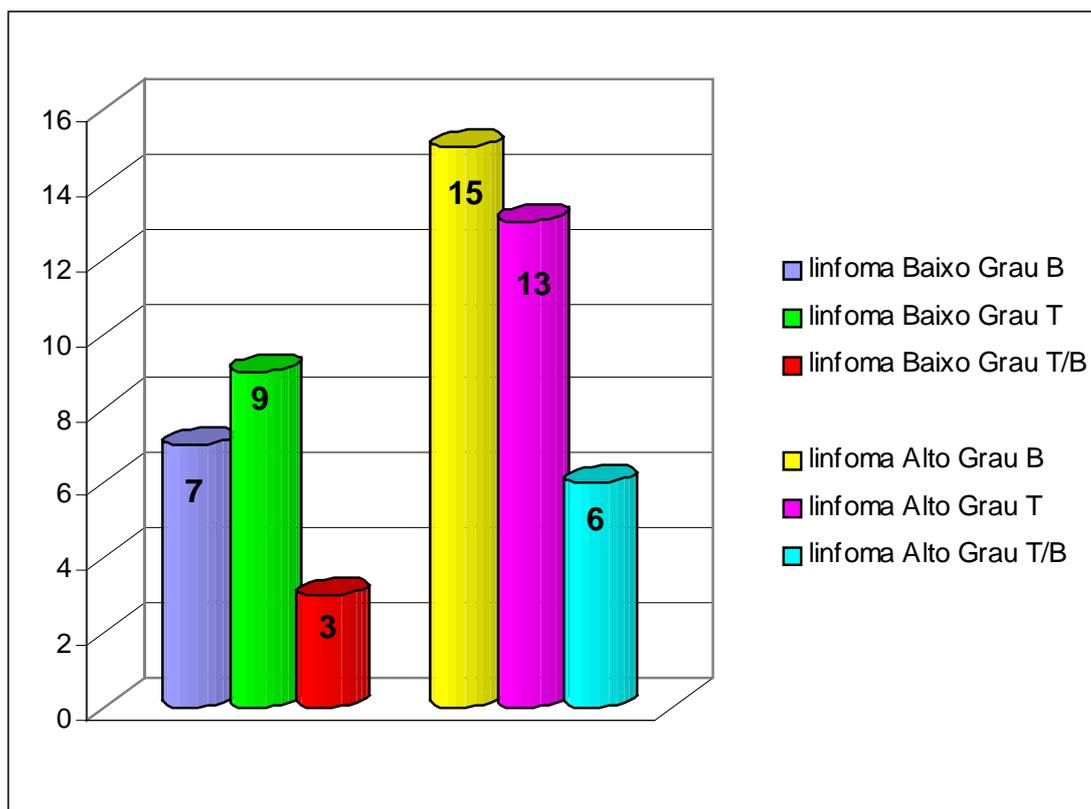


Figura 17 - Distribuição dos imunofenótipos e graus de malignidade dos 53 casos de linfoma de acordo com a classificação de Kiel e FF

Quando o sistema de classificação utilizado foi a **WF**, apenas cinco (9,43%) dos 53 casos estudados foram agrupados como de grau baixo de malignidade. Deste total, dois casos (40%) possuem imunofenótipo B (CD79a+/CD3-) e dois casos (40%) foram agrupados como tendo imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e apenas um

caso (20%) de imunofenótipo com imunorreatividade positiva tanto para B como para T (CD79a+/CD3+) (tabela 15).

Tabela 15 - correlação entre os graus de malignidade e imunofenotipagem dos 53 linfomas caninos utilizando-se a classificação da WF

GRAUS MALIGNIDADE	N^oCASOS	LINFOMA B	LINFOMA T	LINFOMA T/B
Grau baixo	05	02	02	01
Grau intermediário	18	08	07	03
Grau alto	30	12	13	05
Total	53	22	22	09

Dentre os tipos de linfomas mais freqüentes classificados como de grau baixo de malignidade na **WF**, dos cinco casos incluídos nesta categoria, três foram classificados como linfoma linfocítico e dois casos foram classificados como linfoma linfocítico plasmocitóide

Quanto aos linfomas de grau intermediário, dos 53 casos estudados, 18 cães (33,96%) apresentaram este tipo de padrão de malignidade. Destes, oito (44,44%) apresentaram imunofenótipo B (CD79a+/CD3-), sete (38,90%) imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e três (16,66%) apresentaram imunorreatividade tanto para B como para T (CD79a+/CD3+).

Dentre os linfomas de grau intermediário, o linfoma do tipo difuso de pequenas células clivadas foi o mais freqüente,

diagnosticado em 11 casos estudados, sendo cinco com imunofenótipo B (CD79a+/CD3-), o mesmo número de casos apresentando imunofenótipo T (CD3+/CD79a-), e um caso com imunomarcção positiva para B e para T (CD79a+/CD3+).

Entre os 53 casos de linfomas deste estudo, 30 (56,60%) casos se enquadraram no grau alto de malignidade pela **WF**, sendo que 12 (40%) apresentaram imunofenótipo B (CD79a+/CD3-), 13 casos (43,33%) imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e cinco casos (16,67%) apresentaram imunofenótipo T/B (CD79a+/CD3+).

Dentre os linfomas de grau alto, o mais freqüente foi o tipo imunoblástico, evidenciado em 27 casos, sendo 10 apresentando imunofenótipo B (CD79a+/CD3-), 13 com imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) e quatro com imunomarcção tanto para B como para T (CD79a+/CD3+) (figura 18).

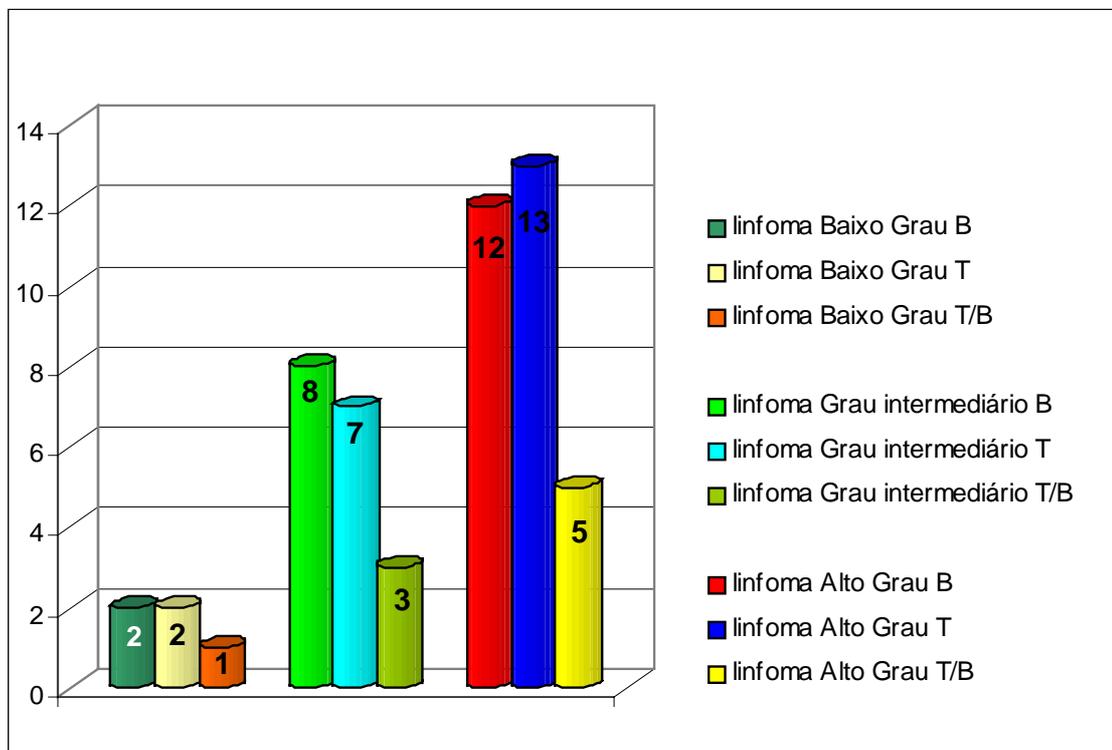


Figura 18 - Distribuição dos imunofenótipos e graus de malignidade dos 53 casos de linfoma de acordo com a classificação da WF

As classificações citoistológicas e seus respectivos imunofenótipos mediante o uso das classificações de Kiel e WF podem ser observados nos Anexos 05 e 06.

Dentre as subpopulações de linfócitos T observadas neste estudo, expressão positiva para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foi observada em 28 casos (52,83%). O imunofenótipo (CD4+CD8-) foi observado em 13 casos; houve expressão do imunofenótipo (CD8+CD4-) em 10 casos e em cinco casos, houve imunoexpressão dos dois imunofenótipos. Os dados encontram-se sumariados na tabela 16.

Tabela 16 - correlação citomorfológica e expressão dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 dos 53 linfomas caninos utilizando-se a classificação de Kiel

GRAU/TIPO DE TUMOR	N ^o casos	Número de casos de:		
		(CD4+CD8+)	(CD4+CD8-)	(CD8+CD4-)
GRAU BAIXO				
Células T pleomórfico	05	02	02	01
Centrocítico	04	01	00	00
Centrocítico-centroblástico	03	00	00	01
Linfocítico	03	00	01	00
Linfoplasmacítico	02	00	01	00
Linfoma de Zona T	02	00	00	02
GRAU ALTO				
Imunoblástico	26	03	08	06
centroblástico	04	00	00	00
Linfoblástico	03	00	01	00
Dif. grandes cél. anaplásico	01	00	00	00
TOTAL	53	05	13	10

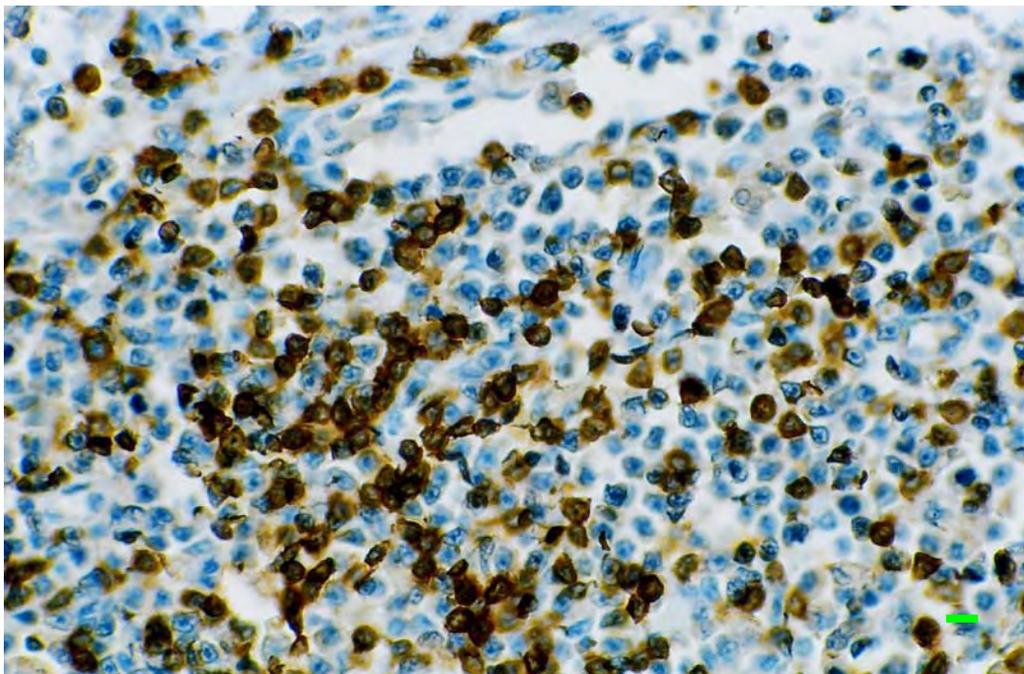


Figura 19 – Linfoma de células T pleomófico de grau baixo (Kiel e FF) apresentando intensa imunomarcção de membrana CD3+ (EnVision, cromógeno DAB, contracoloração pela hematoxilina de Harris. (Barra = 10 μ m).

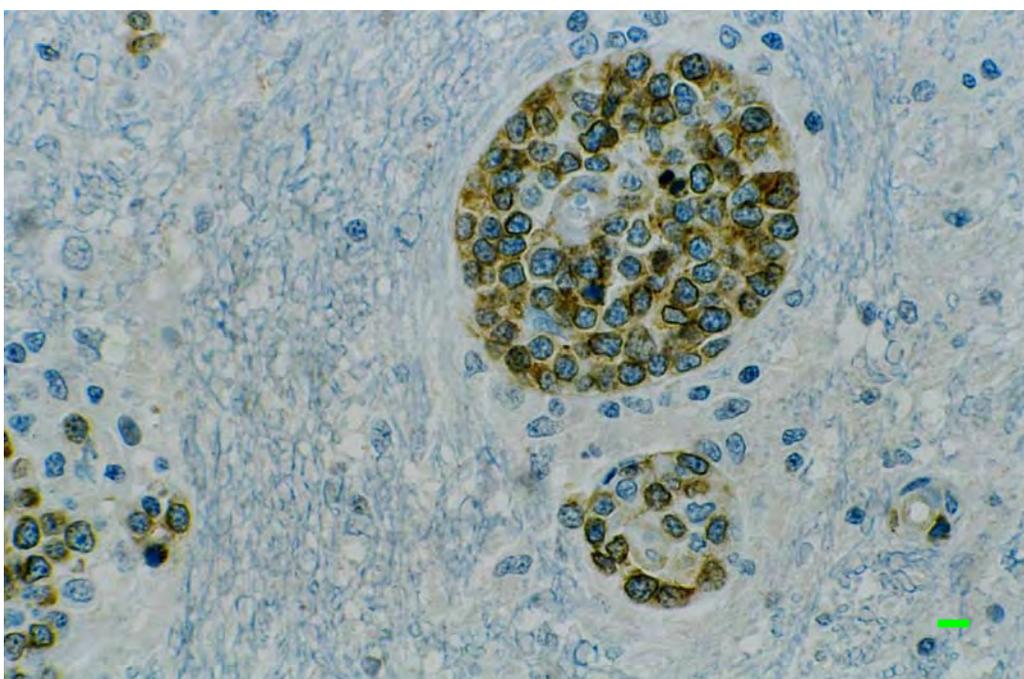


Figura 20 – Linfoma Linfoplasmacítico de grau baixo (Kiel e FF). Manguito perivascular no sistema nervoso central com imunomarcção de membrana CD79a+. (EnVision, cromógeno DAB, contracoloração pela hematoxilina de Harris. (Barra = 10 μ m).

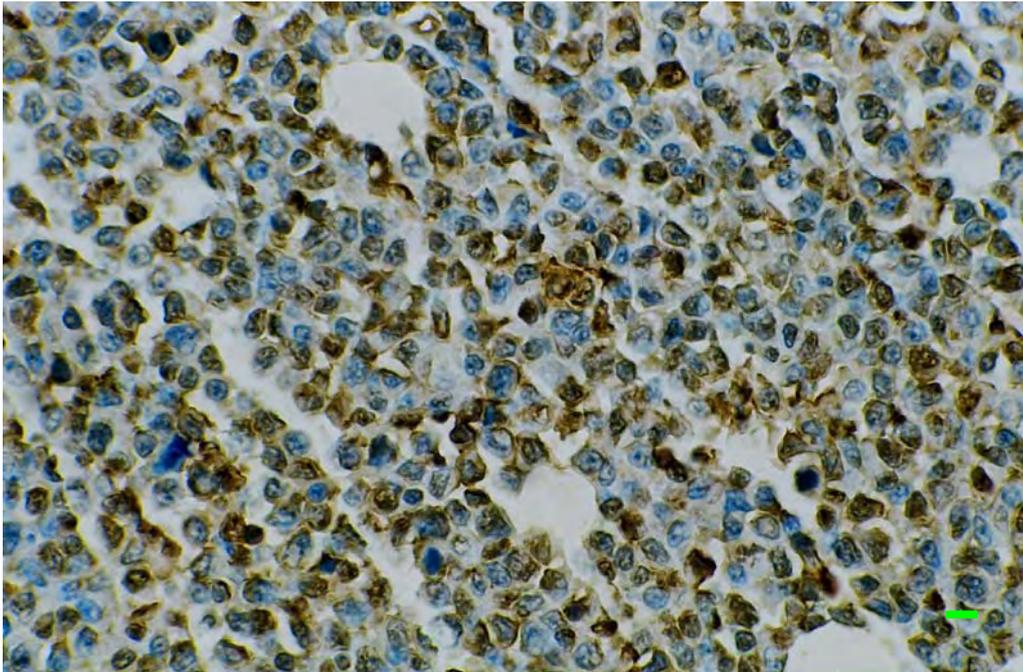


Figura 21 – Linfoma Imunoblástico de grau alto (Kiel e FF). Subpopulações de linfócitos T neoplásicos apresentando imunomarcagem de membrana CD4+ (CSA, cromógeno DAB, contracoloração pela hematoxilina de Harris. (Barra = 10 μ m).

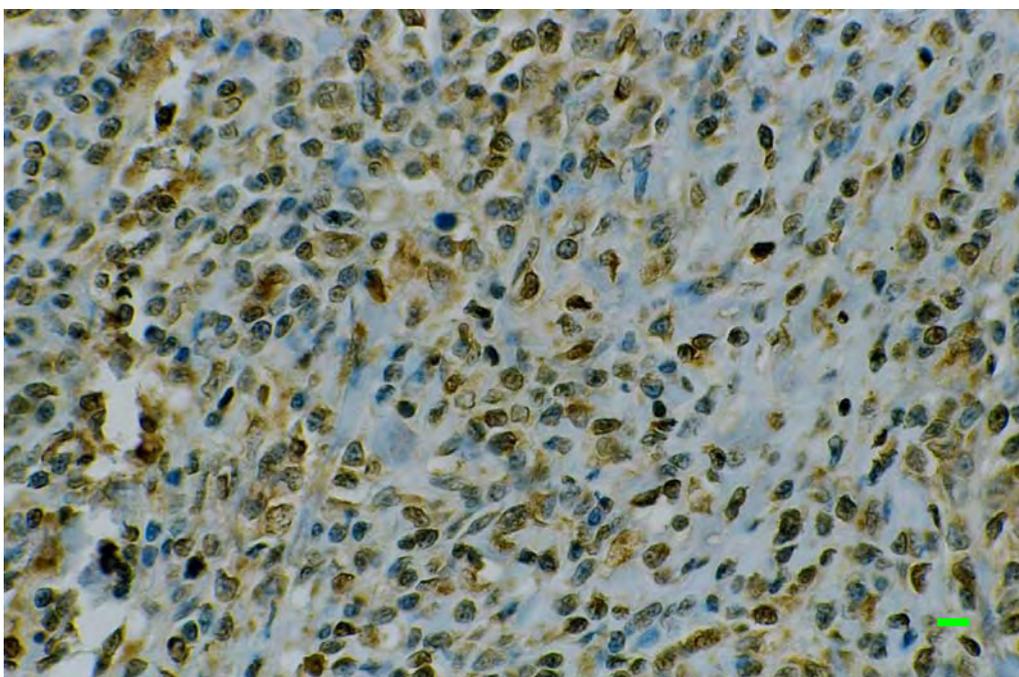


Figura 22 – Linfoma de Zona T de grau baixo (Kiel e FF). Subpopulações de linfócitos T neoplásicos apresentando imunomarcagem de membrana CD8+ (CSA, cromógeno DAB, contracoloração pela hematoxilina de Harris. (Barra = 10 μ m).

4.4. Avaliação Qualitativa e Quantitativa de AgNORs

Dos 53 casos de linfomas, as Regiões Organizadoras Nucleolares coradas pela técnica de PLOTON *et al.*, (1986) foram nitidamente analisados em 29 preparados citológicos. Os demais foram excluídos devido à baixa qualidade do esfregaço, inviabilizando a avaliação. A classificação e a definição dos graus de malignidade de cada caso foram realizadas posteriormente por meio da análise histopatológica.

De acordo com a classificação de Kiel e WF, dentre 29 casos de linfomas analisados pelo método de AgNor, 22 (75,86%) foram classificados como de grau alto e sete casos (24,14%) como de grau baixo. A maioria dos linfomas apresentou imunofenótipo T (CD3+/CD79a-).

De acordo com a classificação da WF, dos 29 casos analisados pelo método de AgNor, 18 (62,07%) foram de grau alto, oito (27,59%) foram enquadrados no grau intermediário e três casos (10,34%) foram classificados como de grau baixo. Diferentemente da classificação Kiel, o esquema da WF nos aponta maior número de linfomas apresentando imunofenótipo B (CD79a+/CD3-).

No presente estudo as AgNors apresentavam-se, na grande maioria, como pequenos pontos escuros dispersos pelo núcleo, correspondendo ao tipo II de padrão de distribuição descrito por CROCKER & EGAN (1988) e foram mais freqüentemente observadas nos linfomas tipo imunoblástico de grau alto (Figuras 23 e 24). Interessante observar que dentre os linfomas de grau alto pela classificação de Kiel, notou-se a supremacia do linfoma tipo imunoblástico. Algumas vezes se observava agregados marrons-escuros únicos (figura 24), as vezes correspondendo a área nucleolar e apresentando tamanho e forma variáveis. Diferente do outro tipo de distribuição de AgNors, esse não predominava especificamente em nenhum padrão citomorfológico de linfoma neste estudo. Os valores médios das medidas obtidas das células se encontram no Anexo 07.

Quando se fez a comparação entre as médias de AgNors por ponto ($\hat{A}pNor$) e área média dos núcleos ($\hat{A}Nu$), observou correlação direta e positiva entre esses dois parâmetros ($r^2= 0,444$ e $P= 0,0158$). Outra correlação positiva foi observada quando se comparou ($\hat{A}pNor$) com o número de AgNors por núcleo ($r^2= 0,885$ e $P<0,005$).

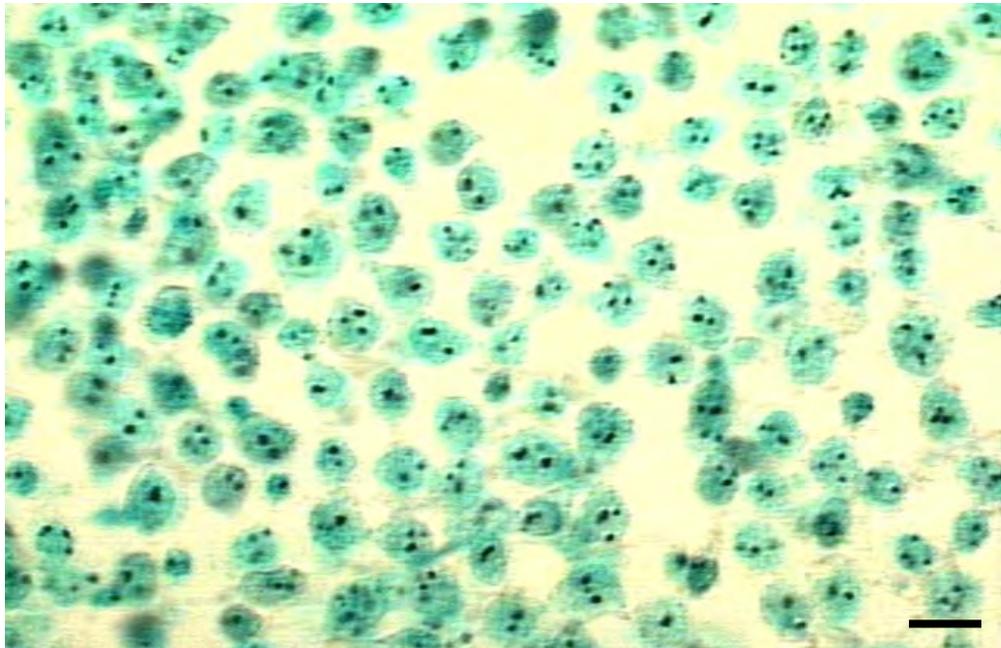


Figura 23 – Linfoma Imunoblástico de grau alto (Kiel e FF). Múltiplos AgNors (padrão de distribuição tipo II) espalhados nos núcleos das células neoplásicas. Contracoloração por metil-green. (Barra = 10 μ m).

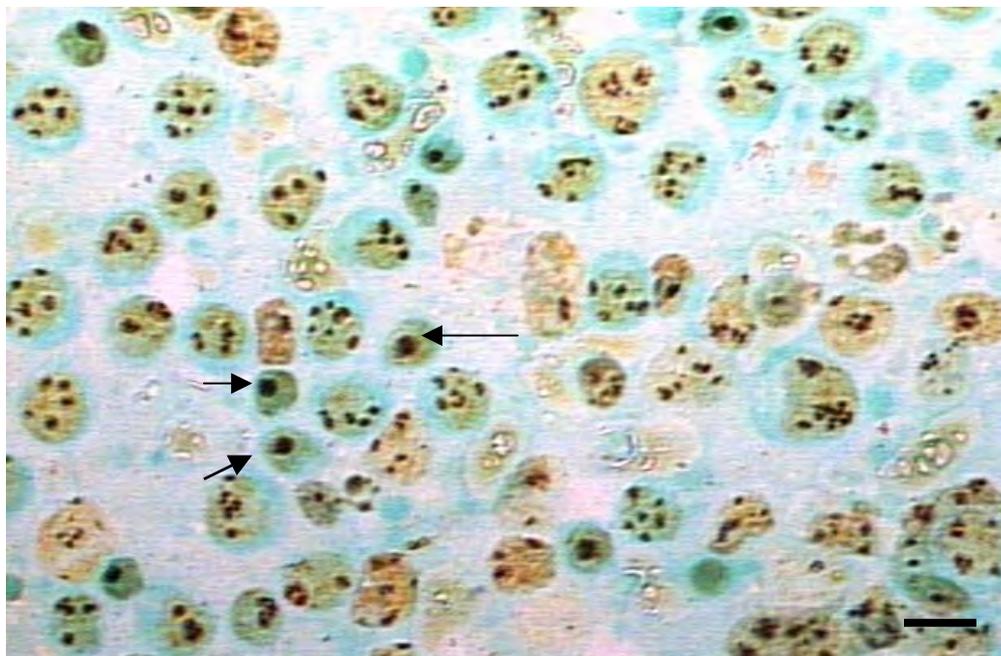


Figura 24 Linfoma Imunoblástico de grau alto (Kiel e FF). Múltiplos AgNors (padrão de distribuição tipo II) espalhados nos núcleos das células neoplásicas. Pode-se observar células com único e grande AgNor (setas). Contracoloração por metil-green. (Barra = 10 μ m).

Quando se comparou a área média do núcleo ($\hat{A}nu$) com o a área de AgNor por núcleo ($\hat{A}norNu$), obteve-se correlação significativa ($r^2 = 0,457$ e $P < 0,005$).

4.5.1. Área média por ponto de AgNors

A área média de cada ponto de AgNors foi calculada a partir dos dados gerados pela medição destes usando-se o sistema de análise de imagens KS300. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa, as médias e/ou medianas dos parâmetros apresentaram valores maiores para os linfomas de grau alto em relação aos de grau baixo, levando-se em consideração os tipos citológicos da classificação de Kiel. Estes resultados apresentam mesmo comportamento quando levou-se em consideração a classificação da WF. Nesta, as médias e medianas obtidas foram maiores para os linfomas de grau alto seguidos pelos de grau intermediário, sendo as menores médias atribuídas aos de grau baixo. Exceção foi observada nos linfomas de grau baixo, cuja média foi maior que o do grau intermediário (figuras 25 e 26)

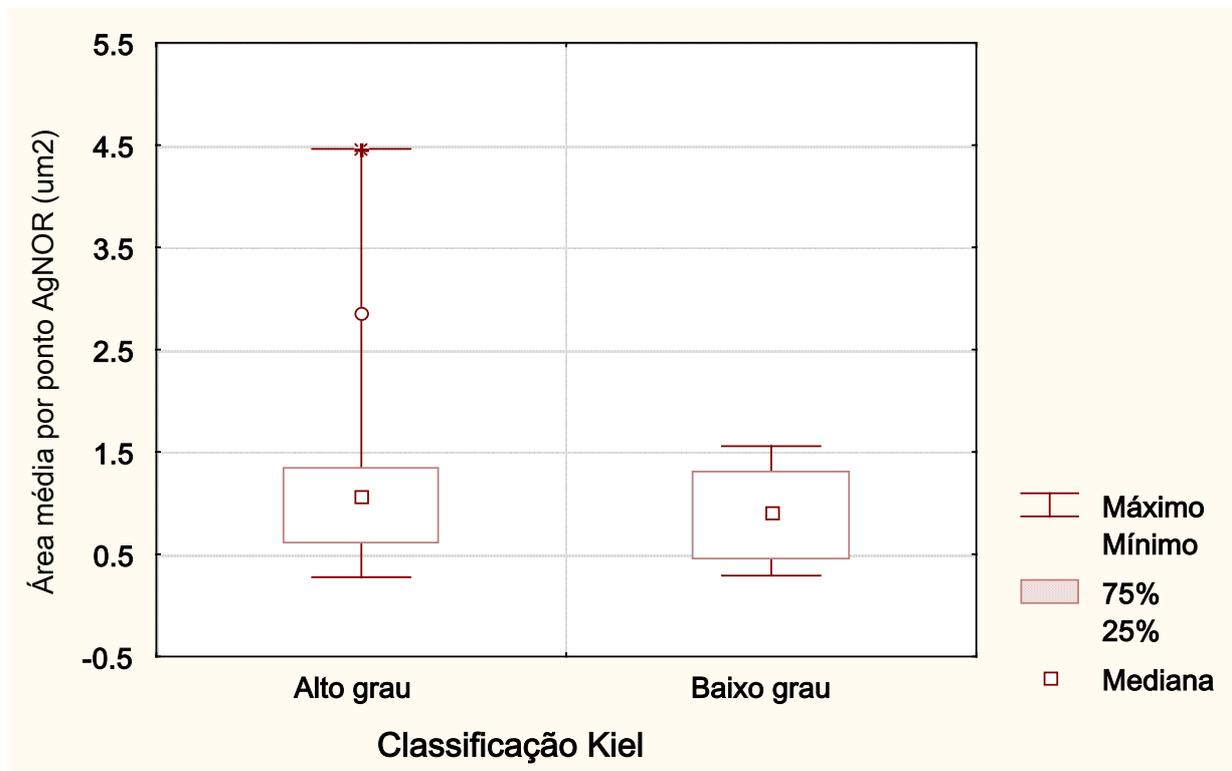


Figura 25 - Área média por ponto de AgNor (μm^2) observada nos exames citológicos dos 29 cães portadores de linfoma, de acordo com a classificação de Kiel e FF

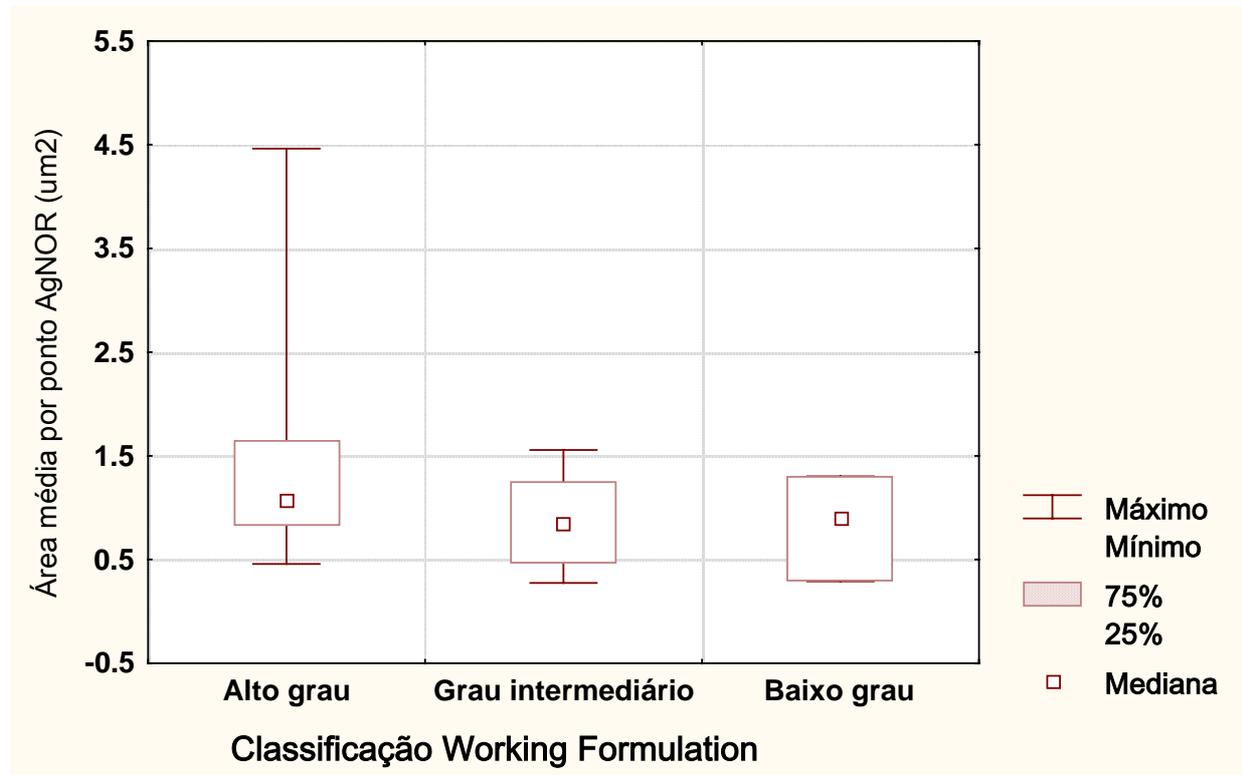


Figura 26 - Área média por ponto de AgNor (μm^2) observada nos exames citológicos dos 29 cães portadores de linfoma, de acordo com a classificação da WF

4.5.2. Área média de AgNors nuclear

Foram calculadas as áreas médias de AgNors nuclear. As medidas das áreas de AgNors nucleolares foram excluídas do estudo porque não foi possível determinar com clareza a área correspondente a essa organela na maioria das amostras estudadas. Não foi encontrada diferença estatística entre os valores médios das áreas de AgNors e graus de malignidade dos tumores nas diferentes classificações do utilizadas (figuras 27 e 28).

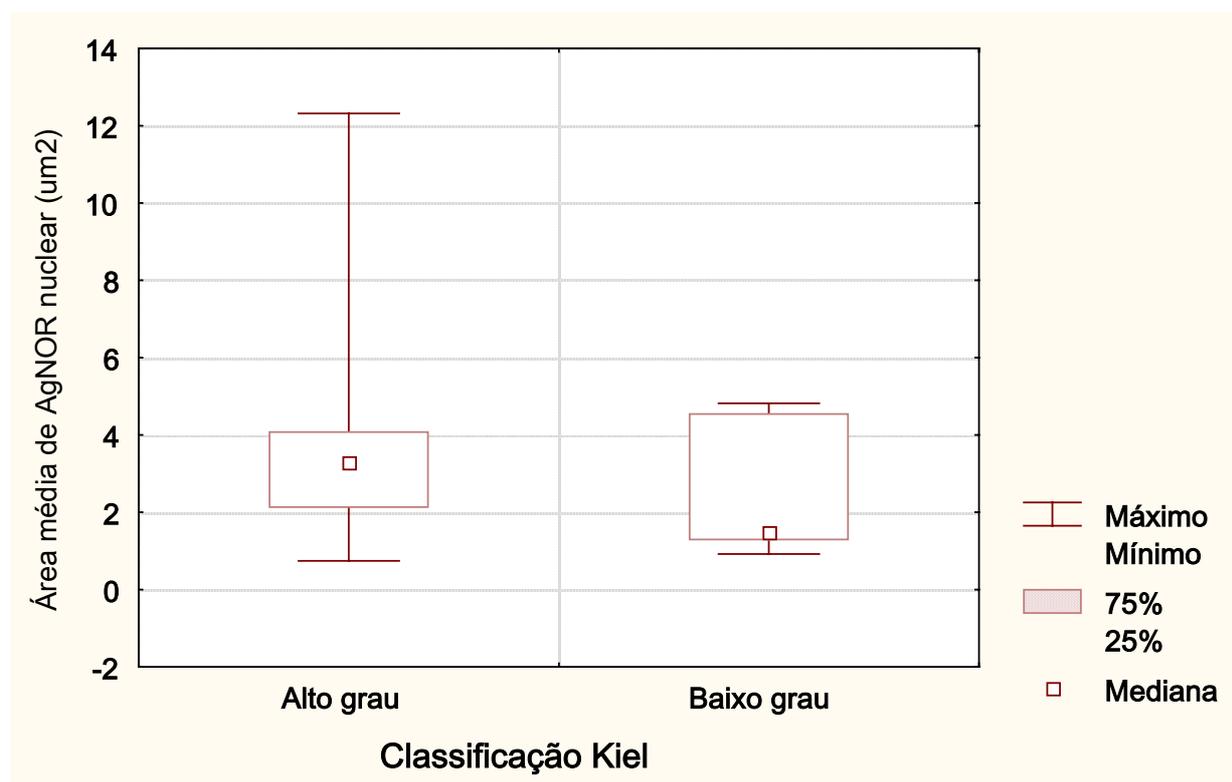


Figura 27 – Área média de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação de Kiel e FF

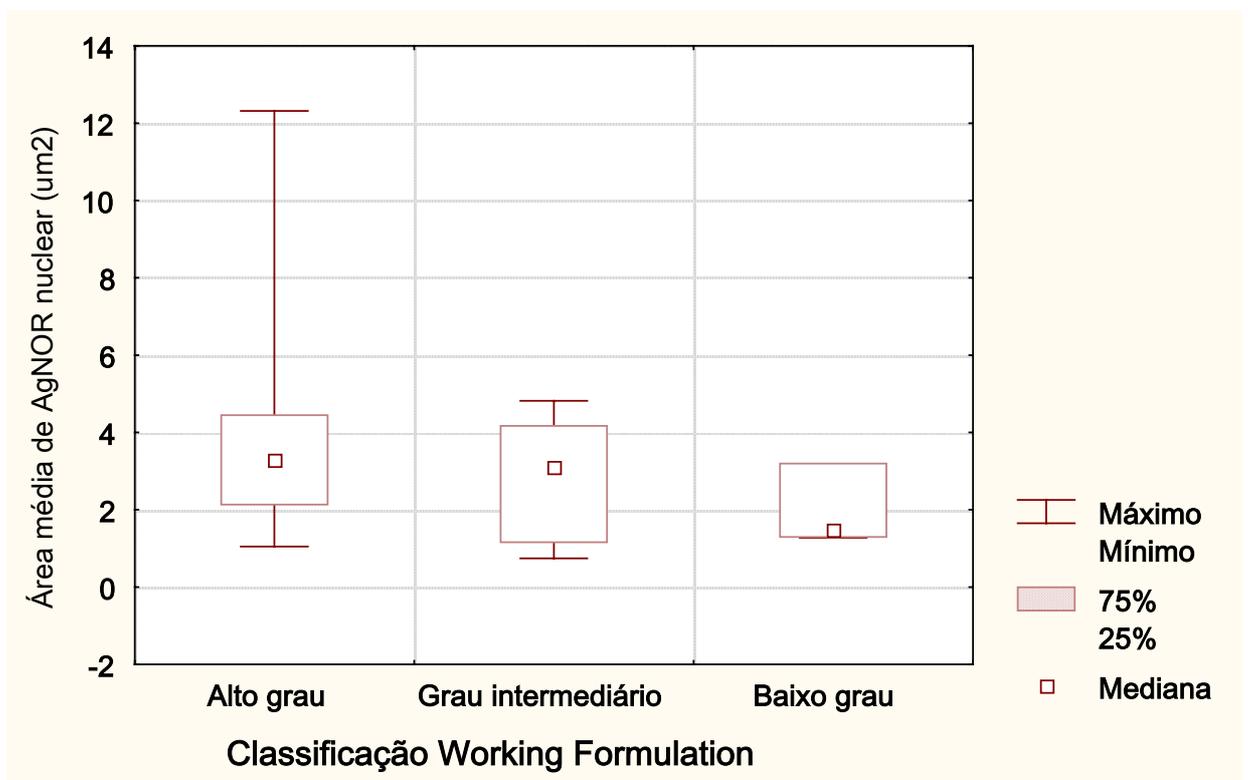


Figura 28 – Área média de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação da WF

4.5.3 Área média relativa de AgNors nuclear

As áreas médias relativas de AgNors nucleares foram obtidas e comparadas entre com os graus de malignidade da neoplasia em cada classificação utilizada. Não foi encontrada diferença estatística entre os valores obtidos (figuras 29 e 30).

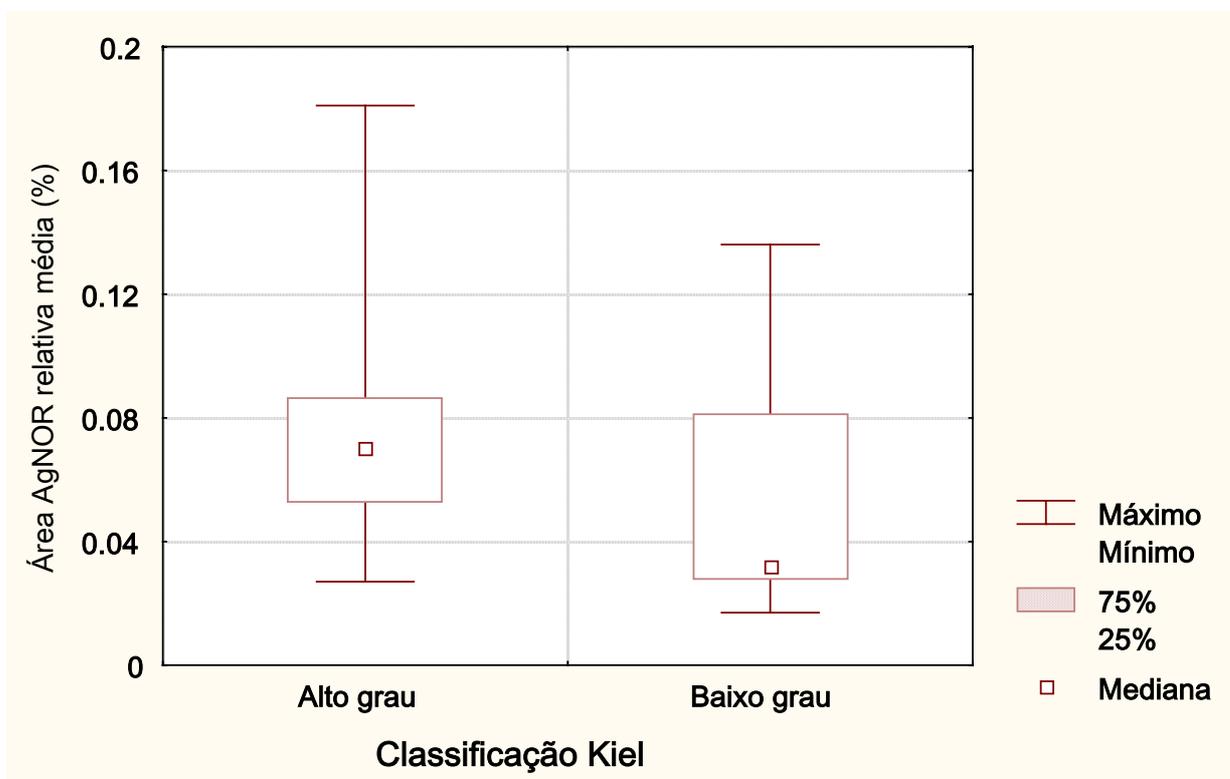


Figura 29 – Área média relativa de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação Kiel e FF

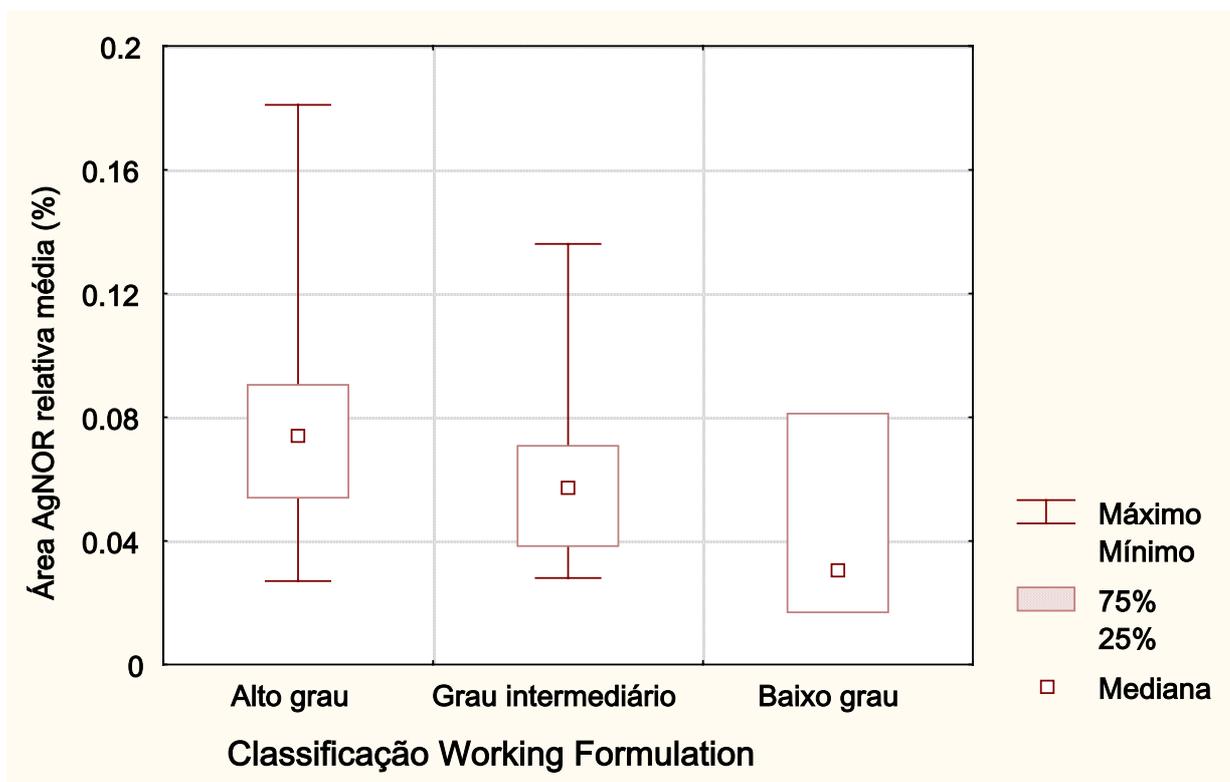


Figura 30 – Área média relativa de AgNors nuclear (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação da WF

4.5.4. Área média do núcleo

Os valores médios das áreas do núcleo das células tumorais foram calculados para melhor caracterização entre os diferentes graus de malignidade da neoplasia e seus valores encontram-se expressos nas figuras 31 e 32.

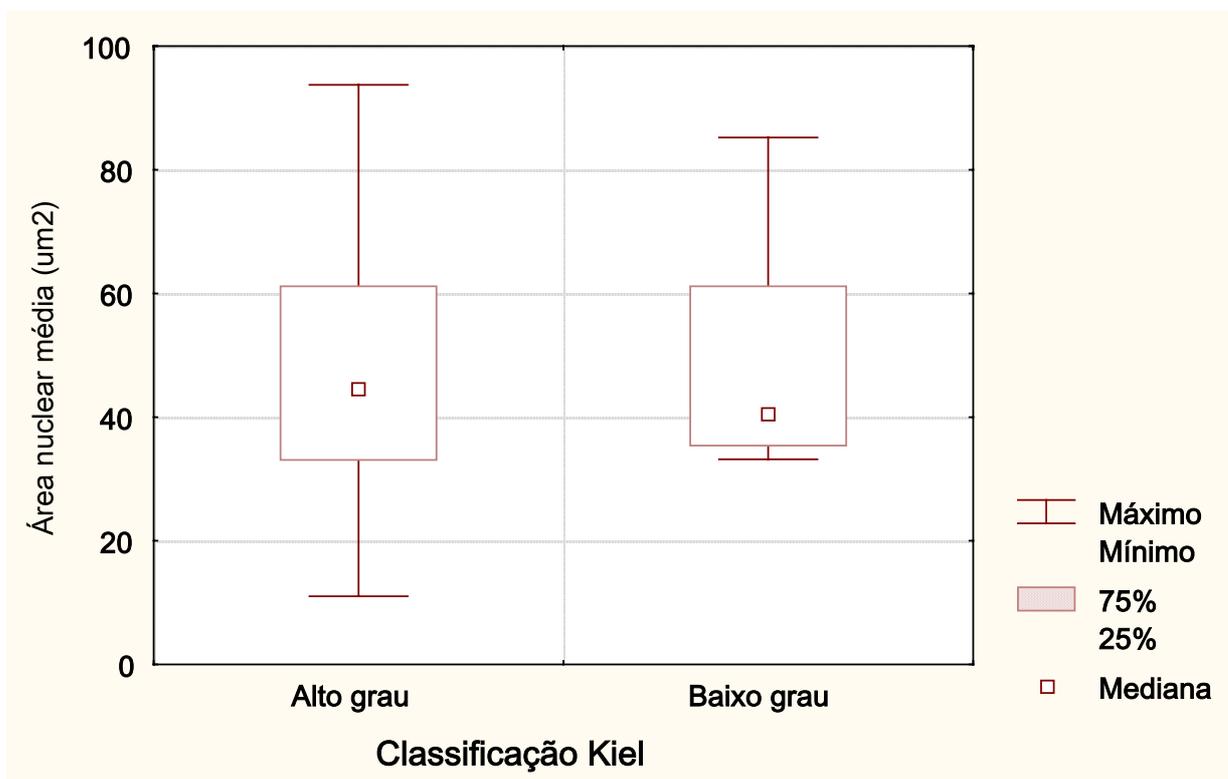


Figura 31 – Área média do núcleo (μm^2) avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação Kiel e FF

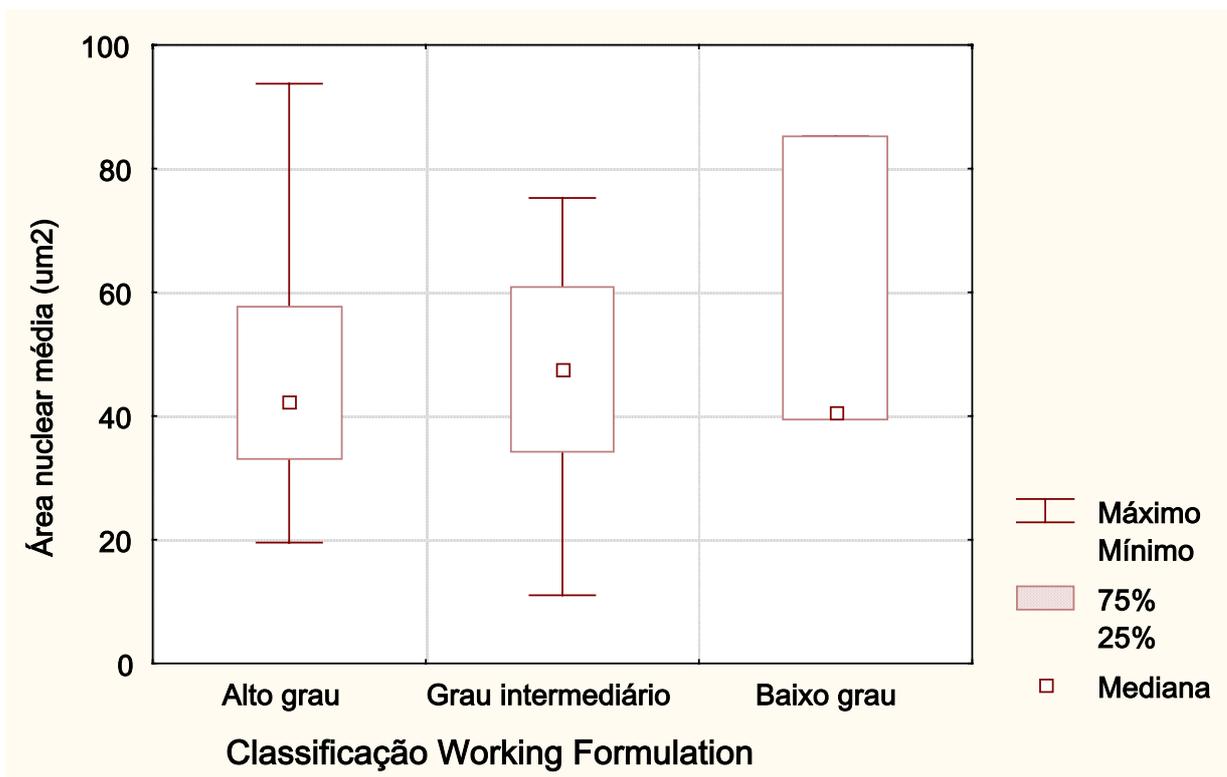


Figura 32 - Área média do núcleo (μm^2) avaliado no exame citológico dos 29 cães com linfoma de acordo com a classificação da WF na coloração pelo AgNor

4.5.5. Média número de pontos de AgNors por célula

Determinou-se o número de pontos de AgNor em cada núcleo de célula com objetivo de se comparar os valores médios do número de AgNors entre os diferentes graus de malignidade com as classificações utilizadas (figuras 33 e 34).

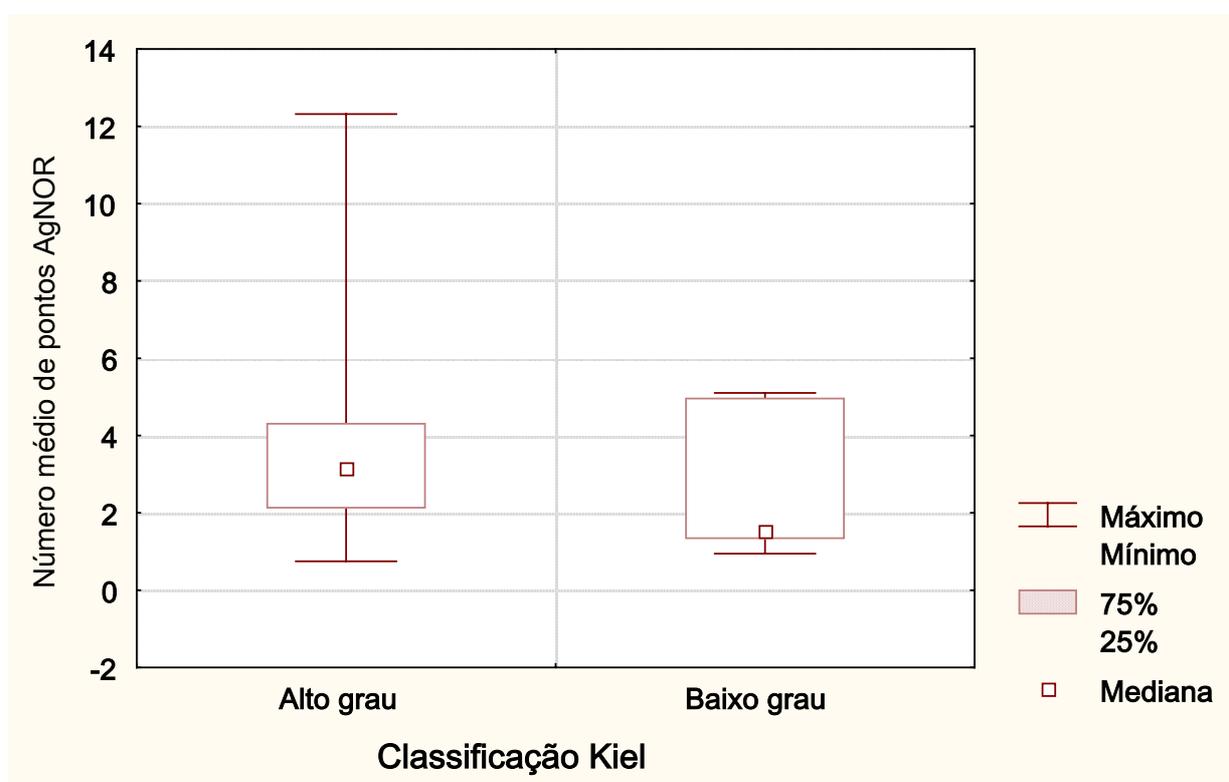


Figura 33 – Área média do número de pontos de AgNor por célula avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação Kiel e FF

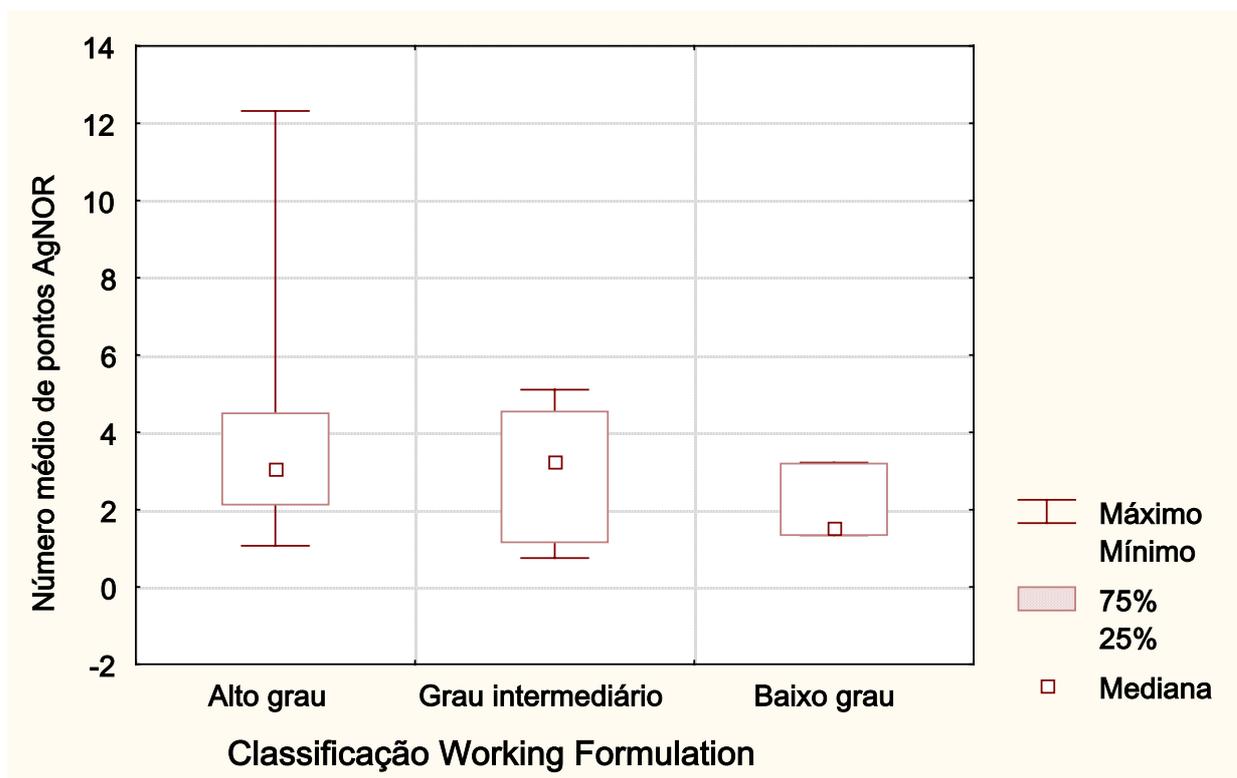


Figura 34 – Área média do número de pontos de AgNor por célula avaliado no exame citológico de cães com linfoma de acordo com a classificação da WF

4.5. Estudo Morfométrico

Avaliação morfométrica foi realizada nos preparados citológicos obtidos pela PAAF e corados pelo método de May Grünwald Giemsa (MGG). Dos 53 casos de linfomas estudados, o estudo morfométrico foi realizado em 40. Os demais foram descartados devido a baixa qualidade do material presente nos esfregaços. A definição dos graus de malignidade de cada caso foi realizada posteriormente pela histopatologia.

Foram medidas cem células tumorais por caso selecionadas aleatoriamente e aferidos: tamanho e diâmetro do núcleo e índice de circunferência nuclear; tamanho e diâmetro do citoplasma e índice de circunferência do citoplasma e relação núcleo/citoplasma. Os dados obtidos foram analisados em microscópio de luz adaptado ao analisador de imagens KS300², sob objetiva de 100x.

Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa, as médias dos parâmetros apresentaram valores maiores para os linfomas de grau alto em relação aos de grau baixo, levando-se em consideração os tipos citológicos da classificação de Kiel e FF. Estes resultados apresentam mesmo comportamento

quando levou-se em consideração a classificação da WF. Nesta, as médias obtidas foram maiores para os linfomas de grau alto seguidos pelos de grau intermediário, sendo as menores médias atribuídas aos de grau baixo. As médias de cada caso encontram-se no Anexo 03 e expressos nas figuras 35 a 40.

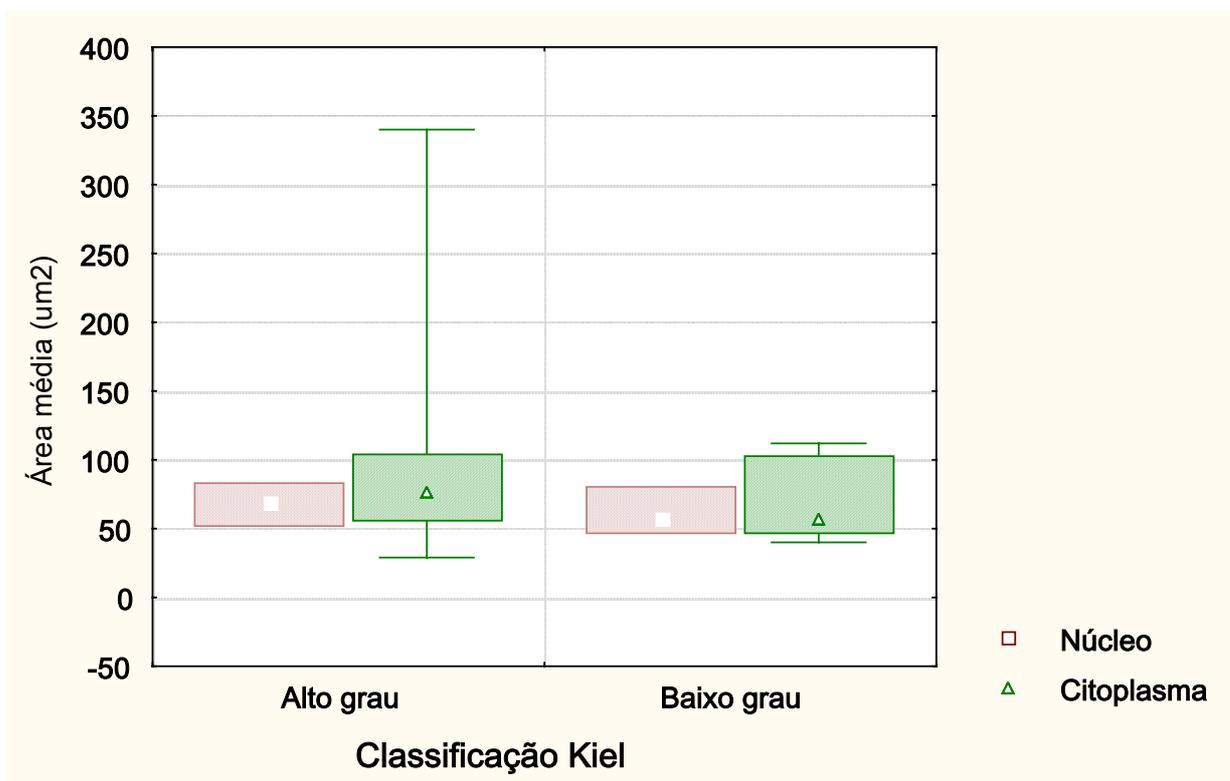


Figura 35 – Área média do núcleo e citoplasma (μm^2) das células neoplásicas de acordo com a classificação de Kiel e FF

² Analisador de imagem KS300.

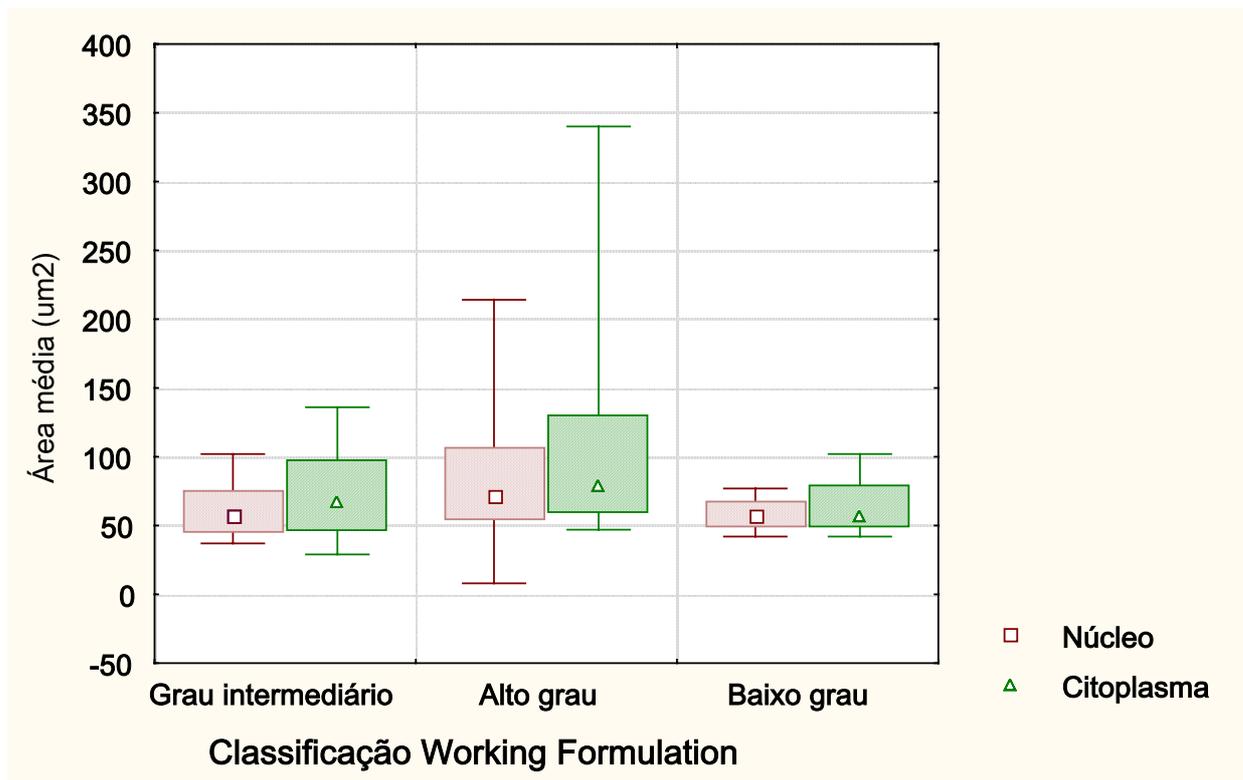


Figura 36 – Área média do núcleo e citoplasma (µm²) das células neoplásicas de acordo com a classificação da WF

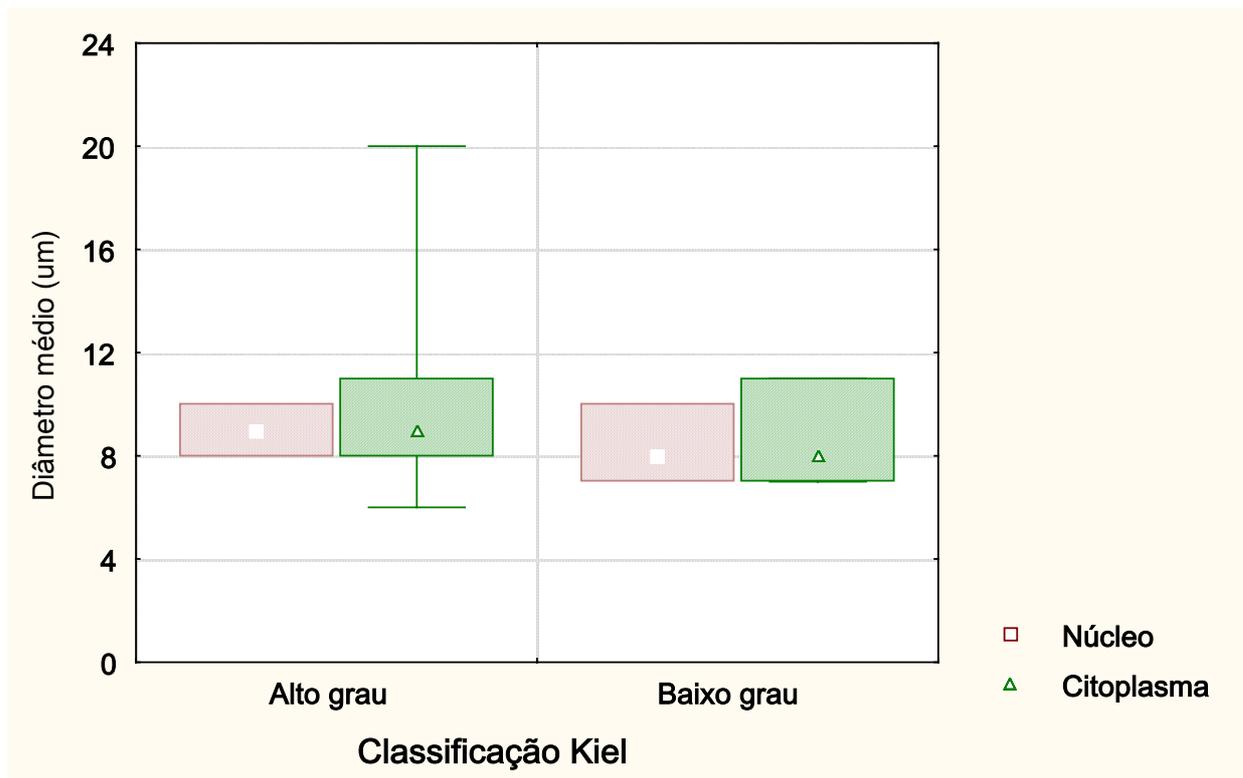


Figura 37 – Média do diâmetro nuclear e citoplasmático das células neoplásicas de acordo com a classificação de Kiel e FF

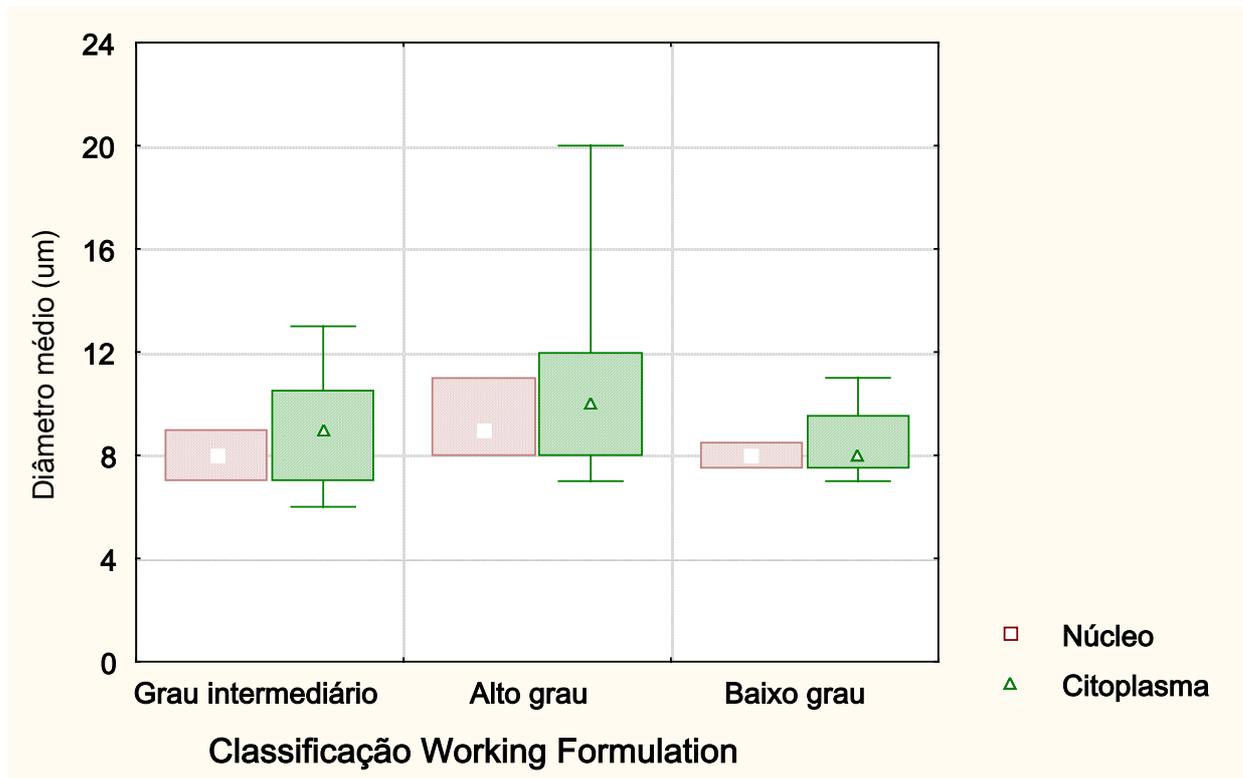


Figura 38– Média do diâmetro nuclear e citoplasmático das células neoplásicas de acordo com a classificação da WF

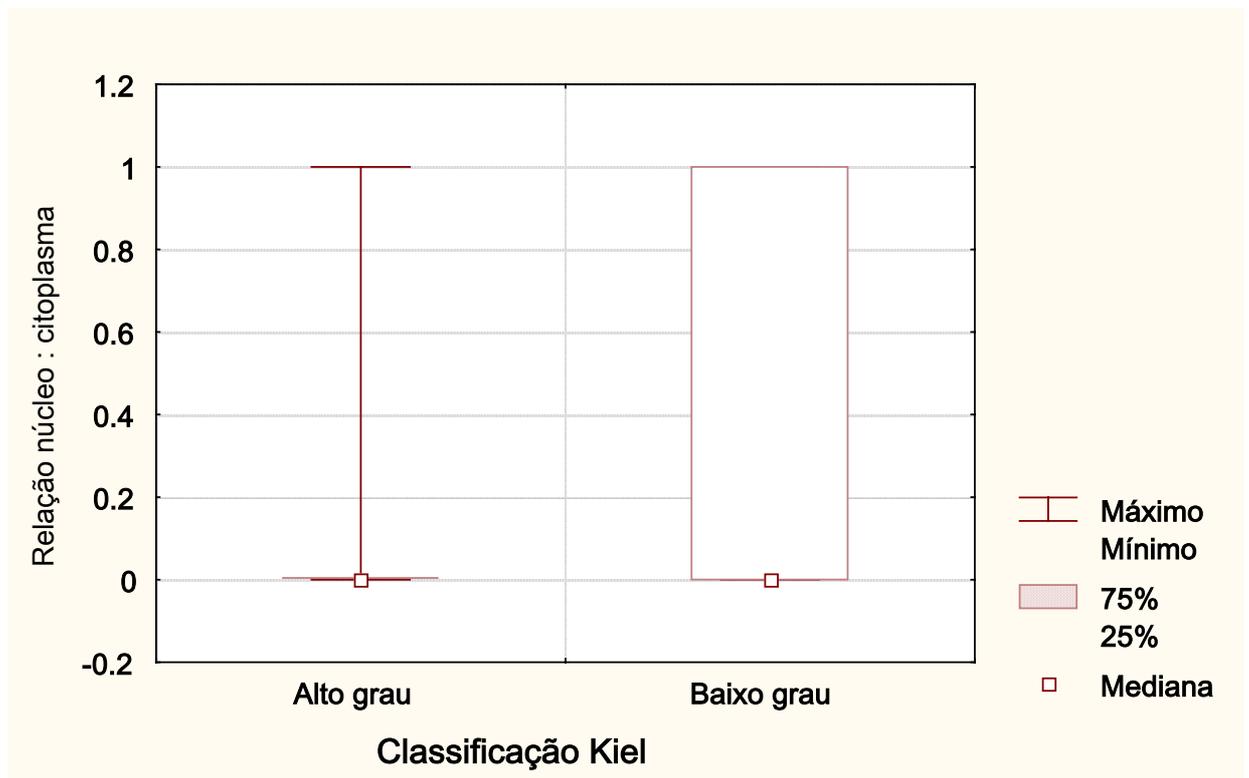


Figura 39 – Relação núcleo:citoplasma das células neoplásicas de acordo com a classificação de Kiel e FF

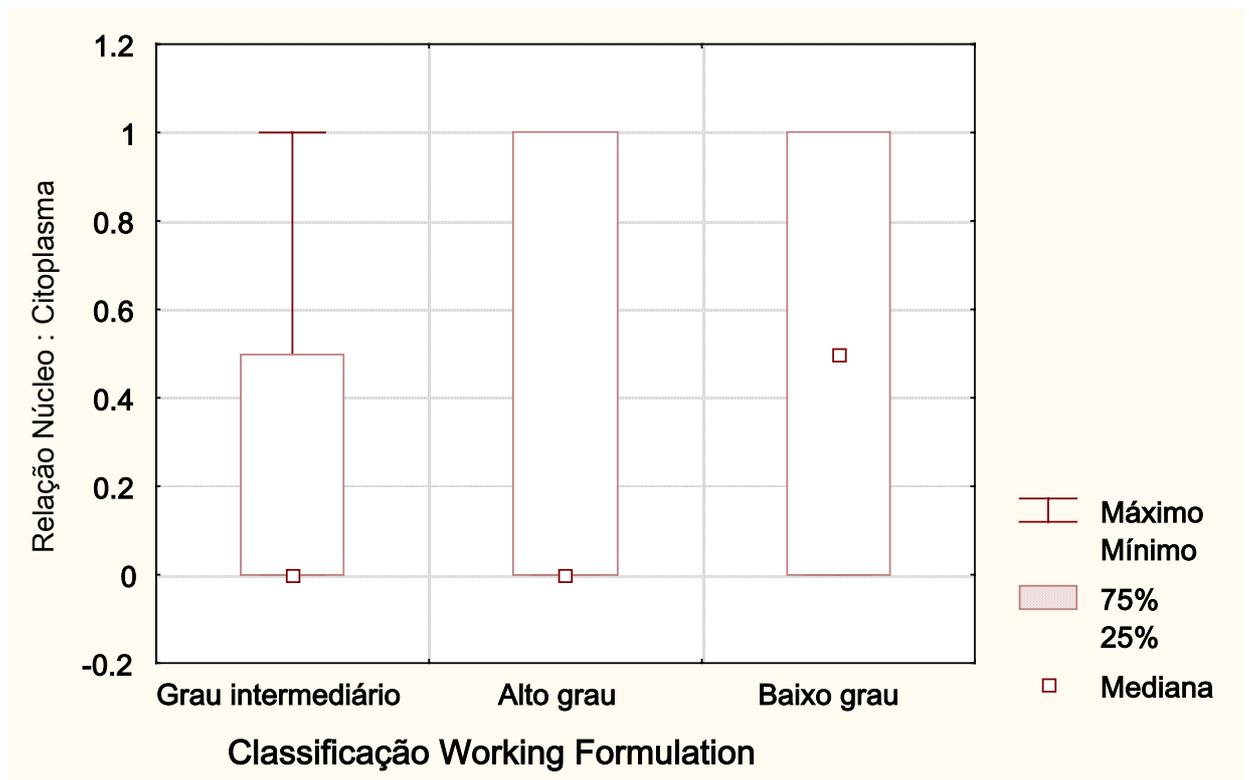


Figura 40 – Relação núcleo:citoplasma das células neoplásicas de acordo com a classificação da WF

4.7. Teste do Cometa para avaliar os danos no DNA das células de linfoma dos cães

De 29 cães utilizados para o teste do cometa foram conseguidas 44 amostras. Deste número, conseguiu-se pareamento das amostras de sangue e de células do tumor em 15 cães, perfazendo total de 30 amostras. As demais, nove provenientes do tumor e cinco do sangue foram também analisadas e seus resultados incorporados ao número de amostras. A discriminação de todos os dados e os valores obtidos para o teste do cometa encontram-se no Anexo 08.

Toda análise e avaliação dos dados do teste do cometa foram realizadas as cegas. O tipo morfológico de cada tumor só foi definido posteriormente por meio do exame citológico corado pela técnica de Giemsa e classificados de acordo com os esquemas de Kiel e WF.

As figuras 41 e 42 apresentam sumariados os tipos e totais das amostras utilizados para o estudo do cometa, após avaliação citológica dos tumores utilizando-se os esquemas de Kiel e da WF.

Figura 41 – Distribuição das amostras de sangue e de massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com Kiel e FF

	<i>GRAU BAIXO</i>	<i>GRAU ALTO</i>	<i>TOTAL</i>
N ^o amostras de sangue	06	14	20
N ^o amostras de tumor	05	19	24

Figura 42 – Distribuição das amostras de sangue e da massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com WF.

	<i>GRAU BAIXO</i>	<i>GRAU INTERMEDIÁRIO</i>	<i>GRAU ALTO</i>	<i>TOTAL</i>
N ^o amostras de sangue	00	09	11	20
N ^o amostras de tumor	01	07	16	24

O teste do cometa é uma técnica sensível para detectar danos no DNA em células individualizadas. As células são submetidas ao processo de eletroforese com objetivo de “arrastar” o DNA da célula em direção ao ânodo, graças a sua carga negativa. Desse modo, o DNA danificado migra para longe do nucleóide. Após coloração com corante fluorescente específico para o DNA, o que se observa é a

formação de uma figura semelhante a um “cometa”, o que levou OLIVE (1989) a sugerir o nome “comet assay”.

Para interpretação desses resultados, o “cometa” é dividido em cabeça e cauda. Assim, células sem nenhum ou que apresentam pouco dano no DNA não exibem cauda e permanecem semelhantes aos nucleóios; células com danos expressivos no DNA apresentam caudas maiores. A avaliação desses efeitos nas células foram mensurados através de sistemas de análise de imagens automatizados.

O parâmetro de avaliação utilizado em nosso trabalho foi o “tail moment” que corresponde a quantidade de DNA danificado nas células neoplásicas. Ao observarmos os resultados provenientes tanto dos casos de sangue e massa tumoral pareados como da análise do sangue e do tumor individuais, não apresentaram diferenças estatísticas ao comparar os graus de malignidade com maior dano no DNA ou maior cauda de cometa.

Quando comparamos os resultados do total das amostras de sangue dos animais portadores de linfoma pela classificação de Kiel, 14 casos (70%) apresentam graus de malignidade alto e seis casos (30%) de grau baixo. Quando se aplica o esquema da WF, 11 casos

(55%) são de grau alto e nove casos (45%) são de grau intermediário.

Quando comparamos os resultados do total das amostras de massa tumoral dos animais portadores de linfoma pela classificação de Kiel, 19 casos (79,17%) apresentam graus alto e cinco casos (20,83%) grau baixo de malignidade. Quando se aplica o esquema da WF, 16 casos (66,67%) são de grau alto, sete casos (29,17%) são de grau intermediário e apenas um (4,16%) de grau baixo. Maiores detalhes podem ser observados na figura 43.

Figura 43 Distribuição das amostras de sangue e da massa tumoral proveniente dos cães portadores de linfoma e utilizadas no teste do cometa, classificados de acordo com os esquemas de Kiel e WF.

Total de Amostras e (%) no:		
	Sangue	Massa
KIEL		
Grau Alto	14 (70%)	19 (79,17%)
Grau Baixo	06 (30%)	05 (20,83%)
WF		
Grau Alto	11 (55%)	16 (66,67%)
Grau Intermediário	09 (45%)	07 (29,17%)
Grau Baixo	00	01 (4,16%)

Os resultados podem ser melhor visualizados observando-se as figuras 44 a 49.

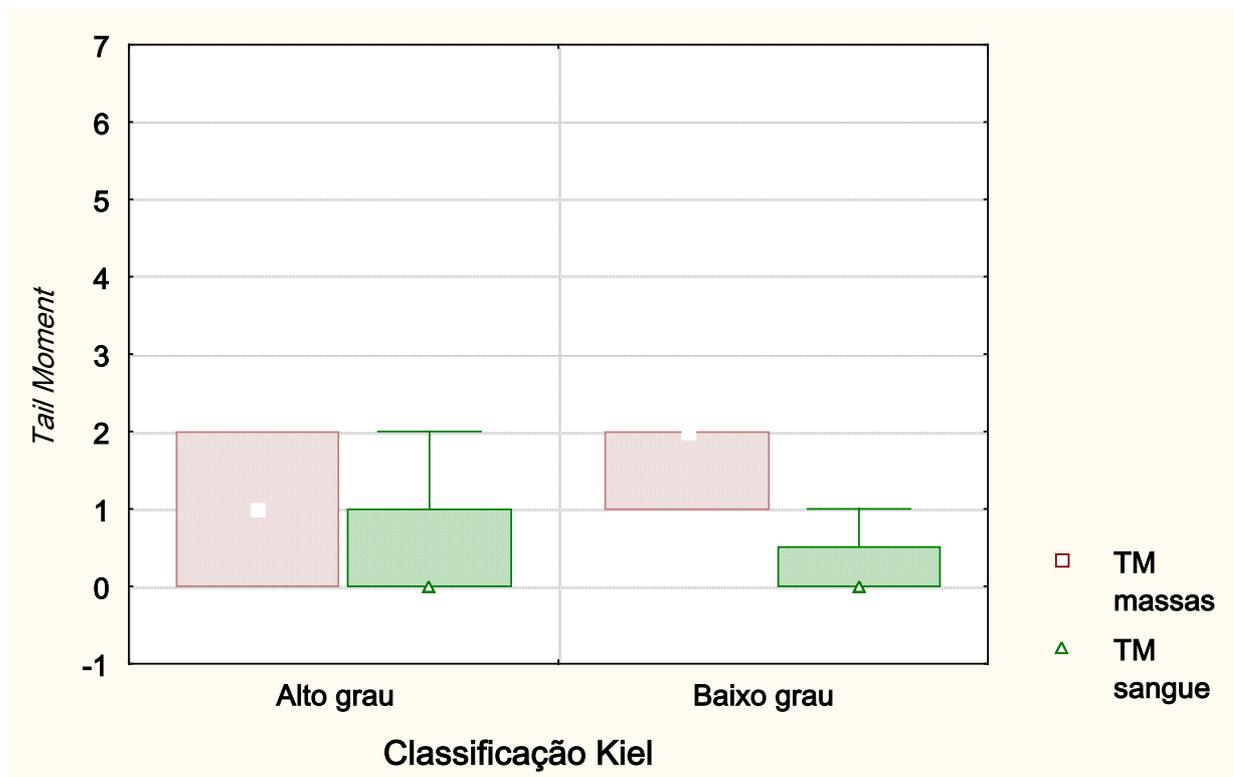


Figura 44 – Avaliação de dano no DNA ou *Tail moment* (TM) das amostras de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com Kiel e FF

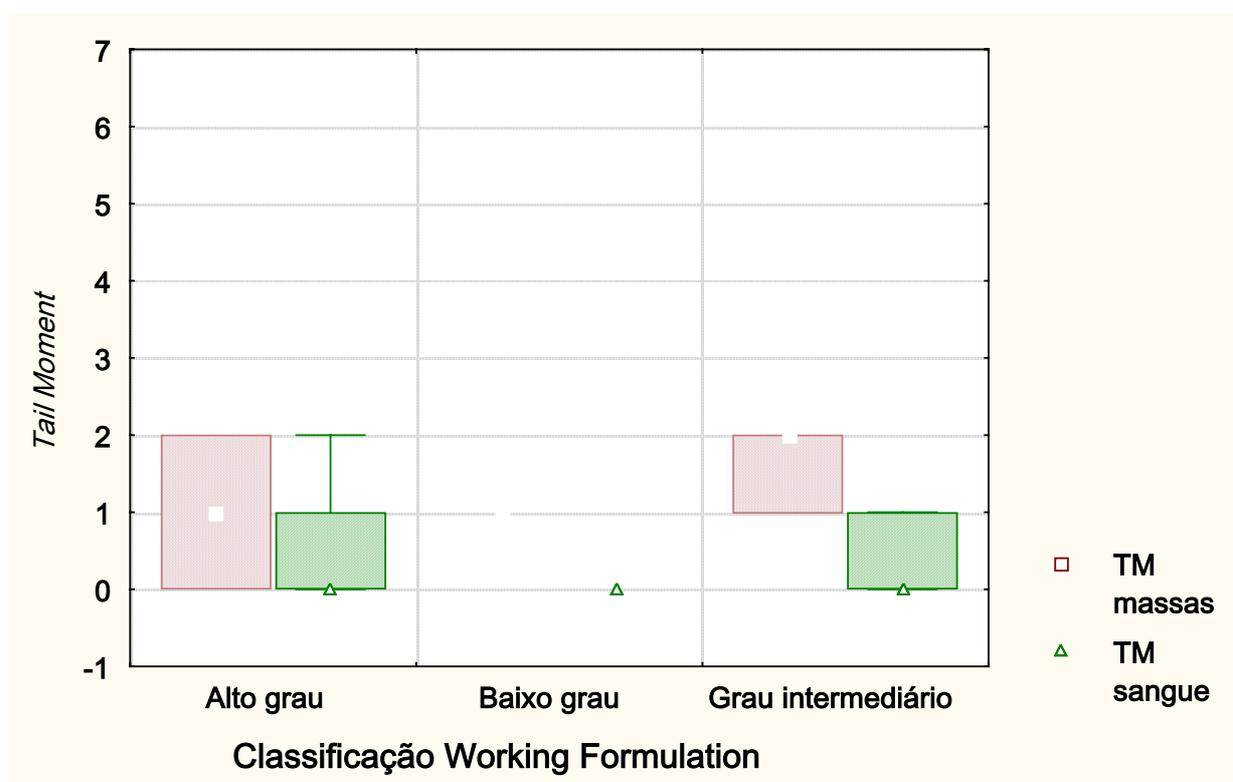


Figura 45 – Avaliação de dano no DNA ou *Tail moment* (TM) das amostras de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o teste do cometa classificados de acordo da WF

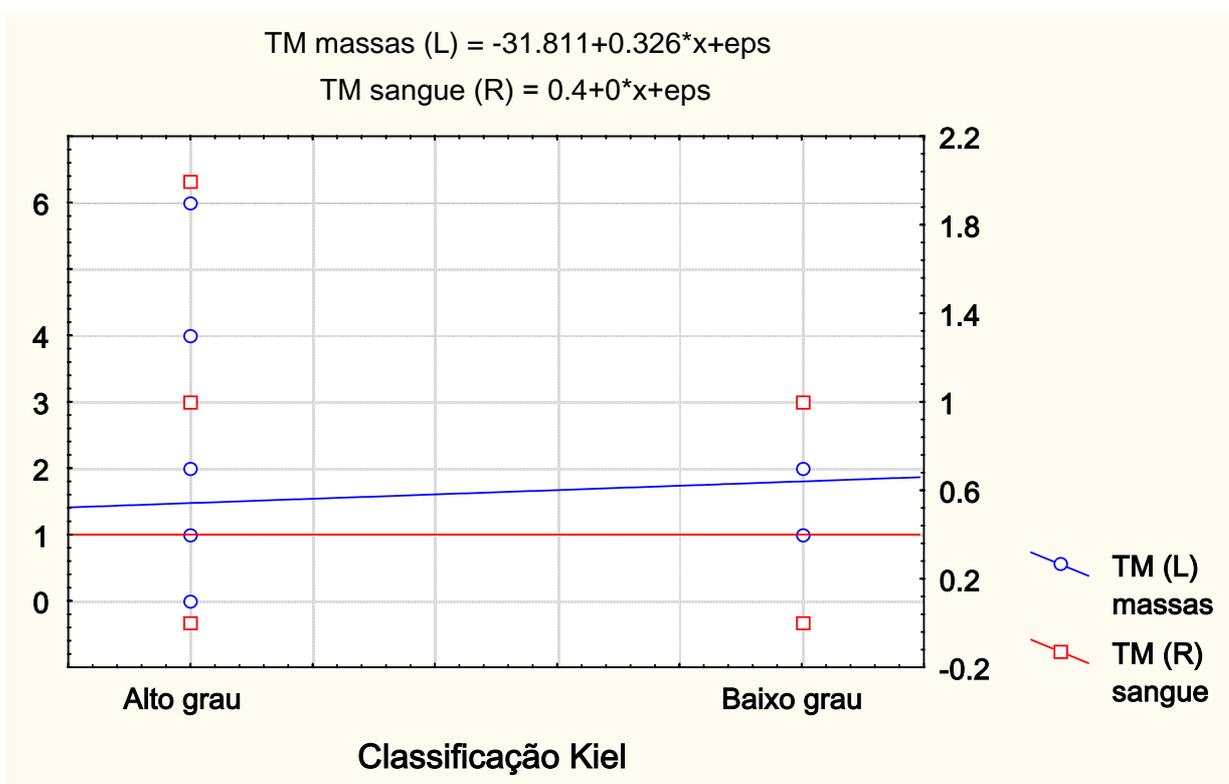


Figura 46 – Avaliação de dano no DNA ou *Tail moment* (TM) das amostras pareadas de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com Kiel e FF

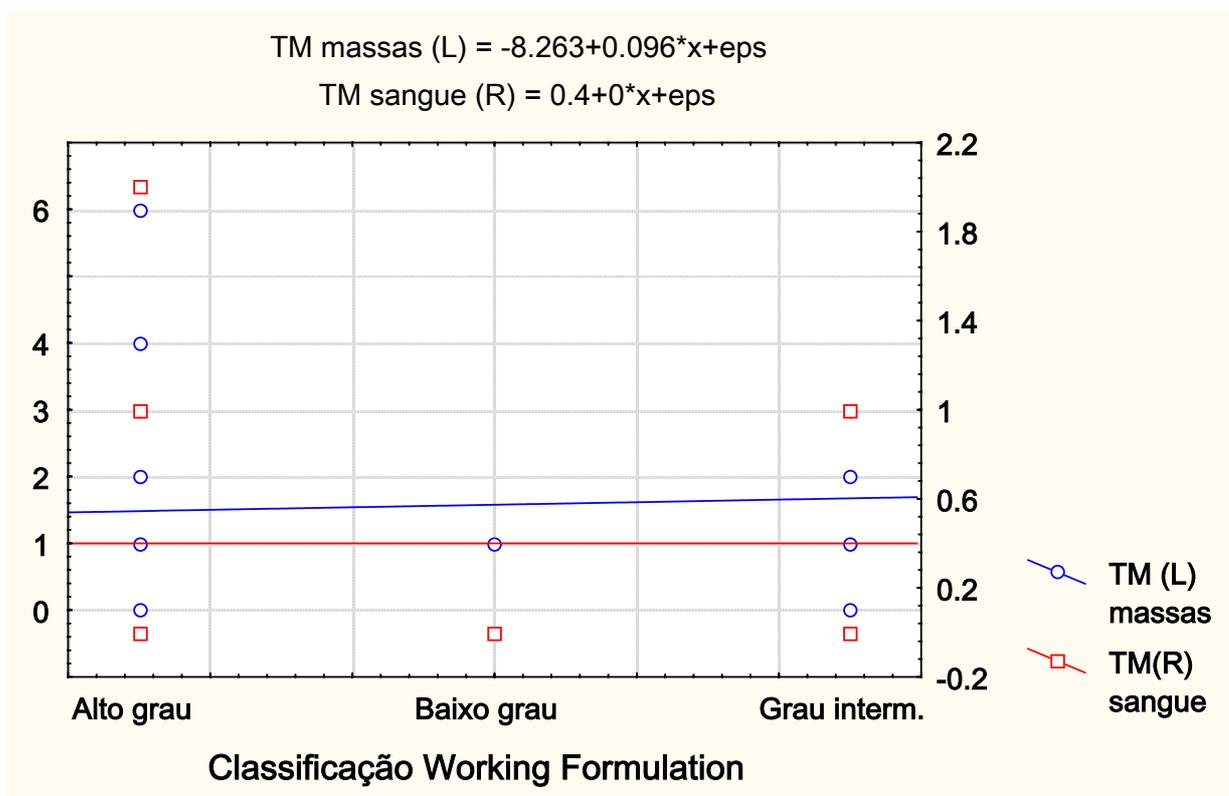


Figura 47 – Avaliação de dano no DNA ou *Tail moment* (TM) das amostras pareadas de sangue e massa tumoral dos linfomas dos cães utilizadas para realizar o estudo do teste do cometa classificados de acordo com a classificação da WF

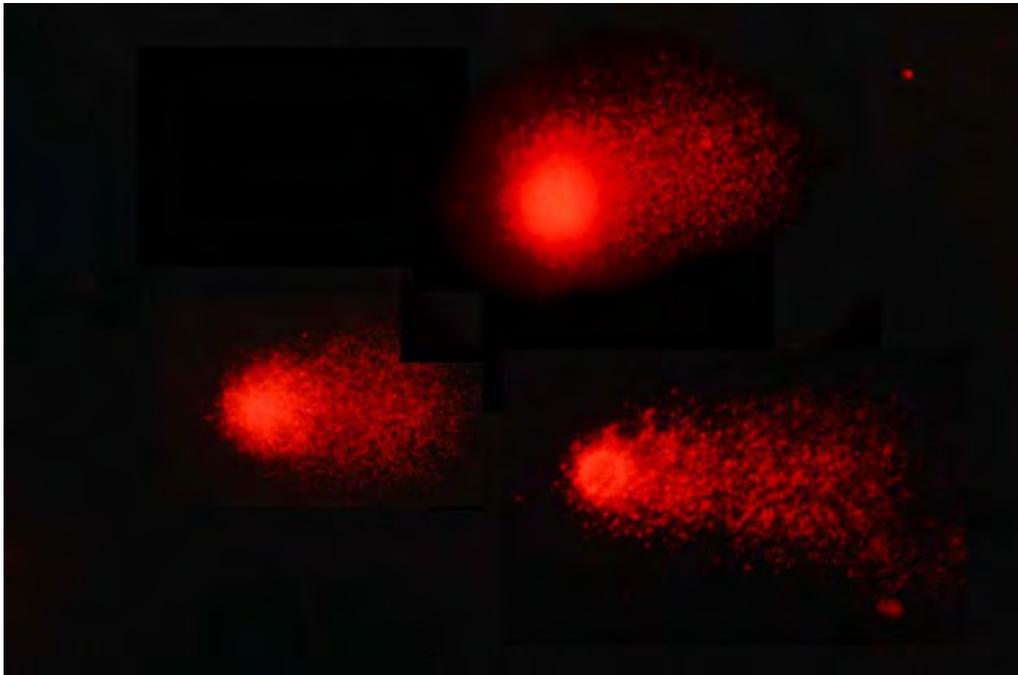


Figura 48 – Linfoma linfoblástico de grau alto (Kiel e FF). Células neoplásicas de linfonodo visualizadas em microscópio de fluorescência formando cometas com tamanhos diferentes de cauda.

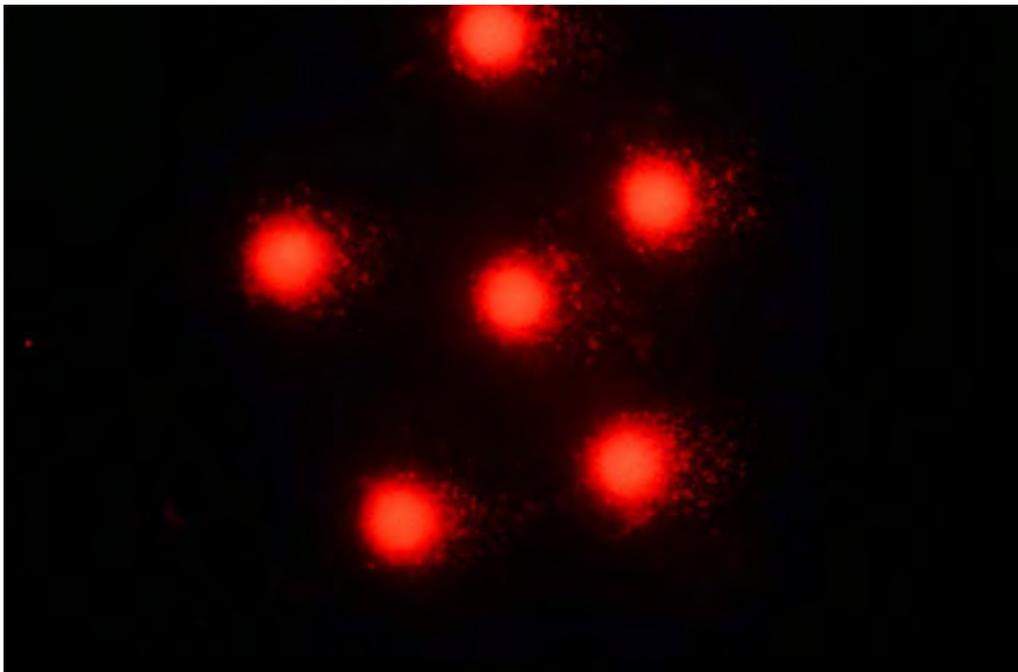


Figura 49 – Células individualizadas do sangue de cão portador de linfoma visualizadas em microscópio de fluorescência. As formações das caudas de cometa são incipientes.

5. DISCUSSÃO

Recentes avanços nas áreas da imunologia, genética e da biologia molecular têm ampliado significativamente o estudo e a compreensão dos linfomas. Esses avanços associados com o aperfeiçoamento das classificações morfológicas vêm contribuindo para diagnósticos mais precisos e protocolos terapêuticos mais efetivos (GREENLEE *et al.*, 1990). Melhorias na terapêutica dessa doença estão na dependência direta de modelos experimentais bem caracterizados para tais modalidades e, de acordo com FURNEL-FLEURY *et al.*, (1997) o linfomas dos cães é um excelente modelo para essa doença no homem

Os achados histomorfológicos observados nos 53 linfomas de cães utilizados neste estudo estão de acordo com as características celulares estabelecidas pela classificação de Kiel e seus correspondentes nos esquemas da *WF* e de FURNEL-FLEURY *et al.*, (1994).

Dos 53 casos de linfomas incluídos neste trabalho, 25 casos (47,16%) foram inicialmente utilizados por SUZANO (2004) em seu estudo sobre a classificação citológica e imunocitoquímica dos

linfomas nos cães. Ao compararmos os resultados obtidos entre o diagnóstico citológico obtido pela PAAF e o diagnóstico histológico, verificou-se que houve paridade quanto a classificação citomorfológica em 14 casos (56%). Quando essa comparação foi feita observando-se os graus de malignidade dessas neoplasias o índice de acerto foi de 100% nos casos estudados. Assim, apesar do tipo celular da neoplasia determinado nos dois tipos de exames diferir, essa divergência não alterou o grau de malignidade, que é um importante critério para o estabelecimento dos protocolos de tratamento e do comportamento biológico do tumor. Essa discrepância nos resultados pode ser atribuída, pelo menos em parte, aos diferentes esquemas de classificações utilizadas. Sobre isso, Fournel-Fleury et al., (1997), explicam que o fato da classificação dos linfomas do cães serem baseadas nas diferentes classificações dos linfomas para a espécie humana, torna-se comum a ocorrência de diferentes subtipos morfológicos tanto nos estudos puramente morfológicos como citoistológicos (APLEBAUM *et al.*, 1984; DELVERDIER *et al.*, 1988; CARTER *et al.*, 1986). Essa mesma dificuldade já foi relatada por outros autores (GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE *et al.*, 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997, JACOBS *et al.*, 2002).

5.1. Estadiamento dos Linfomas

Para estabelecer o estadiamento dos linfomas é necessário realizar exame clínico do animal e são considerados o estado geral, doenças oportunistas, síndromes paraneoplásicas e localização das massas. É um importante dado no prognóstico e na determinação do tipo de tratamento a ser aplicado em pacientes humanos portadores desse tipo de neoplasia (LIEBERMAN *et al.*, 1986). Nos cães, o estabelecimento do estágio auxilia no planejamento e na avaliação dos resultados do protocolo de tratamento, no estabelecimento do prognóstico, além de permitir a comparação entre diferentes tratamentos de um mesmo tipo de neoplasia (VONDERHAAR & MORRISON, 1998). Neste trabalho, a maior prevalência de casos foi constatado nos estágios IV (22 casos – 41,50%) e V (20 casos – 37,73%). Estes resultados estão em concordância com GREENLEE *et al.*, (1990), TESKE (1994c), VONDERHAAR & MORRISON, (1998), SEQUEIRA *et al.*, 1999, DEMOURA, (2000), que afirmam que o maior número de casos observados nos estágios III, IV e V, são diagnosticados com maior frequência porque os estágios I e II dificilmente são percebidos pelos proprietários. Além disso, a incidência significativa do estágio V em nosso estudo deveu-se a coleta da medula óssea durante a realização da necropsia, uma vez que raramente este exame era feito durante a avaliação clínica do animal.

A apresentação anatômica dos linfomas é variável e tem influência no quadro clínico do animal (SEQUEIRA *et al.*, 1999). Observando-se as características clínicas e anatomopatológicas pode-se verificar que a forma multicêntrica foi a mais freqüente em nosso estudo (86,79%) e envolvia principalmente alterações como linfadenopatia generalizada, hepatomegalia (52,38%) e esplenomegalia (56,60%), achados esses compatíveis com a literatura pertinente (TESKE *et al.*, 1994a; CANIATTI *et al.*, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997a; DEMOURA, 2000; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002; SUEIRO *et al.*, 2004 e SUZANO, 2004). Apesar do elevado número de animais que apresentaram comprometimento mediastinal (21 casos – 39,62%), a forma tímica foi observada em quatro casos (7,54%) aparecendo como a segunda forma anatômica mais freqüente em nosso estudo. Esse achado também foi observado por SEQUEIRA *et al.*, (1999) e SUZANO (2004). Entretanto, isso difere das observações de JACOBS *et al.*, (2002) e DEMOURA (2000), que relatam ser a forma tímica a terceira e quarta formas, respectivamente, mais freqüentes nos linfomas dos cães. Nos outros 17 animais (32,07%), o comprometimento mediastinal foi caracterizado por aumento generalizados dos linfonodos internos, inclusive dos mediastínicos e/ou efusão torácica.

Os linfomas cutâneos e solitários ou extranodais são raros nos cães (JACOBS *et al.*, 2002). Em nosso estudo, 14 animais (26,41%)

foram diagnosticados inicialmente como portadores de linfoma cutâneo através da PAAF. Entretanto, à necropsia, esses animais foram incluídos na forma multicêntrica por apresentarem comprometimento de linfonodos internos e órgãos como baço e fígado.

Estudo retrospectivo elaborado por DEMOURA (2000), a frequência de linfomas cutâneos foi de 10,2% em 98 animais portadores dessa neoplasia. Como essa entidade é rara (JACOBS *et al.*, 2002) e não foi evidenciado microscopicamente os microabscessos de *Paultrier* característicos dos linfomas de pele, estes animais também foram incluídos na forma multicêntrica. Os linfomas solitários ou extranodais foram evidenciados em três casos (5,66%) e apresentaram localização renal, genital (testículo) e baço.

Em nosso estudo houve predominância do número de cães machos (33 – 62,26%) sobre o de fêmeas. Este achado também foi observado por vários pesquisadores (RALLIS *et al.*, 1992; SEQUEIRA *et al.*, 1999; DEMOURA *et al.*, 2001; SUEIRO *et al.*, 2004 e SUZANO, 2004). Entretanto, a prevalência de fêmeas foi comprovada nos estudos de BÄCKGREN, (1965), VAN PELT & CONNOR, (1968) e TESKE *et al.*, (1994b). Outros autores apontam indícios de que a incidência de linfoma seja maior nas fêmeas não ovariectomizadas (PRIESTER & MCKAY, 1980) e em machos orquiectomizados (VALLI, 1993), embora JACOBS

et al.,(2002) não considere que essa neoplasia sofra qualquer influência do sexo do animal.

Quanto à influência das raças nos linfomas, verificou-se em nosso estudo que a maior frequência ocorreu nos cães sem raça definida (SRD) de médio e grande porte (35,84%), seguida por cães das raças pastor alemão (09 casos – 16,98%), rottweiler (08 casos – 15,09%), boxer (06 casos – 11,32%), fila brasileiro e dog alemão (02 casos cada – 3,77%). Relatos indicam que os cães da raça boxer aparecem como animais de alto risco. Outras raças tidas como predispostas ao aparecimento desse tipo de neoplasia são basset hound, São Bernardo, bullmastif e rottweiler (TESKE *et al.*, 1994b, VONDERHAAR & MORRISON, 1998; JACOBS *et al.*, 2002).

Existem estudos anteriores sobre linfomas dos cães envolvendo a frequência racial dessa população na região de Botucatu (SEQUEIRA *et al.*, 1999; DEMOURA *et al.*, 2001 e SUZANO, 2004). Como não há dados sobre a composição racial da população canina nesta região e porque no Brasil há o predomínio de animais sem raça definida (SRD), que correspondem na realidade a uma mistura de raças, muito provavelmente as frequências observadas nestes estudos estejam mais relacionadas à proporção de cada raça na população de

cães da região que à predisposição racial propriamente dita influenciando o desenvolvimento da neoplasia.

O câncer é uma doença degenerativa e característica de indivíduos mais velhos (COTRAN *et al.*, 2002). Os animais portadores de linfoma em nosso estudo foram agrupados por faixa etária. A média de idade dos animais acometidos foi de 5,5 anos. A maior prevalência da neoplasia ocorreu nos animais com faixa etária entre seis a 10 anos (71,69%), seguida da faixa etária acima de 11 anos (11,32%). Com base nesses dados podemos afirmar que 83,01% dos animais com linfoma neste trabalho tinham idade igual ou acima de cinco anos. Esse resultado é também observado claramente na literatura consultada, embora haja registro de animais bem jovens portadores dessa doença (VONDERHAAR & MORRISON 1998; SEQUEIRA *et al.*, 1999; DeMoura, 2000, JACOBS *et al.*, 2002; SUEIRO *et al.*, 2004 e SUZANO *et al.*, 2004).

5.2. Emprego das classificações de Kiel e *Working Formulation* (WF) nos linfomas não-Hodgkin nos cães.

No presente estudo, os 53 casos de linfoma foram classificados de acordo com o esquema proposto por Kiel (LENNERT & FELLER, 1991) e *Working Formulation* (NCI, 1982) e a classificação apresentada por

FOURNEL-FLEURY, *et al.*, (1994) para os linfomas dos cães (Anexos 09,10 e 11).

A supremacia dos linfomas de grau alto também foi observada por vários autores (APPELBAUM *et al.*, 1984; PARODI *et al.*, 1988; GREENLEE *et al.*, 1990, TESKE, 1994; TESKE & HEERDE, 1996; Fournel-Fleury *et al.*, 1997), independentemente do esquema de classificação utilizado. Em seu estudo retrospectivo sobre linfoma dos cães, DEMOURA (2000), ao utilizar a classificação da WF, encontrou preponderância do grau intermediário (52%) independente do imunofenótipo do tumor. Já SUZANO (2004), utilizando a classificação Kiel, encontrou maior frequência de tumores de grau alto (33,89%). SUEIRO *et al.*, (2004), utilizando a WHO para animais domésticos (VALLI *et al.*, 2002), encontrou índice de 72,72% para os linfomas do tipo grande célula B e PONCE *et al.*, (2004) também observaram supremacia dos tumores de grau alto em seus estudos utilizando a classificação de Kiel.

Levando-se em consideração que a classificação de Kiel é fundamentada no aspecto citomorfológico e que os linfomas foliculares são raros nos cães, GREENLEE *et al.*, (1990) e Fournel-Fleury *et al.*, (1997) acreditam que a utilização da classificação da WF para a espécie canina seja limitada. Talvez seja por isso que os resultados obtidos por TESKE *et al.*, (1994) e DEMOURA (2000),

utilizando a WF em seus estudos, demonstraram haver predomínio de linfomas de grau intermediário de malignidade. Isso parece ser, à luz das evidências citomorfológicas, um resultado contraditório. Entretanto, conforme explica GREENLEE *et al.*, (1990), é possível que alguns linfomas difusos sejam inicialmente foliculares (a semelhança do que ocorre no homem) e que devido a rápida e difusa invasão das células blásticas de origem folicular altamente proliferativas, tenham progredido para tumores difusos mais agressivos antes do diagnóstico.

SOARES & ARIAS, (1999), mencionam a necessidade imperativa da separação dos linfomas por imunofenótipo e que é nesse ponto que se fundamenta a classificação REAL e a classificação de Kiel. Para esses autores, como a WF não prevê essa separação essa se tornou uma das críticas mais fortes para a não utilização desse sistema.

5.3. Imunofenotipagem dos Linfomas

A identificação detalhada dos diferentes marcadores de superfície e de citoplasma suporta a hipótese do paralelo entre célula normal e célula linfóide neoplásica, estas consideradas consequência do bloqueio mais ou menos completo do processo de maturação da diferenciação linfóide normal (DELSOL *et al.*, 1993; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

Infelizmente, o painel de anticorpos monoclonal e policlonal disponíveis para identificação desses marcadores no cão é ainda pequeno e a padronização de alguns anticorpos espécie-específico foi realizado por COBBOLD & METCALFE, (1994). Atualmente, existem alguns anticorpos anti-cão, porém a maioria específicos para linhagens T (McKENZIE & FABRE, 1981; MOORE *et al.*, 1990 e MOORE *et al.*, 1992). Além disso, são anticorpos fora de linha de comercialização, o que torna menos disponíveis sua ampla utilização.

Essa dificuldade provavelmente pode explicar a disparidade nos resultados dos primeiros estudos de imunofenotipagem dos linfomas nos cães. Dentre os marcadores de linfócitos T, as moléculas de CD3, CD5, CD4 e CD8 já estão bem estabelecidas. Por outro lado, alguns anticorpos originalmente assumidos como pan-T, o F3-20-7 (McKENZIE & FABRE, 1981) ou o CA1-4G8 (MOORE ET AL., 1990; TESKE *et al.*, 1994), não são reconhecidos como anticorpo específicos para a linhagem T (CHABANNE, 1994).

Neste estudo, após a marcação imunoistoquímica dos 53 animais portadores de linfomas, 22 casos (41,5%) apresentaram imunorreatividade B (CD79+/CD3-), o mesmo número observado para os linfomas com imunofenótipo T (CD3+/CD79-). O número de tumores apresentando positividade tanto para B como para T (CD3+/CD79a+) foi observada em nove casos (16,98%).

Ao se avaliar os casos de linfoma e determinar seu imunótipo deve-se realizar cuidadosa estimativa da população celular que compõe o tecido. As neoplasias de células B podem apresentar células positivas para linhagem T e essa marcação representar população original do órgão linfóide ou reação imunológica do tecido à neoplasia. O contrário também pode ser observado e nos linfomas de células T podem ser evidenciados linfócitos de origem B presente na massa neoplásica (CANIATTI *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos neste estudo revelam supremacia dos linfomas de grau alto. Estudos anteriores utilizando-se as classificações de Kiel e WF têm demonstrado que os linfomas nos cães se apresentam, em sua maioria, como neoplasia de grandes células e de imunofenótipo B (CD79a+/CD3-). (WELLER *et al.*, 1980; GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE *et al.*, 1994c; CANIATTI *et al.*, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1990).

Neste estudo, na categoria de linfomas de grau alto, o tipo imunoblástico apareceu com maior frequência (49,05%). Destes, expressivo número de casos (13,33%) manifestou imunofenótipo T (CD3+/CD79-). Resultado diferente foi revelado por FOURNEL-FLEURY *et al.*, (1997), ao estudar 134 linfomas de cães. Todos os linfomas imunoblásticos (20 casos – 14,9%) diagnosticados em seu trabalho

apresentaram imunofenótipo B (CD79+/CD3). Essa diferença pode ser explicada, devido ao número de anticorpos (11 no total) utilizados em seu trabalho, pelo fato de que dos 11 anticorpos, sete eram específicos para cão e também devido a grande diversidade da metodologia utilizada nas reações imunoistoquímicas entre os dois trabalhos. Além disso, conforme salientam os próprios autores, pode haver perda da expressão da molécula BCR nos linfomas associadas com a diferenciação plasmacítica e a forte expressão de clg, mesmo a despeito do fato dessas moléculas serem expressas normalmente nos plasmócitos durante sua diferenciação.

No presente trabalho, 13 casos foram excluídos por não apresentarem imunomarcacão para os anticorpos testados e foram classificados como tumores de células redondas de origem mesenquimal. Para alguns autores, dificilmente um caso de linfoma não expressa o imunótipo T ou B (JACOBS *et al.*, 2002). Se isso ocorre, provavelmente pode ser consequência da má fixação do material (MONTEIRO, 2003) ou por se tratarem de casos de linfoma com imunofenótipo "nulo" (Teske *et al.*, 1994c; Fournel-Fleury *et al.*, 1997; SUEIRO *et al.*, 2004).

Este trabalho evidenciou co-expressão dos imunótipos T/B (CD3+/CD79a+) em 09 casos (16,98%), usando-se a classificação de Kiel, sendo três casos de linfoma de grau baixo (5,66%) e em

seis casos (11,32%) de linfoma de grau alto. Estudos anteriores realizados por DEMOURA (2000) e SUZANO (2004), também encontraram expressão dupla em 7,14% e 7,90%, respectivamente. APPLEBAUM *et al.*, (1984) e GREENLEE *et al.*, (1990) revelaram co-expressão de antígenos de células T e imunoglobulinas de superfície numa proporção relativamente alta de casos interpretados como sendo de células B. FOURNEL-FLEURY *et al.*, (1997), atribuíram esse achado a uma possível perda de especificidade dos marcadores utilizados por esses autores. Entretanto, PILOZZI *et al.*, (1988) relataram co-expressão em 10% de linfomas humanos e THOMAS *et al.*, (2001), encontraram co-expressão de antígenos de células B e T em 95% das células neoplásicas no linfoma linfoblástico de grau alto. Não acreditamos que a co-expressão tenha sido resultado de possível perda de especificidade dos marcadores utilizados, como defende FOURNEL-FLEURY *et al.*, (1997), haja vista que todo nosso trabalho foi realizado após padronização em linfonodo reativo de cão, obtendo-se excelentes resultados no padrão de marcação para cada anticorpo utilizado. Além do mais, como alertam GREENLEE *et al.*, (1990), nem todas os linfócitos B, como as células progenitoras, pré-linfócitos B e plasmócitos, expressam imunoglobulinas de superfície detectáveis na imunistoquímica.

Determinar a incidência e a evolução das várias categorias de linfomas T (CD3+/CD79a-) nos cães é essencial para conduzir

estudos epidemiológico e estatísticos futuros e para investigar a possibilidade de influência de agentes ambientais nas diferentes categorias deste tipo de neoplasia (Fournel-Fleury et al., 2002). Segundo TESKE, (1994c), os animais portadores de linfoma T (CD3+/CD79a-), apresentam curso clínico variável e prognóstico desfavorável e devem ser classificados como de alta malignidade independentemente do seu tipo celular. Por isso a determinação precisa da imunofenotipagem é essencial para identificar as várias categorias de linfomas tanto no homem como no animal quando se utiliza as classificações mais atuais para esta neoplasia. Os principais marcadores utilizados na medicina humana para determinar as linhagens dos linfócitos T - os antígenos pan-T - são os anticorpos anti-CD2, anti-CD3, anti-CD5 e anti-CD7, além dos anticorpos restritos aos timócitos (CD1) ou ainda aqueles presentes nas células linfóides imaturas, como o (TdT) expresso pelos linfomas linfoblásticos; aqueles antígenos definindo subpopulações de células T (anti-CD4 e anti-CD8) são expressos pelas populações de linfócitos T periféricos (FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997). Essas considerações são importantes porque algumas categorias de linfomas T no homem expressam especificamente certos marcadores, como na *mycosis fungoides*, a qual é essencialmente (CD4+), os linfomas pleomórficos que apresentam imunofenótipo (CD4+) mais que o (CD8+) e os linfomas/leucemia de células T no adulto que normalmente é (CD4+). Assim, a heterogeneidade dos linfomas de células T nos humanos é

marcante e contribui para o diagnóstico de subcategorias desses linfomas. Infelizmente, o painel de anticorpos mono e policlonais dos anticorpos disponíveis para a identificação destes marcadores no cão é ainda incompleto.

Neste estudo, os resultados obtidos com a expressão dos marcadores CD4 e CD8 parecem ser equivalentes entre os linfomas (CD4+CD8-) e (CD8+CD4-). Esse achado foi também semelhante ao encontrado por FOURNEL-FLEURY *et al.*, (1997). Entretanto existem variações na expressão entre as várias categorias de linfomas. Essa variação, provavelmente, está centralizada no tipo de marcador e respectiva metodologia adotada. Apesar da utilização em citometria fluxo, o anticorpo utilizado neste estudo é monoclonal e já apresentou resultados positivos em tecido de cão incluído em parafina (COSTA *et al.*, 2000). Provavelmente esforços devem ser envidados no sentido de evitar o *background* observado em muitos casos de linfomas constatado em nosso estudo.

5.4. Avaliação do índice de Proliferação Celular por meio do AgNor

Diversos autores têm utilizado a técnica do AgNor para demonstrar que o número de AgNor por núcleo pode ser utilizado como indicador confiável do grau de malignidade de linfomas não-Hodgkin humano e animal (BETHWAITE *et al.*, 1995; VAIL *et al.*, 1995; FREEMAN *et al.*, 1997; KIUPEL *et al.*, 1998; MEJÍA, 1988). Outros pesquisadores têm utilizados essa técnica na histopatologia, principalmente para diferenciar lesões benignas e malignas e na diferenciação dos tumores de grau baixo e alto de malignidade (DERENZINI *et al.*, 1989, QUEIROZ, 1996; CROCKER & NAR, 1997; SANTOS *et al.*, 1988). A validade da técnica está fundamentada na correlação entre a frequência do AgNor com o comportamento clínico das neoplasias para determinar seu valor prognóstico (BOSTOCK *et al.*, 1992; HAMELIN *et al.*, 1995). A utilização da técnica do AgNor em preparados citológicos para avaliar proliferação celular na medicina veterinária são escassos (VAIL *et al.*, 1997; VAJDOVICH *et al.*, 2004). Neste tipo de procedimento, as etapas de esfregaço, fixação e coloração são menos agressivas que aquelas observadas nos métodos convencionais do procedimento histopatológico. Desse modo, os danos ultraestruturais são suaves e os AgNor, embora menores, podem ser mais facilmente observados (VAJDOVICH *et al.*, 2004).

Neste estudo, a utilização de amostras citológicas coradas pelo AgNor utilizando-se a técnica descrita por PLOTON *et al.*, (1994) não foi satisfatória pois foi freqüente a observação de falsa coloração positiva para AgNor devido a intensidade dos precipitados de prata sobre os esfregaços. A modificação da técnica proposta por VIDAL *et al.*, (1994), acrescentando-se Triton X-100 para remoção de proteínas citoplasmáticas e nucleares somado ao uso de lâmina invertida foram alternativas satisfatórias porque produziram a coloração desejada sem o inconveniente de *background* e precipitados, permitindo boa avaliação e mensuração dos AgNors.

A PAAF de órgãos como o linfonodo neoplásico é altamente rico em células. Mesmo realizando esfregaço dentro da técnica, muitas vezes observa-se intenso aglomerado de células dificultando a observação de seus contornos. Por isso, o uso da contra-coloração com o metyl-green foi implementada com objetivo de individualizar os linfócitos neoplásicos para posterior mensuração.

O número de células necessários para mensuração do AgNor descrito em grande parte dos estudos utilizando a técnica do AgNor variam de 20 a 300 células. Entretanto KIUPEL *et al.*, (1999), referiram que não houve diferença nos resultados ao se medir 100, 200 ou 300 nos linfomas dos cães. Assim optamos por medir 100

células por caso. A dificuldade de fazer as mensurações utilizando-se o analisador de imagens está na execução, pois é bom lembrar que é um trabalho exaustivo, pois se utilizou a marcação manual dos pontos de AgNor em cada célula e não por densitometria.

Os resultados obtidos por esta coloração demonstram que o padrão de distribuição mais freqüente de AgNors é do tipo II e correspondem aos linfomas de alto grau de malignidade. De acordo com SHIRO *et al.*, (1993) nos carcinomas hepatocelulares bem diferenciados esse padrão de distribuição é menor. LORAND-METZE & METZE (1996) correlacionaram o padrão de distribuição de AgNors com a cinética celular em pacientes com leucemia crônica, para discriminar os pacientes como estáveis ou progressivos. Os autores concluíram que os linfócitos apresentando maior quantidade de aglomerado de AgNors era aqueles que representavam a fração celular responsável pela proliferação neoplásica. Os pacientes com mais de 13% de linfócitos com aglomerados de AgNors tinham prognóstico de leucemia progressiva. Os relatos sobre o assunto têm mostrado que o número de AgNors nos núcleos das células malignas é maior que o número nas suas correspondentes normais, hiperplásicas ou benignas e está associado estritamente com a taxa de duplicação celular (CROCKER & NAR, 1987; TRERÈ *et al.*, 1989; DERENZINI & PLOTON, 1991; RABENHORST *et al.*, 1996; VAJDOVICH *et al.*, 2004).

Em nossa casuística, apesar de não haver diferença estatística ($P > 0,05$) na correlação entre área média por ponto de AgNor no núcleo e graus de malignidade nas classificações de Kiel e WF, essas diferenças ocorreram e foram mais evidentes nos linfomas de grau alto de malignidade. Os resultados obtidos apresentam importância biológica uma vez que corroboram com a literatura e evidenciam a associação entre o número de AgNors e a atividade proliferativa das células, pois os tumores de alto grau de malignidade em ambas as classificações apresentam quantidade maior de AgNors (Figuras 13 e 14) e padrão compatível com o descrito para as células pouco diferenciadas (DERENZINI & PLOTON, 1991; GROTTO *et al.*, 1991; LORAND-METZE & METZE, 1996; SANTOS *et al.*, , 1998).

O maior número de AgNors nas células em proliferação pode ser explicado pelo fato de que na fase G_1 ocorre síntese das proteínas AgNors, as quais se acumulam no nucléolo onde pela associação com genes ribossomais previamente localizados no espaço extranucleolar, originam novos NORs. A associação com as proteínas AgNors induz a descondensação da cromatina ribossômica, evento necessário para etapa seguinte de duplicação genética (HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 1981; DERENZINI & PLOTON, 1991; PLOTON, 1994).

A área total de AgNors por núcleo é considerada como o indicador quantitativo básico na avaliação dos AgNors segundo o "Committee on AgNors Quantification" da "European Society of Pathology" (AUBELE *et al.*, 1994; OFNER & SCHMID, 1996).

Neste trabalho, embora a área total de AgNors tenha tido resultados quantitativamente diferentes, essa diferença não foi significativa ($P > 0,05$) para os diferentes tipos citomorfológicos estudados. Interessante ressaltar que morfologicamente, o padrão de distribuição de AgNors nos tumores de grau alto caracterizou-se por possuir estruturas menores, mais difusas e mais numerosas que, segundo DERENZINI & PLOTON, (1991), VAIL *et al.*, (1996); KIUPEL *et al.*, (1998) são características das neoplasias mais malignas.

Em nossa casuística, quando foi feita correlação entre área do núcleo com área média de AgNors, observou-se diferença estatística entre essas variáveis ($r^2 = 0,444$ e $P < 0,05$), significando que os maiores núcleos das células neoplásicas têm áreas de AgNors maiores.

Alta correlação foi também observada quando se estimou a área média por ponto de AgNor com o número de pontos de AgNors ($r^2 = 0,885$ e $P < 0,05$) e a área do núcleo com o número de pontos de AgNors ($r^2 = 0,457$ e $P = 0,05$). Com isso podemos inferir tanto que

as células neoplásicas que possuem núcleos maiores apresentam maior número de pontos de AgNors e, conseqüentemente maior área desses pontos, como também que quanto maior for a área do núcleo da célula neoplásica, maior será o número de pontos. Esses achados são perfeitamente compatíveis com as observações morfológicas, pois havíamos mencionado anteriormente que a maior quantidade de números de pontos de AgNors foi observada nos linfomas de grau alto, cujo tipo citomorfológico predominante foi o linfoma tipo imunoblástico, que é constituído por células grandes com núcleo redondo ou oval, nucléolo central grande e único.

5.5. Estudo morfométrico

Durante a década de 80, vários trabalhos na medicina humana foram publicados utilizando a morfometria como ferramenta para diagnóstico. Segundo os autores, parâmetros morfométricos do núcleo e citoplasma (incluindo o tamanho, forma, número e tamanho do nucléolo) em LNH humanos de baixo e alto grau de malignidade são recursos que podem ser usados no diagnóstico histopatológico (HAROSKE et al., 1984; VAN DER VALK *et al.*, (1983b); DAWSEY *et al.*, 1989; ROY *et al.*, 1989;). VAN DER VALK *et al.*, (1983) realizaram a

caracterização morfométrica de 52 linfomas não Hodgkin de células B, utilizando os parâmetros de tamanho do núcleo, área citoplasmática, taxa núcleo/citoplasma, índice de contorno nuclear, tamanho do nucléolo, localização do nucléolo dentro do núcleo (núcleolo excêntrico) e a média do número de nucléolo/núcleo por lâmina. Seus resultados indicaram que morfometria pode ser uma técnica adicional ao diagnóstico. Avaliar a importância da utilização da morfometria nuclear de imagens em esfregaços de diferentes grupos de células redondas foi a proposta de BRAHMI *et al.*, (2001). Os autores concluíram que a morfometria nuclear de imagens não foi eficiente para diferenciar os diversos tumores de células redondas. Mais recentemente, SAIKIA & SAIKIA, (2002) aliaram imunofenotipagem de linfomas folicular não Hodgkin e morfometria e concluíram que os dados morfométricos obtidos não foram estatisticamente significativos, sendo portanto, pouca utilidade no diagnóstico.

Na medicina veterinária não foram encontrados na literatura dados utilizando a morfometria nos linfomas dos cães. Em nosso estudo, apesar de haver diferença entre os dados morfométricos e os graus de malignidade nas duas classificações utilizadas para os linfomas dos cães, essas diferenças não foram significativas ($P > 0,05$).

É bem provável que a não significância dos dados seja reflexo da grande variabilidade de respostas obtidas para as variáveis estudadas ou, ainda, pode ser devido ao número de amostras insuficientes dentro de cada variável aplicada ou o somatório das duas possibilidades. Mesmo aplicando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que pressupõe apenas a interdependência das observações (*rank* teste) ou teste paramétrico de ANOVA, que pressupõe homogeneidade de variâncias, distribuição normal e independência das observações, os resultados foram semelhantes.

5.6. Teste do Cometa

O teste do cometa pode ser utilizado para investigar a genotoxicidade de produtos químicos industriais, biocidas, agrotóxicos e farmacêuticos. As maiores vantagens para esse teste incluem a sua fácil aplicação a qualquer tecido de interesse, a detecção de múltiplas classes de danos de DNA e a geração de dados ao nível de uma única célula (HARTMANN *et al.*, 2003). A noção de instabilidade genética ou genômica é utilizada para descrever o aumento da taxa de alterações no genoma de mamíferos, incluindo a desestabilização cromossômica, amplificação gênica e mutações

seguida da exposição da célula aos agentes danosos ao DNA. A perda de estabilidade do genoma nas células tumorais está se tornando mundialmente aceito como um dos mais importantes aspectos do câncer e tem sido proposto que a essa instabilidade seja a força motriz atrás dos múltiplos passos da carcinogênese (COLLEU-DUREL *et al.*, 2004). A manutenção das espécies ou talvez de um indivíduo requer perfeita replicação do DNA. Durante cada divisão celular, cada célula-filha recebe a mesma informação genética. Erros nesse processo resultam em mutações. Por princípio, as células somáticas são capazes de tolerar grande número de mutações. Uma vez que essas mutações não são passadas para as gerações subsequentes elas não se acumulam dentro do "pool" de genes da espécie. As mutações ocorrem quando a incorporação errônea da seqüência nucleotídeos excede a capacidade de excisão e reparo da célula. As mutações somáticas também são resultados de erros da participação dos cromossomos durante a divisão celular. Divisão inadequada desses cromossomos resultam em aneuploidia e alterações no número de cromossomos, alterações mais comumente observada nas células cancerígenas. Considerando-se a raridade de mutações nas células normais e o grande número de mutações observadas nos cânceres humanos, tem sido proposto que a taxa de mutação espontânea nas células normais não são suficientes para contribuir para o número de mutações encontradas nos cânceres humanos. Assim, as células cancerígenas exibem fenótipo mutante e este, é o

resultado de mutações nos genes que atuam na manutenção da estabilidade genômica. A consequência é o aumento das taxas de mutação e na evolução genética das células do câncer que dirigem a progressão do tumor. O dano no DNA é um processo primariamente randômico. Se o dano não for reparado servirá como potente fonte de mutações (LOEB, 2001). As aberrações cromossômicas nas células cancerígenas têm sido reconhecida como um critério para a graduação do tumor e prognóstico. Poucos casos de aberrações cromossômicas são causas específicas de doenças.

Na medicina veterinária existem poucas publicações sobre análise citogenética do tecido linfóide normal ou neoplásico. O número de cromossomos (78 no cão contra 46 no homem) e a grande semelhança entre os vários cromossomos dificultam sua identificação (TESKE, 1994c). Em humanos, vários estudos mostram certa consistência nas aberrações cromossômicas não randômicas observadas em alguns subgrupos de linfomas não Hodgkin. A maioria dessas alterações envolve translocações como a envolvendo o cromossomo 8 e 14 ou 2 ou 22 nos linfomas de Burkitt e a translocação envolvendo o oncogene BCL-2 nos linfomas foliculares

Os parâmetros utilizados em nosso trabalho avaliaram o "tail moment" que corresponde a quantidade de DNA danificado nas células neoplásicas.

No presente estudo não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$), quando comparadas as amostras de sangue e da massa proveniente dos cães com linfoma com os graus de malignidade nas classificações de Kiel e WF. Os valores do *tail moment* (TM) encontrados nas neoplasias de graus baixo, intermediário e de grau alto não apresentam uma lógica esperada correspondente aos graus de malignidade esperado dessas neoplasias. De acordo com COLLEU-DUREL *et al.*, (2004), o teste do cometa, neste caso, demonstra a fragilidade genômica espontânea (ou instabilidade genômica), que pode ser considerada como constitucional, ou seja, presente em todas as células somáticas (neste trabalho, nas células do sangue e da massa tumoral). Essa fragilidade, segundo esses autores, é expressa por altíssimos níveis de quebra de DNA. Essas anomalias são descritas como marcadores da instabilidade genômica.

De acordo com NOWELL, citado por LOEB, (2001), o fenótipo mutante no câncer é o resultado de repetidos "rounds" de seleção clonal nos quais a mutação de uma única célula concede crescimento seletivo permitindo sua progênie proliferar e formar o tumor. Assim, a progressão do tumor resultaria de proliferações seqüenciais de células mais agressivas. Isso talvez justifique a falta de correlação entre os valores de TM quando se utilizou as diferentes classificações para os linfomas dos cães para avaliar o grau de malignidade.

Afora isso, a maioria dos animais utilizada neste trabalho encontrava-se nos estádios IV e V, ou seja, nos estágios mais avançados da doença com sinais sistêmicos (sub-estágio *b* - Tabela 1), mesmo quando os casos de linfomas eram de grau baixo. De acordo com TESKE, (1994c), a taxa de crescimento das células do linfoma ou alterações no seu DNA devem ser correlacionadas com a grande variação do grau de agressividade desses tumores de acordo com as classificações citomorfológicas e imunofenotípicas.

Das 44 amostras selecionadas para o teste do cometa, em 15 delas conseguiu-se pareamento do sangue com a amostra da massa tumoral. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) quando se avaliou o valor do TM do sangue com o valor de TM do tumor nas amostras pareadas.

Quando se avaliou essa mesma amostra pela correlação de Spearman, verificou-se que há correlação positiva entre sangue e tumor do mesmo animal, podendo-se inferir que quando o TM do sangue aumenta, o TM da massa tumoral também aumenta. Apesar deste resultado não ser estatisticamente significativo ($P > 0,05$), é um dado biológico importante, pois revela a necessidade da coleta de amostras de sangue pareadas com amostra das células neoplásicas do mesmo paciente.

Outros estudos são necessários para investigar alterações genômicas específicas que possam desempenhar papel na patogênese e comportamento biológico dos linfomas dos cães. O pequeno passo dado com este trabalho na investigação da integridade do DNA nos tipos de linfomas dos cães nos permite sonhar com novas possibilidades de pesquisas: correlação entre TM e imunofenótipo do linfoma, avaliação do dano de DNA nos cães logo no início da doença e seu monitoramento durante o tratamento, correlação entre TM com recidiva, período de remissão da doença e sobrevida dos animais e até observação dos efeitos de resistência das drogas quimioterápicas, comumente relatados na literatura.

6. Conclusões

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

- * Independentemente da classificação citoistológica utilizada para os linfomas dos cães, houve predominância das neoplasias grau alto;
- * A classificação de Kiel foi a que melhor se adaptou aos achados citoistológicos neste trabalho;
- * A análise citopatológica do tumor permite estabelecer com segurança o grau de malignidade dos linfomas;
- * A frequência de linfomas que expressaram o imunofenótipo B (CD79a+/CD3-) foi igual o dos linfomas que expressaram imunofenótipo T (CD3+/CD79a-);
- * A citomorfometria não se apresentou como uma ferramenta segura para indicar grau de malignidade nos linfomas dos cães neste trabalho;

- * Não houve correlação entre o grau de malignidade e a frequência de dano do DNA das células neoplásicas dos linfomas dos cães;

- * A frequência de dano do DNA no sangue dos animais portadores de linfoma teve correlação direta positiva com a frequência de dano do DNA das células neoplásicas da massa tumoral do mesmo animal.

7. Referências Bibliográficas¹

ALVES, A. ***Avaliação de lesões no DNA e citopatologia urinária de cães***. Botucatu, 2001. Dissertação (Mestre) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 116p.

ALVES, A., DE MIRANDA CABRAL GONTIJO, A.M., SALVADORI, D.M.F., ROCHA, N.S. Acute bacterial cystitis does not cause deoxyribonucleic acid damage detectable by the alkaline comet assay in urothelial cells of dogs. ***Veterinary Pathology***, v. 41, n. 3, p. 299-301, 2004.

ALVES, V.A.C.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia, 1999, p.135-151

APPELBAUM, F.R.; SALE, G.E.; STORB, R.; CHARRIER, K.; DEEG, H.J.; GRAHAM, T.; WULFF, J.C. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:informação e documentação- Referências- Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

chemotherapy. **Hematol. Oncol.**, Chichester, v.2, p.151-168, 1984.

ASTER, J.; KUMAR, V. White cells, lymph nodes, spleen and thymus. In: CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Pathologic Basis of Disease**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. p.651-686.

ATKINSON, K.; DEEG, H.J.; STORB, R.; WEINDEN, P.L.; GERHARD-MILLER, L.; TOROK-STORB, B.J.; SEIGNEURET, M.; THHOMAS, E.D. Canine lymphocyte subpopulations. **Exp. Hematol.**, New York, v.8, p.821-829, 1980.

AUBELE, M., BIESTERFIELD, S., DERENZINI, M., *et al.* Guidelines of AgNORs quantitation. **Zentralblatt für Pathologie**, v. 140, p. 107-108, 1994.

BÄCKGREN, N.W. Lymphatic leucosis in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.6, p.16-26S, 1965

BRAHMI, U.; RAJWANSHI, A .; JOSHI, K.; DEY, P.; VOHRA, H.; GANGULY, N.K.; GUPTA, S.K. Automated nuclear image morphometry on fine needle aspiration smears of malignant round cell tumors. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, n.23, v.4, p. 287-290, 2001

BRATULIC, M., GRABAREVIC, B., ARTUKOVIĆ, CAPAK, D. Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus—prognostic value in canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, v. 33, p. 527-532, 1996.

BUSCARINI, E.; CAVANNA, L.; Ultrasound-guided fine needle biopsy of the spleen: High clinical efficacy and low risk in a multicenter Italian study. **Am. J. Hematol.**, New York, v.67, n.2, p.93-99, 2001.

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

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

CARTAGENA, N.; KATZ, R.L.; HIRSCH-GINSBERG, C.; CHILDS, C.C.; ORDONEZ, N.G.; CABANILLAS, F. Accuracy of diagnosis of malignant lymphoma by combining fine-needle aspiration cytomorphology with immunocytochemistry and, in selectes cases, Southern blotting of aspirated cells: a tissue-controlled study of 86 patients. **Diagn. Cytophatol.**, New York, v. 8 p.456-464, 1992.

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

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

CIVARDI, G.; VALLISA, D.; BERTE, R.; GIORGIO, A.; FELICE, C.; CAREMANI, M.; CATURELLI, E.; POMPILI, M.; DE SIO, I.; BUSCARINI, E.; CAVANNA, L. Ultrasound-guided fine needle biopsy of the spleen: High clinical efficacy and low risk in a multicenter Italian study. **Am. J. Hematol.**, New York, v.67, n.2, p.93-99, 2001.

COSTA, F.A.L.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.M.S.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniosis. **B.J.M.B.R.**, v.34, p.1455-1458, 2000.

COSTA, F.A.L.; GOTO, H.; SALDANHA, L.C.; SILVA, S.M.M.S. SINHORINI, I.L.; SILVA, T.C.; GUERRA, J.L. Histopathologic

patterns of nephropaty in naturally acquired canine visceral leishmaniosis. **Vet. Pathol.** V.40, n.6, p.677-684, 2003.

CROCKER, J.; EGAN, M.J. Correlation between the NOR sizes and numbers in non-Hodgkin´s lymphomas. **J. Pathol.** V.151, p.111-118, 1987.

CROCKER, J., BOLDY, D.A., EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standarzed approach. **J. Pathology**, v. 158, p. 185-188, 1989.

CROCKER, J., MACARTNEY, J. C., SMITH, P.J. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin´s lymphomas. **Pathol.**, v. 154, p. 151-156, 1988.

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

DAY, M.J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, v.112, p.79-96, 1995.

DELVERDIER, M.; BUCHET, B.; VAN HAVERBEKE, G. Histologie et cytologie des lymphomes malins canins etude comparative des classifications actuelles. **Revue des Medicine Veterinaire**, 1988, v.139, pp.1141-1150.

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

DEMOURA, V.M.B.D.; SEQUEIRA, J.L.; BANDARRA, E.P. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.2, n.2, p.29-33, 1999

DERENZINI, M., PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **Review International of Experimental Pathology**. v. 32, p. 149-192, 1991.

DERENZINI, M., SIRRI, V., TRERÈ, D. Nucleolar organizer regions in tumor cells. **Cancer J.**, v. 7, p. 71-74, 1994.

DERENZINI, M., TRERÈ, D. Standardization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. **J. Pathol.**, v. 165, p. 337-342, 1991a.

DERENZINI, M., TRERÈ, D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchows Arch. B. Cell Incl. Mol, Pathol.**, v. 61, p. 1-8, 1991b.

DERENZINI, M., TRERÈ, D. AgNORs proteins as a parameter of the of the cell proliferation. *Zentralblatt für Pathologie*, v. 140, p. 7-10, 1994.

DOBSON, J.M.; GORMAN, N.T. Canine multicentric lymphoma. **J. Small Am Pract.**, Oxford, v.34, n.12, p.594-598, 1993.

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

DORN, R.C.; TAYLOR, D. O .; HIBBARD, H.H. Epizootiological characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. **American Journal of Veterinary Research**, v.28, p. 933-1001, 1967.

EGAN, M., CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *Journal of Clinical Pathology*, v. 154, p. 247-253, 1988.

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

FOURNEL-FLEURY, C Fournel-Fleury, C.; Magnol, J.P., GuelFI, J.F. **Color atlas of cancer cytology of the dog and cat.** Paris: Conference Nationale des veterinaries Specialises en Petits Animaux, 1994. p.243-267.

FOURNEL, C.; Magnol, J.P.; Marchal, T.; Chabanne, L.; Bryon, P.A.; Felman, P. Na original perifollicular zone cell in the canine reactive lymph node: a morphological, phenotypical and aetiological study. **Journal Comparative Pathology**, 113, 217-231, 1995

FOURNEL-FLEURY, C.; Magnol, J.P.; Bricaire, P.; Marchal, T.; Charbanne, L.; Delverdier, A.; Bryon, P.A.; Felman, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodking's lymphomas. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v.117, n.1, p.35-59, 1997a.

FOURNEL-FLEURY, C.; Magnol, J.P.; Chabanne, L.; Ghernati, I., Marchal, T.; Bonnefond, C.; Bryon, P.A.; Felman, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of Ki-67 antigen. **J Comp Path.**, v.117, p.61-72, 1997b

FOURNEL-FLEURY, C.; Ponce, F.; Felman, P.; Blavier, A.; Bonnefont, C.; Chabanne, L.; Marchal, T.; Cadore, J.L.; GoY-TholLOT, I.; Ledieu, D.; Ghernati, I.; Magnol, J.P. Canine T-cell Lymphoma: a morphological, immunological, and clinical

study of 46 new cases. **Vet. Pathol.**, Washington, v.32, p.92-109, 2002.

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

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

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

GRINDEM, C. B. Blood cell markers. **Vet. Clin. North Amer: Small Animal Pract.**, v. 26, p. 1043-1064, 1996.

GOESSENS, G. Nuclear structure. **International Review of cytology**, v. 87, p. 107-158, 1984.

HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., STEIN H., BANKS, P.M., CHAN, J.K.C., CLEARY, M.L., DESLOL, G., WOLF-PEETERS, C., FALINI, B., GATTER, K.C., GROGAN, T.M., ISAACSON, P.G., KNOWLES, D.M.,

MASON, D.Y., MULLER-HERMELINK, H., PILERI, S.A., PIRIS M.A., RALFKIAER, E., WARNKE, R.A. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**. v.84, n.5, p.1361-1392, 1994.

HAYES, H.M.; TARONE, R.E.; CANTOR, K.P.; JESSEN, C.R.; McCURNIN, D.M.; RICHARDSON, R.C. Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 83, n. 17, p. 1226-1231, 1991.

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

HEATON, P.; RANSLEY, R. The comet assay: a measure of DNA protection in cats fed diets developed with WALTHAM science. **Waltham Focus**, v. 11, n.3, p. 28-29, 2001.

HOLMBERG, C.A.; MANNING, J.S.; OSBURN, B.I. Canine malignant lymphomas: comparison of morphologic and immunologic parameters. **J. Natl. Cancer Inst**, Bethesda, v.56, p. 125-132, 1976.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

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

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

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

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

KASSIE, F., PARZEFALL, W., KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation research*, v. 463, p. 13-31, 2000.

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

KREJA, L.; SELIG, C.; NOTHDURFT, W. Assessment of DNA damage in canine peripheral blood and bone marrow after total body irradiation using the single-cell gel electrophoresis technique. **Mutation Research**, v. 359, p.63-70, 1996.

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

LUNA, L.G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: McGraw Hill, 1968, 258p

MacEWEN, G.E.; HAYES, A A; MATUS, R. E.; KURZMAN, I. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.190, n.5, p. 564-568, 1987.

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

MELLO, M.L.S. Relocation of RNA metacromasy at mitosis. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 28, p. 149-154, 1995.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Critical eletrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, v. 59, p. 87-93, 1989.

MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C., DANTAS, M.M., MONTEIRO, A.L.P. Discrimination of the nucleolus by a critical eletrolyte concentration method. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 26, p. 1-3, 1993.

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

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

NACIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a Working

Formulation for a clinical usage. **Cancer**, Philadelphia, v.48, p.2112-2135, 1982.

MOORE, P.F.; AFFOLTER, V.K.; VERNAU, W. Immunophenotyping in the dog. In: BONAGURA, J.D. (Ed.) ***Kirk's current veterinary therapy XIII***. Philadelphia : Saunders, 2000. Sec. 6, p. 505-509.

NOWELL P.C. Cytogenetic approaches to human cancer genes. ***The FASEB Journal***. v.8, p.408-413, 1994.

OERTEL, J.; OERTEL, B.; KASTNER, M.; LOBECK, H.; HUHN, D. The value of immunocytochemical staining of lymph node aspirates in diagnostic cytologic. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.70, p.307-316, 1988.

ÖFNER. D., SCHMID, K.W., Standardized AgNORs analysis: its usefulness in cirurgical oncology. ***Histochemistry Cell Biology***. v. 106, p. 193-196, 1996.

ORREL, J.M., EVANS, A.T.,GRANT, A. A critical evaluation of AgNORs counting in benign naevi and malignant melanoma. **Pathol.** v.163, p.239-244, 1991.

ONIONS, D. B and T-cell markers on canine lymphosarcoma cells. .
J. Natl. Cancer Inst, Bethesda, v.59, p.1001-1006, 1977.

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

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

PLOTON, D. Structure and molecular organization of nucleolus.
Zentralblatt für Pathologie. v. 140, p. 3-6, 1994.

PLOTON, D., MENAGER, M., JEANNESSON, P., *et al.* Improvement in the staining and in the visualization of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochemical Journal**. v. 18, p. 5-14, 1986.

POLI, P., BUSCHINI, A., RESTIVO, F.M., FICARELLI, A., CASSONI, F., FERRERO, I., ROSSI, C. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeasts tests. **Mutagenesis**, v. 14, n.8, p.547-555, 1999.

PREZIOSI, R., DELLA SALDA, L., RICCI, A., SIMONI, P., MARCATO, P.S. Quantification of nucleolar organiser regions in canine perianal gland tumours. *Research in Veterinary Science*, v.58, p.277-281, 1995.

RABENHORST, S.H., BURINI, R.C., SCHMITT, F.C.L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Rev. Bras. Cancerol.*, v.40, n.3, p.141-147, 1994.

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

RASKIN, R.E.; NIPPER, M.N. Cytochemical characteristics of lymph nodes from normal and lymphoma-affected dogs. *Vet. Clin. Pathol.*, Santa Barbara, v.21, p.62-67, 1992.

ROBEY, S.S.; CAFFETY, L.L.; BESCHORNER, W.E.; GUPTA, P.K. Value of lymphocyte marker studies in diagnostic cytopathology. *Acta Cytol.*, St. Louis, v.31, p.453-459, 1987.

ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (I). *Cães e Gatos*, n.75, p.15-16, 1998.

ROCHA, N.S., RAHAL, S.C., SCHMITT, F., DI SANTI, G.W. Citologia aspirativa por agulha fina como método de auxílio durante a cirurgia. **Cães e Gatos**, n. 98, p. 22-23, 2001.

ROJAS, E., LOPEZ, M.C., VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v.722, p.225-254, 1999.

ROSOL, T.J., NAGODE, L.A, COUTO, C.G. et al. Parathyroid hormone (PTH)-related protein, PTH, and α -25,dehydroxyvitamin-D in dogs with cancer-associated hypercalcemia. **Endocrinology**, v.131, p.1157-1164, 1992

SAIKIA, U.N.; DEY, P.; SAIKIA, B.; DAS, A . Fine-needle aspiration biopsy in diagnosis of follicular lymphoma: cytomorphologic and immunohistochemical analysis. **Diagn. Cytopathol.**, v.26, n.4, p.251-256, 2002.

SANDURSKY, G.E., CARLTON, W.W., WIGHTMAN, K.A. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. **Veterinary Pathology**, v.24, p.495-499, 1987.

SANTOS, F.G.A., VASCONCELOS, A.C., MORO, L., et al. Apoptose no tumor venéreo transmissível canino: características morfológicas e evidência bioquímica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.5, p. 557-562, 2001.

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

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

SINGH, N.P., McCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, p.184-191, 1988.

SNEIGE, N.; DEKMEZIAN, R.H.; KATZ, R.L.; FANNING, T.V.; LUKEMAN, J.L.; ORDONEZ, N.F.; CABANILLAS, F.F. Morphologic and immunocytochemical evaluation of 220 fine needle aspirates of malignant lymphoma and lymphoid hyperplasia. **Acta Cytol.**, St. Louis, v.34, p.311-322, 1990.

SHIRO, T.; SEKI, T.; NAITOH, Y.; INOUE, K.; OKAMURA, A. A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions stages of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, v.71, p 44-49, 1993.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of Cell Biology*, v.140, p.1307-1320, 1998.

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

SUEIRO, F.A.R. *Linfomas caninos: estudo morfológico e imunoistoquímico de 55 casos e correlação com a imunoexpressão da proteína P53*. Campinas, 2004. Dissertação (Doutor) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas. 116p.

SUEIRO, F.A.R.; ALESI, AC.; VASSALO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. *J. Comp. Path.*, v.131, p.207-213, 2004.

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

TESKE, E.; Van HEERDE P.; RUTTEMAN, G.R.; KURZMAN, I.D.; MOORE, P.F.; MACEWEN, E.G. prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **J. Am.Vet. Med. Assoc.**, v.205, n.12, p.1722-1728, 1994a

TESKE, E. WISMAN, P.; MOORE, P.F.; Van HEERDE, P. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. **Experimental Hematology**, v.22, n.12, p.1179-1187, 1994b

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

TESKE, E.; de VOS, J.P.; EGERBRINK, H.F. et al. Clustering in canine malignant lymphoma. **Vet Quart** , v.16, n.2, p.134-136, 1994d.

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

TRERÈ, D. Critical analysis of the commonly employed in the assessment of cell proliferation: advantages of the NOR silver-staining technique in routine cyto-histopathology. ***Anal. Cell Pathol.***, v.5, p.191-201. 1994.

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

VAIL, D.M., KISSEBERTH, W.C., OBRADOVICH, J.E., MOORE, F.M., LONDON, C.A., MacEWEN, E.G., RITTER, M.A. Assessment of potential doubling time (T_{pot}), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. ***Experimental Hematology***, v.24, n.7, p.807-815, 1996.

VERNAU, K.M.; HIGGINS, R.J.; BOLLEN, A.W.; JIMENEZ, D.F.; ANDERSON, J.V.; KOBLIK, P.D. Primary canine and feline nervous tumors: intraoperative diagnosis using the smear technique. ***Vet. Pathol.***, Washington, v.38, n.1, p.47-57, 2001.

VIDAL, B.C., PLANDING, W., MELLO, M.L., SHENCK, U. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells high-resolution image cytometry. ***Analytical Cellular Pathology***, v. 7, p. 27-41, 1994.

VIDAL, B.C., BARBISAN, L.F., MARIA, S.S., RUSSO, J., MELLO, M.L.S., Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. *Apoptosis*, v. 1, p. 218-221, 1996.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. *Acta Histochemica et Cytochemica*, v. 22, p. 471-478, 1989.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. Re-evaluating the AgNOR staining response in Triton X-100-treated liver cells by image analysis. *Analytical Cellular Pathology*. v. 9, p. 39-43, 1995.

VONDERHAAR, M.A.; MORRISON, W.B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats**. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1998. p.667-95.

WAKAMATSU, A.; SIMÕES, A.S.; KANAMURA, C.T.; PINTO, G.A.; METZE, I.L.; VASSALO, J.; CARVALHO, L.V.; GAYOTTO, L.C.C.; SEIXAS, M.T.; SANTOS, R.T.M.; PAES, R.A.P.; IRAZUSTA, S.P.; NONOGAKI, S.; ALVES, V.A.F. Manual de Imunohistoquímica. VASSALO, J. *In: Tecido Linfo-hematopoético*. Sociedade Brasileira de Patologia, São Paulo, p. 21-9, 1995.

WELLER, R.E., HOLMBERG, C.A., THEILEN, G.H. et al Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma. **Am J Vet Res.**, v. 41, p.1310-1314, 1980.

ZAR, J. H. ***Biostatistical analysis***. 3.ed. New Jersey : Prentice Hall, 1996. 718p.

ANEXO 02

Dados de identificação, forma anatômica, estadiamento, grau de malignidade nas classificações de Kiel e WF e resultados das análises imunofenotípicas dos 53 casos de linfoma analisados durante o período de 2001 a 2004 (continua.....)

ANIMAL	RAÇA	SEXO	IDADE	FORMA ANATOMICA	ESTADIO	Grau Kiel	Grau WF	CD3	CD79a	CD4	CD8
1.	SDR	F	6a	Multicêntrica	IV	baixo	intermediário	+	-	-	-
2.	SRD	F	7a	Multicêntrico	IV	alto	alto	+	-	+	-
3.	Fox terrier	M	8a	Multicêntrico	V	alto	intermediário	+	+	-	-
4.	Pastor alemão	F	10a	Multicêntrico	IV	alto	intermediário	-	+	-	-
5.	Pastor alemão	F	7a	Multicêntrica	IV	alto	intermediário	+	-	+	-
6.	Fila brasileiro	M	3a	Multicêntrico	V	baixo	intermediário	+	-	+	-
7.	Boxer	F	6a	Multicêntrico	IV	alto	alto	+	-	+	+
8.	Rottweiler	F	7a	Multicêntrico	IV	baixo	intermediário	-	+	-	-
9.	SRD	M	3a	Multicêntrico	V	alto	alto	+	-	+	+
10.	SRD	M	6a	Multicêntrico	V	alto	alto	-	+	-	-
11.	SRD	F	10a	Multicêntrico	V	baixo	intermediário	+	-	-	+
12.	Fila brasileiro	M	4a	Multicêntrica	III	alto	alto	-	+	-	-
13.	SRD	M	12a	Multicêntrico	V	alto	alto	+	+	+	-
14.	Pastor alemão	F	7a	Solitária	V	baixo	intermediário	+	-	+	+
15.	SRD	M	13a	Multicêntrico	IV	alto	alto	-	+	-	-
16.	SRD	M	8a	Multicêntrico	V	alto	alto	+	-	+	-
17.	Labrador	F	2a	Multicêntrico	IV	alto	alto	-	+	-	-
18.	Weimaraner	F	4a	Multicêntrico	IV	baixo	baixo	+	+	+	-
19.	Pastor belga	F	10a	Multicêntrico	V	alto	intermediário	-	+	-	-

Dados de identificação, forma anatômica, estadiamento, grau de malignidade nas classificações de Kiel e WF e resultados das análises imunofenotípicas dos 53 casos de linfoma analisados durante o período de 2001 a 2004 (continua....)

ANIMAL	RAÇA	SEXO	IDADE	FORMA ANATOMICA	ESTADIO	Grau Kiel	Grau WF	CD3	CD79a	CD4	CD8
20.	Rottweiler	M	7a	Multicêntrica	IV	alto	Alto	+	-	-	+
21.	Boxer	M	11a	Tímica	IV	alto	intermediário	-	+	-	-
22.	Dog alemão	F	8a	Multicêntrico	V	alto	alto	-	+	-	-
23.	SRD	M	7a	Solitária	IV	baixo	intermediário	+	-	-	+
24.	Rottweiler	M	3a	Multicêntrica	IV	baixo	intermediário	-	+	-	-
25.	Boxer	F	5a	Multicêntrica	V	baixo	baixo	+	-	-	-
26.	SRD	F	10a	Tímica	II	alto	alto	-	+	-	-
27.	Rottweiler	F	8a	Multicêntrica	V	alto	alto	-	+	-	-
28.	Sheepdog	M	5a	Multicêntrica	III	alto	alto	+	+	+	-
29.	Dálmata	M	4a	Multicêntrica	III	baixo	baixo	-	+	-	-
30.	Pastor alemão	N	9a	Multicêntrica	V	baixo	baixo	-	+	-	-
31.	SRD	F	6a	Multicêntrica	V	alto	alto	+	+	-	+
32.	SRD	M	6a	multicêntrica	V	alto	alto	+	-	+	-
33.	Rottweiler	M	5a	multicêntrica	V	baixo	intermediário	+	-	+	-
34.	Basset	M	12a	multicêntrica	IV	alto	alto	-	+	-	-
35.	Boxer	M	5a	multicêntrico	IV	alto	alto	+	-	-	+
36.	Pastor alemão	M	11a	multicêntrico	III	alto	alto	+	-	+	-
37.	SRD	F	7a	tímica	V	alto	alto	+	+	-	+
38.	Boxer	F	3a	multicêntrica	IV	alto	alto	+	-	+	-
39.	Rottweiler	M	10a	Multicêntrica	III	baixo	intermediário	+	-	-	+
40.	Pastor alemão	M	4a	multicêntrico	III	baixo	intermediário	+	+	-	+
41.	SRD	F	11a	multicêntrico	IV	alto	alto	+	-	+	+
42.	Rottweiler	M	6a	multicêntrico	V	alto	alto	-	+	-	-
43.	Pastor alemão	M	6a	multicêntrico	III	alto	alto	+	+	+	+

Dados de identificação, forma anatômica, estadiamento, grau de malignidade nas classificações de Kiel e WF e resultados das análises imunofenotípicas dos 53 casos de linfoma analisados durante o período de 2001 a 2004 (final).

ANIMAL	RAÇA	SEXO	IDADE	FORMA ANATOMICA	ESTADIO	Grau Kiel	Grau WF	CD3	CD79a	CD4	CD8
44.	SRD	M	6a	multicêntrico	III	baixo	intermediário	-	+	-	-
45.	Rottweiler	M	6a	multicêntrico	IV	alto	alto	+	-	+	-
46.	SRD	M	8a	timica	IV	baixo	intermediário	+	+	-	+
47.	SRD	M	6a	multicêntrica	III	alto	alto	-	+	-	-
48.	SRD	M	6a	multicêntrica	IV	alto	alto	-	+	-	-
49.	Boxer	M	7a	multicêntrica	V	baixo	intermediário	-	+	-	-
50.	Dog alemão	M	6a	multicêntrica	V	alto	alto	+	-	-	+
51.	Pastor alemão	M	5a	multicêntrico	V	alto	alto	-	+	-	-
52.	Pastor alemão	F	6a	multicêntrica	IV	baixo	intermediário	+	-	+	-
53.	SRD	M	6a	solitário	IV	baixo	intermediário	-	+	-	-

RG	Área núcleo	Diâmetro núcleo	Área citopl	Diâmetro citopl	Kiel	WF	N: C	IMUNO
1	62,4691	8,8400	62,4691	8,8400	alto	inter	1,0000	T
2	73,5044	9,6265	91,1055	10,5701	alto	alto	0,8068	T
3	39,1513	7,0327	45,6338	7,5969	alto	inter	0,8579	TB
4	77,0298	9,8773	126,1047	12,6138	alto	inter	0,6108	B
5	54,2327	8,2267	64,9964	9,0052	alto	inter	0,8344	T
6	102,8011	11,3663	136,0116	13,0079	alto	inter	0,7558	T
7	138,8709	13,1840	136,4600	13,0702	alto	alto	1,0177	T
8	87,0091	10,4503	112,9222	11,9027	baixo	inter	0,7705	B
9	118,2808	12,1350	141,2784	13,2786	alto	alto	0,8372	T
10	54,3944	8,1474	54,5888	8,1690	alto	alto	0,9964	B
11	85,4658	10,3300	105,2022	11,4718	baixo	inter	0,8124	T
12	59,1847	8,5971	56,5345	8,4364	alto	alto	1,0469	B
13	44,3931	7,4356	47,3942	7,6975	alto	alto	0,9279	TB
14	45,8418	7,6108	52,6924	8,1570	alto	inter	0,8700	T
15	49,8705	7,8924	56,1815	8,4034	alto	alto	0,8877	B
16	72,9004	9,5724	71,2676	9,4764	alto	alto	1,0229	T
17	69,8604	9,3622	78,7018	9,9274	alto	alto	0,8877	B
18	42,4538	7,3281	42,4538	7,3281	baixo	baixo	1,0000	TB
19	55,7985	8,3707	69,9236	9,3679	alto	inter	0,7980	B
20	37,5873	6,8483	29,8240	6,1023	alto	inter	1,2603	B
21	52,2516	8,1019	60,3895	8,6715	alto	alto	0,8652	B
22	62,0833	8,7369	75,3847	9,6305	baixo	inter	0,8236	B
23	57,2440	8,5066	57,3084	8,5110	baixo	baixo	0,9989	T
24	130,2913	12,9042	130,3298	12,9063	alto	alto	0,9997	B
25	57,2418	8,4651	57,2418	8,4651	baixo	baixo	1,0000	B
26	214,1884	16,4245	340,5000	20,6796	alto	alto	0,6290	TB
27	93,0080	10,7715	115,8724	12,0183	alto	alto	0,8027	T
28	73,9764	9,6376	92,1011	10,7452	alto	inter	0,8032	T
29	79,9378	10,0320	79,9378	10,0320	alto	alto	1,0000	B
30	86,2785	10,4404	86,2785	10,4404	alto	alto	1,0000	T
31	106,7396	11,5789	162,0727	14,2548	alto	alto	0,6586	T
32	71,2844	9,3663	80,1942	10,0281	alto	alto	0,8889	T
33	57,9335	8,5081	68,1684	9,1922	alto	inter	0,8499	T
34	80,4815	10,0225	103,6058	11,4114	baixo	inter	0,7768	TB
35	40,0691	7,1245	40,0691	7,1245	baixo	inter	1,0000	B
36	50,8022	8,0065	50,8022	8,0065	baixo	inter	1,0000	TB
37	8,2298	3,2106	77,5553	9,9040	alto	alto	0,1061	T
38	47,3731	7,7075	47,2862	7,7007	baixo	inter	1,0018	B
39	59,0022	8,6162	75,8233	9,7717	alto	alto	0,7782	B
40	77,6194	9,9151	102,3218	11,3049	baixo	baixo	0,7586	T

Pearson Product Moment Correlation

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:04:10

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Cell Contents:
 Correlation Coefficient
 P Value
 Number of Samples

	Diâmetro núcleo	Área citoplasma	Diâmetro citoplasma	N:C
Área núcleo	0,977	0,918	0,916	-0,0777
	4,672E-027	6,882E-017	1,163E-016	0,634
	40	40	40	40
Diâmetro núcleo		0,841	0,860	0,0361
		1,151E-011	1,180E-012	0,825
		40	40	40
Área citoplasma			0,980	-0,412
			3,320E-028	0,00822
			40	40
Diâmetro citoplasma				-0,459
				0,00291
				40

N:C

The pair(s) of variables with positive correlation coefficients and P values below 0,050 tend to increase together. For the pairs with negative correlation coefficients and P values below 0,050, one variable tends to decrease while the other increases. For pairs with P values greater than 0,050, there is no significant relationship between the two variables.

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:03:32

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Área núcleo

Normality Test: Failed (P < 0,050)**Equal Variance Test:** Passed(P = 0,114)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
intermediário	17	0	62,359	19,145	4,643
alto	19	0	83,288	44,773	10,272
baixo	4	0	58,640	14,447	7,223

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	4714,803	2357,402	2,049	0,143
Residual	37	42573,572	1150,637		
Total	39	47288,375			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,143).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,211

The power of the performed test (0,211) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:03:25

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Área núcleo

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Rank

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:03:25

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Área núcleo

Group	N	Missing	Median	25%	75%
intermediário	17	0	57,933	46,990	77,893
alto	19	0	72,900	55,546	103,307
baixo	4	0	57,243	49,848	67,432

H = 3,308 with 2 degrees of freedom. (P = 0,191)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,191)

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:03:14

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Diâmetro núcleo

Normality Test: Passed(P = 0,098)

Equal Variance Test: Passed(P = 0,118)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
intermediário	17	0	8,747	1,336	0,324
alto	19	0	9,863	2,754	0,632
baixo	4	0	8,554	1,059	0,530

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	13,382	6,691	1,470	0,243
Residual	37	168,400	4,551		
Total	39	181,782			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,243).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,117

The power of the performed test (0,117) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:03:07

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Área citoplasma

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Equal Variance Test: Passed(P = 0,529)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
intermediário	17	0	75,482	31,717	7,693
alto	19	0	102,235	66,433	15,241
baixo	4	0	64,831	25,952	12,976

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	8630,391	4315,195	1,637	0,208
Residual	37	97556,846	2636,672		
Total	39	106187,237			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,208).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,143

The power of the performed test (0,143) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:03:02

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Área citoplasma

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:03:02

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Área citoplasma

Group	N	Missing	Median	25%	75%
intermediário	17	0	68,168	49,923	104,005
alto	19	0	79,938	63,109	126,715
baixo	4	0	57,275	49,848	79,815

H = 3,856 with 2 degrees of freedom. (P = 0,145)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,145)

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:02:53

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Diâmetro citoplasma

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Equal Variance Test: Passed(P = 0,614)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
intermediário	17	0	9,522	2,027	0,492
alto	19	0	10,933	3,024	0,694
baixo	4	0	8,902	1,693	0,846

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	24,576	12,288	1,903	0,163
Residual	37	238,915	6,457		
Total	39	263,491			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,163).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,186

The power of the performed test (0,186) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:02:46

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Diâmetro citoplasma

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranksterça-feira, dezembro 28, 2004, 17:02:46

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: Diâmetro citoplasma

Group	N	Missing	Median	25%	75%
intermediário	17	0	9,192	7,930	11,426
alto	19	0	10,028	8,873	12,684

baixo 4 0 8,488 7,897 9,908

H = 3,765 with 2 degrees of freedom. (P = 0,152)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,152)

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:02:35

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: N:C

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Equal Variance Test: Passed(P = 0,563)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
intermediário	17	0	0,872	0,145	0,0352
alto	19	0	0,851	0,217	0,0497
baixo	4	0	0,939	0,121	0,0603

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,0265	0,0132	0,400	0,673
Residual	37	1,224	0,0331		
Total	39	1,251			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,673).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049

The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

One Way Analysis of Variance

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:02:29

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: N:C

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranksterça-feira, dezembro 28, 2004, 17:02:29

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: N:C

Group	N	Missing	Median	25%	75%
intermediário	17	0	0,834	0,793	1,000

alto	19	0	0,888	0,804	1,000
baixo	4	0	0,999	0,879	1,000

H = 0,872 with 2 degrees of freedom. (P = 0,647)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,647)

t-test

terça-feira, dezembro 28, 2004, 17:02:14

Data source: Data 1 in GIEMSA Adriana

Dependent Variable: N:C

Normality Test: Passed(P = 0,110)

Equal Variance Test: Passed(P = 0,694)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
alto	29	0	0,855	0,199	0,0369
baixo	11	0	0,904	0,112	0,0338

Difference -0,0487

t = -0,764 with 38 degrees of freedom. (P = 0,450)

95 percent confidence interval for difference of means: -0,178 to 0,0804

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0,450).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,050

The power of the performed test (0,050) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

TESTE DO COMETA**Preparo de Soluções****1) Solução de Lise (Estoque)**

- 2,5 M – NaCL ----- 146,1 g
- 100 mM – EDTA ----- 37,2 g
- mM – Tris ----- 1,2 g

Obs: Ajustar o pH para **10**, antes de colocar o N-Lauroyl-Sarcosine. Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

* N-lauroyl-Sarcosine a 1% - 10 g

Conservação: Temperatura ambiente, abrigada da luz.

2) Solução de Lise (Uso)

- Triton X – 100 ----- 1 ml
- DMSO ----- 10 ml

Completar para 100 ml com solução de Lise estoque.

Obs: Essa solução deve ser feita na hora do uso. Deve ser colocada na geladeira até atingir 4° C, aproximadamente duas horas antes do uso.

3) Solução de EDTA (A)

- EDTA ----- 14,89 g
- H₂O destilada ----- 200 ml

Obs: O pH deve ser ajustado para 10.

Conservação: Temperatura ambiente.

4) Solução de NaOH (B)

- NaOH -----200 g
- H₂O destilada ----- 500 ml

Conservação: Temperatura ambiente, abrigada da luz.

5) Solução de Eletroforese

Deve-se fazer separadas as soluções: A (EDTA) e B (NaOH).

Reagir *cinco (05) ml de solução A e trinta (30) ml de solução B*, completando para 1000 ml com H₂O destilada.

☞ O pH deve ser ajustado para 13.

6) Solução de Neutralização

- 0,4 M Tris ----- 48,5 g
- Completar para 1000 ml de H₂O destilada.

Obs: O pH deve ser ajustado para 7,5.

Conservação: Temperatura ambiente, abrigada da luz.

7) Solução de Coloração (Solução Estoque)

- Brometo de Etídio ----- 10 mg
- H₂O destilada ----- 50 ml

Conservação: Temperatura ambiente abrigada da luz.

8) Solução de Coloração (Solução Uso)

- Fazer diluição da solução de uso 1 para 10.
- 1 ml Solução Coloração estoque ----- 9 ml H₂O destilada

Conservação: Temperatura ambiente abrigada da luz.

9) Agarose – Ponto de Fusão Normal

- Agarose PFN ----- 300 mg (0,3 g)
- PBS (Livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) ----- 20 ml (20 ml)

10) Agarose – Low Melting Point (Baixo Ponto de fusão)

- Agarose LMP ----- 100 mg (0,1 g)
- PBS (Livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) ----- 20 ml (20 ml)

Preparação das lâminas Gel Primeira Camada

01. Lavar as lâminas
02. Diluir a Agarose Ponto de Fusão Normal, deixando-a ferver de duas a três vezes no microondas.
03. Colocar o gel já diluído no banho Maria à 60°C.
04. Com o auxílio de uma pinça, mergulhar as lâminas limpas no gel sem deixar escorrer.
05. Colocá-las na posição horizontal em frente a um aquecedor, deixando-as secar por algumas horas.

Conservação: Geladeira a 4°C ou temperatura ambiente.

Teste do Cometa

Sangue

01. Preparar a solução de lise (uso), duas horas (2h) antes do uso ou até chegar a 4°C.
02. Diluir a agarose Baixo Ponto de Fusão.
03. Aquecê-la no microondas sem deixar ferver.
04. Transferí-la para banho-maria à 37°C.
05. Apagar todas as luzes do laboratório.
06. Coletar 5µl de sangue total e transferí-lo para um ependorf.
07. Coletar 100µl de agarose, homogeneizar junto com o sangue.
08. Pingar lentamente a mistura feita sobre a lâmina preparada com agarose ponto de fusão normal.
09. Colocar uma lamínula grande (24x60), soltando-a lentamente sobre a lâmina.
10. Deixar na geladeira por 5 minutos.
11. Retirar cuidadosamente a lamínula.
12. Mergulhar a lâmina na solução de lise (uso) recém preparada.

OBS: A cuba com solução de lise deve estar coberta com papel alumínio para proteger da luz.

Eletroforese

- 1) Preparar a solução Tampão de Eletroforese, esperar chegar a 4°C.
- 2) Envolver a cuba de eletroforese num banho de gelo, mantendo-a a 4°C.
- 3) Retirar as lâminas da solução de lise, lavá-las com PBS e colocá-las na cuba de eletroforese.
- 4) Colocar a solução tampão de eletroforese até cobrir as lâminas.
- 5) Deixar as lâminas na cuba descansando por 20 minutos.
- 6) Programar a fonte de eletroforese com:
 - a. 25v
 - b. 20 minutos
 - c. Manter a mili amperagem – 300
- 7) Retirar cuidadosamente as lâminas da cuba e colocá-las em um trilho de coloração.
- 8) Lavá-las cuidadosamente com solução de neutralização, 3 vezes de 5 minutos.
- 9) Mergulhar as lâminas em Etanol 100% para fixação.
- 10) Deixar secar a temperatura ambiente.

OBS: A mili amperagem e a potência serão reguladas com a quantidade de solução de eletroforese colocada na cuba.

Padronizar qual lado será deixado para o pólo negativo para que os cometas não corram de lados opostos.

As lâminas podem ser conservadas em temperatura ambiente ou geladeira.

Coloração

- 1) Para coloração das lâminas, utilizar 50µl de solução de Brometo de Etídio (uso).
- 2) Cobrir com uma laminula grande (24x60).
- 3) As lâminas devem ser lidas imediatamente após a coloração.
- 4) Ao retirar as laminulas da lâmina, mergulha-las em etanol 100%.

OBS: Se for preciso reanalisar a lâmina, pode ser repetido o procedimento de coloração, sem perder a qualidade da análise.

Análise das lâminas

As lâminas são analisadas com um microscópio de fluorescência, que permite a visualização das seguintes imagens microscópicas: com contorno circular (sem danos no DNA) ou estruturas em forma de "cometa" (com danos no DNA).

A extensão de cada imagem significa a distância de migração da fita de DNA danificada, que foi classificada segundo Singh e col. (1988, 1991); Pool-Zobel e col.(1994) Speit e col.(1995).

As células foram classificadas em cinco categorias (0-4) correspondente às seguintes quantidades de danos na cauda do DNA.

- 0 ⇒ sem danos (<5%)
- 1 ⇒ baixo nível de danos (5-20%)
- 2 ⇒ médio nível de danos (20-40%)
- 3 ⇒ alto nível de danos (40-95%)
- 4 ⇒ dano total (>95%)

Dicas

- 1) Coletar sangue: 5µl de sangue / 100 ou 120µl agarose. (Homogenizar)
- 2) Pingar na lâmina, e após colocar lamínula.
- 3) Deixar 5 minutos na geladeira, retirar a lamínula e mergulhar na solução de lise (uso).
- 4) Deixar na solução de lise no mínimo 1 hora e no máximo 4 semanas.
- 5) Retirar da solução de lise e colocar em uma cuba com PBS (uso) por aproximadamente 5 minutos, para retirar os cristais que se formam.
- 6) Preparar a solução de eletroforese.
- 7) Colocar as lâminas na cuba de eletroforese, colocar lentamente a solução de eletroforese e deixar descansando por 20 minutos.
- 8) Programar eletroforese.
 - 25 V
 - 20 minutos
 - 300 MA
- 9) Se passar de 300 MA, retirar solução de eletroforese, e se estiver abaixo, acrescentar solução.
- 10) Correr eletroforese.

- 11) Após correr, retirar as lâminas da cuba e colocar sobre o ferro, lavar 3 vezes de 5 minutos com solução de neutralização. (Com muito cuidado para não romper a agarose).
- 12) Mergulhar em álcool absoluto para fixação.
- 13) Corar e analisar.

OBS: 1 ml = 1μ

A lise é uma solução hipotônica que quebra a membrana e deixa somente o núcleo.

RG	KIEL	IMUNOFENÓTIPO
1	linfoma de céls T pleomórfico	T
2	imunoblástico	T
3	centroblástico	T/B
4	centroblástico	B
5	imunoblástico	T
6	linfoma de céls T pleomórfico	T
7	imunoblástico	T
8	centrocítico	B
9	imunoblástico	T
10	imunoblástico	B
11	linfoma de zona T	T
12	imunoblástico	B
13	linfoblástico	T/B
14	linfoma de céls T pleomórfico	T
15	linfoblástico	B
16	imunoblástico	T
17	linfoblástico	B
18	linfoplasmacítico	T/B
19	centroblástico	B
20	imunoblástico	T
21	centroblástico	B
22	imunoblástico	B
23	linfoma de zona T	T
24	centrocítico-centroblástico	B
25	linfocítico	T
26	imunoblástico	B
27	difuso grandes células anaplásico	B
28	imunoblástico	T/B
29	linfoplasmacítico	B
30	linfocítico	B
31	imunoblástico	T/B
32	imunoblástico	T
33	linfoma de céls T pleomórfico	T
34	imunoblástico	B
35	imunoblástico	T
36	imunoblástico	T
37	imunoblástico	T/B
38	imunoblástico	T
39	linfoma de céls T pleomórfico	T
40	centrocítico-centroblástico	T/B
41	imunoblástico	T
42	centrocítico	B
43	centrocítico	T/B
44	imunoblástico	T
45	imunoblástico	B
46	imunoblástico	B
47	imunoblástico	B
48	centrocítico-centroblástico	B
49	imunoblástico	T
50	imunoblástico	T/B
51	imunoblástico	B
52	linfocítico	T
53	centrocítico	B

Anexo 06

RG	WF	IMUNOFENÓTI	GRAU
1	linfoma difuso pequenas céls clivadas	T	intermediário
2	imunoblástico	T	alto
3	linfoma difuso de grandes céls. Não clivadas	T/B	intermediário
4	linfoma difuso de grandes céls. Não clivadas	B	intermediário
5	imunoblástico	T	intermediário
6	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	T	intermediário
7	imunoblástico	T	alto
8	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	B	intermediário
9	imunoblástico	T	alto
10	imunoblástico	B	alto
11	linfoma difuso misto pequenas e grandes células	T	intermediário
12	imunoblástico	B	alto
13	linfoblástico	T/B	alto
14	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	T	intermediário
15	linfoblástico	B	alto
16	imunoblástico	T	alto
17	linfoblástico	B	alto
18	linfoma linfocítico plasmocitóide	T/B	baixo
19	linfoma difuso grandes células não-clivadas	B	intermediário
20	imunoblástico	T	alto
21	linfoma difuso grandes células não-clivadas	B	intermediário
22	imunoblástico	B	alto
23	linfoma difuso misto pequenas e grandes células	T	intermediário
24	linfoma difuso pequenas céls clivadas	B	intermediário
25	linfocítico	T	baixo
26	imunoblástico	B	alto
27	imunoblástico	B	alto
28	imunoblástico	T/B	alto
29	linfocítico plasmocitóide	B	baixo
30	linfocítico	B	baixo
31	imunoblástico	T/B	alto
32	imunoblástico	T	alto
33	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	T	intermediário
34	imunoblástico	B	alto
35	imunoblástico	T	alto
36	imunoblástico	T	alto
37	imunoblástico	T/B	alto
38	imunoblástico	T	alto
39	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	T	intermediário
40	linfoma difuso grandes células não-clivadas	T/B	intermediário
41	imunoblástico	T	alto
42	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	B	intermediário
43	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	T/B	intermediário
44	imunoblástico	T	alto
45	imunoblástico	B	alto
46	imunoblástico	B	alto
47	imunoblástico	B	alto
48	linfoma difuso pequenas céls clivadas	B	intermediário
49	imunoblástico	T	alto
50	imunoblástico	T/B	alto
51	imunoblástico	B	alto
52	linfocítico	T	intermediário
53	linfoma difuso de pequenas céls. Clivadas	B	intermediário

Anexo 07

RG	Área média p/ ponto de NOR	Área média de NOR p/ núcleo	Área média nuclear	Área relativa de NOR nuclear	Nº pontos NOR/cél	KIEL	WF
1	0,98425656	3,376	35,7216	0,094508645	3,5668	alto	alto
2	1,095411255	2,505346535	30,03920792	0,08340256	2,6836	alto	intermediário
3	0,617280702	2,786930693	52,14534653	0,053445437	2,894	baixo	intermediário
4	0,588412256	2,1124	33,118	0,063784045	2,1124	alto	alto
5	1,385810398	4,486732673	36,88316832	0,121647163	4,5316	alto	alto
6	4,463043478	12,318	67,9548	0,181267548	12,318	alto	alto
7	1,889777778	3,189	46,546	0,068512869	2,5512	alto	alto
8	1,302896552	3,740990099	60,84594059	0,061482985	4,1636	baixo	intermediário
9	0,837553957	2,282745098	42,94941176	0,053149624	2,5192	alto	alto
10	1,003930636	1,702745098	62,98156863	0,027035607	1,9896	alto	alto
11	0,903611111	1,275686275	40,6654902	0,031370236	1,5436	baixo	baixo
12	1,076732026	3,396701031	75,25896907	0,045133504	3,58	alto	intermediário
13	1,01804878	2,47960396	29,36673267	0,084435822	2,5044	alto	intermediário
14	0,456581197	1,04745098	19,54862745	0,053581811	1,0684	alto	alto
15	0,291304348	1,472527473	85,2232967	0,017310642	1,34	baixo	baixo
16	1,183414634	5,131923077	93,75230769	0,054739163	5,3372	alto	alto
17	2,864675325	4,4116	61,666	0,071540233	4,4116	alto	alto
18	1,187511737	4,817904762	35,3287619	0,136373453	5,1036	baixo	intermediário
19	2,343649635	6,358019802	69,49861386	0,091484132	6,9568	alto	alto
20	0,461220657	1,945346535	41,97544554	0,046344875	1,9728	alto	alto
21	1,110032362	3,396039604	38,18059406	0,088946766	3,6028	alto	alto
22	0,91972028	2,604356436	34,63366337	0,07519725	2,6304	alto	alto
23	0,275441176	0,741782178	11,02613861	0,067220097	0,7492	baixo	intermediário
24	1,556655518	4,563137255	61,17647059	0,07458974	4,9472	baixo	intermediário
25	0,49015544	0,918446602	33,18834951	0,027673777	0,946	baixo	intermediário
26	1,057283951	3,391683168	46,29148515	0,073267959	3,4256	alto	alto
27	0,461610738	1,361980198	42,96910891	0,031696724	1,3756	baixo	intermediário
28	1,985227273	7,434042553	53,77659574	0,138239364	7,026	alto	alto
29	1,303360324	3,187326733	39,55366337	0,080582353	3,2192	baixo	intermediário

Teste do cometa**Anexo 08**

Resultados do Tail Moment ou dano de DNA observados nos animais pareados e não pareados

RG massa	TM massa	Kiel	WF	RG sgué	TM sgué
1	14.007	alto	alto	1	0,5630
2	0,4586	alto	alto	2	0,7493
3	13.104	alto	alto	3	20.210
4	20.545	baixo	intermediário	4	13.202
5	0,9550	alto	intermediário	5	0,4426
6	31.877	alto	alto	6	15.170
7	10.801	alto	alto	7	11.633
8	10.035	alto	alto	8	0,9957
9	22.793	baixo	intermediário	9	0,3779
10	10.871	alto	alto	10	0,4856
11	30.535	baixo	intermediário	11	0,6914
12	11.529	baixo	intermediário	12	0,4623
13	23.367	alto	intermediário	13	14.736
14	23.861	alto	alto	14	0,5279
15	49.262	alto	alto	15	10.256

TM da massa neoplásica dos animais não pareados

RG	TM massa	Kiel	WF
16	12.914	baixo	baixo
17	24.252	alto	alto
18	0,3517	alto	alto
19	23.520	alto	intermediário
20	68.808	alto	alto
21	23.092	alto	alto
22	0,9124	alto	alto
23	0,6600	alto	alto
24	0,4764	alto	alto
TM do sangue	animais não pareados		
16	TM sgué	kiel	WF
17	0,4894	baixo	intermediário
18	0,4320	alto	alto
19	0,6648	baixo	intermediário
20	0,5336	alto	intermediário
21	15.303	alto	alto

Classificação dos 53 linfomas caninos e seus respectivos imunofenótipos elaborada de acordo com o esquema proposto por Fournel-Fleury et al., 1997

GRAU/TIPO DE TUMOR	Número de casos de:			
	Nº de casos	Linfoma T (CD3+)	Linfoma B (CD79a+)	Linfoma T/B (CD3+/CD79a+)
GRAU BAIXO				
Células T pleomórfico	05	05	00	00
Centrofítico	04	00	03	01
Centrofítico-centroblástico	03	00	02	01
Linfocítico	03	02	01	00
Linfoplasmacítico	02	00	01	01
Linfoma de Zona T	02	02	00	00
Células Médias Macronucleoladas (MMC)	00	00	00	00
GRAU ALTO				
Imunoblástico	26	13	09	04
centroblástico	04	00	03	01
Linfoblástico	03	00	02	01
Difuso grandes células anaplásico	01	00	01	00
TOTAL	53	22	22	09

Classificação dos 53 linfomas caninos e seus respectivos imunofenótipos elaborada a partir do esquema proposto por Kiel

GRAU/TIPO DE TUMOR	Nº de casos	Número de casos de:		
		Linfoma T (CD3+)	Linfoma B (CD79a+)	Linfoma T/B (CD3+/CD79a+)
GRAU BAIXO				
Células T pleomórfico	05	05	00	00
Centroclítico	04	00	03	01
Centroclítico-centroblástico	03	00	02	01
Linfocítico	03	02	01	00
Linfoplasmacítico	02	00	01	01
Linfoma de Zona T	02	02	00	00
GRAU ALTO				
Imunoblástico	26	13	09	04
centroblástico	04	00	03	01
Linfoblástico	03	00	02	01
Difuso grandes células anaplásico	01	00	01	00
TOTAL	53	22	22	09

Classificação dos 53 linfomas caninos e seus respectivos imunofenótipos elaborada de acordo com o esquema da Working Formulation

GRAU/TIPO DE TUMOR	Nº de casos	Número de casos de:		
		Linfoma T (CD3+)	Linfoma B (CD79a+)	Linfoma T/B (CD3+/CD79a+)
GRAU BAIXO				
Linfocítico	03	02	01	00
Linfocítico plasmocitóide	02	00	01	01
GRAU INTERMEDIÁRIO				
Pequenas células clivadas	11	05	05	01
Grandes células não-clivadas	05	00	03	02
Misto de pequenas e grandes células	02	02	00	00
GRAU ALTO				
Imunoblástico	27	13	10	04
Linfoblástico	03	00	02	01
TOTAL	53	22	22	09