

Anne Santos do Amaral

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO: CRITÉRIOS

CITOLÓGICOS DE MALIGNIDADE E CARACTERIZAÇÃO

CITOMORFOLÓGICA CORRELACIONADA A

IMUNOCITOQUÍMICA E LESÕES DE DNA

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Área de Concentração: Clínica Veterinária).

Orientadora: Prof^a Adj^a Dr^a Noeme Sousa Rocha

Botucatu – SP

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

Amaral, Anne Santos do.

Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA / Anne Santos do Amaral. – 2005.

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

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Assunto CAPES: 50501062

1. Câncer em cão 2. Cão – Doenças 3. Cão – Aparelho genital – Tumor

CDD 636.7089665

Palavras-chave: Antígeno mielóide/histiocitário; CD163; Lisozima; Critérios citológicos de malignidade; Teste do cometa; Tumor venéreo transmissível; Vimentina

ANNE SANTOS DO AMARAL

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO: CRITÉRIOS
CITOLÓGICOS DE MALIGNIDADE E CARACTERIZAÇÃO
CITOMORFOLÓGICA CORRELACIONADA A IMUNOCITOQUÍMICA E
LESÕES DE DNA

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

PRESIDENTE E ORIENTADORA: Prof^a Adj^a Dr^a Noeme Sousa Rocha, FMVZ-UNESP

2º EXAMINADOR: Prof. Dr. Alexandre Hataka, Faculdade de Ciências Agrárias,
UNIMAR

3º EXAMINADOR: Prof^a Adj^a Dr^a Ana Maria Barros Soares, Faculdade de Medicina
Veterinária, UFF

4º EXAMINADOR: Prof^a Assist. Dr^a Mirela Tinucci Costa, FCAV-UNESP

5º EXAMINADOR: Prof. Assist. Dr. Julio Lopes Sequeira, FMVZ-UNESP

Botucatu, 27 de janeiro de 2005

*A meus Pais,
meu início
Sem eles não teria chegado aqui*

*A meus Filhos,
minha continuação
Sem eles não teria porque chegar*

*A meu Marido,
meu querido companheiro
Sem ele não teria sequer começado*

AGRADECIMENTOS

*“Uma alegria compartilhada se transforma em dupla alegria;
uma dor compartilhada, em meia dor.”
(Provérbio sueco)*

Neste momento de encerramento de um período tão proveitoso, é extremamente agradável reconhecer que não estamos sós, que na medida em que percorremos o caminho, muitas pessoas vieram nos fazer companhia. Algumas foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho – sem seu conhecimento, não teria conseguido desenvolver muitas das atividades. Outras foram fundamentais para meu crescimento pessoal; outras, ainda, foram importantes só pelo fato de terem estado ao meu lado. Mais do que crescimento profissional, mais que um título, conquistei novos amigos, e isso tem um valor inestimável. Obrigada a Deus por ter permitido que isso acontecesse.

É extremamente difícil nomear àqueles a quem desejo agradecer, pelo medo de esquecer alguém – se isso acontecer, desculpem-me, foi involuntário.

Meu muito obrigada à minha orientadora, Prof^a Noeme, por tudo – pela coragem de aceitar orientar alguém que não era da sua área e que vinha de tão longe, pelo exemplo de competência e profissionalismo, pelos conselhos, pelo desprendimento, pela dedicação, pela amizade. Tenho muito orgulho de dizer que sou sua orientada.

Agradeço também aos professores Julio e Renée, pelo contato amigável que desenvolvemos nestes quatro anos, em que eu aprendi a ser um pouco patologista - hoje já não me sinto mais uma “estranha no ninho” e isso se deve, em muito, a vocês. Julio e Cristina, obrigada pela amizade e por manterem as portas da sua casa abertas. A Renée, um especial agradecimento pela ajuda na técnica de imunocitoquímica.

Obrigada aos residentes e ex-residentes da Patologia Veterinária pelo auxílio na colheita das amostras, pela troca de experiências e

pela amizade. Muito obrigada ao Maury Raul, sempre disposto a ajudar, e ao Noel, pelas dicas de coloração.

Obrigada também a todos residentes e ex-residentes da Cirurgia de Pequenos Animais, por possibilitarem o contato com os pacientes e seus proprietários, mesmo quando isso interferia na sua rotina ambulatorial.

Muito obrigada à professora Daisy Salvadori, pela possibilidade do uso do laboratório do TOXICAN e pelas orientações importantes para o desenvolvimento da técnica. Agradeço, igualmente, a Elaine, pela imensa boa-vontade e pela paciência no treinamento das "despreparadas".

Agradeço aos técnicos do centro de Microscopia Eletrônica, Maria Euleda Peres, Maria Helena Moreno e Nivalde Basso pelo processamento das amostras e à professora Elisa Gregório pelo auxílio na análise das imagens.

Obrigada ao professor Adalberto Crocci do Instituto de Biociências, pela orientação na análise estatística.

Agradeço, também, aos professores Regina e Raimundo, do Laboratório Clínico, por disponibilizarem o equipamento de análise de imagens, e ao professor Reinaldo, do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biociência, pelo uso do fotomicroscópio.

Obrigada aos amigos do Centro Cristão Espírita Amor e Luz, pelas horas felizes que compartilhamos e por me ajudarem no meu crescimento pessoal.

Não poderia deixar de lembrar meus grandes amigos, os colegas da patologia, Adriana, Sandra, Camila, Celmira, Flávia, Louisiane, Sara, Mércia, Edna (*Galega*), Andréa Alice, Fábio Henrique (os dois), Marcela (*Tia Maluca*), Leandro, Arlete. Viemos todos de tão longe, e agora chega a hora da separação... O nosso dia-a-dia tornava as dificuldades menores e foi um dos melhores aprendizados. A saudade que vocês vão deixar será enorme. Minhas sextas-feiras serão muito estranhas sem nossos bolinhos de final de tarde.

Obrigada, mais uma vez, a minha mãe e a meu pai, que sempre me apoiaram e que me ensinaram a ter iniciativa e a perseguir os sonhos. Obrigada por terem me conduzido ao que eu sou hoje. Nestes últimos dias, tão corridos, vocês deixaram seus afazeres de lado para prontamente vir a Botucatu, a 1500km de distância – sem tua ajuda, Mamãe, não teria conseguido escrever este trabalho em tão pouco tempo.

Finalmente, um agradecimento especial a meus filhos, e também um pedido de desculpas, pela falta de atenção dos últimos meses,

quando a corrida contra o tempo foi mais intensa. Vocês aceitaram a mudança de cidade, a separação dos amigos, a distância da família, para que Mamãe e Papai fossem fazer "isso de doutorado". Muito obrigada, meus amores.

Obrigada a todos meus familiares e amigos, que apesar da distância, mantiveram-se presentes, em especial a Tetê, Michel e Vitor (que se viram privados de filho e de pai para que nós pudemos ter esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal) e a meus queridos irmãos e cunhadas Álisson e Eduardo, Priscila e Débora.

Por fim, agradeço o suporte financeiro dado pela CAPES, que me concedeu a bolsa de doutorado, e a FAPESP, pelo financiamento do projeto que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Se pretenderes avançar ao encontro do melhor,
despoja-te do inútil.

Emmanuel

SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS	xxv
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL	04
2.1.1 BIOLOGIA CELULAR.....	05
2.1.2 EPIDEMIOLOGIA	08
2.1.3 SINAIS CLÍNICOS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	09
2.1.4 TRATAMENTO	13
2.1.5 ASPECTOS MORFOLÓGICOS	14
2.1.5.1 Características histológicas	14
2.1.5.2 Características ultra-estruturais	15
2.1.5.3 Exame citológico	16
2.2 IMUNOCITOQUÍMICA	24
2.3 TESTE DO COMETA	29
3 MATERIAL E MÉTODO	33
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA	33
3.3 TÉCNICA CITOPATOLÓGICA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	36
3.4 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA	38
3.4.1 VERIFICAÇÃO DO PADRÃO CITOMORFOLÓGICO PREDOMINANTE.....	38
3.4.2 DETERMINAÇÃO DE CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE	40
3.4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	45
3.5 IMUNOFENOTIPAGEM	46
3.6 AVALIAÇÃO DE DANOS DE DNA	51
3.6.1 TESTE DO COMETA	51

3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	53
4 RESULTADO	55
4.1 PROPEDEÚTICA SEMIOLÓGICA	56
4.1.1 SEXO, IDADE E RAÇA	56
4.1.2 PERFIL CLÍNICO E HÁBITOS DE CRIAÇÃO	57
4.1.3 ESTAGIAMENTO CLÍNICO DA NEOPLASIA	61
4.2 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA	65
4.2.1 VERIFICAÇÃO DO PADRÃO CITOMORFOLÓGICO PREDOMINANTE	65
4.2.2 DETERMINAÇÃO DE CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE	74
4.2.2.1 Critérios gerais de malignidade	75
4.2.2.2 Critérios de malignidade citoplasmáticos	88
4.2.2.3 Critérios de malignidade nucleares	94
4.2.2.4 Critérios de malignidade nucleolares	100
4.2.3 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	101
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	106
4.4 IMUNOFENOTIPAGEM	113
4.5 AVALIAÇÃO DE DANOS DE DNA	120
5 DISCUSSÃO	124
5.1 PROPEDEÚTICA SEMIOLÓGICA	124
5.1.1 SEXO, IDADE E RAÇA	124
5.1.2 PERFIL CLÍNICO E HÁBITOS DE CRIAÇÃO	125
5.1.3 ESTAGIAMENTO CLÍNICO DA NEOPLASIA	128
5.1.3.1 Massas primárias	128
5.1.3.2 Metástases	130
5.1.3.3 Classificação das massas neoplásicas amostradas	131
5.2 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA	131
5.2.1 EXAME CITOLÓGICO	131
5.2.2 DETERMINAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE	134
5.2.2.1 Critérios gerais de malignidade	134
5.2.2.2 Critérios de malignidade citoplasmáticos	139
5.2.2.3 Critérios de malignidade nucleares	139
5.2.3 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	143
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	145
5.4 IMUNOFENOTIPAGEM	147
5.5 AVALIAÇÃO DE DANOS NO DNA	152
6 CONCLUSÃO	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
Anexo A: Certificado de aprovação do projeto de pesquisa	169
Anexo B: Termo de consentimento	170

Anexo C: Protocolo semiológico	171
Anexo D: TNM adaptado para o tumor venéreo transmissível	173
Anexo E: Ficha de avaliação citológica	176
Anexo F: Técnica para microscopia eletrônica de transmissão	177
Anexo G: Protocolo para <i>Alkaline Single Cell Gel Eletrophoresis</i> Assay (Teste do Cometa)	181
Anexo H: Dados dos pacientes em estudo	185
Anexo I: Dados individuais do teste do cometa	188
Anexo J: Dados estatísticos dos critérios citológicos de malignidade	189

AMARAL, A.S. *Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA*. Botucatu, 2005. 228p. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Foram analisados 132 casos de tumor venéreo transmissível (TVT) de ocorrência natural, atendidos no Hospital Veterinário de Botucatu, considerando aspectos clínicos e epidemiológicos. Os pacientes eram, em sua maioria, sem raça definida e com idade variando entre um e 18 anos, com maior frequência na idade de quatro anos. A localização mais frequente foi a genital, seguida pela nasal; 25% dos pacientes apresentavam metástases. Estas ocorreram mais frequentemente na pele (31% das metástases), seguida pela localização mamária, em fêmeas, e em linfonodos, nos machos. Foram colhidas amostras de 188 tumores para avaliação citológica por microscopia ótica, microscopia eletrônica de transmissão, imunofenotipagem e estimacão de danos no DNA pelo teste do cometa. As massas foram avaliadas de acordo com a localização, em genitais ou extragenitais, com o comportamento biológico, em primárias e não primárias (metastáticas ou recorrentes) e, ainda, de acordo com o tamanho e tempo de evolução clínica. A avaliação citológica incluiu a classificação de acordo com o padrão morfológico predominante, em linfocitóide (18,4%), plasmocitóide (52,5%) ou misto (29,1%). As amostras extragenitais e não primárias foram predominantemente do padrão plasmocitóide. Foram observadas as características de malignidade gerais, citoplasmáticas, nucleares e nucleolares apresentadas. Anisocitose, anisocariose e macrocariose foram observadas em todos os padrões citomorfológicos, assim como a presença de vacúolos citoplasmáticos, basofilia e eosinofilia citoplasmáticas e corpúsculos linfoglandulares. As características citoplasmáticas de malignidade observadas com maior frequência foram projeções citoplasmáticas e espessamento de membrana citoplasmática. Células em forma de girinos foram relacionadas ao tipo linfocitóide. Dos critérios nucleares, os mais frequentes foram brotamentos, halo perinuclear, hipercromia, pseudoinclusões, espessamento de membrana nuclear e a presença de mitoses anormais e normais, binucleação e lobulações nucleares. O tipo citomorfológico linfocitóide foi o menos associado aos brotamentos nucleares. Infiltrado inflamatório composto de células polimorfonucleares e mononucleares foi significativo nas massas primárias, genitais e do padrão linfocitóide, sugerindo um melhor prognóstico. Na microscopia eletrônica de transmissão, a presença de projeções da membrana citoplasmática foi a característica distintiva deste tumor, sendo que as células plasmocitóides apresentaram uma maior quantidade de organelas, especialmente mitocôndrias, retículo rugoso e complexos de Golgi, sugerindo uma maior atividade metabólica deste padrão celular. As células neoplásicas apresentaram positividade para a marcação com vimentina, que foi mais intensa nas células plasmocitóides. Foi observada imunorreatividade com anticorpo antilisozima em todos os tipos morfológicos. Também houve marcação positiva com os anticorpos anti-histiócitos MAC387 e CD163 (Ber-MAC3). A marcação com MAC387 foi mais frequente nos tumores plasmocitóides, extragenitais e não primários. Foram verificados cometas em todos os tipos citomorfológicos, porém com maior quantidade de danos nas células do padrão plasmocitóide. Os resultados encontrados permitem concluir

que as diferenças morfológicas nas células do tumor venéreo transmissível estão relacionadas a um comportamento biológico mais agressivo do padrão plasmocitóide, quanto à sua capacidade de se desenvolver em locais extragenitais e metastatizar. A habilidade metastática tem sido relacionada à superexpressão de vimentina, que foi observada neste tipo celular. A reatividade aos marcadores de histiócitos sugere que esta neoplasia seja de origem histiocítica. As organelas citoplasmáticas mais desenvolvidas sugerem graus diferentes de ativação metabólica e os resultados do teste do cometa indicam que as células plasmocitóides apresentam mais alterações genômicas.

AMARAL, A.S. *Transmissible venereal tumor: cytological criteria of malignancy, and cytomorphological characterization correlated with DNA damage and immunocytochemistry*. Botucatu, 2005. 228p. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

A hundred and thirty-two dogs with naturally transplanted transmissible venereal tumor (TVT) from ambulatory service of the Veterinary Hospital UNESP, Botucatu, were analyzed for epidemiological and clinical aspects. The animals were predominantly mongrel dogs, with age range between one and eighteen years, and mean of four years. The most usual location was genital, followed by nasal; 25% presents metastasis, the cutaneous location being the most frequent, followed by lymph nodes, in males, and mammary, in females. A sample of 188 tumors were collected for cytologic evaluation in optical microscopy, transmission electron microscopy, immunophenotyping and measure of DNA damage by the Comet test. The masses were classified by location as genital or extragenital, by biological behavior as primary or non-primary (metastatic or recurrent), and by size and time of clinical evolution. The cytologic evaluation included cytomorphological classification in lymphocyte-like (18.4%), plasma-cell-like (52.5%) and mixed pattern (29.1%). Extragenital and non-primary tumors were essentially plasma cell-like. Malignancy features were noted as general, cytoplasmatic, nuclear and nucleolar. Anisocytosis, anisocariosis and macrocariosis were present in all cytomorphological patterns, as well as cytoplasmatic vacuoles, basophilic and eosinophilic tintorial properties, and lymphoglandular bodies. Cytoplasmatic malignancy criteria most frequently observed were cytoplasmatic projections and cellular membrane thickness. Cells resembling a racket were related to lymphocyte-like pattern. Nuclear buds, perinuclear halos, hyperchromatic nuclei, pseudoinclusions, nuclear membrane thickness and mitosis (normal and abnormal), binucleation, and nuclear lobulations (pleomorphic nuclei) were the most frequent nuclear malignancy criteria. The lymphocyte-like pattern was less related to nuclear buds than the other ones. Inflammatory cells, lymphoid and myeloid, had infiltrated significantly in primary, genital and lymphocyte-like masses, suggesting a better prognosis. In the transmission electron microscopy (TEM), the presence of cytoplasmic membrane projections was the

distinctive feature of this neoplasia. Plasma-cell-like neoplastic cells had more cytoplasmic organelles, especially mitochondria, rough endoplasmic reticulum and Golgi bodies, suggesting a greater metabolic activity in this cellular pattern. All cytomorphological patterns were positive for immunolabelling with vimentin antibody, but this was more intense in the plasma-cell-like. Likewise, all cellular patterns were labeled with anti-lysozyme antibody. Positive staining with histiocyte markers CD163 (Ber-MAC3) and MAC387 was completed. The labeling with MAC387 was more frequent in plasma-cell-like, extragenital and non-primary tumors. Comet formation was perceived in all morphologic patterns, but with more damage presented by plasma-like cells. These results permit the follow conclusions: the differences in morphology in TVT cells are related to a more aggressive biological behavior in plasma-cell-like ones by its capacity to grow in extragenital sites and to metastatize. Metastatic capability has been related to vimentin superexpression, that was observed in this cellular pattern. The labeling with histiocyte markers suggests that TVT has a histiocytic origin. The more developed cytoplasmic organelles suggests different grades of metabolic activation and Comet test results indicated that plasma-like cells have more genomic alterations.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Esquema dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível canino: linfocitóide (1A) e plasmocitóide (1B).	39
FIGURA 2	- Características gerais de malignidade avaliadas nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. A: cromatina densa (A1), granular (A2), grosseira (A3) e frouxa (A4); B: anisocitose; C: anisocariose; D: macrocariose; E: padrão de distribuição dos vacúolos citoplasmáticos e presença de corpúsculos linfoglandulares (seta); F: arranjo polar da paracromatina nuclear.	42
FIGURA 3	- Esquema dos critérios citoplasmáticos de malignidade avaliados nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. A: célula em fuso; B: células girino; C: espessamento de membrana citoplasmática; D: canibalismo; E: fagocitose; F: célula em anel de sinete; G: projeções citoplasmáticas.	43
FIGURA 4	- Critérios nucleares de malignidade analisados nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. A: hiper Cromasia; B: pseudoinclusões (vacúolos nucleares); C: núcleos riniformes; D: brotamentos nucleares; E: lobulações nucleares; F: binucleação; G: multinucleação; H: halo perinuclear; I: micronucleação; J: espessamento de membrana nuclear; mitoses: normais (K) e anormais (L).	44
FIGURA 5	- Cidades de origem dos casos de tumores venéreos transmissíveis incluídos no estudo, mostrando a área de influência da FMVZ-UNESP de Botucatu.	55
FIGURA 6	- Frequência dos casos de tumores venéreos transmissíveis estudados, por idade.	56
FIGURA 7	- Formas de apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino: A. forma genital, localizada no bulbo peniano; B. forma genital localizada na glândula; formas genitais vulvo-vaginal (C) e vaginal (D); E. TVT nasal, com deformidade de face, secreção nasal purulenta e epistaxe (setas); F. TVT afetando conjuntiva ocular; G. tumores cutâneos múltiplos; H. disseminação mamária a partir de uma massa genital primária; I. localização na mucosa anal.	59
FIGURA 8	- Distribuição dos casos de tumor venéreo transmissível, de acordo com a localização da massa primária e sexo.	62
FIGURA 9	- Frequência das metástases de tumor venéreo transmissível, de acordo com localização e sexo; (★) diferença significativa entre os sexos pelo teste de χ^2 ($\alpha=5\%$).	63

FIGURA 10 - Classificação das massas neoplásicas amostradas de acordo com localização (G=genital; EG=extragenital), comportamento biológico (P=primária; M=metastática; R=recorrente), tempo de evolução (R=recente; E=estabelecida; A=antiga) e tamanho (P=pequena; M=média; G=grande).	65
FIGURA 11 - Amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos diferentes tipos citomorfológicos: A. padrão linfocitóide (predomínio de células redondas, citoplasma escasso e alta relação núcleo:citoplasma); B. padrão plasmocitóide (predomínio de células ovóides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico); C. padrão misto (presença dos dois tipos morfológicos sem predomínio de nenhum). Giemsa, barra = 20µm.	66
FIGURA 12 - Frequência de tumores de localização genital e extragenital de acordo com o grupo citomorfológico. As distribuições dos grupos linfocitóide e plasmocitóide diferiram estatisticamente entre si.	68
FIGURA 13 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide entre tumores primários e não primários (metastáticos ou recorrentes).	69
FIGURA 14 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide de acordo com tempo de evolução e com tamanho.	71
FIGURA 15 - Frequência de células neoplásicas de tumor venéreo transmissível dos padrões linfocitóide e plasmocitóide, de acordo com a localização (A) e o comportamento biológico (B).	73
FIGURA 16 - Frequência de células dos padrões linfocitóide e plasmocitóide em casos primários de tumor venéreo transmissível com metástases e sem metástases.	74
FIGURA 17 - Padrões de cromatina encontrados no exame citológico de amostras de tumor venéreo transmissível: A: densa; B: granular; C: grosseira; D: frouxa. Giemsa, barra: 10µm.	76
FIGURA 18 - Número de nucléolos por célula verificado nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de diferentes tempos de evolução.	84
FIGURA 19 - Características gerais de malignidade avaliadas em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível coradas com Giemsa: A: anisocitose, anisocariose e macrocariose; observar nucléolos evidentes e presença de vacúolos citoplasmáticos uniformes e distribuídos ao longo da membrana celular; B: anisocitose e anisocariose marcadas; notar a basofilia citoplasmática; C: anisocitose e eosinofilia citoplasmática. A seta mostra ocorrência de canibalismo; D: vacúolos citoplasmáticos abundantes e de tamanho e distribuição irregular (★ : figura de mitose); E: células de TVT coradas pelo método de Shorr, evidenciando cromatina granular e um ou dois nucléolos por célula; F: arranjo polarem célula de TVT corada com Giemsa; observar distribuição da paracromatina em pólos opostos do	

	núcleo. As cabeças de seta em A, B e C identificam corpúsculos linfoglandulares (barra: 20µm).	87
FIGURA 20	- Apresentação do padrão "célula-em-célula" no tumor venéreo transmissível: A célula neoplásica fagocitando neutrófilo; B : canibalismo (fagocitose do mesmo tipo celular). Observar halo fagocitário que dá o aspecto de "olho de ave"; C : formas amastigotas de <i>Leishmania</i> parasitando uma célula neoplásica. Giemsa, barra: 10µm.	89
FIGURA 21	- Critérios de malignidade citoplasmáticos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível coradas por Giemsa: A e B : as cabeças de seta indicam célula girino (ou célula em raquete); C : célula em fibra (seta) . Barra: 10µm.	90
FIGURA 22	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células girino em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos.	91
FIGURA 23	- Projeções citoplasmáticas verificadas em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível coradas pelo Giemsa (barra: 20µm).	92
FIGURA 24	- Espessamento de membrana citoplasmática em células de tumor venéreo transmissível coradas com Giemsa (cabeças de seta). A seta mostra uma figura de mitose e a seta pontilhada destaca um plasmócito infiltrado no tumor (barra: 20µm).	93
FIGURA 25	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com espessamento de membrana citoplasmática em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com comportamento biológico (A) e localização (B).	94
FIGURA 26	- Critérios de malignidade nucleares observados no tumor venéreo transmissível: A : multinucleação; a seta aponta micronúcleos entre os núcleos de diversos tamanhos; B : uma grande lobulação nuclear confere aspecto indentado ao núcleo; C : célula binucleada apresentando um núcleo acessório bem menor que o núcleo principal (micronucleação); D : espessamento de membrana nuclear (setas); E : brotamentos nucleares de vários tamanhos evidentes em amostra corada por Shorr; F : hipercromia, representada pela maior afinidade tintorial; esta célula apresenta também espessamento de membrana nuclear (seta); G : halo perinuclear (cabeça de seta) e pseudoinclusão nuclear (seta); H : núcleo riniforme, associado a fissura nuclear, nesta célula. Coloração (exceto em E) Giemsa; barra: 10µm.	96
FIGURA 27	- Células binucleadas de tumor venéreo transmissível observadas em amostras citológicas coradas pelo Giemsa (barra 10µm).	97
FIGURA 28	- Frequência de binucleação verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de acordo com o tamanho.	98
FIGURA 29	- Figuras de mitose, normais e anormais, observadas em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. As cabeças de seta apontam <i>chromatin lag</i> . Giemsa, barra: 10µm.	99

- FIGURA 30** - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células apresentando brotamentos nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos. 100
- FIGURA 31** - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de monócitos infiltrados em amostras de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos. 102
- FIGURA 32** - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) dos diferentes infiltrados celulares observados em amostras de tumor venéreo transmissível de localização genital e extragenital. 104
- FIGURA 33** - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) dos diferentes infiltrados celulares observados em amostras de tumores venéreos transmissíveis primários e não primários. 105
- FIGURA 34** - Microscopia eletrônica de transmissão de tumor venéreo transmissível. **A:** célula de padrão linfocitóide: citoplasma preenchido por ribossomos e polissomas, com poucas organelas destacadas. São visíveis algumas mitocôndrias (M), a estrutura delicada de retículo endoplasmático liso (REL) e inclusões lipídicas (Lip). O núcleo (N) apresenta escassa cromatina condensada e um nucléolo (Nu) com padrão nucleolêmico. A seta mostra microvilos na membrana citoplasmática e a cabeça de seta indica invaginação nuclear. Barra = 1 μ m; aumento 13250x. **B:** célula plasmocitóide: o citoplasma é mais abundante, com maior quantidade de mitocôndrias (M) de vários tamanhos e formas, com poucas cristas e matriz granular; a estrutura do retículo citoplasmático liso é mais desenvolvida. Em R, ribossomos; N: núcleo. Aumento de 7750x; barra = 2 μ m. 108
- FIGURA 35** - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de tumor venéreo transmissível. **A:** duas células no campo apresentando núcleos (N) grandes e excêntricos, uma delas com dois nucléolos (Nu). Observa-se a cromatina associada ao nucléolo (CA) no núcleo maior. As setas apontam poros nucleares; M: mitocôndria; Lip: inclusões lipídicas. Aumento 9750x (barra = 1 μ m). **B:** Ampliação de 31500x de uma célula isolada de TVT, evidenciando *filopodia*. A vesícula com conteúdo citoplasmático (seta) é visualizada na microscopia ótica como corpúsculo linfoglandular. N= núcleo; Nu= nucléolo (barra = 0,5 μ m). 109
- FIGURA 36** - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de tumor venéreo transmissível. **A:** N= núcleo; Nu= nucléolo; cabeça de seta= espaço perinuclear. Observar projeções da membrana celular (setas) nas junções celulares (*filopodia*). Aumento 9750x (barra = 2 μ m). **B:** Maior ampliação da célula mostrada em A. N= núcleo; Nu= nucléolo; ca= cromatina associada ao nucléolo, cabeça de seta= poros nucleares. Aumento de 23000x (barra = 0,5 μ m). 110
- FIGURA 37** - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão de tumor venéreo transmissível, padrão plasmocitóide. **A:** observa-se a formação em vesículas achatadas do aparelho de Golgi (G), o retículo endoplasmático rugoso (r) com os ribossomos aderidos à superfície (seta) e estruturas tubulares do retículo liso com material elétron-denso no interior (cabeça de seta). N= núcleo;

M= mitocôndrias (aumento 23000x, barra= 0,5µm). **B**: outra amostra do mesmo tumor em A, mostrando uma lobulação nuclear. O corte tangencial permitiu a visualização dos esfíncteres dos poros nucleares (setas). Notam-se as mitocôndrias (M) com poucas cristas e matriz granular. A cabeça de seta marca a presença de uma vesícula com material elétron-denso; N= núcleo (aumento de 23000x; barra= 0,5µm). 111

FIGURA 38 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão de tumor venéreo transmissível, padrão plasmocitóide. **A**: presença de figuras de mielina (FM), originada da precipitação de fosfolipídios durante o processamento da amostra; inclusões lipídicas (Lip) e grande quantidade de mitocôndrias; N= núcleo; F: *filopodia* (aumento 9750x, barra= 2µm). **B**: o aumento de 77500x detalha o aspecto dos *filopodia* (F) e a característica dupla camada da membrana citoplasmática (seta). Observa-se mitocôndria (M) com cristas longitudinais e matriz densa (barra= 0,2µm). 112

FIGURA 39 - Marcação pelo anticorpo antivimentina em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível processadas por citocentrifugação: **A**: marcação forte; **B**: marcação fraca. Método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm. 113

FIGURA 40 - Marcação pelo anticorpo antilisoizima em amostra citológica de tumor venéreo transmissível processada por citocentrifugação; método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm. 115

FIGURA 41 - Marcação pelos anticorpos antiantígeno mielóide / histiocítico (**A**, **B**, **C**) e anti-CD163 (**D**, **E**, **F**) em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível processadas por citocentrifugação. Controles positivos estão na inserção (**C**) e em **F**. Setas preenchidas indicam macrófagos infiltrados no tumor (**B**); setas vazias apontam marcação positiva das células neoplásicas; método EnVision® HRP, cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm. 117

FIGURA 42 - Imagens de células de tumor venéreo transmissível submetidas ao teste do cometa, observadas em microscopia de fluorescência (**A-D**) e a correspondente análise gerada pelo programa de análise Comet Assay II®, exibindo os diferentes graus de danos de DNA, representado pela migração e intensidade de fluorescência da "cauda". 121

FIGURA 43 - Percentagem (média por caso) de DNA na cauda (*tail moment*) observadas em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com o grupo citomorfológico. 122

FIGURA 44 - Comparação entre mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da percentagem de DNA na cauda (*tail moment*) em amostras de tumor venéreo transmissível dos três grupos citomorfológicos. 123

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Aplicação do TNM no tumor venéreo transmissível canino primário.	35
TABELA 2	- Padronização da técnica de imunocitoquímica para os diversos anticorpos utilizados na marcação do tumor venéreo transmissível.	48
TABELA 3	- Raças dos pacientes diagnosticados com tumor venéreo transmissível durante o período experimental.	57
TABELA 4	- Frequência do tumor venéreo transmissível, de acordo com o sexo, nos diferentes sítios primários de implantação.	61
TABELA 5	- Classificação das massas neoplásicas amostradas, com base na sua localização, comportamento biológico, tempo de evolução e tamanho ao diagnóstico.	64
TABELA 6	- Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide, de acordo com a localização.	67
TABELA 7	- Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide entre tumores primários e não-primários (metastáticos ou recorrentes).	69
TABELA 8	- Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide, de acordo com o tempo de evolução clínica.	70
TABELA 9	- Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide de acordo com o tamanho.	71
TABELA 10	- Frequência de células linfocitóides e plasmocitóides nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de acordo com a localização e comportamento biológico do tumor.	72
TABELA 11	- Frequência dos diferentes padrões de cromatina nuclear nos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide.	77

TABELA 12	- Graduação da anisocitose verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	78
TABELA 13	- Graduação da anisocariose verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	78
TABELA 14	- Frequência da anisocariose verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos grupos de acordo com o tempo de evolução clínica.	79
TABELA 15	- Ocorrência de macrocariose nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos experimentais.	80
TABELA 16	- Frequência de basofilia e eosinofilia citoplasmáticas nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos experimentais.	81
TABELA 17	- Percentual de vacuolização em amostras de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	82
TABELA 18	- Percentual de células vacuolizadas em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não-primário (metastáticos e recorrentes).	82
TABELA 19	- Percentual de células com vacúolos citoplasmáticos, de acordo com o padrão de distribuição em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	83
TABELA 20	- Número de nucléolos por célula verificado nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos experimentais.	83
TABELA 21	- Número de nucléolos por célula verificado nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de diferentes tempos de evolução.	84
TABELA 22	- Ocorrência de corpúsculos linfoglandulares verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	85
TABELA 23	- Frequência de observação de arranjo polar da paracromatina verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	86
TABELA 24	- Frequência de observação de arranjo polar da paracromatina verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível primários e não primários.	86

TABELA 25	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com critérios citoplasmáticos de malignidade em amostras de tumor venéreo transmissível.	88
TABELA 26	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células girino em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos.	90
TABELA 27	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com espessamento de membrana citoplasmática em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com comportamento biológico e localização.	93
TABELA 28	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com critérios nucleares de malignidade em amostras de tumor venéreo transmissível.	95
TABELA 29	- Frequência de binucleação verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de acordo com o tamanho.	97
TABELA 30	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células apresentando brotamentos nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos.	100
TABELA 31	- Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de monócitos infiltrados em amostras de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	102
TABELA 32	- Mediana, percentis (P_{25} : P_{75}) e probabilidade dos diferentes infiltrados celulares observados em amostras de tumor venéreo transmissível de localização genital e extragenital.	103
TABELA 33	- Mediana, percentis (P_{25} : P_{75}) e probabilidade dos diferentes infiltrados celulares observados em amostras de tumores venéreos transmissíveis primários e não primários.	105
TABELA 34	- Frequência de células marcadas e intensidade de marcação pelo anticorpo anti-vimentina nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.	114
TABELA 35	- Mediana e percentis da frequência de células marcadas e intensidade de marcação pelo anticorpo antilisozima nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível.	115
TABELA 36	- Frequência de marcação das células do tumor venéreo transmissível pelos anticorpos anti-CD163 e anti-MAC387.	118

TABELA 37 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células positivas para a marcação com o anticorpo MAC387 em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com grupo citomorfológico, comportamento biológico e localização.	119
TABELA 38 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células positivas para a marcação com o anticorpo CD163 em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com tamanho, comportamento biológico e localização.	120
TABELA 39 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da percentagem de DNA na cauda (<i>tail moment</i>) em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com o grupo citomorfológico.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC = streptoavidina-biotina-peroxidase

BSA = soroalbumina bovina

CAAF = citologia aspirativa com agulha fina

CSA = *Catalyzed Signal Amplification System*

DAB = 3'-3' diaminobenzidina

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

IgG = imunoglobulina G

Mac3 = anticorpo antiCD163, clone Ber-Mac3

MAC387 = anticorpo antiantígeno mielóide / histiocítico

MHC = complexo de histocompatibilidade principal

PBS = tampão fosfato

PCR = reação em cadeia da polimerase

RNA = ácido ribonucléico

TOXICAN = Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena

TVT = tumor venéreo transmissível

1 INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma das neoplasias de maior frequência em cães; entre setembro de 2000 e agosto de 2001, dos 863 exames citológicos realizados nesta espécie pelo Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário de Botucatu, 72 casos tiveram o diagnóstico de TVT, numa média de seis novos casos por mês. Além disso, o comportamento agressivo de alguns tumores e o aumento na incidência de diagnóstico de TVTs com morfologia plasmocitóide merece atenção, já que morfologia e função são características intimamente relacionadas (WILKENING *et al.*, 2003).

Desde que Novinsky conseguiu, em 1876, sucesso no transplante experimental, o tumor venéreo transmissível adquiriu um *status* único, estimulando um vivo interesse de cientistas e tornando-se um ponto de partida para o estudo da oncologia (DAS & DAS, 2000).

O TVT é um enigma biológico (GIMENO *et al.*, 1995). Baseado na sua morfologia, as células do TVT têm sido classificadas como linfócitos, histiócitos, células reticulares ou células reticuloendoteliais maduras. A natureza incerta das células neoplásicas do TVT tem sido tema de controvérsia por décadas e ainda permanece como questão não resolvida (VARASCHIN *et al.*, 2001); se, em 1951, BLOOM *et al.* supuseram tratar-se de células maduras de origem reticuloendotelial, algumas teorias recentes apontam para um tecido indiferenciado de origem mielóide (MACLACHLAN & KENNEDY, 2002).

O TVT não é a única neoplasia de importância na rotina clínica veterinária, mas existe grande interesse científico com relação a sua célula de origem, modo de transmissão, cariótipo incomum e questionável regressão espontânea (KROGER *et al.*, 1991).

As similaridades observadas entre o TVT canino e o sarcoma de Kaposi, altamente incidente entre pacientes com AIDS e que também parece ter uma transmissão venérea por implante de células (RECHAVI *et al.*, 1991), faz do TVT um excelente modelo experimental para esta lesão no homem. Por se tratar de um tumor reproduzível experimentalmente, pode ser mantido por várias gerações, inalterado, possibilitando o estudo de fenômenos relacionados à carcinogênese em uma espécie muito mais próxima do homem que os roedores.

Por se tratar de um tumor que consegue se evadir da resposta imune do hospedeiro, implantando-se apesar da barreira do complexo de histocompatibilidade e por ser imunogênico, seu estudo tem servido como modelo para a pesquisa das interações entre o crescimento tumoral e o sistema imune do hospedeiro (LIAO *et al.*, 2003).

Considerando os aspectos supracitados, este estudo traz a proposta de caracterizar as diferentes morfologias celulares observadas no tumor venéreo transmissível, procurando confirmar diferenças de comportamento e evolução clínica e possibilitando, futuramente, antecipar tratamentos adequados com o diagnóstico citopatológico precoce.

Para tanto, buscou-se:

- correlacionar a morfologia das células de TVT com o seu comportamento biológico, localização, tempo de evolução e tamanho do tumor;
- avaliar a frequência de critérios de malignidade nos diferentes grupos;

- observar o infiltrado inflamatório presente nos três grupos;
- observar a morfologia celular dos diferentes grupos por microscopia eletrônica;
- correlacionar a reatividade a marcadores antilisozima, antivimentina e a antígenos específicos para a linhagem macrofágica/histiocitária, com a morfologia celular;
- comparar a ocorrência de quebras no DNA das células neoplásicas com a morfologia celular, usando o teste do cometa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia contagiosa e sexualmente transmissível que, em condições naturais, afeta somente caninos (ROGERS, 1997), tendo sido relatado o transplante experimental de TVT espécies filogeneticamente relacionadas, como chacais e coiotes (COCKRILL & BEASLEY, 1979).

Esta neoplasia já foi chamada de sarcoma infeccioso, linfossarcoma infeccioso, granuloma venéreo e condiloma canino, o que reflete a incerteza quanto à sua origem histológica (COHEN, 1985). Também é conhecida como sarcoma de Sticker, em referência ao pesquisador que a investigou extensivamente nos primeiros anos do século XX (ROGERS, 1997).

O TVT canino tem sido objeto de numerosas investigações desde 1876, quando Novinsky relatou o sucesso do primeiro transplante experimental de um tumor usando esta neoplasia (COHEN, 1978). Além disso, tem a distinção de ser a primeira comprovadamente transmissível de um animal a outro, como foi demonstrado em 1898 por Smith & Washbourn, quando 11 de 12 fêmeas cobertas por um macho portador desenvolveram a lesão (ROGERS, 1997).

2.1.1 BIOLOGIA CELULAR

O tumor é transmitido pela implantação de células tumorais viáveis nas mucosas, especialmente se existem abrasões ou perda de integridade da superfície (COHEN, 1978; COHEN, 1985). As características do coito dos cães permitem contato prolongado e a formação de escoriações na mucosa genital, tornando a cópula um modo muito eficiente de transmissão (ROGERS, 1997). Além do contato genital, o TVT também pode ser transmitido por hábitos sociais como farejar e lambar, o que explica os casos primários extragenitais nas mucosas nasal, oral e conjuntival (KROGER *et al.*, 1991; PÉREZ *et al.*, 1994).

O tipo celular exato de origem do TVT não é conhecido. BLOOM *et al.* (1951) foram quem primeiramente propuseram a classificação de tumor diferenciado de origem reticuloendotelial. Mais atualmente, tem sido classificado histologicamente como um tumor indiferenciado de células redondas, provavelmente de origem reticuloendotelial (COHEN, 1985; MACEWEN, 2001). Estudos com técnicas de imunoistoquímica têm apontado para origem mesenquimal e histiocítica (SANDURSKY *et al.*, 1987; GIMENO *et al.*, 1995; MARCHAL *et al.*, 1997; TINUCCI-COSTA, 1999b). Outra evidência desta foi sugerida, adicionalmente, pelo comportamento das células neoplásicas: ALBANESE *et al.* (2002) e CATONE *et al.* (2003) publicaram o achado de células de TVT parasitadas por formas amastigotas de *Leishmania*, da mesma forma que acontece com macrófagos, considerando esta ocorrência altamente sugestiva de origem histiocítica para a neoplasia.

A infectividade do TVT sugere causa viral, mas a inoculação de filtrados livres de células não produz crescimento tumoral; os poucos autores que alegaram resultado positivo tiveram sua metodologia questionada (COHEN,

1985). Da mesma forma, nenhuma evidência reproduzível de oncogene viral foi demonstrada (ROGERS, 1997).

Estudos citogenéticos fortalecem a idéia de transmissão por transplante de células. O cariótipo canino normal é 78 cromossomos, dos quais 76 são acrocêntricos; TVTs de vários locais do mundo possuem número de cromossomos estável ao redor de 59 (varia de 57 a 64), sendo 16 metacêntricos e 43 acrocêntricos (WEBER *et al.*, 1965; IDOWU, 1977; HASLER & WEBER, 2000; MACEWEN, 2001). Estas mesmas características são mantidas nas células cultivadas *in vitro* (ADAMS *et al.*, 1981). Entretanto, o número de braços cromossômicos e a quantidade de DNA das células de TVT são iguais aos das células caninas normais (COHEN, 1978). As aberrações cromossômicas constantes e muito específicas, como o rearranjo da sequência LINE/*c-myc*, idêntico em todos os tumores (KATZIR *et al.*, 1985; AMARIGLIO *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 1999; PORTELA *et al.*, 2003), sugerem que os casos de TVT em diferentes locais geográficos provavelmente se desenvolveram a partir de uma origem comum e têm sido transmitidos continuamente como aloenxertos (ROGERS, 1997). Estudos com antígenos de histocompatibilidade demonstraram que o TVT não é composto por células do hospedeiro modificadas, e sim por um transplante celular (COHEN, 1985).

Além da transmissão natural, o TVT pode ser induzido em cães adultos e imunocompetentes pela inoculação subcutânea de células tumorais vivas (OTOMO *et al.*, 1981), mesmo para locais não genitais (COHEN, 1978). No transplante experimental, o curso clínico varia da regressão espontânea à disseminação metastática, dependendo da resposta imune montada contra o tumor (COHEN, 1985). Em cães filhotes, o crescimento é rápido, chegando a 5mm de diâmetro uma semana após a inoculação (YANG, 1987). A maioria dos

tumores regride dentro de seis meses; nesses animais não é observada recorrência (COHEN, 1985).

O TVT é antigênico para os cães; a regressão é seguida por imunidade. Resposta imune humoral contra o TVT foi descrita (YANG & PALKER, 1981). Anticorpos IgG anti-TVT podem ser detectados no soro na maioria dos animais com o tumor, seja qual for o estágio da doença (FENTON & YANG, 1988). YANG *et al.* (1991) encontraram uma correlação positiva entre os níveis de antígeno tumoral circulante e o volume do tumor, associado à diminuição da reatividade dos leucócitos circulantes no teste de inibição da aderência de leucócitos.

Estudos sugerem que os anticorpos anti-TVT são direcionados contra os antígenos de histocompatibilidade principal tipo II (MHC-II), já que as células do TVT não apresentam β_2 -microglobulina de superfície, o que é necessário para expressão dos antígenos do MHC classe I (COHEN *et al.*, 1984). Relato recente publicado por HSIAO *et al.* (2002) investigou o papel dos linfócitos infiltrados no tumor sobre a expressão de moléculas do MHC nas células de TVT. Estes autores afirmaram que na fase de progressão tumoral, após a implantação, a expressão do MHC foi baixa, mas à medida que os tumores entram em fase de regressão, a partir da 12^a semana, a expressão de MHC-I e II aumentou dramaticamente, por efeito do aumento da quantidade dos linfócitos infiltrados no tumor e de uma substância solúvel e sensível ao calor, não determinada, produzida por eles.

A demonstração que a transferência passiva de soro imune induz a regressão tumoral sugere que mecanismos dependentes de anticorpos estão envolvidos na regressão (COHEN, 1985). Entretanto, a recidiva de TVT em casos de ocorrência natural demonstra que a imunidade não é duradoura, já

que BOSCOS *et al.* (1999) observaram casos de recorrência após dois anos do diagnóstico inicial.

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

O TVT possui distribuição mundial, mas parece ser mais prevalente em regiões urbanas de clima temperado (COHEN, 1985; ROGERS, 1997). Ainda que a prevalência exata do tumor venéreo transmissível não seja conhecida em muitos países, esta neoplasia já foi diagnosticada nos cinco continentes, incluindo Canadá (MIKAELIAN *et al.*, 1998), Estados Unidos (FOWLER *et al.*, 1997; ROGERS *et al.*, 1998), México (MORALES & GONZÁLEZ, 1995; GONZÁLES *et al.*, 1997), Grã-Bretanha (BOOTH, 1994), Espanha (PÉREZ *et al.*, 1994), Portugal (FERREIRA *et al.*, 2000), Grécia (BOSCOS *et al.*, 1999), Turquia (ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000); Quênia (NDIRITU *et al.*, 1977), Nigéria (AMBER & ADEYANJU, 1986), Tanzânia (BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991), Papua Nova Guiné (HAMIR, 1986), Israel (COHEN, 1978), Índia (GANDOTRA *et al.*, 1993; AYYAPPAN *et al.*, 1994), entre vários outros. No Brasil, o TVT é uma das neoplasias mais frequentes em cães (SOBRAL *et al.*, 1998; TINUCCI-COSTA, 1999b).

Ainda que a maioria dos estudos sobre o TVT de ocorrência natural não mostre clara predisposição sexual (ROGERS *et al.*, 1998), SOBRAL *et al.* (1998) reportam maior prevalência entre fêmeas, enquanto VARASCHIN *et al.* (2001) relatam maior prevalência entre machos. Outros autores limitam-se a descrever sua casuística, sem apontar predisposição racial, como é o caso de CALVERT (1983), BOSCOS (1988), MORALES & GONZÁLEZ (1995), ROGERS *et al.* (1998), BRANDÃO *et al.* (2002) e GOLDSCHMIDT & HENDRICK (2002). Estudo feito por AMARAL *et al.* (no prelo) a partir da casuística de TVT no Hospital

Veterinário da UNESP – Botucatu, abrangendo o período de 1994 a 2002, obteve maior prevalência em machos.

O tumor ocorre mais comumente em cães sexualmente ativos, devido ao modo de transmissão (CALVERT, 1983; MORALES & GONZÁLEZ, 1995; SOBRAL *et al.*, 1998; DAS & DAS, 2000), mas não parece haver predisposição racial (ROGERS, 1997). A neoplasia é diagnosticada mais freqüentemente em cães sem raça definida (MORALES & GONZÁLEZ, 1995; ROGERS *et al.*, 1998; SOBRAL *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 2002), em parte refletindo uma maior população de cães mestiços, mas também o baixo controle de cruzamentos e o fácil acesso à rua pelos animais acometidos (SOBRAL *et al.*, 1998). Tem-se observado que o TVT é mais prevalente em áreas onde a população de cães de rua é abundante (HIGGINS, 1966; COHEN, 1985; BOOTH, 1994; ROGERS, 1997; BOSCOS *et al.*, 1999; SOUSA *et al.*, 2000).

2.1.3 SINAIS CLÍNICOS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

O TVT de ocorrência natural geralmente se desenvolve na genitália externa (OTOMO *et al.*, 1981; ROGERS *et al.*, 1998). Em machos, os tumores são verificados no pênis ou no prepúcio e, nas fêmeas, vagina, vestibulo e junção vestibulovaginal são os locais primários de implantação (DAS & DAS, 2000; HASLER & WEBER, 2000). O tamanho dos TVT vaginais pode variar desde 0,5cm até massas com mais de 10cm de diâmetro, geralmente com aspecto de ‘couve-flor’, friáveis e de cor avermelhada (MACEWEN, 2001). Nos machos, secreção prepucial serossanguinolenta é a apresentação mais comum (BRANDÃO *et al.*, 2002), sendo necessária a exposição do pênis para a visualização da massa. Em muitos casos pode haver a extensão do tumor vaginal até cérvix e útero (YANG, 1987) ou do TVT nasal até seios maxilares e faringe (HAMIR, 1985). Conforme a localização, a massa tumoral pode levar à

obliteração parcial da uretra e ser um fator predisponente para a infecção bacteriana do trato urinário (BATAMUZI & KRISTENSEN, 1996). O tumor pode ser sésil ou pedunculado e, por ser friável, sangra facilmente, o que em geral é a causa da consulta veterinária (WEIR *et al.*, 1978; BOOTH, 1994). A superfície do tumor ulcera e inflama com facilidade (MORALES & GONZÁLEZ, 1995).

O diagnóstico pode ser suscitado pelos sinais clínicos, que incluem secreção genital persistente ou intermitente e geralmente serossanguinolenta, aumento ou deformação genital, odor anormal, lambidura da área genital ou presença de massa visível (BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; ROGERS, 1997). Em muitos casos, os sinais clínicos podem estar presentes por mais de um ano (ROGERS *et al.*, 1998; BOSCOS *et al.*, 1999).

COHEN (1985) relatou o desenvolvimento de policitemia em animais com grandes crescimentos tumorais de TVT após o implante experimental. Estes animais apresentavam níveis elevados de eritropoietina e o hormônio foi detectado no tumor. Este achado não é freqüente em casos de TVT espontâneo (ROGERS, 1997). TINUCCI-COSTA (1994), trabalhando com quarenta cães com TVT de ocorrência natural, observou que 57% dos animais apresentavam número de eritrócitos abaixo dos valores normais.

Apesar de se tratar de um processo neoplásico, a condição física geral dos pacientes não costuma estar afetada (RODRIGUES *et al.*, 2001). BRIGHT *et al.* (1983), relatando um caso de TVT na cavidade nasal e faringe de um cão, observaram que o mesmo encontrava-se em boa condição corporal. O mesmo foi reportado por HAMIR (1985), em um caso de TVT nasal e genital. YANG (1987) e FERREIRA *et al.* (2000), entretanto, relataram casos de TVT metastáticos e, ainda assim, observaram que os cães com a neoplasia apresentavam-se em boas condições, apesar da disseminação da doença.

Também foram reportadas a ocorrência de TVT na cavidade nasal, cavidade oral, pele e mucosa conjuntival, acompanhadas (HAMIR, 1985) ou não (BRIGHT *et al.*, 1983) do envolvimento genital, provavelmente como consequência de comportamentos sociais (COHEN, 1985; AMBER & ADEYANJU, 1986; PÉREZ *et al.*, 1994; GINEL *et al.*, 1995). Não pode ser descartada a possibilidade de auto-infecção por lambedura do tumor genital (NDIRITU *et al.*, 1977; BRIGHT *et al.*, 1983; BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; GINEL *et al.*, 1995; FOWLER *et al.*, 1997), especialmente nos casos nasais, orais e conjuntivais. A frequência de casos primários nasais foi registrada, por ROGERS *et al.* (1998), como sendo de dois casos em 29 pacientes. WEIR *et al.* (1978) descreveram duas ocorrências de TVT nasal sem a forma genital, em dois cães machos, mas não descartaram a possibilidade de que uma eventual massa genital houvesse regredido até a manifestação dos sinais respiratórios.

Os sinais clínicos associados ao TVT nasal são dispnéia, respiração estertorosa, espirros, epistaxe e deformação da face (WEIR *et al.*, 1978; AMBER & ADEYANJU, 1986; PÉREZ *et al.*, 1994). Invasão do seio maxilar com lise óssea e perda dentária também são ocorrências relacionadas à expansão nasal do tumor venéreo transmissível (HAMIR, 1985; AMBER & ADEYANJU, 1986).

As massas oculares primárias desenvolvem-se a partir da conjuntiva, como reportado por BOSCOS *et al.* (1998) e, assim como nos casos nasais, podem ser originadas de outro cão ou como resultado de auto-implante a partir de uma massa genital, embora a ocorrência de massas intra-oculares seja sempre considerada como uma forma de metástase (MILLER *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2001).

BATAMUZI & BITTEGEKO (1991) relataram um caso de TVT anal e genital, assumindo que o implante anal foi possível devido à existência de um

processo alérgico cutâneo generalizado, que poderia ter produzido a inoculação perianal das células neoplásicas pela associação do prurido com pele lesada.

A presença de metástases no TVT de ocorrência natural surge numa taxa estimada entre 1,5 a 6%, segundo FERREIRA *et al.* (2000), ou de 0 a 17%, segundo ROGERS (1997) e MACEWEN (2001). Os locais comuns são os linfonodos inguinais e ilíacos (ODUYE *et al.*, 1973; NDIRITU *et al.*, 1977; YANG, 1987; ROGERS *et al.*, 1998; DAS & DAS, 2000), pele e/ou tecido subcutâneo (PANDEY *et al.*, 1989; MILLER *et al.*, 1990; KROGER *et al.*, 1991; AYYAPPAN *et al.*, 1994; GUEDES *et al.*, 1996; BOSCOS *et al.*, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2002), fígado, baço (HAMIR, 1985; KROGER *et al.*, 1991), língua (NDIRITU *et al.*, 1977), faringe (NDIRITU *et al.*, 1977), cérebro (KROGER *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 2000), adeno-hipófise (MANNING & MARTIN, 1970), olhos (MILLER *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2001), músculos (KROGER *et al.* 1991).

Em 1973, ODUYE *et al.* propuseram que as diferenças observadas na ocorrência de metástases entre machos e fêmeas devia-se à diferença na drenagem linfática da genitália externa: enquanto nos machos essa é feita para linfonodos inguinais, nas fêmeas a drenagem é dirigida para linfonodos ilíacos internos, o que facilitaria o aparecimento de metástases viscerais.

A regressão espontânea é bem documentada em casos de TVT experimental, mas o mesmo não é visto como rotina nos atendimentos clínicos reportados (COHEN, 1985; BOOTH, 1994), ao menos nos pacientes do Hospital Veterinário da Unesp-Botucatu (BRANDÃO *et al.*, 2002). Ainda que a regressão espontânea nos casos de ocorrência natural tenha sido reportada por HIGGINS (1966), numerosos estudos clínicos controlados não têm registrado a regressão espontânea do tumor (BOOTH, 1994). Além disso, a presença crônica de

tumores por até quatro anos se opõe francamente à teoria da regressão espontânea (BOSCOS *et al.*, 1999).

2.1.4 TRATAMENTO

Como a regressão espontânea não é esperada em casos naturais, a terapia sempre deve ser recomendada. Independente do potencial maligno desta neoplasia, o TVT é singular por sua responsividade a uma variedade de tratamentos (ROGERS, 1997). A exérese cirúrgica dos tumores foi durante muito tempo o tratamento preconizado, mas a localização pouco acessível e a dificuldade em delimitar os bordos do tumor resultam em alta taxa de recorrência (DASS & SAHAY, 1989), que pode variar de 20 a 60%, dependendo da localização e extensão da doença (MACEWEN, 2001). O sucesso no uso de crioterapia para o tratamento de um cão com TVT genital também foi reportado (RICKARDS, 1983), embora seja pouco prática em algumas localizações anatômicas. A terapia de radiação é extremamente efetiva em casos de tumores solitários ou resistentes à quimioterapia, mas implica na necessidade do equipamento especializado (ROGERS *et al.*, 1998).

Dentre as várias modalidades de tratamento, como radioterapia, cirurgia ou criocirurgia, a quimioterapia é a aceita como mais efetiva (ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). Existem inúmeros relatos utilizando vincristina, vimblastina, doxorrubicina e ciclofosfamida, como agentes únicos (CAMACHO & LAUS, 1987; DALECK *et al.*, 1987a; NUNES *et al.*, 1987; SEM *et al.*, 1994; SINGH *et al.*, 1997) ou combinados (CALVERT *et al.*, 1982; HOQUE *et al.*, 1995) para o tratamento do TVT. A terapia com sulfato de vincristina como agente único, em aplicações semanais, é o protocolo mais efetivo, sendo necessárias de quatro a oito aplicações intravenosas para a obtenção da cura

(ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). Em tumores resistentes à vincristina, a droga de escolha é a doxorrubicina (ROGERS, 1997).

2.1.5 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

2.1.5.1 Características histológicas

Histologicamente, o TVT é composto por células redondas, arranjadas em massas compactas, agrupadas ou dispostas em cordões entremeadas por um delicado estroma vascular. As células possuem um núcleo redondo, grande e hipercromático, cromatina distintamente marginal, nucléolo proeminente e quantidade moderada de citoplasma levemente eosinofílico. Figuras mitóticas são observadas com frequência (OTOMO *et al.*, 1981; HAMIR, 1985; ROGERS, 1997). Células inflamatórias, particularmente plasmócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos podem estar presentes (ROGERS, 1997). BOSCOS *et al.* (1999) descreveram três tipos de células neoplásicas de TVT no exame histológico: redondas, ovais ou poliédricas.

2.1.5.2 Características Ultra-Estruturais

As características ultra-estruturais das células do TVT observadas por microscopia eletrônica de transmissão incluem núcleo redondo a oval, com membranas nucleares freqüentemente invaginadas por extensões citoplasmáticas, discreta cromatina nuclear, nucléolo volumoso e proeminente (COCKRILL & BEASLEY, 1975; OTOMO *et al.*, 1981; HILL *et al.*, 1984). No citoplasma, os ribossomos se encontram livres ou como polissomos e com distribuição irregular; as mitocôndrias encontram-se agrupadas e são redondas a ovais e com raras cristas (MURRAY *et al.*, 1969; AMBER *et al.*, 1985; HARME LIN *et al.*, 2002) e o complexo de Golgi é pequeno (OTOMO *et al.*, 1981).

A superfície celular apresenta um arranjo característico de projeções citoplasmáticas (WEIR *et al.*, 1978; OTOMO *et al.*, 1981; AMBER *et al.*, 1985), denominadas por KENNEDY *et al.* (1977) de *filopodia*, e de acordo com PLACKE *et al.* (1987), produzindo interdigitações entre células vizinhas, porém sem a formação de nenhum tipo de complexo juncional. HILL *et al.* (1984) observaram que estas projeções citoplasmáticas (*filopodia*) eram mais evidentes nas áreas em que as células encontravam-se unidas frouxamente, enquanto que nas áreas em que as células estavam mais unidas, as projeções limitavam-se a vilosidades curtas. Estes autores atribuíram a estas longas projeções um mecanismo de disseminação de antígeno tumoral, como forma de escape do sistema imunológico do hospedeiro. Em 1985, HILL & YANG demonstraram que estas projeções e vilosidades contêm quantidades de antígeno associado ao tumor.

AMBER *et al.* (1985) descreveram a presença de partículas icosaédricas, eletrondensas e de tamanho uniforme, confinadas ao citoplasma de células de TVT degeneradas ou necróticas, que eles supuseram ser partículas virais.

KENNEDY *et al.* (1977) publicaram um estudo detalhado do acompanhamento da evolução ultra-estrutural do TVT entre 14 e 71 dias após o implante experimental. Estes autores observaram que no início do desenvolvimento tumoral, as células apresentavam-se frouxamente arranjadas e redondas, tornando-se fortemente unidas, com aumento das interdigitações de membrana à medida que o tumor se desenvolvia, porém com o aumento de células de formato irregular, semelhantes a fibroblastos; ambos os tipos celulares degeneravam durante a regressão tumoral.

Até o momento, nenhuma característica ultra-estrutural específica foi identificada, mas os achados são consistentes com um tumor linforreticular (ROGERS, 1997).

2.1.5.3 Exame Citológico

A avaliação citológica de lesões superficiais é ferramenta extremamente útil que pode ser realizada com rapidez e facilidade, com baixo custo e risco mínimo (COWELL & TYLER, 1989). A eficácia da citologia aspirativa por agulha fina para o diagnóstico de neoplasias ou lesões inflamatórias é de 90% (ROCHA, 1998).

A citologia deve ser o método de escolha para o diagnóstico de suspeitas de TVT, pois é uma técnica simples, minimamente invasiva e indolor e, além disso, produz muito menos distorção da morfologia celular do que as amostras de biópsia fixadas por formaldeído (MILLER *et al.*, 1990; KROGER *et al.*, 1991; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). Observações semelhantes já haviam sido feitas por DALECK *et al.* (1987b), comparando diferentes métodos diagnósticos para essa neoplasia. Este exame tem sido usado largamente no diagnóstico do TVT: dos 127 casos reportados por BRANDÃO *et al.* (2002), 94,6% foram diagnosticados por exame citológico. Em artigo publicado em 2002, MEINKOTH e COWELL discorreram sobre formas de identificação dos diferentes tipos celulares e seus critérios de malignidade, abordando, entre eles, o TVT.

DUNCAN & PRASSE (1979), comentando o uso da citologia para o diagnóstico de tumores de células redondas, apontaram que em muitos casos as características citológicas foram mais definitivas para o diagnóstico que as histológicas. Os mesmos autores salientaram que a aparência citológica do TVT

é distinta dos outros tumores de células redondas, o que facilita seu diagnóstico.

O exame citológico também pode ser um auxiliar durante o ato cirúrgico (ROCHA *et al.*, 2001). A citologia esfoliativa tem sido usada durante a cirurgia de exérese do TVT para confirmar a efetiva remoção das células tumorais, obtendo redução na recorrência local do tumor de 22% para apenas 8% (BATAMUZI & KESSY, 1993). ERÜNAL-MARAL *et al.* (2000) utilizaram o exame citológico para a avaliação do período de recuperação de fêmeas caninas sob tratamento para a neoplasia.

A citologia diagnóstica adquiriu seu *status* largamente devido ao trabalho de Papanicolaou, considerado “o pai da citologia moderna”, por sua extensa pesquisa do método citológico para avaliação hormonal e sua extensão para o diagnóstico do câncer, estabelecendo as bases da citopatologia e dos critérios citológicos de malignidade (GREENINGS, 1993). COWEL & TYLER (1989) afirmaram que a citologia pode auxiliar na estimativa do potencial maligno de uma neoplasia. Eles salientaram que a presença de três ou mais critérios de malignidade, especialmente nucleares, em muitas células do tecido, são considerados altamente significativos de neoplasia maligna. Alguns dos critérios de malignidade comumente citados são macrocariose, multinucleação, nucléolos grandes ou angulares, basofilia citoplasmática ou alterações da coloração habitual, vacuolização citoplasmática, alterações na organização da cromatina e do formato nuclear e presença de mitoses normais ou anormais (COWELL & TYLER, 1989; CARTER & VALLI, 1990; WELLMAN, 1990; MEYER & HARVEY, 1998).

Segundo MCKINLEY (2004), as características celulares individuais podem ser divididas em nucleares e citoplasmáticas: o núcleo reflete o nível de atividade celular, enquanto que o citoplasma reflete a

diferenciação funcional da célula. Em decorrência, os critérios nucleares devem ser considerados indicadores mais fortes (DENICOLA & REAGAN, 1998).

Anisocitose, anisocariose e macrocariose são critérios iniciais da avaliação de um exame citológico e podem estar presentes, em algum grau, em qualquer tecido, ainda que normal (MEINKOTH & COWELL, 2002). A ocorrência de macrocitose nas amostras de tumor venéreo transmissível, genitais ou extragenitais, tem sido relatada por vários pesquisadores (CARTER & VALLI, 1990; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). O mecanismo de formação da macrocariose é associado ao aumento do conteúdo de DNA nuclear, sem a divisão celular (CARTER & VALLI, 1990; REAGAN & SOMRAK, 1993; MCKINLEY, 2004) e geralmente está relacionada ao aparecimento de hipercromia (aumento da afinidade tintorial) do núcleo.

A cor do citoplasma é dependente do estado metabólico da célula: aquelas imaturas, ou altamente ativadas, apresentam citoplasma basofílico (REAGAN & SOMRAK, 1993; DENICOLA & REAGAN, 1998). Citoplasma eosinofílico pode ser apresentado por plasmócitos ricos em imunoglobulinas dissolvidas no citoplasma, denominados de *flame cells* (HARVEY, 2001). O citoplasma das células de TVT têm sido descrito em tons variando entre incolor (DUNCAN & PRASSE, 1979; ROGERS, 1997; SANTOS *et al.*, 2001), azul claro (WELLMAN, 1990; GONZÁLEZ *et al.*, 2000b), acinzentado (MEINKOTH & COWELL, 2002) ou basofílico (ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000).

Vacuolização citoplasmática pode ser vista secundariamente a processos inflamatórios, na maioria dos tecidos (MCKINLEY, 2004). Entretanto, quando se considera o TVT, a presença de vacúolos citoplasmáticos adquire a condição de característica distintiva desta neoplasia (DUNCAN & PRASSE, 1979; ROGERS, 1997; DENICOLA & REAGAN, 1998; MEINKOTH & COWELL, 2002). Estes vacúolos apresentam-se distribuídos mais freqüentemente junto ao bordo

celular, em um arranjo tipo “ferradura” (ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000; ALBANESE *et al.*, 2002), ainda que outros tipos de arranjo possam ocorrer (DUNCAN & PRASSE, 1979). ROGERS (1997) salientou que em um pequeno número de casos os vacúolos estão ausentes, o que dificulta o diagnóstico da neoplasia (DUNCAN & PRASSE, 1979).

Os nucléolos são compostos predominantemente de proteína, especialmente RNA ribossomal e são os centros organizadores do núcleo. Desta forma, sua aparência pode ser o reflexo da função de síntese da célula (McKINLEY, 2004). O número de nucléolos está associado às atividades de transcrição e translação (CARTER & VALLI, 1990). A síntese protéica reflete-se morfológicamente nas células ativadas como presença de nucléolos múltiplos, grandes ou irregulares (McKINLEY, 2004). Ainda assim, sua presença não é exclusiva de células neoplásicas, já que podem ser vistos macronúcleolos em algumas condições benignas, como processos reparativos (REAGAN & SOMRAK, 1993). Relatos de diversos autores apontam para a presença de um ou dois nucléolos salientes nas células de TVT (DUNCAN & PRASSE, 1979; COWELL & TYLER, 1989; WELLMAN, 1990; ROGERS, 1997; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000; MEINKOTH & COWELL, 2002).

Pequenas estruturas citoplasmáticas, destacadas das células, costumam ser vistas em associação com tecido linfóide normal e neoplásico e, por isso, foram denominadas de corpúsculos linfoglandulares (McKINLEY, 2004). Segundo MEINKOTH & COWELL (2002), as células linfóides, especialmente as blásticas, são muito sensíveis e rompem-se durante a preparação dos esfregaços. Entretanto, estas estruturas também podem ser vistas em outros tecidos neoplásicos não linfóides.

O formato das células deve-se não só à sua função, mas também são importantes a ação dos microtúbulos, a rigidez da membrana

citoplasmática, a tensão da superfície celular e a pressão exercida pelas células circundantes. A pressão exercida sobre as células no tecido pode contribuir para a sua forma, já que células ovóides são observadas em tecidos com alta taxa de divisão celular (REAGAN & SOMRAK, 1993).

Em células neoplásicas, a paracromatina pode estar ampliada, conferindo uma aparência vesicular ao núcleo, já que a heterocromatina cora-se fortemente, enquanto a paracromatina não (REAGAN & SOMRAK, 1993; MCKINLEY, 2004). Segundo DENICOLA & REAGAN (1998), nas células neoplásicas a cromatina nuclear costuma encontrar-se anormalmente agregada, o citoplasma, basofílico, e as mitoses, raras em tecidos normais, são freqüentes e muitas vezes anormais. Todos autores que descreveram as características citológicas do tumor venéreo transmissível relataram a freqüência elevada de mitoses, especialmente as anormais, associadas a *lag chromatin*, que é a falta de ligação de cromátides no fuso acromático (WEIR *et al.*, 1978; DUNCAN & PRASSE, 1979; ROGERS, 1997; DENICOLA & REAGAN, 1998; ALBANESE *et al.*, 2002; MEINKOTH & COWELL, 2002).

Formas nucleares bizarras também são vistas em processos neoplásicos malignos. Por outro lado, a multinucleação não é uma forte característica de malignidade, uma vez que ela pode ser vista em uma série de tecidos normais. Porém, quando a multinucleação está associada com núcleos de tamanhos diferentes (anisocariose) dentro da mesma célula, especialmente com a presença de micronúcleos, torna-se bastante significativa (DENICOLA & REAGAN, 1998). Outra forma de alteração nuclear que pode ser observada em exames citológicos é a dos brotamentos nucleares. Estas alterações indicam pontos de alterações gênicas (amplificação gênica), e têm sido consideradas um mecanismo celular de *housekeeping*, ou seja, uma forma da célula se organizar, eliminando segmentos de DNA amplificados excessivamente, gerando

micronúcleos (SHIMIZU *et al.*, 1998). Têm sido relatados em células irradiadas (BINDU *et al.*, 2003) e em cultura de células com mutações genéticas (FENECH & CROTT, 2002). Apesar disso, na literatura citopatológica estas estruturas não costumam ser descritas.

As amostras citológicas de TVT são geralmente muito celulares e contêm células redondas ou ovais, que variam entre 14 e 30 μ de diâmetro, e bordos citoplasmáticos bem delimitados. O núcleo, redondo ou oval, é freqüentemente excêntrico, de tamanho variável, com cromatina grosseiramente granular e com um ou dois nucléolos proeminentes (WELLMAN, 1990). A relação núcleo:citoplasma é relativamente alta (BOSCOS *et al.*, 1999).

O exame citológico do tumor venéreo transmissível caracteriza-se, também, pela presença de células inflamatórias, de neutrófilos, a linfócitos e plasmócitos (ROGERS, 1997). Macrófagos também costumam estar presentes (DUNCAN & PRASSE, 1979; TINUCCI-COSTA, 1999a; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). Estudos em TVT transplantado experimentalmente observaram que a presença de maiores quantidades de linfócitos está associada aos tumores em fase de regressão (PÉREZ *et al.*, 1998; TINUCCI-COSTA, 1999a; GONZÁLEZ *et al.*, 2000a; GONZÁLEZ *et al.*, 2000b; LIAO *et al.*, 2003). CHANDLER & YANG (1981) apontaram que na fase de progressão, os linfócitos infiltrados no tumor são da linhagem B, enquanto que na fase de regressão, predominam linfócitos T. Da mesma forma, o infiltrado de macrófagos, apesar de ser em número reduzido, quando comparado ao de linfócitos, também é maior nos tumores em regressão (PÉREZ *et al.*, 1998). A este respeito, TINUCCI-COSTA (1999a) também concluiu que estas células desempenham alguma função moduladora no processo de resposta imune do hospedeiro. CHANDLER & YANG (1981) observaram uma discreta monocitose nos pacientes com tumores em regressão.

Postula-se que o TVT consegue evadir-se da ação do sistema imune, ao menos na fase inicial após o implante experimental por sua ação sobre os linfócitos. LIAO *et al.* (2003) comprovaram que as células de TVT produzem, na fase de progressão, uma substância solúvel e termo-lábil que induz a apoptose dos linfócitos B. A ação citotóxica dos linfócitos T é mediada por anticorpos (ação citotóxica mediada por anticorpos) e estes são produzidos pelos linfócitos B, que são os primeiros a infiltrar o tumor, como foi observado por CHANDLER & YANG (1981). TINUCCI-COSTA (1999a), usando marcadores imunoistoquímicos identificou linfócitos T CD3⁺ e CD8⁺, linfócitos B e macrófagos em vários estágios de ativação, infiltrando tumores primários, refratários à terapia e também em tumores transplantados experimentalmente. Desta maneira, a indução de apoptose seletiva para os linfócitos B seria um mecanismo eficiente da neoplasia desenvolver-se no hospedeiro. Adicionalmente, foi comprovado por HSIAO *et al.* (2002) que a ação dos linfócitos induz a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) dos tipos I e II pelas células neoplásicas do TVT, o que não acontece quando o tumor está em progressão.

GONZÁLEZ *et al.* (2000a, 2000b) observaram que a regressão neoplásica induzida por quimioterapia está associada ao aumento do número de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, em comparação ao infiltrado pré-quimioterápico. HILL *et al.* (1984) observaram a presença de eosinófilos infiltrados no TVT, em amostras analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Apesar da literatura sobre o tumor venéreo transmissível de ocorrência natural ou transplantado experimentalmente não se reportar sobre diferentes tipos celulares, as descrições encontradas suportam estas diferenças. Entre elas, estão a ausência dos vacúolos citoplasmáticos (ROGERS,

1997) e a presença de células maiores e ovóides em relação à morfologia típica das células de TVT (BOSCOS *et al.*, 1999). VARASCHIN *et al.* (2001) registraram que TVTs malignos apresentam citoplasma abundante. Muitas vezes o aspecto das células pode variar entre o tumor primário e a metástase (ROGERS, 1997; BOSCOS *et al.*, 1999), ou ser atípico em casos de tumores antigos (BOSCOS *et al.*, 1999). Além disso, MOHANTY & RAJYA (1977) descreveram que células de TVT *in vitro* apresentaram-se sob dois tipos morfológicamente distintos: um, de células pequenas e núcleo redondo a oval, e outro, de células grandes, com núcleo hipercromático e citoplasma acidofílico. Como morfologia e função são duas características intimamente relacionadas (WILKENING *et al.*, 2003), então as diferenças morfológicas devem ser investigadas.

Associado às modificações na morfologia está o fato de que tumores antigos não respondem bem à quimioterapia (BOSCOS *et al.*, 1999), que é mais efetiva quanto mais precoce é o diagnóstico (PÉREZ *et al.*, 1994). Uma hipótese é a existência de diferentes linhagens celulares de TVT no que diz respeito a características que influenciam seu comportamento biológico, como a habilidade em produzir eritropoietina ou em metastatizar (ROGERS *et al.*, 1998).

2.2 IMUNOCITOQUÍMICA

Considerável atenção é dada à classificação morfológica das neoplasias, numa expectativa de que isto possibilite algum valor prognóstico para o comportamento biológico e ajude na escolha de uma terapia apropriada. Inerente a esta classificação está o conceito de que a morfologia avalia a diferenciação e reflete a histogênese (WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998). A imunoistoquímica tem sido ferramenta útil para estabelecer a identificação,

classificação e prognóstico de neoplasias, possibilitando definição precisa do tipo celular, muitas vezes impossível somente pelo reconhecimento morfológico (TAYLOR & COTE, 1994), especialmente para classificar tumores indiferenciados ou de origem desconhecida (GATTER, 1989). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais facilitou a identificação de marcadores ou produtos celulares, podendo-se determinar a presença de antígenos relacionados a tipos de tecido específicos (WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998). A marcação de células por anticorpos específicos pode ser realizada tanto em tecidos em corte de congelação, como em amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina ou em amostras citológicas, em esfregaços ou preparadas por citocentrifugação. CANIATTI *et al.* (1996) realizaram a imunofenotipagem de linfomas caninos utilizando amostras colhidas por citologia aspirativa com agulha fina, suspensas em salina e preparadas por citocentrifugação, com fixação em álcool, relatando que esta técnica foi prática, barata e eficiente para o objetivo em questão.

Vários estudos mostram que anticorpos contra antígenos humanos, disponíveis comercialmente, podem ser usados para o reconhecimento de epitopos em tumores de cães e gatos (MOORE *et al.*, 1989; DESNOYERS *et al.*, 1990; THOOLEN *et al.*, 1992; WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998).

A maior necessidade para a imunofenotipagem é a determinação da célula de origem em tumores cutâneos de células redondas em cães, uma vez que o aspecto morfológico similar entre histiocitoma, linfoma cutâneo epiteliotrópico, linfoma cutâneo não epiteliotrópico, sarcoma histiocítico, mastocitoma, plasmocitoma e TVT contribui para a alta frequência de erros de diagnóstico (MOORE *et al.*, 2000).

Entretanto, poucas tentativas têm sido feitas de definir o imunofenótipo do TVT. LAGING & KRONING (1989) e BACCHI & NEGRETTE (1990) não encontraram reatividade à citoqueratina; CLEMO *et al.* (1995) não encontraram reatividade do TVT ao anticorpo monoclonal B72.3, um marcador de neoplasias epiteliais. Já SANDURSKY *et al.* (1987) encontraram expressão de vimentina, mas não de proteína S100, enolase neurônio-específica ou cadeias leves κ e λ . MOZOS *et al.* (1996) encontraram imunorreatividade à lisozima e α -1-antitripsina, que originou a hipótese de imunofenótipo histiocítico para o TVT, também aceita por GIMENO *et al.* (1995), MARCHAL *et al.* (1997) e TINUCCI-COSTA (1999a).

A vimentina é uma proteína do citoesqueleto que faz parte da família de filamentos intermediários. A maioria das células mesenquimais de mamíferos possuem vimentina como principal proteína de filamento intermediário, enquanto células musculares contêm desmina, astrócitos contêm proteína ácida fibrilar glial (GFAP), neurônios têm enolase neurônio-específica e células epiteliais têm queratina ou citoqueratina (MOORE *et al.*, 1989). LEADER *et al.* (1987) consideraram a vimentina um anticorpo sensível e específico para a marcação da derivação ou diferenciação de tecidos neoplásicos humanos. A distribuição tecido-específica dessas proteínas é mantida na maioria das neoplasias e sua detecção tem sido usada para a caracterização de células tumorais anaplásicas em seres humanos (DESNOYERS *et al.*, 1990). Mais recentemente, a superexpressão de vimentina foi sendo associada com um fenótipo invasivo em um modelo de câncer de próstata (SINGH *et al.*, 2003). Estes autores comentaram que o mesmo foi reportado em tumores de mama: a expressão de vimentina em associação com citoqueratina está relacionada a um fenótipo agressivo e metastático de neoplasia mamária, em seres humanos. Da mesma forma, HU *et al.* (2004) observaram que a

superexpressão de vimentina está ligada a um estado mais agressivo em vários tumores e no carcinoma hepatocelular está relacionada à ocorrência de metástase.

Estudos em veterinária têm confirmado a expressão de vimentina em vários tumores mesenquimais (MOORE *et al.*, 1989; GRINDEM, 1996; WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998), dentre eles o TVT (SANDURSKY *et al.*, 1987; GIMENO *et al.*, 1995; MOZOS *et al.*, 1996; MARCHAL *et al.*, 1997; TINUCCI-COSTA, 1999a).

A lisozima é uma enzima bacteriolítica de baixo peso molecular. No homem, ela é sintetizada e secretada principalmente por histiócitos, monócitos, granulócitos e algumas células epiteliais. Em cães, a distribuição desta enzima é semelhante àquela descrita em seres humanos, sendo encontrada também em macrófagos, leucócitos mielóides e células epiteliais de glândulas exócrinas, além de estar presente em desordens histiocíticas (MARCHAL *et al.*, 1997). O uso deste marcador em veterinária foi estabelecido por MOORE (1986a), que testou tecidos caninos normais, encontrando marcação semelhante à vista em medicina. Esta enzima é considerada um marcador histiocítico, sendo usada como ajuda no diagnóstico de histiocitose maligna, histiocitose sistêmica, paniculite granulomatosa e na diferenciação entre neoplasias linfóides ou epiteliais (MOORE, 1986b; THOOLEN *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1994).

Os relatos de reatividade do TVT à lisozima são conflitantes; MARCHAL *et al.* (1997) encontraram 100% de reatividade, enquanto MOZOS *et al.* (1996) encontraram reatividade em somente 40% dos casos e TINUCCI-COSTA (1999a) não encontrou reatividade em nenhum dos casos testados. Talvez possíveis explicações para esta discrepância estejam nas diferenças de pré-

tratamento das amostras ou na fixação do material (MARCHAL *et al.*, 1997; TINUCCI-COSTA, 1999a).

MARCHAL *et al.* (1997) também observaram reatividade das células de TVT com a enolase neurônio-específica (NSE) em 80% dos casos e atribuíram esta reação a uma habilidade surgida da transformação neoplásica, da mesma forma que ocorre em tumores de tireóide caninos, que expressam a NSE ainda que o tecido tireoidiano normal não apresente esta reatividade. Desta forma, estes autores consideram esta reação como não-específica de origem neuronal.

Além da positividade para vimentina e lisozima, a reatividade contra marcadores de macrófagos ACM1 (MARCHAL *et al.*, 1997), MAC-1, MAC-2 e MAC-3 (TINUCCI-COSTA, 1999a) é um forte argumento de que o TVT é um tumor mesenquimal de possível origem histiocítica. É interessante salientar que a reatividade a MAC-1 e MAC-3 foi diferente entre tumores primários, transplantados e refratários à terapia (TINUCCI-COSTA, 1999a).

Entretanto, a suposição de origem histiocítica, baseada na marcação positiva para lisozima tem sido questionada por MACLACHLAN & KENNEDY (2002) que, baseados em informações pessoais de P.F. Moore, propuseram a teoria de que as células de TVT sejam leucócitos imaturos, de provável origem mielóide, uma vez que estas células reagem positivamente com anticorpos anti-CD45 e CD45RA, marcadores panleucocitários, e por considerarem que a lisozima não é um marcador exclusivo de histiócitos.

Em 1992, O'LAUGHLIN *et al.* realizaram um estudo visando estabelecer se macrófagos (histiócitos) em diferentes condições reativas ou inflamatórias expressariam diferentes fenótipos antigênicos, demonstrando que esta variação existe entre o estado de não ativação e as condições reativas. Uma das alterações de imunofenótipo demonstradas foi a aquisição dos

antígenos identificados pelos anticorpos G16/1 e MAC387. Apesar do anticorpo anti-antígeno mielóide/histiocítico, também conhecido como MAC387, ser utilizado largamente como um marcador de histiócitos na medicina humana e veterinária (FURLONG *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2003; MUELLER *et al.*, 2004), LOFTUS *et al.* (1991) alertaram para a sua não-especificidade, já que estes autores obtiveram marcações positivas em menos de 50% das células de sarcomas de tecidos moles (à exceção dos angiossarcomas), adenocarcinomas e carcinomas de células basais. GUIGNARD *et al.* (1996) demonstraram que este anticorpo reconhece três proteínas da família S100, que provavelmente apresentam um epítipo em comum.

2.3 TESTE DO COMETA

Estudos cromossômicos de tumores humanos têm dado importantes pistas sobre a localização de genes importantes e os mecanismos pelos quais suas funções regulatórias de crescimento tenham sido alteradas. A dissecação molecular das translocações cromossômicas em neoplasias hematopoiéticas e as deleções cromossômicas em tumores sólidos têm sido particularmente úteis na demonstração do envolvimento de alguns dos previamente conhecidos oncogenes (NOWELL, 1994). Atualmente, a associação entre neoplasia e mutações genotípicas está bem estabelecida – considerando a raridade das mutações em células normais, tem sido proposto que a frequência de mutações espontâneas nas células normais não é suficiente para justificar o número de mutações encontradas nas células neoplásicas (LOEB, 2001). As alterações citogenéticas do tumor venéreo transmissível em relação ao genótipo canino normal são descritas desde a década de 1960, em tumores de ocorrência natural de diversas partes do mundo e em cultura de células (WEBER

et al., 1965; IDOWU, 1977; ADAMS *et al.*, 1981; HASLER & WEBER, 2000). A presença de uma translocação no oncogene *c-myc*, presente em amostras do tumor em três continentes (KATZIR *et al.*, 1985; AMARIGLIO *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 1999; PORTELA *et al.*, 2003), tem sido considerada a “assinatura” molecular desta neoplasia, permitindo sua identificação por técnicas como o PCR e dando suporte à teoria de que todos os casos de TVT encontrados no mundo inteiro são originados de um mesmo tumor que se disseminou ao longo de muitas e muitas gerações através do implante de células íntegras, provavelmente evoluindo junto com a espécie canina (COHEN, 1985; AMARIGLIO *et al.*, 1981; CHOI *et al.*, 1999).

O teste do cometa é uma técnica visual rápida, simples e sensível para medir e analisar quebras de DNA em células individuais de mamíferos (SINGH *et al.*, 1988). Este teste, também chamado de *single-cell gel electrophoresis* (SCGE), evidencia, sob condições alcalinas, fragmentos de DNA que migram do núcleo na eletroforese, resultando na formação de uma imagem que lembra um cometa, com cabeça e cauda, permitindo a detecção, em células isoladas, de quebras e sítios álcali-lábeis no DNA (POLI *et al.*, 1999).

A lise remove os conteúdos celulares, exceto o material nuclear. O DNA permanece superespiralado na presença de uma pequena quantidade de proteína não-histona, mas quando colocado em meio alcalino, começa a desenrolar-se a partir dos pontos de quebras de fita. Células com dano aumentado no DNA mostram migração aumentada do DNA do núcleo em direção ao ânodo, quando sob corrente elétrica, gerando a imagem com aparência de ‘cometa’ (ROJAS *et al.*, 1999). Trata-se de uma adaptação de outros métodos, como a sedimentação nucleóide e o teste do halo, e a introdução de condições alcalinas torna possível estabelecer a relação de dose com a indução de quebra e reparo de cadeia simples de DNA (MATTII *et al.*,

1998). Quando usado com pH neutro, somente quebras de cadeia duplas eram detectadas, pois nestas condições o pareamento de bases não era rompido e, assim, descontinuidades das quebras de cadeia simples não podiam ser observadas (KASSIE *et al.*, 2000). O princípio básico é que o DNA presente em todos os tipos celulares pode sofrer mutação ou recombinações sob ação de, por exemplo, ataque de radicais livres. As enzimas de reparo de DNA presentes nas células normais (endonucleases) removem estas seções lesadas do DNA. Isto deixa espaços (as quebras de cadeia) no DNA e estes é que são detectados pelo teste do cometa (HEATON & RANSLEY, 2001).

Dentre as vantagens deste teste estão a necessidade de um pequeno número de células para ser realizado e poder ser obtido em um período de algumas horas, sem a necessidade de cultura de células ou de células em divisão, como em outros testes de genotoxicidade (SINGH *et al.*, 1988). A intensidade da cauda do cometa reflete o número de quebras do DNA (COLLINS, 2004).

O teste do cometa vem sendo largamente aplicado para a avaliação de genotoxicidade e reparo de DNA, monitoramento ambiental e biomonitoramento e, ainda, em aplicações clínicas na análise de efeitos de exposição ambiental, ocupacional ou dieta (ROJAS *et al.*, 1999; KASSIE *et al.*, 2000; COLLINS, 2004). Entretanto, sua aplicação em medicina veterinária ainda é tímida, com poucos trabalhos publicados. KREJA *et al.* (1996) utilizaram-no para avaliar o efeito da irradiação sobre as células medulares e do sangue periférico em cães; HEATON & RANSLEY (2001) aplicaram o teste do cometa na análise do efeito protetor de dietas suplementadas com antioxidantes sobre as células sangüíneas de gatos; ALVES (2001) e ALVES *et al.* (2004) avaliaram o efeito da cistite bacteriana aguda sobre o DNA das células vesicais, utilizando este teste, concluindo que processos agudos não provocam alterações no DNA.

Atualmente o teste do cometa é o único método disponível com sensibilidade suficiente para detectar lesões iniciais de DNA em células individuais e o possível reparo deste dano. O teste baseia-se no princípio de que o DNA contendo mais quebras irá migrar uma distância maior no campo eletroforético devido à massa de menores fragmentos. Desta forma, a migração do DNA fragmentado no gel reflete claramente a extensão do dano genômico (RICHEUX *et al.*, 1999).

Tem sido descrito que populações de células expostas a agentes indutores de cometas podem reparar as falhas do seu DNA e isto pode ser verificado com a repetição do teste em intervalos após a exposição (MATTII *et al.*, 1998). Estes autores utilizaram o teste do cometa para avaliar a resistência multidroga em duas linhagens de células de leucemia humana, confirmando que este teste é adequado para prever a quimiorresistência celular.

WILKENING *et al.* (2003) utilizaram recentemente o teste do cometa como parte de um protocolo de comparação do metabolismo de pró-mutagênicos entre hepatócitos humanos normais e uma linhagem celular de hepatoma, observando que as células normais são mais sensíveis a este tipo de lesão e, portanto, apresentam mais lesões no DNA após o tratamento. BALTACI *et al.* (2003) estudaram a extensão do dano de DNA em adenocarcinomas colorretais, avaliado pelo teste do cometa, encontrando diferença significativa entre as células neoplásicas e os controles. Entretanto, no que diz respeito ao TVT, não existe um tecido normal que possa servir de controle negativo, já que a origem histológica desta neoplasia ainda não foi estabelecida.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), *campus* Botucatu (Anexo A). No seu desenvolvimento foram utilizados, para a composição do grupo-estudo, 132 cães, sem restrição de sexo, idade ou raça, com diagnóstico clínico e citológico de tumor venéreo transmissível, atendidos no Hospital Veterinário ou abrigados no Biotério Central, entre março de 2002 e setembro de 2004. A inclusão dos pacientes foi condicionada ao consentimento escrito dos proprietários (Anexo B), após o esclarecimento sobre o protocolo experimental, o qual incluiu exames clínicos e laboratoriais e acompanhamento durante a quimioterapia.

3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

O protocolo experimental incluiu estudo epidemiológico baseado nas informações fornecidas pelos proprietários sobre história clínica pregressa, hábitos de criação, histórico reprodutivo, animais-contato e densidade populacional na residência. Como parte da propedêutica semiológica, foram obtidas informações sobre tratamentos prévios para a neoplasia, incluindo doses e datas de aplicação. O tempo de evolução do

processo neoplásico foi estimado pela data de início da apresentação dos sinais clínicos até o momento do diagnóstico. Avaliação física geral e exame específico da área afetada pela neoplasia, com a medição do tumor em seu ponto de maior diâmetro e a avaliação de linfonodos regionais faziam parte do protocolo aplicado a todos os pacientes.

Avaliação hematológica era obrigatoriamente realizada antes da instituição da quimioterapia. Quando indicado por achados de anamnese ou exame físico, exames de diagnóstico por imagem (radiológico e/ou ultrassonográfico) e análises laboratoriais de bioquímica sanguínea também foram realizadas. O Anexo C apresenta a ficha do protocolo semiológico.

Os dados clínicos e de exames auxiliares foram utilizados para a classificação dos tumores primários pelo sistema TNM recomendado pela World Health Organization (WHO). Este sistema é amplamente utilizado na medicina humana como uma forma de categorizar os casos de câncer pela extensão da doença, mas pouco na veterinária, tendo sido recentemente aplicado em tumores de mama (BURINI, 2002; HATAKA, 2004).

Adotou-se uma adaptação da classificação sugerida por OWEN (1980) para a classificação TNM dos tumores em animais domésticos de acordo com os locais anatômicos específicos (genitália externa, cavidade nasal/seios e pele), conforme apresentado na Tabela 1. A classificação TNM detalhada para estes locais está no Anexo D.

A droga de eleição para o tratamento quimioterápico foi o sulfato de vincristina, na dose de 0,75 mg/m² de superfície corporal, aplicado a cada sete dias, por via intravenosa obrigatória. A duração do tratamento variou entre quatro a oito semanas, a depender da evolução do quadro, reavaliado semanalmente.

TABELA 1 – Aplicação do TNM no tumor venéreo transmissível canino primário.

GENITÁLIA EXTERNA			
<i>T (Tumor primário)</i>		<i>N (linfonodo regional)</i>	
T0	ausência de tumor	N0	ausência de envolvimento
T1	tumor até 3cm	N1	nodo ipsilateral móvel
T2	tumor até 5cm	N2	nodo bilateral móvel
T3	tumor maior que 5cm ou profundo	N3	nodo fixo
T4	invasão local		
CAVIDADE ORAL / CAVIDADE NASAL / SEIO			
<i>T (Tumor primário)</i>		<i>N (linfonodo regional)</i>	
T0	ausência de tumor	N0	ausência de envolvimento
T1	tumor unilateral, destruição óssea ausente ou mínima	N1	nodo ipsilateral móvel
		N1a	sem crescimento
		N1b	com crescimento
T2	tumor bilateral ou destruição óssea moderada	N2	nodo bilateral móvel
		N2a	sem crescimento
		N2b	com crescimento
T3	invasão local	N3	nodo fixo
PELE			
<i>T (Tumor primário)</i>		<i>N (linfonodo regional)</i>	
T0	ausência de tumor	N0	ausência de envolvimento
T1	tumor <2cm, superficial	N1	nodo ipsilateral móvel
		N1a	sem crescimento
		N1b	com crescimento
T2	tumor entre 2-5cm ou com invasão mínima	N2	nodo bilateral móvel
		N2a	sem crescimento
		N2b	com crescimento
T3	tumor >5cm ou invadindo subcutâneo	N3	nodo fixo
T4	invasão de estruturas profundas (fáscia, osso, cartilagem)		
<i>M (Metástase)</i>			
M0	ausência de metástase		
M1	metástase para outro órgão ou sistema		

* Adaptado de OWEN, L.N. World Health Organization TNM classification of tumors in domestic animals. Geneva : WHO, 1980.

A partir dessas informações, cada massa tumoral foi classificada de acordo com sua localização, comportamento biológico, tempo

de evolução e tamanho, sendo consideradas como UNIDADES EXPERIMENTAIS, conforme se segue:

- De acordo com a localização: *genitais* ou *extragenitais*;
- Quanto ao comportamento biológico: *primários*, *metastáticos* ou *recorrentes*;
- Com relação à evolução clínica: *recentes* (com até três semanas de evolução), *estabelecidos* (com três a oito semanas de evolução) ou *antigos* (com mais de oito semanas);
- De acordo com o tamanho: *pequenos*, *médios* e *grandes*, sendo estas categorias estabelecidas com base em avaliação visual ou palpação, como uma estimativa aproximada do eixo de maior diâmetro, na qual as massas pequenas eram menores que 3cm e as grandes, maiores que 5cm.

3.3 TÉCNICA CITOPATOLÓGICA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Nos cães com diagnóstico confirmado de tumor venéreo transmissível eram colhidas amostras da neoplasia por citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) para confecção de preparados citológicos utilizados para a caracterização citomorfológica e avaliação dos critérios de malignidade. Para tanto, foram utilizadas seringas descartáveis de 10ml, agulhas descartáveis e citoaspirador de Valeri. Após a anti-sepsia local, foi realizada a punção da massa seguida da aplicação de pressão negativa, fazendo-se o reposicionamento da agulha sem que ela saísse da massa tumoral. A seguir, a pressão negativa era relaxada e a agulha retirada da massa; a agulha era então desacoplada da seringa, aspirando para dentro da mesma um pequeno volume de ar, suficiente para expulsar o conteúdo da agulha sobre lâminas de

microscopia com extremidade fosca, procedendo-se imediatamente à extensão do material (COWEL & TYLER, 1989). Duas lâminas ainda úmidas eram imersas em etanol 95% para coloração pelo método de Shorr, enquanto outras duas eram deixadas secar ao ar, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa, para a avaliação citomorfológica.

Padronizou-se a utilização de agulha de calibre 24 $\frac{3}{4}$ G independentemente do tamanho do tumor a ser aspirado, pois o uso de agulhas mais calibrosas provocava excessiva contaminação do material colhido com sangue, já que o tumor venéreo transmissível é bastante friável e vascularizado, especialmente nas lesões genitais. Nos casos em que a visualização da massa genital não era possível, assim como em casos de massas intranasais, utilizou-se escova ginecológica como forma de colheita de células.

Um segundo aspirado foi realizado, desta vez suspendendo-se as células em 1,5ml de PBS livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ gelado. A amostra era imediatamente acondicionada em gelo e protegida da luz, requisitos fundamentais e necessários para a realização do teste do cometa. Esta suspensão de células também foi utilizada para a confecção de oito lâminas, com auxílio de citocentrífuga, com velocidade entre 550 e 600 rpm, durante três minutos. As lâminas histológicas com o botão de células centrifugadas foram então armazenadas em etanol 95% para realização das técnicas de imunocitoquímica. As amostras de citocentrifugado mostraram-se mais adequadas que os esfregaços diretos, pois apresentavam menor marcação de fundo na imunocitoquímica.

Em alguns casos, fragmentos tumorais se desprenderam da massa neoplásica durante o exame clínico e foram utilizados para confeccionar preparados citológicos pela técnica de impressão. Estas lâminas foram também

fixadas e mantidas em etanol 95% até o processamento da técnica de imunocitoquímica. Os fragmentos remanescentes foram fixados em formalina tamponada 10% e processados como de rotina para a realização de exame histopatológico (HE). Da mesma forma, animais encaminhados ao Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP e que apresentavam esta neoplasia tiveram amostras citológicas colhidas por impressão, seguindo-se a necropsia e processamento para histopatologia.

3.4 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA

3.4.1 VERIFICAÇÃO DO PADRÃO CITOMORFOLÓGICO

PREDOMINANTE

As preparações citológicas coradas pelo Giemsa foram analisadas em microscopia óptica, para inclusão dos tumores em um dos grupos experimentais, de acordo com as características do tipo celular predominante, da seguinte forma:

- Grupo L (LINFOCITÓIDE): predomínio de 60% ou mais de células de TVT típicas, ou seja, com morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, com presença de vacúolos que acompanham a periferia da célula, núcleo redondo com cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos salientes (Figura 1A).
- Grupo P (PLASMOCITÓIDE): predomínio de 60% ou mais de células de TVT com morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor relação núcleo:citoplasma), com núcleo localizado excentricamente (Fig 1B).
- Grupo M (MISTO): celularidade mista entre os tipos celulares linfocitóide e plasmocitóide, em que nenhum ultrapassou 59% do total.

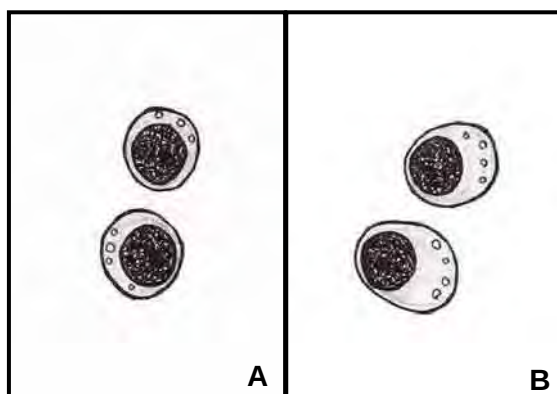


FIGURA 1 - Esquema dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível canino: linfocitóide (**1A**) e plasmocitóide (**1B**).

Os esfregaços corados pelo Giemsa foram avaliados inicialmente com objetiva de 10x para verificação da celularidade da amostra, padrão de coloração e distribuição das células. A seguir, procedia-se à observação em aumentos progressivos de 250x e 400x para o detalhamento das características celulares, contagem de células e verificação das

características de malignidade (ver próximo item). Após a varredura inicial, as áreas com melhor padrão de distribuição celular e coloração eram analisadas em 400x, sendo contados em cada lâmina no mínimo dez campos aleatórios não sobrepostos para a obtenção da classificação do tipo celular predominante. A análise citomorfológica detalhada e cuidadosa foi feita com auxílio de uma ocular reticulada (grade de integração 100/25, com 25mm² de área), que delimitava o campo de contagem celular. Foram contadas ao menos cem células de cada amostra; as células selecionadas eram categorizadas de acordo com a morfologia em linfocitóides ou plasmocitóides e, a seguir, os critérios de malignidade apresentados por elas eram anotados; finalmente, as células inflamatórias presentes no campo eram identificadas e contadas.

3.4.2 DETERMINAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE

Simultaneamente à avaliação para a classificação em tipos citológicos, os esfregaços foram analisados quanto à apresentação de características de malignidade. Foram utilizadas as lâminas coradas pelo Giemsa como base de avaliação, complementada pela análise das lâminas coradas pelo Shorr para observação mais detalhada das características nucleares e nucleolares.

Apesar de amplamente utilizados na citopatologia humana, estas observações têm recebido pouca atenção na literatura veterinária. Desta forma, os critérios pesquisados aqui foram na sua maior parte extrapolados da literatura médica disponível. O protocolo utilizado para esta avaliação encontra-se detalhado no Anexo E.

As características de malignidade foram divididas em gerais, citoplasmáticas, nucleares e nucleolares. As CARACTERÍSTICAS GERAIS incluíram

aquelas que dizem respeito à amostra como um todo, como: padrão de cromatina predominante, anisocitose, anisocariose, macrocariose, basofilia ou eosinofilia citoplasmática e, especificamente na neoplasia em estudo, presença de vacúolos citoplasmáticos e seu padrão de distribuição nas células. Neste grupo foi também avaliada a presença ou não de corpúsculos linfoglandulares e de um padrão específico de arranjo de cromatina, denominado de arranjo polar, no qual os pólos opostos do núcleo celular apresentavam uma área concentrada de paracromatina. Tal observação não teve equivalente na literatura consultada. Ainda neste grupo foi observado o número de nucléolos apresentado pela maioria das células.

Para avaliação da cromatina nuclear foram estabelecidos quatro padrões distintos, em graus progressivos de granulação: *densa*, *granular*, *grosseira* e *frouxa*. Os vacúolos citoplasmáticos foram avaliados pela distribuição (*regular* ou *irregular*) e o *percentual* de células vacuolizadas. Corpúsculos linfoglandulares e arranjo polar foram avaliados em termos de *presentes* ou *ausentes*. Os demais critérios gerais foram avaliados como *ausentes*, *discretos*, *moderados* ou *intensos*. A Figura 2 ilustra as características de malignidade gerais estudadas.

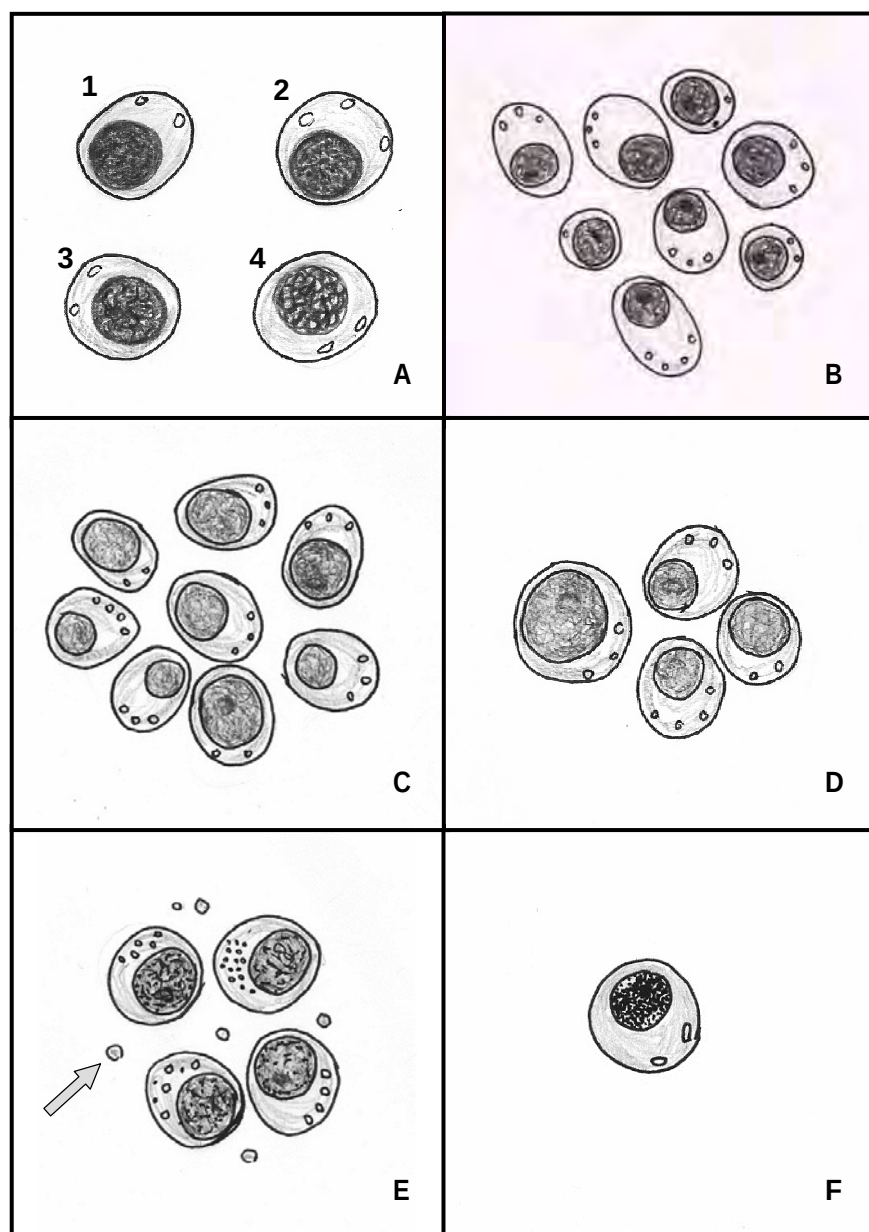


FIGURA 2 - Características gerais de malignidade avaliadas nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. **A**: cromatina densa (**A1**), granular (**A2**), grosseira (**A3**) e frouxa (**A4**); **B**: anisocitose; **C**: anisocariose; **D**: macrocariose; **E**: padrão de distribuição dos vacúolos citoplasmáticos e presença de corpúsculos linfoglandulares (seta); **F**: arranjo polar da paracromatina nuclear.

Foram avaliadas também as CARACTERÍSTICAS CITOPLASMÁTICAS, principalmente aquelas relacionadas à alteração da forma celular, como a

presença de células em fibra, células girino, presença de projeções citoplasmáticas (células amebóides) e células nuas (núcleos íntegros sem citoplasma visível). Observou-se também a ocorrência de fagocitose, canibalismo, células em anel de sinete e espessamento de membrana citoplasmática (Figura 3). Todas as observações foram quantificadas em termos de número de células apresentando a característica na população contada, para a expressão de número relativo (%).

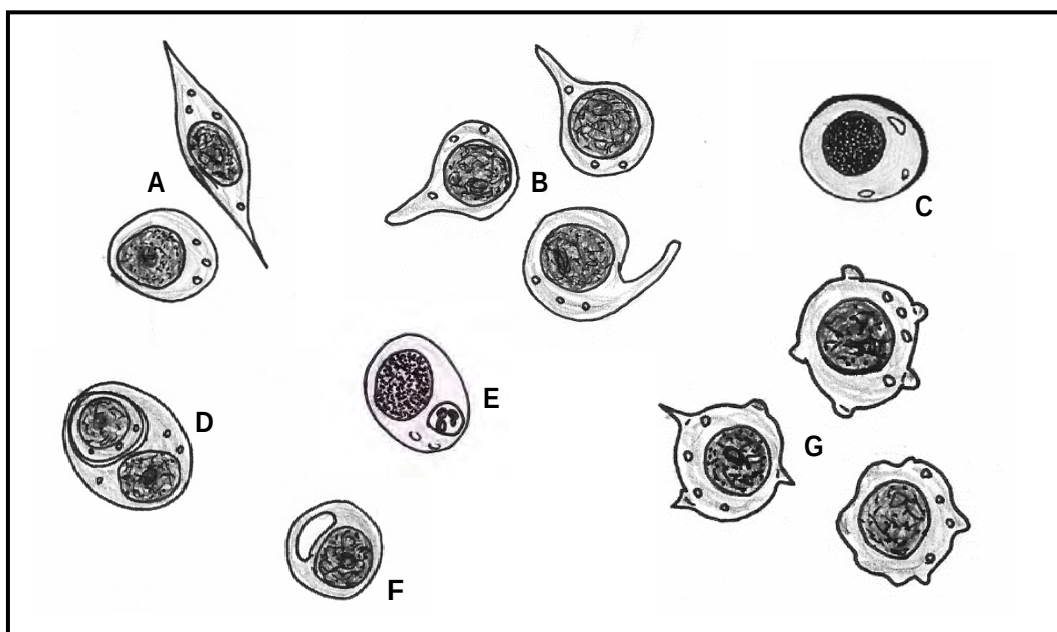


FIGURA 3 - Esquema dos critérios citoplasmáticos de malignidade avaliados nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. A: célula em fusão; B: células girino; C: espessamento de membrana citoplasmática; D: canibalismo; E: fagocitose; F: célula em anel de sinete; G: projeções citoplasmáticas.

Os CRITÉRIOS NUCLEARES de malignidade observados incluíram hipercromasia, pseudoinclusões nucleares (vacúolos nucleares), presença de núcleos riniformes, brotamentos nucleares, lobulação nuclear, binucleação, multinucleação e micronucleação, espessamento de membrana nuclear e presença de halo perinuclear. A ocorrência de anormalidades como projeções nucleares (brotamentos e espículas nucleares) e a presença de mitoses normais

e anormais (Figura 4) também foram avaliadas. Da mesma forma como para as alterações citoplasmáticas, todas as observações foram quantificadas em termos de número de células apresentando a característica na população contada, para a expressão de número relativo (%).

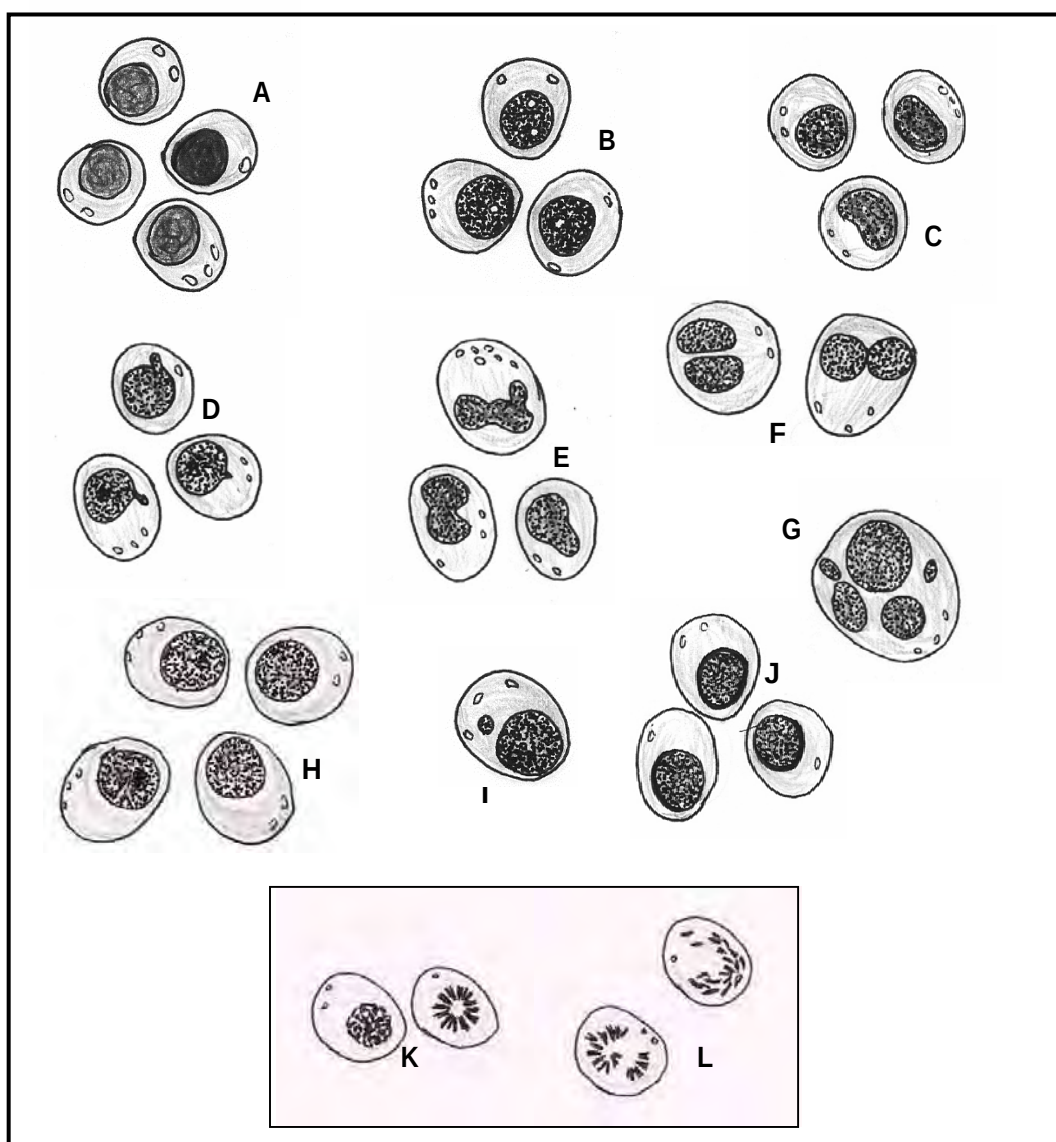


FIGURA 4 - Critérios nucleares de malignidade analisados nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. **A:** hipercromasia; **B:** pseudoinclusões (vacúolos nucleares); **C:** núcleos riniformes; **D:** brotamentos nucleares; **E:** lobulações nucleares; **F:** binucleação; **G:** multinucleação; **H:** halo perinuclear; **I:** micronucleação; **J:** espessamento de membrana nuclear; mitoses: normais (**K**) e anormais (**L**).

Os CRITÉRIOS NUCLEOLARES de malignidade avaliados foram anisonucleose, nucléolos angulares, macronucléolos e presença de halo perinucleolar. Mais facilmente evidenciados nas lâminas coradas pelo método de Shorr, estes critérios foram anotados como *presentes* ou *ausentes*.

3.4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de preparados histológicos e citológicos de nove tumores (três de padrão plasmocitóide, dois linfocitóides e quatro mistos) foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Unesp – campus de Botucatu, com o objetivo de identificar possíveis diferenças entre as morfologias celulares.

As células neoplásicas foram colhidas por citologia aspirativa com agulha fina e suspensas imediatamente em glutaraldeído 2,5% por 24 horas, centrifugadas e o *pellet* processado como fragmento de tecido. Também foram obtidos fragmentos de tecido neoplásico por biópsia, os quais foram fixados por imersão em solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% (tampão fosfato 0,1M e pH 7,3), onde ficaram por até 24 horas. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão. Os fragmentos foram então desidratados em acetona por passagens sequenciais crescentes (50%, 75%, 95% e 100%), impregnados e incluídos em Araldite.

Foram obtidos cortes semifinos (0,5µm) com ultramicrotomo, os quais foram então corados com azul de metileno/azur II e observados em microscopia óptica para a escolha das melhores áreas para os cortes ultrafinos.

Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, examinados e fotografados em microscópio

eletrônico de transmissão¹, operado a 80kV. A técnica de processamento para microscopia eletrônica está detalhada no Anexo F.

3.5 IMUNOFENOTIPAGEM

Com os preparados citológicos fixados em álcool etílico 95% foi realizada coloração imunocitoquímica com os anticorpos antivimentina² (clone Vim 3B4), antilisoizima³, anti-CD-163⁴ (clone Ber-MAC3) e antiantígeno mielóide/histiocítico⁵ (clone MAC 387).

Como os anticorpos utilizados são monoclonais anti-humano (exceção feita ao anticorpo antilisoizima, policlonal), houve necessidade da padronização para sua utilização em tecidos de cães. Para tanto, foram testadas várias formas de recuperação antigênica, vários tempos de bloqueio de peroxidase endógena e outros bloqueios para a redução de marcações inespecíficas, concentração ideal do anticorpo primário, tempo e temperatura de incubação e sistema de anticorpo secundário utilizados, visando à obtenção de marcações nítidas e com reduzida marcação de fundo.

Foram testados como formas de recuperação antigênica tampão citrato 10μMol (pH 6) em microondas e tampão EDTA (pH 8 e pH 9) em banho-maria a 96°C. Como regra, testava-se inicialmente a recuperação antigênica com tampão citrato em microondas por 15 minutos; se o resultado

¹ Microscópio Eletrônico de Transmissão Phillips CM100.

² Anticorpo monoclonal IgG2, kappa, anti-vimentina de camundongo. DAKO-Vimentin cód. M 7020. DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca.

³ Anti-lisoizima humana de coelho, fração Ig. Muramidase, cód. A 099, DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca.

⁴ Anti-CD-163 humano de camundongo, clone Ber-MAC-3, monoclonal, código M 0794. DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca.

⁵ Anti-antígeno mielóide/histiocítico humano de camundongo, monoclonal, código M 0747.

não fosse considerado satisfatório, passava-se então ao uso do tampão EDTA, pH 8, em banho-maria por trinta minutos e, por último, se necessário, tampão EDTA pH 9, em banho-maria, por trinta minutos. A recuperação antigênica padronizada para cada anticorpo está relacionada na Tabela 2.

Para o bloqueio de peroxidase endógena utilizou-se tanto água oxigenada 20 volumes, diluída a 1:1 com água destilada na hora do uso, quanto água oxigenada 10 volumes, obtendo-se os mesmos resultados. Também foram testados bloqueios de marcação inespecífica (BSA 2%, por 1 hora em temperatura ambiente), bloqueios de proteína (*kit* CSA¹) e de avidina e biotina².

A incubação padrão dos anticorpos primários era 18 horas a 4°C; entretanto, alguns anticorpos apresentaram melhor resultado de marcação quando incubados por períodos mais curtos (Tabela 2). Para chegar a esta conclusão, foram testados períodos de incubação de 2 horas em temperatura ambiente e a 37°C e de 30 minutos em temperatura ambiente e a 37°C.

Os anticorpos antivimentina e antilisozima mostraram melhores resultados quando foi utilizado o *kit* ABC³ como sistema de anticorpos secundários biotinilados. Para os demais anticorpos foi utilizado o sistema EnVision⁴ como anticorpo secundário.

DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca.

¹Catalyzed Signal Amplification (CSA) System, código K1500. DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca.

²DAKO Biotin Blocking System, código X0590, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

³StreptABComplex/HRP Duet, Mouse/Rabbit. DakoCytomation. Glostrup, Dinamarca.

⁴DakoCytomation EnVision + Dual Link System, Peroxidase. Código K4061. Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

TABELA 2 – Padronização da técnica de imunocitoquímica para os diversos anticorpos utilizados na marcação do tumor venéreo transmissível.

ANTICORPO	VIMENTINA	LISOZIMA	CD163	MIEL/HIST
CLONE	Vim 3b4	EC 3.2.1.17	Ber-MAC3	MAC387
TIPO	monoclonal	policlonal	monoclonal	monoclonal
CONCENTRAÇÃO	1:150	1:300	1:100	1:200
INCUBAÇÃO				
TEMPO	18 horas	18 horas	30 minutos	30 minutos
TEMPERATURA	4°C	4°C	37°C	37°C
RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA				
TAMPÃO	citrato	citrato	EDTA	EDTA
PH	6,0	6,0	8,0	8,0
LOCAL	microondas	microondas	banho-maria	banho-maria
TEMPO	15 minutos	15 minutos	30 minutos	30 minutos
BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA (ÁGUA OXIGENADA 10 VOLUMES)				
TEMPO	2x15 minutos	2x15 minutos	2x15 minutos	2x15 minutos
BLOQUEIO DE MARCAÇÕES INESPECÍFICAS (BSA 2%)				
TEMPO	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora
TEMPERATURA	ambiente	ambiente	ambiente	ambiente
SISTEMA DE DETECÇÃO E AMPLIFICAÇÃO				
	ABC	ABC	EnVision®	EnVision®
CROMÓGENO (DAB)				
TEMPO	3min	1min30seg	5min	5min
NÚMERO DE AMOSTRAS				
LINFOCITÓIDES	19	25	20	21
PLASMOCITÓIDES	21	23	23	24
MISTAS	37	38	30	31
TOTAL	77	86	73	76

Em linhas gerais, as lâminas foram processadas para a técnica de imunocitoquímica pelo complexo streptavidina-biotina, da seguinte maneira:

As preparações citológicas mantidas em álcool etílico 95% foram hidratadas por um banho em álcool 85% por cinco minutos, seguido por

banho em água corrente durante dez minutos e duas passagens em água destilada. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada dez volumes, novo banho de dez minutos em água corrente, seguido de outros dois banhos de água destilada.

O passo seguinte era a recuperação antigênica, realizada em microondas na potência máxima, mantendo-se as lâminas em tampão citrato¹ pH 6 em cubas horizontais, não cruzadas e em recipiente com tampa apropriado para o uso em microondas, ou em banho-maria a 96°C, com tampão EDTA² pH 8, conforme as exigências de cada anticorpo.

Após a recuperação antigênica, as lâminas eram deixadas em repouso mergulhadas no tampão, durante 20-30 minutos, para diminuição da temperatura e, após esfriarem, submetidas a dez banhos com água destilada e um banho em tampão tris pH 7,2³.

As lâminas foram então secas, a área com o material delimitada com caneta⁴ e transferidas para uma bandeja com tampa, tendo-se o cuidado de manter sempre as células umedecidas com tampão tris. Nesse momento fazia-se a incubação com BSA 2% por uma hora em temperatura ambiente, para bloquear marcações inespecíficas.

O BSA 2% era aspirado e os anticorpos primários na diluição apropriada (em BSA 1%) eram então aplicados sobre as lâminas e incubados em câmara úmida pelo tempo e temperatura padronizados (Tabela 2). Seguiam-se duas lavagens em tris e incubação com anticorpo secundário por trinta minutos em temperatura ambiente. Após duas lavagens com tris era aplicado o

¹ 2,1g ácido cítrico monoidratado; 1l de água destilada.

² 0,3722g ácido etilenodiaminotetraacético; 1l de água destilada.

³ 8,5g NaCl; 6g trizma base; 1l de água destilada, ajustando pH em 7,4.

⁴ Dako DakoCytomation Pen. DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca.

anticorpo secundário biotilado ou EnVision, incubado por trinta minutos em temperatura ambiente e novamente lavados com dois banhos de tris.

Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno 3'-3' diaminobenzidina¹ líquido na diluição recomendada pelo fabricante, durante um a cinco minutos (Tabela 2), ao abrigo da luz, seguindo-se a lavagem das lâminas durante dez minutos em água corrente.

A contracoloração era feita com hematoxilina de Harris por um minuto, seguindo-se lavagem em água corrente, desidratação progressiva em álcoois, diafanização em xilol e montagem em Permount².

Foram utilizados controles positivo e negativo para os anticorpos CD163 e MAC387, para comparação da marcação nas células de TVT. Para o anticorpo CD163 foi utilizado como controle positivo impressão de linfonodo e para o anticorpo MAC387 utilizou-se esfregaço de processo inflamatório, além de serem usados como controles positivos internos, para cada lâmina, a marcação apresentada pelos macrófagos (ambos anticorpos) e neutrófilos (CD163). Os controles negativos para ambos anticorpos foram preparados citológicos de TVT no qual não foi utilizado anticorpo primário, somente o diluente.

A avaliação da imunomarcação para vimentina e lisozima foi realizada em microscópio óptico sob objetiva de 40x e classificada pela quantidade de células marcadas como: - (até 25% das células marcadas), + (25-50% das células marcadas), ++ (50-75% das células marcadas) ou +++ (acima de 75% de marcação). A intensidade da marcação foi avaliada como discreta (+), moderada (++) , intensa (+++) ou muito intensa (++++).

¹ DAB líquido Dako. DakoCytomation. Carpinteria, CA, USA.

² Fischer, EUA.

A avaliação da imunorreatividade aos anticorpos CD-163 e anti-antígeno mielóide/histocítico foi realizada através do programa Image-Pro Plus, versão 4.1¹. Para tal, as lâminas foram observadas em microscópio óptico Leica DMR sob objetiva de 40x. O microscópio acoplado à câmera Sony CCD - IRIS / RGB envia as imagens para o programa computacional, procedendo-se à contagem das células marcadas identificadas no monitor de vídeo. Para tanto, foram capturadas imagens de dez campos aleatórios e não contíguos, sendo contadas um número superior a cem células/lâmina. O percentual de células neoplásicas marcadas/lâmina era registrado e convertido de acordo com o escore:

- <10% de células positivas: negativo (-);
- 10-25% de células positivas: +;
- 26-50% células positivas: ++;
- 51-75% de células positivas: +++;
- >75% de células positivas: ++++.

3.6 AVALIAÇÃO DE DANOS DE DNA

3.6.1 TESTE DO COMETA

O teste do cometa foi realizado ao abrigo da luz sob condições alcalinas como reportado por SINGH et al. (1988); a técnica deste teste está detalhada no Anexo G.

Após a colheita das células e sua suspensão em PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} gelado e ao abrigo da luz, a amostra era homogeneizada e 7,5µl da suspensão eram misturados a 100µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%),

¹ Media Cybernetics. Silver Spring, MD, USA.

misturados delicadamente, estendidos sobre uma lâmina de vidro pré-revestida com agarose normal, cobertos com lamínula e mantido a 4°C por cinco minutos para solidificar. Após este período, a lamínula era retirada gentilmente e as células eram lisadas por imersão em NaCl₂ 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. Para cada amostra, eram feitas lâminas em triplicata como material de reserva em caso de problemas na técnica.

A viabilidade das amostras era verificada pela mistura de 10µl da suspensão de células com igual volume de azul de tripan, homogeneizadas e contadas em câmara de Newbauer. Amostras com viabilidade inferior a 65% foram descartadas.

Após o período mínimo de 24 horas na solução de lise, as lâminas eram deixadas repousar em solução alcalina (pH > 13) por 20 minutos e submetidas à corrida eletroforética a 0,66 V/cm por 20 min. Utilizou-se, para cada bateria de eletroforese, um controle negativo e um controle positivo. O material controle era sangue de cão sadio, colhido com anticoagulante¹, acondicionado em gelo e ao abrigo da luz e processado da mesma maneira descrita para as células neoplásicas. A lâmina controle positivo era tratada com uma solução de água oxigenada 100 µM a 4°C, imediatamente antes da eletroforese, para indução de dano no DNA e permitir a avaliação de cada corrida eletroforética.

Após a eletroforese, as lâminas eram então neutralizadas, fixadas em etanol absoluto, coradas com brometo de etídio e analisadas em

¹ EDTA.

microscópio de fluorescência com filtro de 516-560nm e filtro de barreira de 590nm.

As células, 50 por amostra, foram analisadas quanto à intensidade de fluorescência da cauda do cometa, refletindo a intensidade dos danos de DNA, avaliados por análise de imagem digitalizada¹, no Laboratório do Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Unesp Botucatu.

3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram analisados no Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Botucatu, São Paulo.

Para a comparação entre a morfologia de células do TVT com características epidemiológicas (localização, tempo de evolução e tamanho do tumor) e comportamento biológico (massas primárias e não primárias), foram utilizados testes de associação baseados na estatística Qui-quadrado (ZAR, 1996).

As observações de características de malignidade foram comparadas com a morfologia celular usando o teste não-paramétrico de comparação por *ranks* Kruskal-Wallis, com nível de significância $\alpha=0,05$. Os critérios gerais de malignidade (anisocitose, anisocariose, macrocariose, vacúolos citoplasmáticos, basofilia, eosinofilia, padrão de cromatina) e corpúsculos linfoglandulares, arranjo polar e número de nucléolos foram submetidas ao teste estatístico para contrastes entre proporções multinominais

¹ Comet Assay II, Perceptive Instruments, UK.

de Goodman (GOODMAN, 1964). Os demais critérios de malignidade e infiltrado inflamatório foram analisados por Kruskal-Wallis. Os dados foram recombinaados e agrupados por massas primárias e não-primárias ou genitais e extra-genitais e comparados pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância $\alpha=0,05$.

As diferentes marcações imunocitoquímicas foram analisadas pelo teste de Goodman entre os grupos L, P e M: para os anticorpos anti-vimentina e antilisoizima foram avaliados percentual de marcação (menos de 50% e mais de 50% das células) e intensidade de marcação: marcação fraca (escores + e ++) e marcação forte (+++ e ++++). Os marcadores de macrófagos anti-CD163 e MAC387 foram comparados como positivos e negativos entre os grupos L, P e M, considerando-se positivos os tumores com duas a quatro cruzes. Também foi feita análise com os testes não paramétricos de comparação por *ranks* usando-se o percentual de células positivas.

Para as variáveis quantitativas como o teste do cometa, os grupos de morfologia celular foram comparados pela utilização de análise de variância para dados não paramétricos e com a aplicação do teste de Dunn para a identificação de diferenças entre os grupos (ZAR, 1996).

4 RESULTADOS

Dos 132 animais estudados, 79 eram provenientes de Botucatu; os demais eram de cidades vizinhas, como São Manuel, Lençóis Paulista, Areiópolis, Barra Bonita e várias outras, representando a área de abrangência do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP de Botucatu, conforme mostrado na Figura 5. Três animais do Biotério Central tinham a cidade de procedência desconhecida.



FIGURA 5 - Cidades de origem dos casos de tumores venéreos transmissíveis incluídos no estudo, mostrando a área de influência da FMVZ-UNESP de Botucatu.

4.1 PROPEDÊUTICA SEMIOLÓGICA

4.1.1 SEXO, IDADE E RAÇA

O grupo experimental foi constituído por 60 machos e 72 fêmeas, com idades variando entre um e 18 anos, sendo que 40% dos animais estavam concentrados na faixa entre dois e quatro anos. Dezesete animais, todos adultos, tinham idade desconhecida. A distribuição dos casos por faixa etária está na Figura 6.

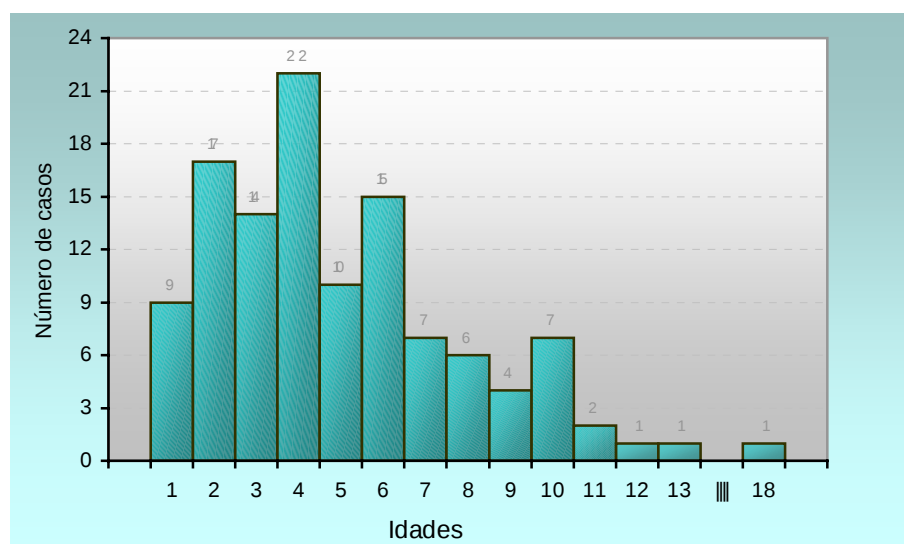


FIGURA 6 - Frequência dos casos de tumores venéreos transmissíveis estudados, por idade.

Com relação à raça, a maioria dos animais era sem raça definida (79%). A distribuição dos casos, por raça, observada no experimento está na Tabela 3.

TABELA 3 - Raças dos pacientes diagnosticados com tumor venéreo transmissível durante o período experimental.

RAÇA	NÚMERO DE CASOS	%
Poodle	6	4,5
Boxer	5	3,7
Pastor Alemão	3	2,3
Cocker	2	1,5
Fila Brasileiro	2	1,5
Fox Paulistinha	2	1,5
Pointer	2	1,5
Dachshund	1	0,8
Dálmata	1	0,8
Husky Siberiano	1	0,8
Sheepdog	1	0,8
Rottweiler	1	0,8
Pastor Belga	1	0,8
SRD*	104	78,7
TOTAL	132	100

* sem raça definida

4.1.2 PERFIL CLÍNICO E HÁBITOS DE CRIAÇÃO

A partir dos dados fornecidos pelos proprietários sobre história clínica pregressa, hábitos de criação, histórico reprodutivo, animais-contato e densidade populacional na residência, traçou-se o seguinte perfil: os pacientes tinham livre acesso à rua, na maioria dos casos; o controle reprodutivo limitava-se ao confinamento doméstico das fêmeas; o uso de anticoncepcionais ocorreu em menos de 5% delas. Nenhum dos cães estudados era castrado. Em dois casos de TVT nasal primário, a origem da transmissão foi a introdução de um animal de rua, portador da neoplasia, na casa. Outra constatação foi a inabilidade dos proprietários, na maioria dos casos, em traçar o histórico clínico pregresso dos seus animais ou, até mesmo, saber precisar se o problema atual (apresentação de uma massa neoplásica) estava evoluindo rapidamente ou se estava estável. Na maior parte dos casos, os proprietários não eram capazes de

ser precisos em relação ao tempo de evolução da doença. Nas fêmeas, o provável contato venéreo era comprovado nos casos com histórico de cobertura e parto recentes. Nos machos, esse tipo de informação era impreciso. A transmissão venérea foi descartada somente em dois casos de TVT cutâneo primário; ambos tinham histórico de lesão cutânea provocada por briga com outros cães, sendo que um desses animais-contato comprovadamente apresentava secreção prepucial hemorrágica.

Apesar de apresentarem um processo neoplásico, somente 15% dos cães estavam em condição física ruim: a grande maioria dos animais apresentava-se clinicamente sadio, exceto pela presença de massa tumoral, e com peso adequado ao porte. Entretanto, em 34% dos casos, os proprietários perceberam emagrecimento dos seus animais, ainda que discreto.

A queixa mais freqüente e que motivava a procura pelo atendimento veterinário referia-se à presença de secreção genital hemorrágica, muitas vezes referida como “cio prolongado” nas fêmeas. Somente 17% dos tumores não tinham caráter hemorrágico e, nesses casos, o aumento de volume ou a presença de uma massa visível (Figura 7a-i) eram as preocupações dos proprietários. Nas massas nasais, epistaxe, respiração ruidosa e deformidade facial (Figura 7e) eram as observações mais comuns.

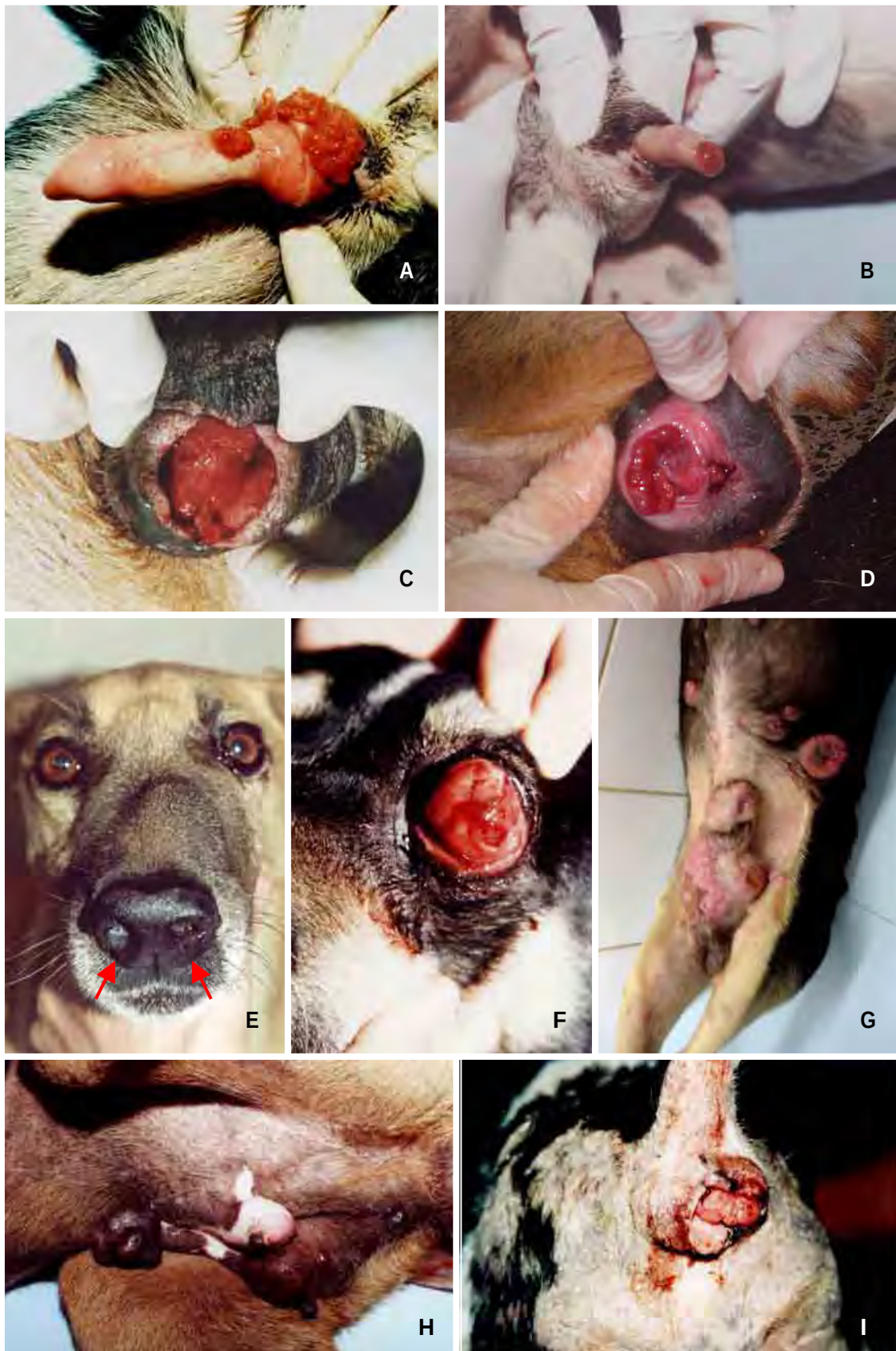


FIGURA 7 - Formas de apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino: **A.** forma genital, localizada no bulbo peniano; **B.** forma genital localizada na glândula; formas genitais vulvo-vaginal (**C**) e vaginal (**D**); **E.** TVT nasal, com deformidade de face, secreção nasal purulenta e epistaxe (setas); **F.** TVT afetando conjuntiva ocular; **G.** tumores cutâneos múltiplos; **H.** disseminação mamária a partir de uma massa genital primária; **I.** localização na mucosa anal.

O aspecto macroscópico das lesões variava desde massas poliposas, com aspecto de couve-flor e superfície vermelho-brilhante (Figura 7a, f) a lesões lisas (Figura 7c), vermelho-claras (Figura 7i) ou até arroxeadas. Em geral, os tumores eram friáveis, muitos deles liberando fragmentos de tecido durante a manipulação, no exame físico. Em oposição, os tumores cutâneos e mamários (Figura 7g-h) eram firmes ao toque. A presença de contaminação bacteriana e secreção exsudativa eram freqüentes, independentemente da localização do tumor. A ocorrência de miíase foi observada em cinco casos genitais.

Nos machos, o TVT genital foi verificado mais freqüentemente na região do bulbo peniano (Figura 7a) e na mucosa prepucial, mas a localização na glândula (Figura 7b) também foi observada. Massas volumosas impediam a exposição peniana. Nas fêmeas, o local preferencial era a região do vestíbulo vaginal (Figura 7d), em alguns casos com protrusão da massa neoplásica além dos lábios vulvares (Figura 7c). A expansão cranial da neoplasia pôde ser comprovada por palpação genital em cerca de metade dos casos.

Dos tumores de localização nasal, todos apresentavam envolvimento bilateral, com lise óssea e progressão ao seio maxilar ou invasão do palato e cavidade oral, muitas vezes com perda dentária associada. As massas orais observadas (três casos) foram em animais com TVT nasal e que, por invasão local, via alvéolos dentários, produziram fístula oronasal, perda dentária e crescimento oral. Estes casos foram considerados como invasão local, ao invés de massas primárias ou metástases. As lesões oculares apresentavam um crescimento a partir da conjuntiva e geralmente encobriam totalmente o globo ocular (Figura 7f). Em um dos casos o animal apresentou, além da massa conjuntival, TVT de câmara posterior.

4.1.3 ESTAGIAMENTO CLÍNICO DA NEOPLASIA

Os tumores de localização genital foram os de diagnóstico mais comum, representando 89,6% dos casos. A localização nasal foi a segunda apresentação primária em frequência, com oito casos diagnosticados (5,9%). Foram observados, ainda, casos de tumores venéreos transmissíveis oculares, anais e subcutâneos, com duas ocorrências em cada uma dessas localizações. Três cães apresentavam a neoplasia em mais de um local – todas foram consideradas massas primárias pelas características de implantabilidade do TVT: um cão apresentava massa primária genital e de conjuntiva ocular, o segundo animal, massas genital e nasal e o terceiro, massas genital e anal. A distribuição das massas primárias de acordo com o sexo está na Tabela 4 e Figura 8.

TABELA 4 - Frequência do tumor venéreo transmissível, de acordo com o sexo, nos diferentes sítios primários de implantação.

SEXO	GENITAL	NASAL	OCULAR	ANAL	SUBCUTÂNEO	TOTAL
MACHOS	50	8	2	1	1	62
FÊMEAS	71	0	0	1	1	73
TOTAL	121	8	2	2	2	135

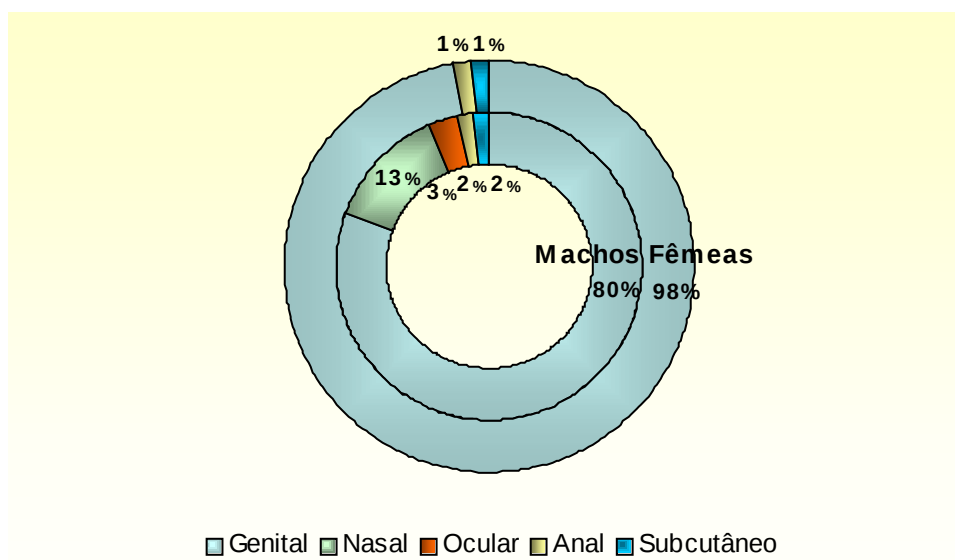


FIGURA 8 - Distribuição dos casos de tumor venéreo transmissível, de acordo com a localização da massa primária e sexo.

De acordo com a classificação TNM, sete cães apresentavam-se em estágio N3, ou seja, além da massa primária, apresentavam invasão neoplásica nos linfonodos regionais, sem metástase em outros órgãos ou sistemas (M0). Outros 26 animais encontravam-se em M1 (evidência de metástase), sendo que quatro deles também apresentavam envolvimento metastático de linfonodos regionais (N3M1). Desta forma, quando considerado o total de pacientes em estudo, 33 (25%) apresentavam disseminação do tumor primário. Chama a atenção o fato de que três animais vieram a apresentá-la durante o período de quimioterapia ou poucas semanas após o seu término. A classificação TNM para todos os pacientes do estudo está no Anexo H.

A forma metastática mais freqüente, no total dos casos, foi a subcutânea, com 13 casos (31% das metástases). Nos machos, a invasão neoplásica foi observada mais freqüentemente em linfonodos inguinais e, nas fêmeas, no tecido mamário. Nestas localizações houve diferença significativa

entre os sexos, de acordo com a estatística de χ^2 ($p < 0,05$). Foram verificadas ainda metástases esplênicas (dois casos por sexo), muscular, cerebral, extra-dural, intra-ocular e peritoneal (uma ocorrência por local, em machos). Em quatro casos, o mesmo paciente apresentou metástase em mais de um local (mama e tecido subcutâneo – dois casos; intra-ocular, peritoneal e extra-dural; subcutânea e esplênica), o que explica o número de metástases superior ao de pacientes com metástase. A Figura 9 ilustra a distribuição das massas não primárias nas diversas localizações, de acordo com o sexo do animal.

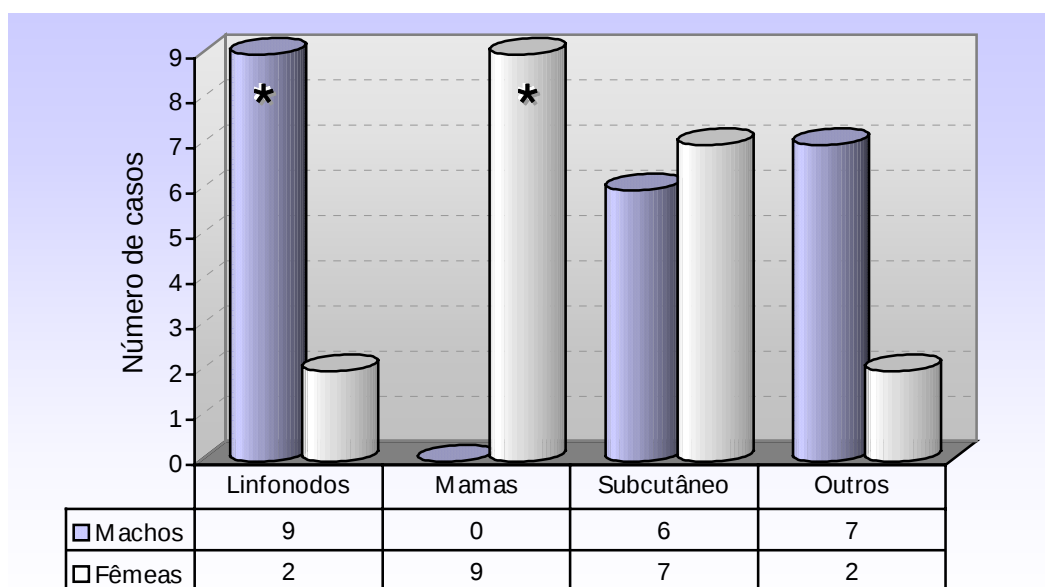


FIGURA 9 - Frequência das metástases de tumor venéreo transmissível, de acordo com localização e sexo; (*) diferença significativa entre os sexos pelo teste de χ^2 ($\alpha=5\%$).

Uma vez definidas as características clínicas de cada paciente, as massas foram analisadas individualmente e tratadas como UNIDADES EXPERIMENTAIS. Dos casos com massas múltiplas, procurou-se obter amostras de várias localizações. Dessa forma, foram colhidas amostras de 188 tumores e cada um foi classificado de acordo com sua localização, comportamento

biológico, tempo de evolução e tamanho, conforme apresentado na Tabela 5. Em alguns casos, não foi possível determinar o tempo de evolução dos sinais clínicos por se tratarem de cães de rua, recém-adotados por seus proprietários e, portanto, com histórico desconhecido.

Aproximadamente dois terços dos tumores foram de localização genital e primários (63,8% e 64,4%, respectivamente), com apenas 6,4% de recorrência e 25% de metástases. Cerca de metade das massas (52,5%) já tinha mais de dois meses de evolução quando os cães foram encaminhados ao atendimento veterinário. Com relação ao tamanho, os tumores menores de 3cm foram um pouco mais prevalentes (39,4%) que tumores os demais. Estes dados estão ilustrados na Figura 10.

TABELA 5 - Classificação das massas neoplásicas amostradas, com base na sua localização, comportamento biológico, tempo de evolução e tamanho ao diagnóstico.

	CLASSIFICAÇÕES DAS MASSAS NEOPLÁSICAS			TOTAL
	LOCALIZAÇÃO			
	GENITAIS		EXTRAGENITAIS	
<i>n</i> (%)	120 (63,8%)		68 (36,2%)	188
	COMPORTAMENTO BIOLÓGICO			
	PRIMÁRIOS	METÁSTASES	RECORRENTES	
<i>n</i> (%)	121 (64,4%)	55 (25,2%)	12 (6,4%)	188
	TEMPO DE EVOLUÇÃO*			
	RECENTES	ESTABELECIDOS	ANTIGOS	
<i>n</i> (%)	31 (18,9%)	47 (28,6%)	86 (52,5%)	164
	TAMANHO**			
	PEQUENOS	MÉDIOS	GRANDES	
<i>n</i> (%)	74 (39,4%)	59 (31,4%)	55 (29,2%)	188

* Recentes: até três semanas de evolução; estabelecidos: entre três e oito semanas; antigos: mais de oito semanas

** Pequenos: até 3cm; médios: entre 3-5cm; grandes: >5cm

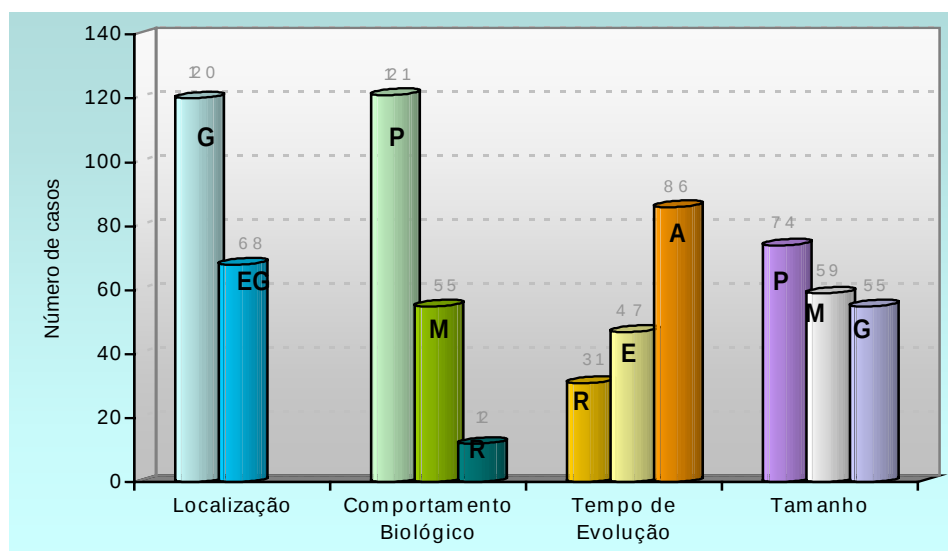


FIGURA 10 - Classificação das massas neoplásicas amostradas de acordo com localização (G=genital; EG=extragenital), comportamento biológico (P=primária; M=metastática; R=recorrente), tempo de evolução (R=recente; E=estabelecida; A=antiga) e tamanho (P=pequena; M=média; G=grande).

4.2 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA

4.2.1 VERIFICAÇÃO DO PADRÃO CITOMORFOLÓGICO PREDOMINANTE

Das amostras colhidas das 188 massas tumorais, 158 foram analisadas para determinação do padrão citomorfológico e subsequente inclusão em um dos grupos experimentais, definidos como L, M ou P, descritos anteriormente. As células linfocitóides costumavam ser menores que as plasmocitóides. A infecção bacteriana (associada a infiltrado inflamatório neutrofílico) foi achado freqüente, assim como a “contaminação” da amostra citológica com sangue, devido às características próprias do TVT (muito friável e hemorrágico). O padrão plasmocitóide foi o mais freqüente, com 52,53% dos casos, seguido pelo misto (29,11%) e, por último, o linfocitóide (18,36%). A Figura 11 ilustra amostras citológicas características de cada grupo.

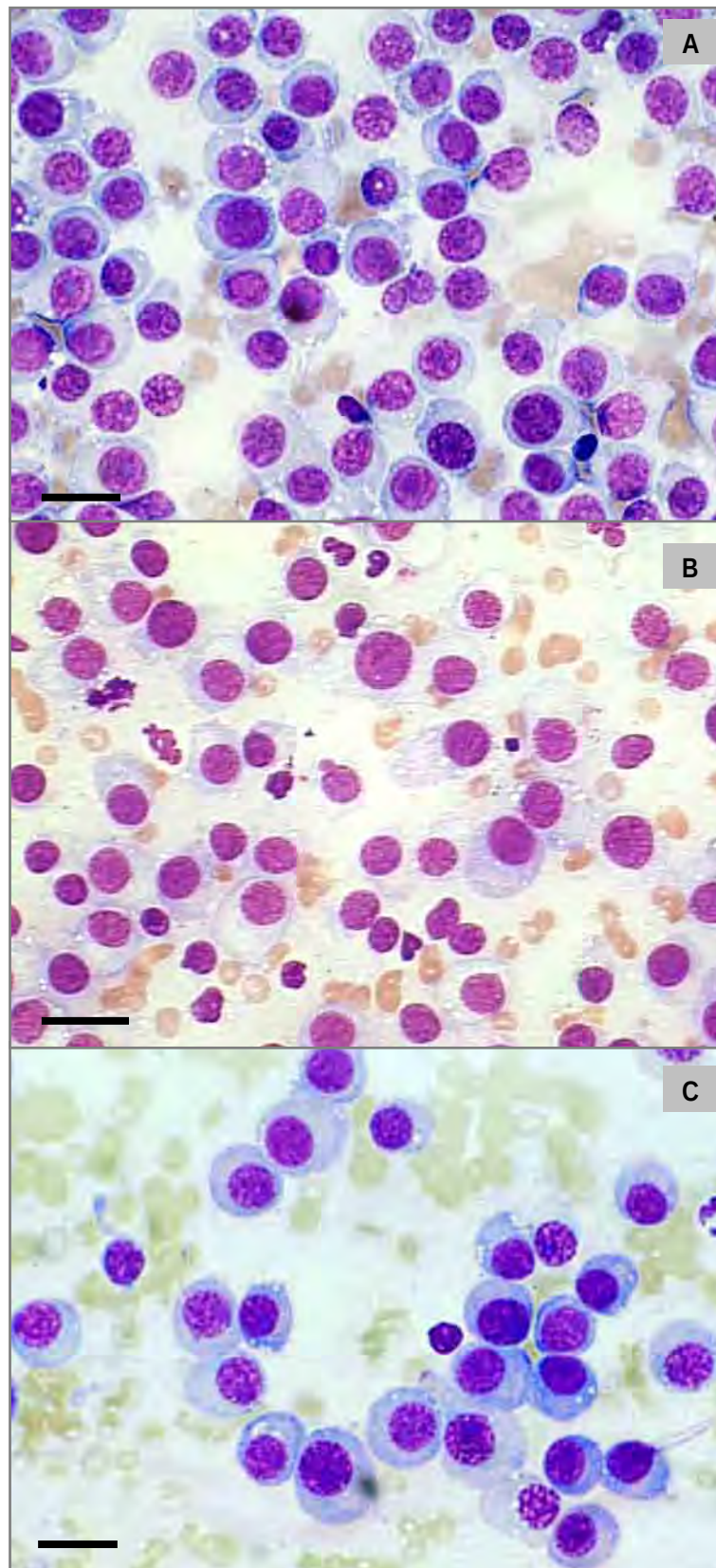


FIGURA 11 - Amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos diferentes tipos citomorfológicos: **A.** padrão linfocitóide (predomínio de células redondas, citoplasma escasso e alta relação núcleo:citoplasma); **B.** padrão plasmocitóide (predomínio de células ovóides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico); **C.** padrão misto (presença dos dois tipos morfológicos sem predomínio de nenhum). Giemsa, barra = 20µm.

As comparações da frequência dos tumores nos três grupos entre as diferentes categorias estão apresentadas nas Tabelas 6 a 9. Estes dados foram analisados por testes estatísticos baseados em χ^2 , com a aplicação do teste de Goodman para comparação de proporções multinominais. Foi detectada diferença significativa entre os grupos na comparação entre a localização genital e extragenital (Tabela 6, Figura 12) e entre as categorias de comportamento biológico (Tabela 7). O grupo linfocitóide apresentou uma concentração de 82,76% dos tumores na localização genital, enquanto que no grupo misto, este número reduziu-se para 76,09% e mais ainda, para 62,65% no grupo plasmocitóide.

TABELA 6 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide, de acordo com a localização.

LOCALIZAÇÃO GRUPO	GENITAIS		EXTRAGENITAIS		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
LINFOCITÓIDE ^a	24	82,76	05	17,24	29	100
MISTO ^{ab}	35	76,10	11	23,90	46	100
PLASMOCITÓIDE ^b	52	62,65	31	37,35	83	100
TOTAL	111	-	47	-	158	-

^{a, b} Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Goodman (p=0,05)

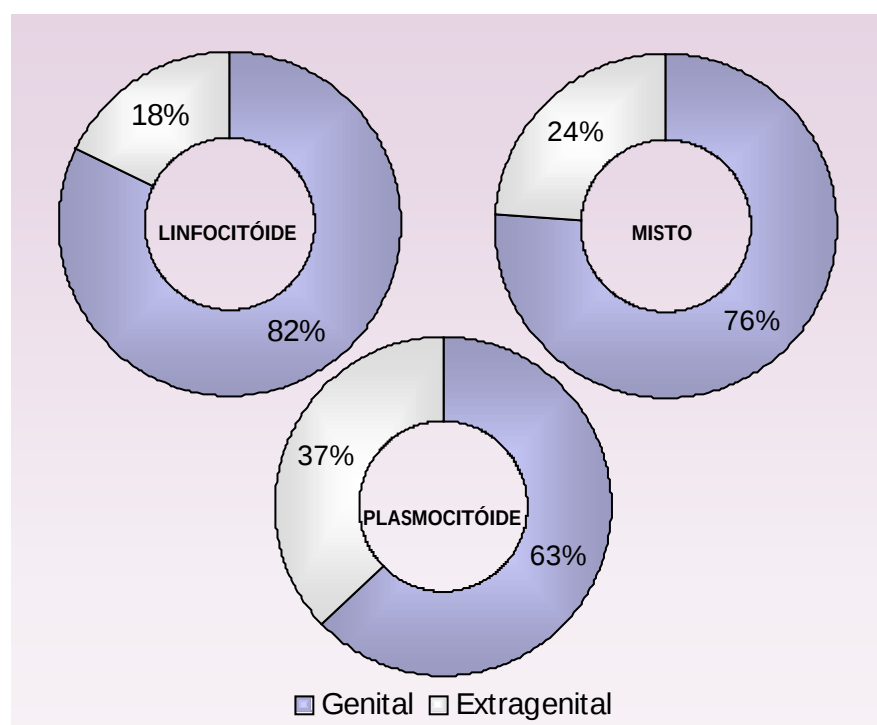


FIGURA 12 - Frequência de tumores de localização genital e extragenital de acordo com o grupo citomorfológico. As distribuições dos grupos linfocitóide e plasmocitóide diferiram estatisticamente entre si.

Também houve diferença significativa entre os grupos em relação ao comportamento biológico. Para fins de análise estatística, as massas metastáticas e as recorrentes foram agrupadas como massas não-primárias, como forma de aumentar a homogeneidade entre as categorias. O grupo linfocitóide apresentou somente 10,3% de massas não-primárias, frequência que aumentou para 26,1% nos tumores do grupo citomorfológico misto e para 41% nos tumores do grupo plasmocitóide. A Tabela 7 e a Figura 13 apresentam estes dados em detalhes.

TABELA 7 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide entre tumores primários e não-primários (metastáticos ou recorrentes).

COMPORTAMENTO BIOLÓGICO GRUPO	PRIMÁRIOS		NÃO-PRIMÁRIOS		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
LINFOCITÓIDE	26 ^a	89,7	03	10,3	29	100
MISTO	34 ^{ab}	73,9	12	26,1	46	100
PLASMOCITÓIDE	49 ^b	59,0	34	41,0	83	100
TOTAL	109	-	49	-	158	-

^{a, b} Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Goodman ($p=0,006$)

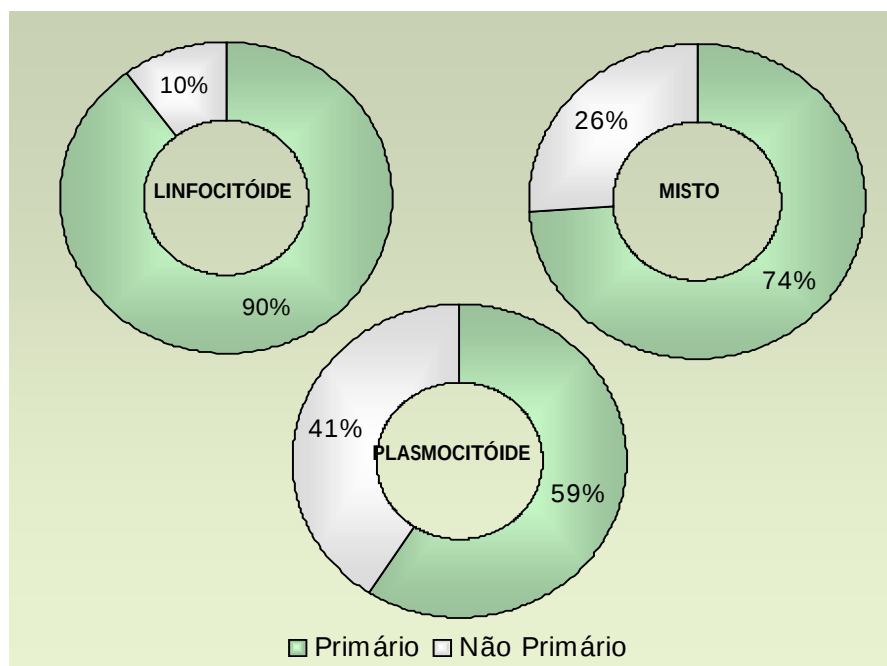


FIGURA 13 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide entre tumores primários e não-primários (metastáticos ou recorrentes).

No critério tempo de evolução, não houve diferença entre os grupos (Tabela 8, Figura 14). Em todos eles, os tumores recentes (até três semanas de sinais clínicos evidentes) foram os menos freqüentes, seguidos pelos estabelecidos (entre três e oito semanas de evolução) e pelos antigos

(mais de oito semanas), estes últimos com mais da metade da frequência total nos três grupos citomorfológicos.

TABELA 8 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide, de acordo com o tempo de evolução clínica.

GRUPOS \ EVOLUÇÃO	RECENTES		ESTABELECIDOS		ANTIGOS		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
LINFOCITÓIDE	03	13,05	08	34,78	12	52,17	23	100
MISTO	07	17,07	10	24,39	24	58,54	41	100
PLASMOCITÓIDE	14	19,44	20	27,78	38	52,78	72	100
TOTAL	24	-	38	-	74	-	136	-

p=0,883 pelo teste χ^2

Com relação ao tamanho da massa neoplásica no momento do diagnóstico, também não foi verificada diferença significativa entre os grupos (Tabela 9). Embora tenha havido uma maior frequência de tumores entre 3 e 5 cm (médios) no grupo linfocitóide (39,3%), enquanto que nos outros dois grupos o predomínio foi das massas de tamanho pequeno (até 3cm), essa diferença foi pequena e não significativa. A relação entre o tamanho dos tumores e o padrão citomorfológico pode ser observada na Figura 14.

TABELA 9 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide de acordo com o tamanho.

TAMANHO* GRUPOS	PEQUENO		MÉDIO		GRANDE		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
LINFOCITÓIDE	10	34,48	12	41,38	07	24,14	29	100
MISTO	17	39,96	15	32,61	14	30,43	46	100
PLASMOCITÓIDE	30	36,1	23	27,72	30	36,14	83	100
TOTAL	57	-	50	-	51	-	158	100

p=0,672 pelo teste χ^2

* Pequeno: até 3cm; médio: entre 3 e 5cm; grande: maior que 5cm.

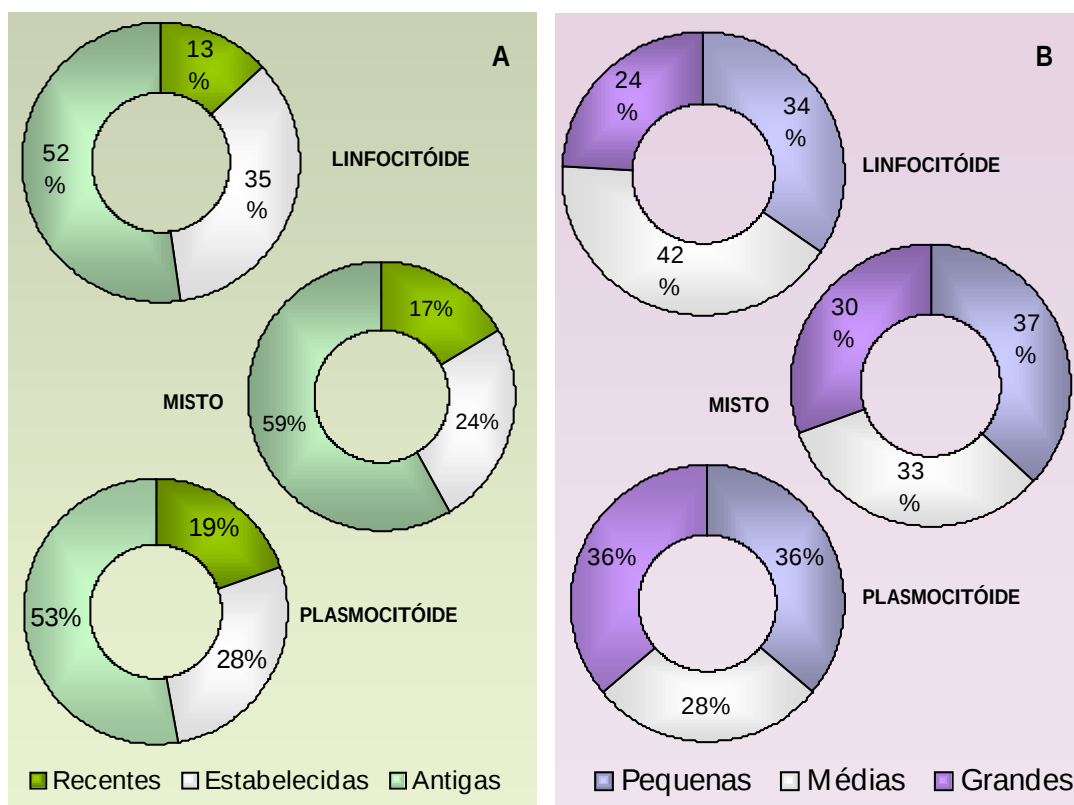


FIGURA 14 - Frequência das massas neoplásicas dos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide de acordo com tempo de evolução (A) e com tamanho (B).

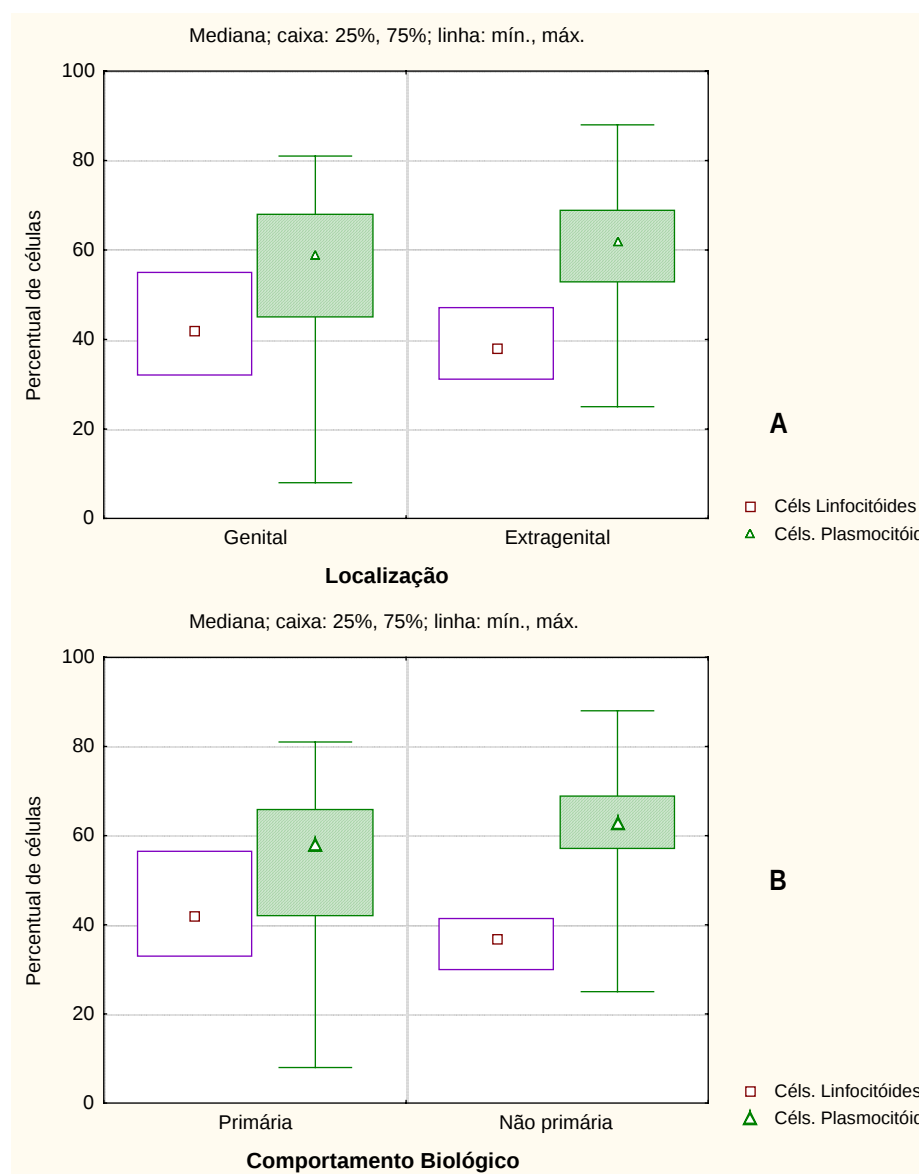
A análise do percentual de células linfocitoides e plasmocitoides de acordo com a localização do tumor e de acordo com seu

comportamento biológico revelou diferenças significativas – existe predomínio de células linfocitóides nas massas genitais quando comparadas às extragenitais, e de células plasmocitóides nos tumores não primários quando comparadas aos primários. Estas observações encontram-se na Tabela 10 e Figura 15.

TABELA 10 - Frequência de células linfocitóides e plasmocitóides nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de acordo com a localização e comportamento biológico do tumor.

	LOCALIZAÇÃO							
	CÉLS. LINFOCITÓIDES				CÉLS. PLASMOCITÓIDES			
	MEDIAN A (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	<i>p</i>	MEDIAN A (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	<i>p</i>
GENITAL	42 ^a	32,25	55,00	0,05	59 ^a	45,0	67,75	0,06
EXTRAGENITAL	38 ^b	31,00	46,50		62 ^a	53,5	69,00	
	COMPORTAMENTO BIOLÓGICO							
	CÉLS. LINFOCITÓIDES				CÉLS. PLASMOCITÓIDES			
	MEDIAN A (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	<i>p</i>	MEDIAN A (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	<i>p</i>
PRIMÁRIO	42 ^a	33,75	57,25	0,005	58 ^a	42,75	66,25	0,006
NÃO PRIMÁRIO	37 ^b	30,75	42,25		63 ^b	57,75	69,25	

^{a, b} Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney



FIG

URA 15 - Frequência de células neoplásicas de tumor venéreo transmissível dos padrões linfocitóide e plasmocitóide, de acordo com a localização (A) e o comportamento biológico (B).

As diferenças entre o percentual de células dos dois tipos citomorfológicos ficaram ainda mais evidentes quando a análise foi limitada às massas primárias e se compararam aquelas em que os pacientes tinham metástase com as que não tinham. Nesta comparação, a diferença entre o percentual de células linfocitóides foi altamente significativo ($p=0,01$), com medianas de 46,5%, nos casos sem metástase e 40% nos casos com metástase. O

percentual de células plasmocitóides foi, igualmente, altamente significativo ($p=0,008$), com medianas de 53,5 e 61%, nos casos sem e com metástases, respectivamente. Estas comparações estão demonstradas na Figura 16.

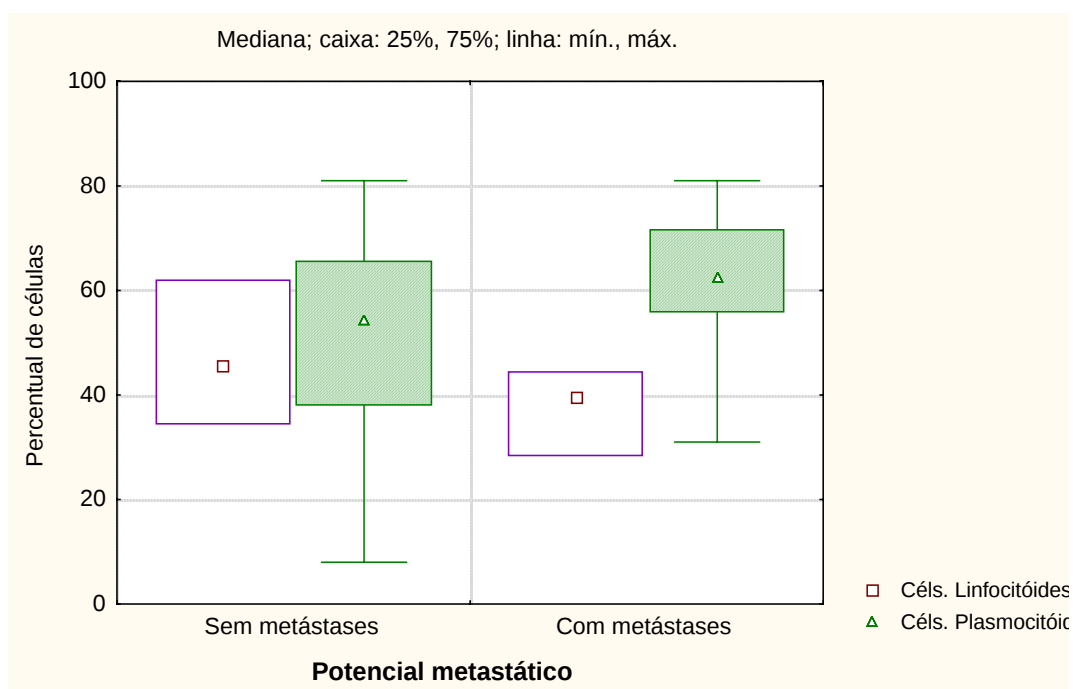


FIGURA 16 - Frequência de células dos padrões linfocitóide e plasmocitóide em casos primários de tumor venéreo transmissível com metástases e sem metástases.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE

Os critérios de malignidade foram determinados nas lâminas coradas pelo Giemsa e pela análise das lâminas coradas pelo Shorr, para observação mais detalhada das características nucleares e nucleolares. A análise estatística destes critérios foi feita pela comparação entre os grupos citomorfológicos (linfocitóide, misto e plasmocitóide) usando testes de frequência (χ^2 e Goodman) ou teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido pela aplicação do teste de comparações múltiplas de Dunn, quando $p \leq 0,05$, de

acordo com o perfil de cada observação. Adicionalmente os dados foram reagrupados pelos critérios de comportamento biológico (massas primárias *versus* massas não primárias), localização (genitais *versus* extragenitais), tamanho (pequenas *vs* médias *vs* grandes) e tempo de evolução (recentes *vs* estabelecidas *vs* antigas) e analisados pelos testes já citados ou por Mann-Whitney. Estes dados estão no Anexo I e só serão apresentados no corpo do texto quando justificado pela presença de diferenças significativas.

4.2.2.1 Critérios Gerais de Malignidade

Conforme descrito anteriormente, as características gerais de malignidade avaliadas foram padrão de cromatina predominante, anisocitose, anisocariose, macrocariose, basofilia ou eosinofilia citoplasmática e vacúolos citoplasmáticos e seu padrão de distribuição nas células. Foi também avaliado o *número* de nucléolos apresentado pela maioria das células e a presença ou não de corpúsculos linfoglandulares e de arranjo polar, no qual os pólos opostos do núcleo celular apresentavam uma área concentrada de paracromatina.

A. CROMATINA: para avaliação da cromatina nuclear foram estabelecidos quatro padrões distintos, em graus progressivos de granulação: *densa*, *granular*, *grosseira* e *frouxa* (Figura 17).

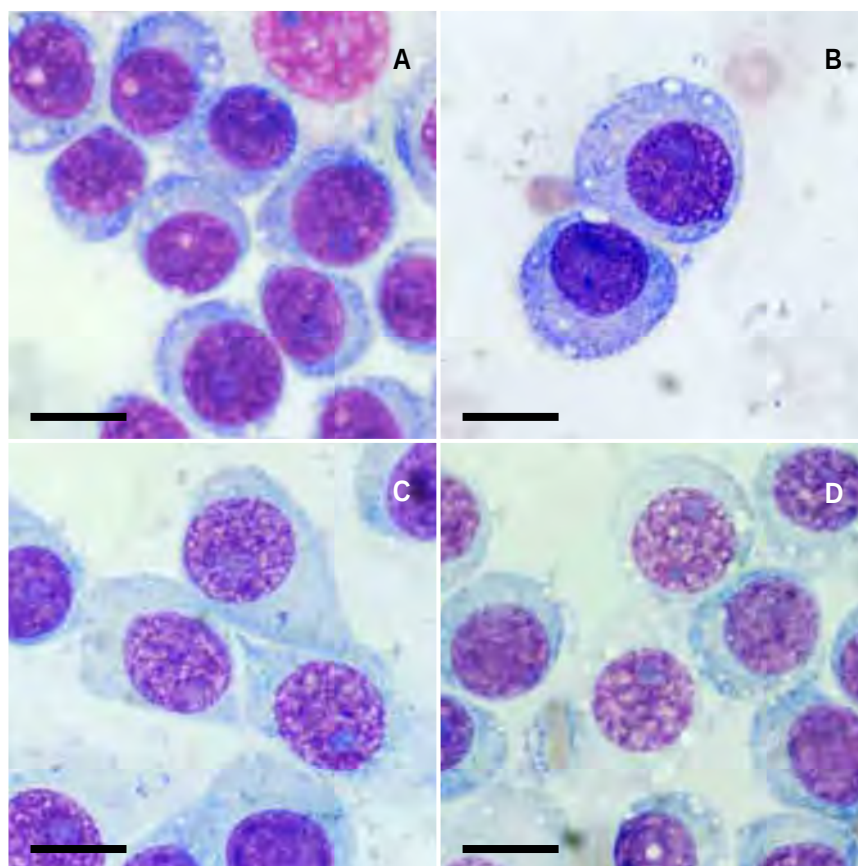


FIGURA 17 – Padrões de cromatina encontrados no exame citológico de amostras de tumor venéreo transmissível: A: densa; B: granular; C: grosseira; D: frouxa. Giemsa, barra: 10µm.

No geral das amostras, houve uma distribuição bastante regular dos quatro padrões de cromatina. Quando analisada a frequência dos padrões pelos grupos citomorfológicos, não foi evidenciada nenhuma diferença significativa entre os grupos (Tabela 11).

TABELA 11 - Frequência dos diferentes padrões de cromatina nuclear nos grupos linfocitóide, misto e plasmocitóide.

GRUPOS PADRÕES	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
DENSA	07	24,1	10	21,7	19	22,9	36	22,8
GRANULAR	05	17,3	11	23,9	25	30,1	41	25,9
GROSSEIRA	10	34,5	07	15,2	23	27,7	40	25,4
FROUXA	07	24,1	18	39,2	16	19,3	41	25,9
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

p=0,49 pelo teste χ^2

A análise dos dados recombinaados e agrupados de acordo com comportamento biológico, tamanho, evolução e localização também não acrescentou nenhuma informação com relação aos padrões de cromatina, com exceção, talvez, da frequência baixa (8,3%) da cromatina frouxa nas massas recentes, comparada à frequência crescente deste padrão nas massas estabelecidas (23,7%) e antigas (33,8%), porém não estatisticamente importante.

B. ANISOCITOSE: este critério foi avaliado semi-quantitativamente em *ausente*, *discreta*, *moderada* e *intensa*. As menores frequências foram observadas nas classificações extremas, e a mais freqüente foi a anisocitose discreta. Independentemente do grupo citomorfológico (Tabela 12), ou de localização, comportamento biológico, tamanho e tempo de evolução, não houve diferença estatística entre os grupos.

TABELA 12 - Graduação da anisocitose verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

GRUPOS GRAUS	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AUSENTE	05	17,2	01	2,2	-	-	06	3,8
DISCRETA	13	44,8	27	58,7	40	48,2	80	50,6
MODERADA	09	31,1	14	30,4	38	45,8	61	38,6
INTENSA	02	6,9	04	8,7	05	6,0	11	7,0
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

p=0,883 pelo teste χ^2

C. ANISOCARIOSE: este critério também foi avaliado semi-quantitativamente em *ausente*, *discreta*, *moderada* e *intensa*. A anisocariose esteve sempre presente, em algum grau, em todas as amostras analisadas. Mais da metade das observações foi de anisocariose discreta, com apenas 7,6% de anisocariose intensa (Tabela 13). A frequência de cada uma delas foi bastante semelhante entre os três grupos citomorfológicos.

TABELA 13 - Graduação da anisocariose verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

GRUPOS GRAUS	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
DISCRETA	17	58,6	27	58,7	37	44,6	81	51,3
MODERADA	10	34,5	16	34,8	39	47,0	65	41,1
INTENSA	02	6,9	03	6,5	07	8,4	12	7,6
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

p=0,78 pelo teste χ^2

Na comparação entre as categorias de tempo de evolução foi observada uma diferença significativa ($p=0,01$) na frequência de anisocariose entre as massas estabelecidas e as recentes ou antigas (Tabela 14).

TABELA 14 - Frequência da anisocariose verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos grupos de acordo com o tempo de evolução clínica.

GRUPOS GRAUS	RECENTE		ESTABELECIDO		ANTIGO		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
DISCRETA	08	33,3	27	71,1	36	45,0	71	52,2
MODERADA	15	62,5	10	26,3	30	37,5	55	40,4
INTENSA	01	4,2	01	2,6	08	12,5	10	7,4
TOTAL	24	100	38	100	80	100	136	100

Diferença significativa entre os grupos de tempo de evolução, de acordo com estatística χ^2 ($p=0,01$)

D. MACROCARIOSE: apesar deste critério também ter sido avaliado semi-quantitativamente em *ausente*, *discreta*, *moderada* e *intensa*, para fins de análise estatística as duas primeiras categorias foram agrupadas, sendo considerada clinicamente importante a presença de macrocariose moderada e intensa. A macrocariose esteve presente em 34 das 158 amostras analisadas (21,5%), com uma frequência um pouco maior no grupo plasmocitóide, ainda que não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 15). A ocorrência de macrocariose foi mais freqüente nos tumores antigos, nas massas extragenitais e nas não primárias, nestas com $p=0,09$, próximo ao nível de significância ($p \leq 0,05$).

TABELA 15 - Ocorrência de macrocariose nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos experimentais

GRUPOS OBSERVAÇÃO	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AUSENTE*	24	82,75	38	82,60	62	74,70	124	78,48
PRESENTE**	5	17,24	8	17,39	21	25,30	34	21,52
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

p=0,477 pelo teste χ^2

* Ausente ou discreta

** Moderada ou intensa

E. BASOFILIA E EOSINOFILIA CITOPLASMÁTICAS: ambos critérios

foram avaliados semi-quantitativamente em *ausente*, *discreta*, *moderada* e *intensa*, mas a fim de uniformizar as categorias para a análise estatística, as duas primeiras foram agrupadas e consideradas como ausência e as demais, como presença da alteração.

A basofilia ocorreu em 48 e a eosinofilia (Tabela 16) em 28 amostras (30,3% e 17,7%, respectivamente) sem diferenças importantes entre os grupos.

TABELA 16 - Frequência de basofilia e eosinofilia citoplasmáticas nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos experimentais.

GRUPOS OBSERVAÇÃO	BASOFILIA CITOPASMÁTICA ^s							
	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AUSENTE*	20	68,97	31	67,39	59	71,08	110	69,62
PRESENTE**	9	31,03	15	32,61	24	28,92	48	30,38
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

EOSINOFILIA CITOPASMÁTICA ^u								
AUSENTE	23	79,31	36	78,26	71	85,54	130	82,28
PRESENTE	6	20,69	10	21,74	12	14,46	28	17,72
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

^s p=0,524 pelo teste χ^2 ; ^up=0,906 pelo teste χ^2

* Ausente ou discreta

** Moderada ou intensa

F. VACÚOLOS CITOPASMÁTICOS: foram avaliados pela distribuição (*regular* ou *irregular*) e o *percentual* de células vacuolizadas. O percentual de células vacuolizadas foi avaliado pelo teste de Anova em *ranks*, para dados não paramétricos, que não indicou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 17). Somente dois tumores não apresentavam vacúolos citoplasmáticos, mas cerca de 25% dos casos apresentavam menos de metade das células vacuolizadas.

TABELA 17 - Percentual de vacuolização em amostras de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

	MEDIANA (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	MÍN. (%)	MÁX. (%)
GERAL (158 casos)	85,0	50	100	0,0	100
LINFOCITÓIDE	80,0	60	100	0,0	100
MISTO	82,5	40	100	30	100
PLASMOCITÓIDE	90,0	60	100	0,0	100

p=0,683 pelo teste de Kruskal-Wallis

A comparação do percentual de células vacuolizadas entre as massas segundo seu comportamento biológico (tumores primários *versus* tumores metastáticos ou recorrentes) apontou diferença significativa ($p=0,017$), sendo que os tumores não-primários apresentaram um valor mediano superior ao dos tumores primários (Tabela 18).

TABELA 18 - Percentual de células vacuolizadas em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não-primário (metastáticos e recorrentes).

	MEDIANA (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	MÍN. (%)	MÁX. (%)
PRIMÁRIOS	80 ^a	50	95	0,0	100
NÃO-PRIMÁRIOS	90 ^b	70	100	10,0	100

^{a, b} letras diferentes representam diferença significativa ($p=0,017$) pelo teste de Mann-Whitney

Com relação à distribuição nas células, classificada como regular e irregular, aplicou-se teste de χ^2 . Ainda que os dois padrões de distribuição tenham sido mais equilibrados no grupo linfocitóide, enquanto nos outros dois houve predomínio do arranjo irregular, como apresentado na Tabela 19, não foi verificada diferença estatística na comparação entre os grupos.

TABELA 19 - Percentual de células com vacúolos citoplasmáticos, de acordo com o padrão de distribuição em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

GRUPOS OBSERVAÇÃO	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
REGULAR	15	51,72	17	36,96	32	38,55	64	40,50
IRREGULAR	14	48,28	29	63,04	51	61,45	94	59,50
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

p=0,402 pelo teste de χ^2

G. NÚMERO DE NUCLÉOLOS: para a análise desta variável, os dados foram agrupados em duas categorias: tumores com um nucléolo e tumores com mais de um nucléolo. Neste estudo, foram verificados até cinco nucléolos por célula em algumas amostras. Como pode ser observado na Tabela 20, somente 29 (18,3%) das amostras apresentaram células com mais de um nucléolo, sem que tenha sido evidenciada diferença estatística na distribuição deste achado entre os grupos citomorfológicos.

TABELA 20 - Número de nucléolos por célula verificado nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos experimentais.

GRUPOS OBSERVAÇÃO	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
UM	5	86,21	36	78,26	68	81,93	129	81,65
MAIS DE UM	4	13,79	10	21,74	15	18,07	29	18,35
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

p=0,684 pelo teste de χ^2

O cruzamento entre os diferentes tempos de evolução mostrou que tumores antigos apresentam maior frequência de células com mais de um nucléolo do que os tumores recentes, uma diferença significativa pelo teste de Goodman ($p < 0,05$). Estes dados estão na Tabela 21 e Figura 18.

TABELA 21 - Número de nucléolos por célula verificado nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de diferentes tempos de evolução.

GRUPOS OBSERVAÇÃO	RECENTES		ESTABELECIDOS		ANTIGOS		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
UM	23	95,83	34	89,47	56	75,68	113	83,09
MAIS DE UM	01 ^a	4,17	04 ^{ab}	10,53	18 ^b	24,32	23	16,91
TOTAL	24	100	38	100	74	100	136	100

^{a, b} Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste de Goodman para contrastes entre proporções multinomiais

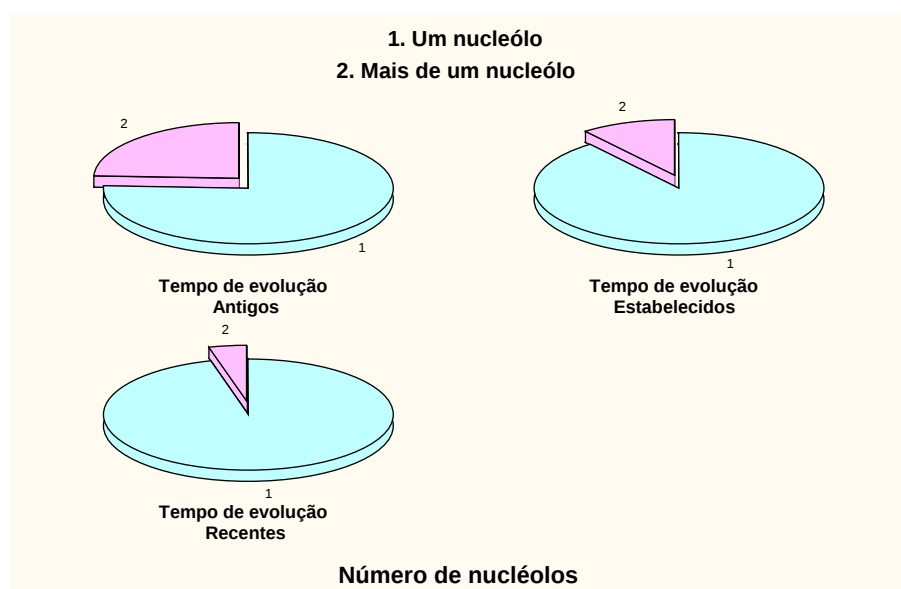


FIGURA 18 - Número de nucléolos por célula verificado nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de diferentes tempos de evolução.

H. CORPÚSCULOS LINFOGLANDULARES: a presença de corpúsculos

linfoglandulares foi um achado consistente, verificado em 127 (80%) dos casos estudados (Tabela 22); eram muitas vezes pequenos e escassos, podendo passar despercebidos. Em outros casos, eram estruturas grandes, pouco menores que as células de tumor venéreo transmissível, assemelhando-se a

“bolhas” de citoplasma dispersas por entre as células neoplásicas. A análise da frequência destas estruturas não evidenciou diferenças entre os grupos citomorfológicos, localização ou comportamento biológico.

TABELA 22 - Ocorrência de corpúsculos linfoglandulares verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

GRUPOS OBSERVAÇÃO	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AUSENTE	8	27,59	7	15,22	16	19,28	31	19,62
PRESENTE	21	72,41	39	84,78	67	80,72	127	80,38
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

$p=0,30$ pelo teste de χ^2

I. ARRANJO POLAR: esta característica foi observada em 46 (29,1%) das amostras de células neoplásicas. Apesar de não ter havido diferenças significativas entre os grupos ($p=0,09$), sua frequência no grupo plasmocitóide (34,9%) foi superior àquela observada no grupo linfocitóide (13,7%), como pode ser notado na Tabela 23. O mesmo também foi observado na comparação entre massas primárias e não primárias (Tabela 24), quando a frequência deste arranjo nas massas não primárias foi acima da esperada pelo teste de χ^2 , ainda que sem diferença significativa ($p=0,10$).

TABELA 23 - Frequência de observação de arranjo polar da paracromatina verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

OBSERVAÇÃO \ GRUPOS	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AUSENTE	25	86,21	33	71,73	54	65,06	112	70,89
PRESENTE	4	13,79	13	28,27	29	34,94	46	29,11
TOTAL	29	100	46	100	83	100	158	100

p=0,096 pelo teste de χ^2

TABELA 24 - Frequência de observação de arranjo polar de cromatina verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível primários e não primários.

OBSERVAÇÃO \ GRUPOS	PRIMÁRIO		NÃO PRIMÁRIO		TOTAL	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AUSENTE	82	75,23	30	61,22	112	70,88
PRESENTE	27	24,77	19	38,78	46	29,12
TOTAL	109	100	49	100	158	100

p=0,10 pelo teste de χ^2

A Figura 19 ilustra algumas das características gerais de malignidade avaliadas durante o experimento, em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível.

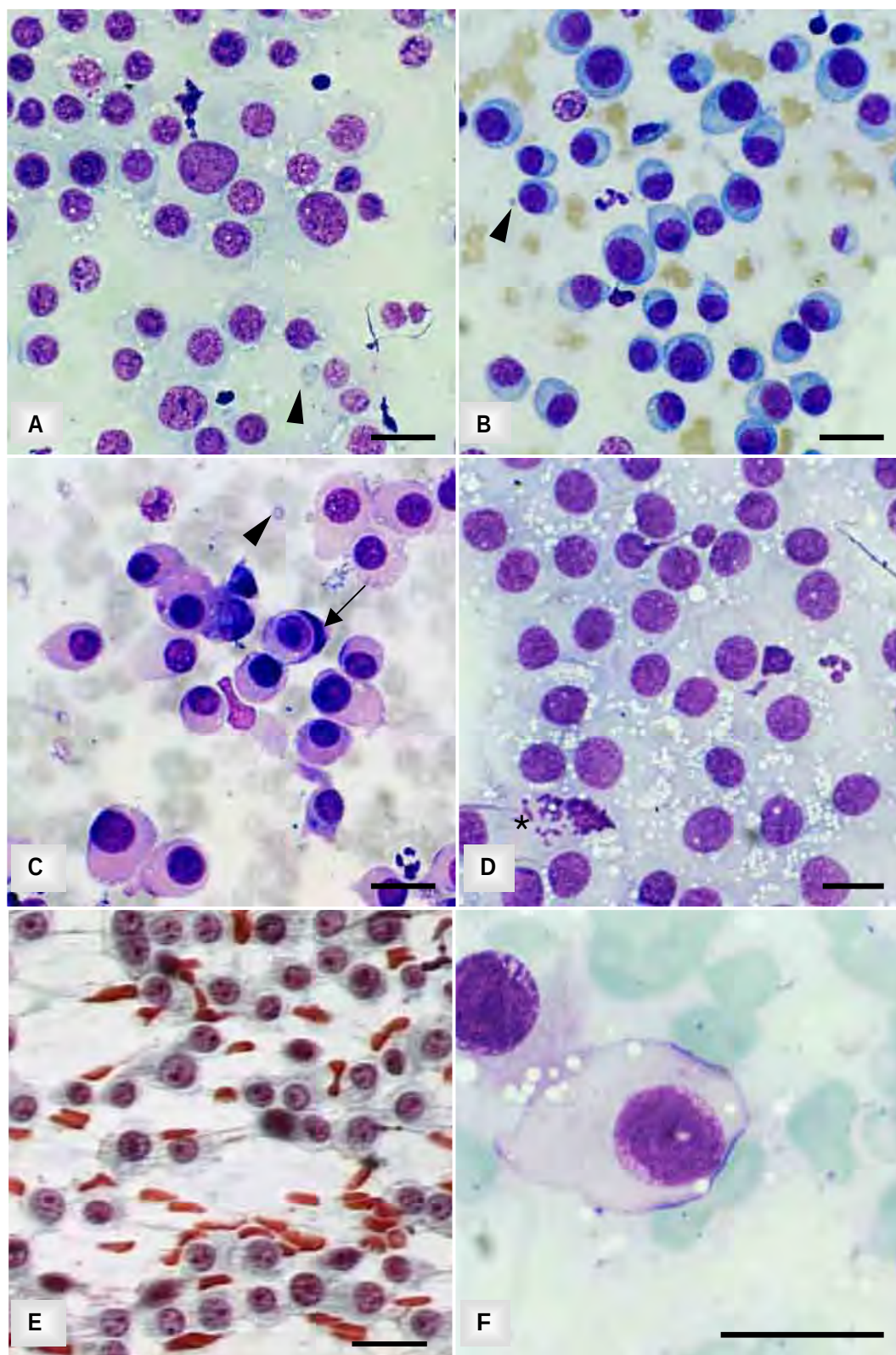


FIGURA 19 – Características gerais de malignidade avaliadas em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível coradas com Giemsa: **A**: anisocitose, anisocariose e macrocariose; observar nucléolos evidentes e vacúolos citoplasmáticos uniformes e distribuídos ao longo da membrana celular; **B**: anisocitose e anisocariose marcadas; notar a basofilia citoplasmática; **C**: anisocitose e eosinofilia citoplasmática. A seta mostra ocorrência de canibalismo; **D**: vacúolos citoplasmáticos abundantes e de tamanho e distribuição irregulares (*: figura de mitose); **E**: células de TVT coradas pelo método de Shorr, evidenciando cromatina granular e um ou dois nucléolos por célula; **F**: arranjo polar em célula de TVT corada com Giemsa; observar distribuição da paracromatina em pólos opostos do núcleo. As cabeças de seta em a, b e c identificam corpúsculos linfoglandulares (barra: 20µm).

4.2.2.2 Critérios de Malignidade Citoplasmáticos

Todas as observações foram quantificadas em termos de número de células apresentando a característica na população contada, para a expressão de número relativo (%). Das características citoplasmáticas de malignidade pesquisadas, a de menor ocorrência foram células em anel de sinete, presentes somente em duas amostras, seguida pela ocorrência de canibalismo e fagocitose (três e oito casos, respectivamente), apresentadas na Figura 20. Em um dos casos foi observada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* parasitando as células neoplásicas, em uma metástase de linfonodo. Como tiveram uma frequência muito baixa, estes critérios não puderam ser submetidos à análise estatística. A análise descritiva dos critérios citoplasmáticos está na Tabela 25.

TABELA 25 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com critérios citoplasmáticos de malignidade em amostras de tumor venéreo transmissível.

CRITÉRIO	POSITIVOS		MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	MÍN. (%)	MÁX. (%)
	<i>n</i>	%					
Projeções citoplasmáticas	140	88,6	19,5	7	33	0	86
Espessamento de membrana citoplasm.	119	75,3	20,0	0	40	0	100
Células em girino	101	63,9	1,0	0	4	0	28
Células nuas	57	36,1	0,0	0	2	0	63
Células em fuso	20	12,7	0,0	0	0	0	2
Fagocitose	8	5,1	0,0	0	0	0	1
Canibalismo	3	1,9	0,0	0	0	0	2
Anel de sinete	2	1,2	0,0	0	0	0	2

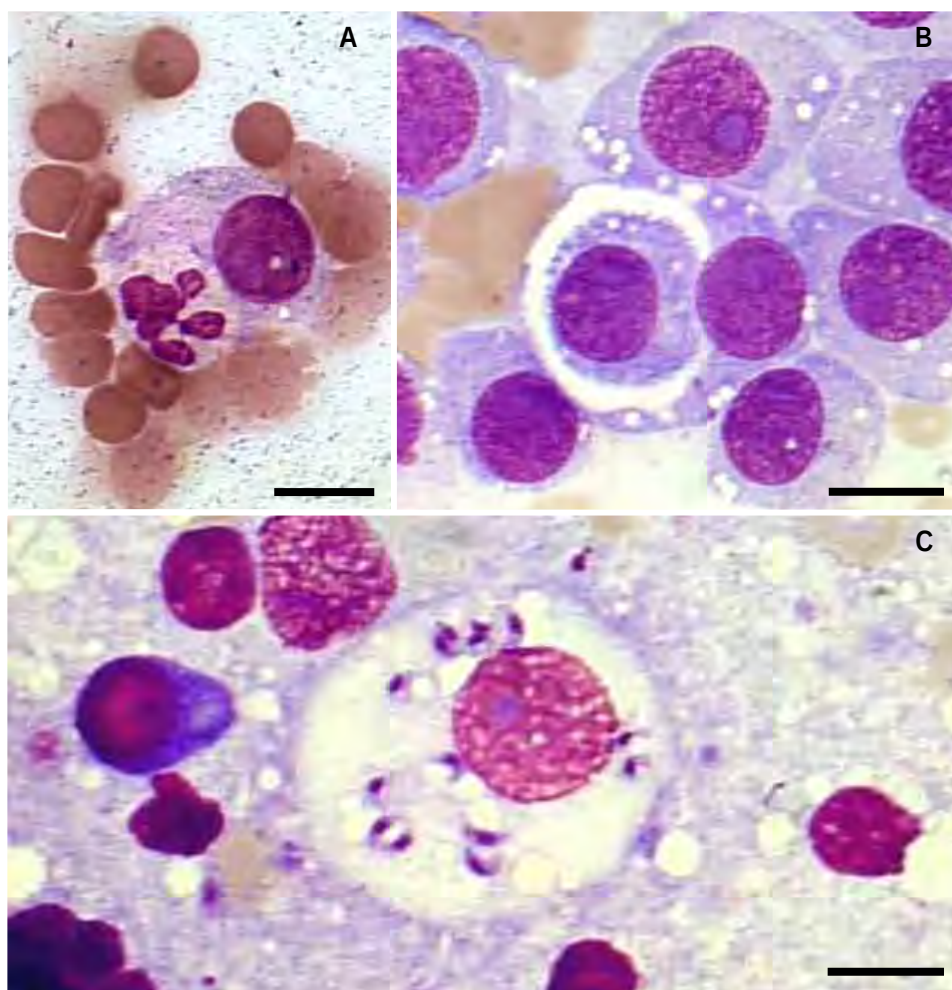


FIGURA 20 – Apresentação do padrão "célula-em-célula" no tumor venéreo transmissível: **A:** célula neoplásica fagocitando neutrófilo; **B:** canibalismo (fagocitose do mesmo tipo celular). Observar halo fagocitário que dá o aspecto de "olho de ave"; **C:** formas amastigotas de *Leishmania* parasitando uma célula neoplásica. Giemsa, barra: 10µm.

A. CÉLULAS EM FUSO: também chamadas de células em fibra, esta característica esteve presente em 20 amostras das 158 analisadas (12,7%). Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos cruzamentos entre grupos citomorfológicos, tamanho, evolução, comportamento biológico ou localização.

B. CÉLULAS GIRINO: esta foi uma das características citoplasmáticas de malignidade observadas com maior frequência, presente em

101 amostras (63,9%). Quando presente, oscilou entre 1 e 28%. A comparação entre os grupos citomorfológicos, apresentada na Tabela 26, mostra que houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos linfocitóide e plasmocitóide, com uma maior mediana de ocorrência no primeiro (Figura 21, 22).

TABELA 26 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células girino em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos.

GRUPO	MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	MÍN. (%)	MÁX. (%)
LINFOCITÓIDE	3 ^a	1	8,25	0	17
MISTO	1 ^{ab}	0	4,25	0	28
PLASMOCITÓIDE	1 ^b	0	3,00	0	10

^{a, b} letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,001$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

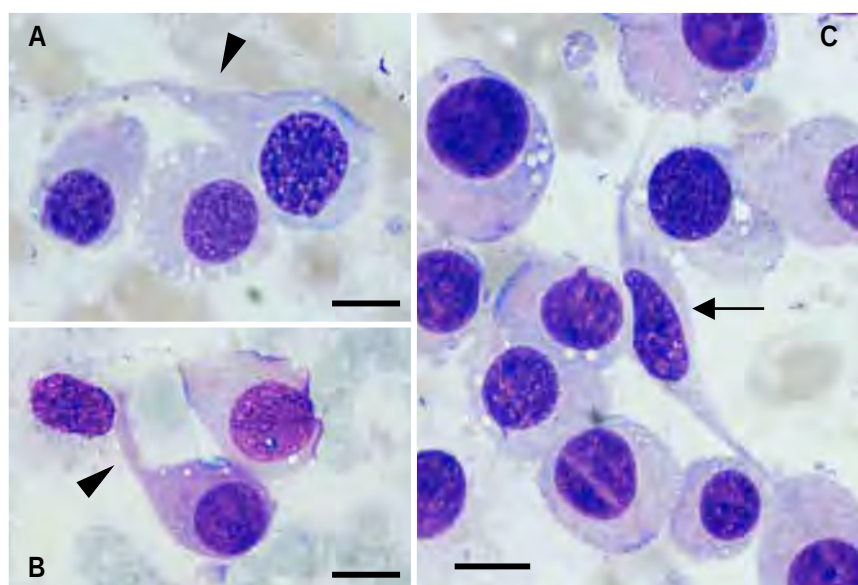


FIGURA 21 – Critérios de malignidade citoplasmáticos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível coradas por Giemsa: A e B: as cabeças de seta indicam célula girino (ou célula em raquete); C: célula em fibra (seta) . Barra: 10 μ m.

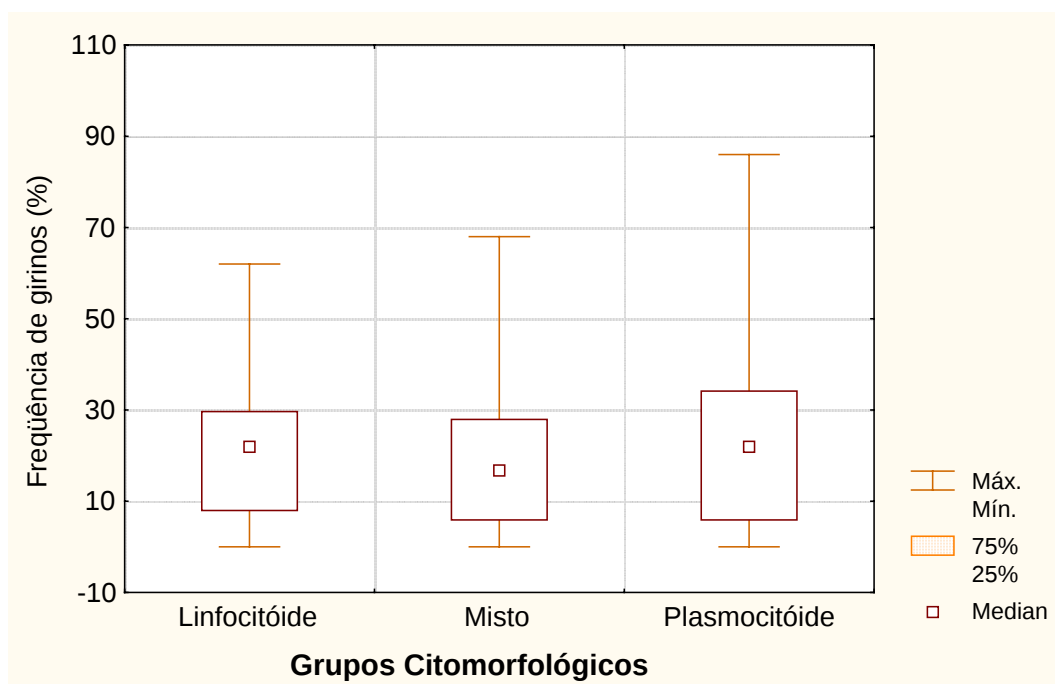


FIGURA 22 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células girino em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos.

C. CÉLULAS NUAS: presente em 36,1% dos casos, este achado teve uma variabilidade muito grande no número de ocorrências por amostra: apesar do valor máximo ter sido 63%, a média foi 3,8% e a mediana, 0%. Não foram notadas diferenças significativas entre os grupos pela comparação de freqüências (presente ou ausente) pelo teste de χ^2 , nem pelos testes de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

D. PROJEÇÕES CITOPASMÁTICAS: sua presença confere um aspecto amebóide às células de TVT (Figura 23). Foi um dos achados mais freqüentes no tumor venéreo transmissível, estando ausente em apenas 18 amostras (11,4%). Além disso, o percentual de células com projeções citoplasmáticas era alto, chegando a 86% (mediana 19,5%; média 21,9%). Não

foram percebidas diferenças significativas na ocorrência de projeções citoplasmáticas nas comparações entre quaisquer grupos.

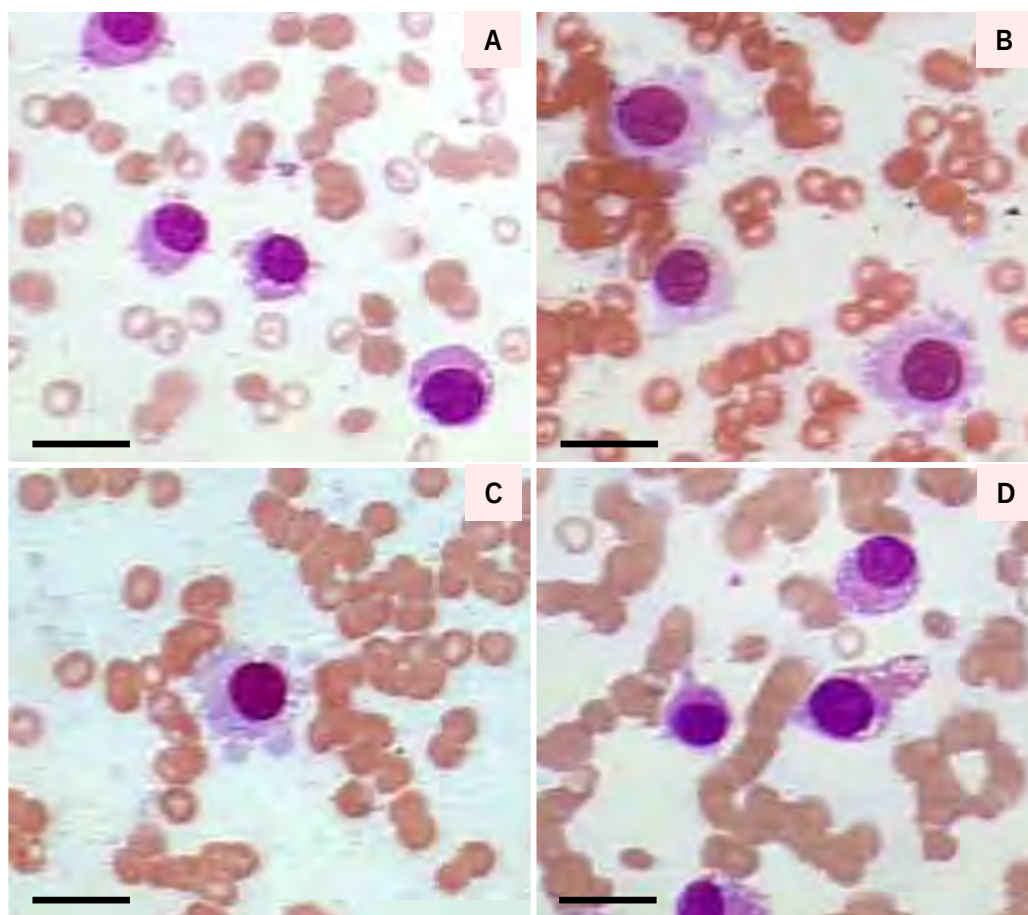


FIGURA 23 – Projeções citoplasmáticas verificadas em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível coradas pelo Giemsa (barra: 20 μ m).

E. ESPESAMENTO DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICA: este critério morfológico (Figura 24) esteve presente em 119 amostras (75,3%) e foi o de segunda maior frequência entre as características citoplasmáticas. Apesar de não ter havido diferenças significativas, nas comparações entre massas primárias e não primárias e entre massas genitais e extragenitais, a diferença

entre os grupos foi evidente ($p=0,08$), como pode ser verificado na Tabela 27 e Figura 25.

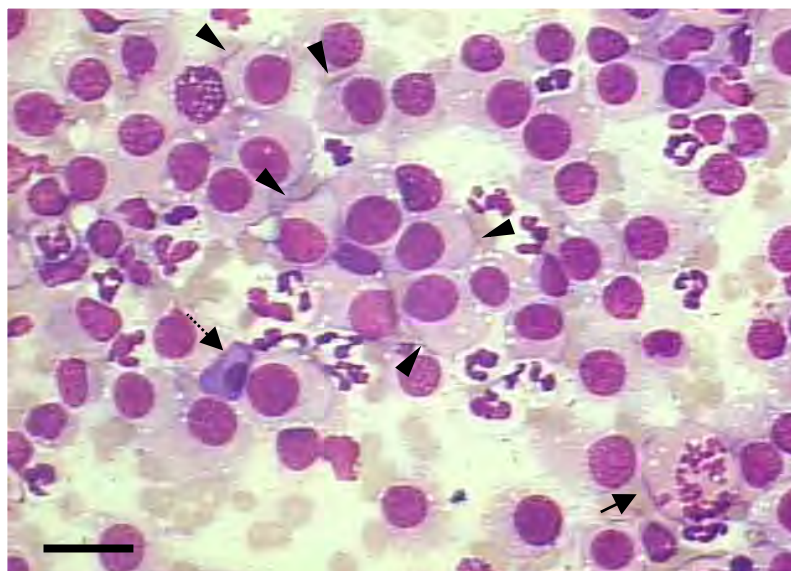


FIGURA 24 – Espessamento de membrana citoplasmática em células de tumor venéreo transmissível coradas com Giemsa (cabeças de seta). A seta mostra uma figura de mitose e a seta pontilhada destaca um plasmócito infiltrado no tumor (barra: 20 μ m).

TABELA 27 – Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com espessamento de membrana citoplasmática em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com comportamento biológico e localização.

COMPORTAMENTO BIOLÓGICO						
	<i>n</i>	MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	Mín. (%)	Máx. (%)
PRIMÁRIA	109	23	3	44,25	0	80
NÃO-PRIMÁRIA	49	12	0	33,25	0	100
LOCALIZAÇÃO						
GENITAL	111	23	3	43,5	0	80
EXTRAGENITAL	47	12	0	33,0	0	100

$p=0,08$ pelo teste de Mann-Whitney

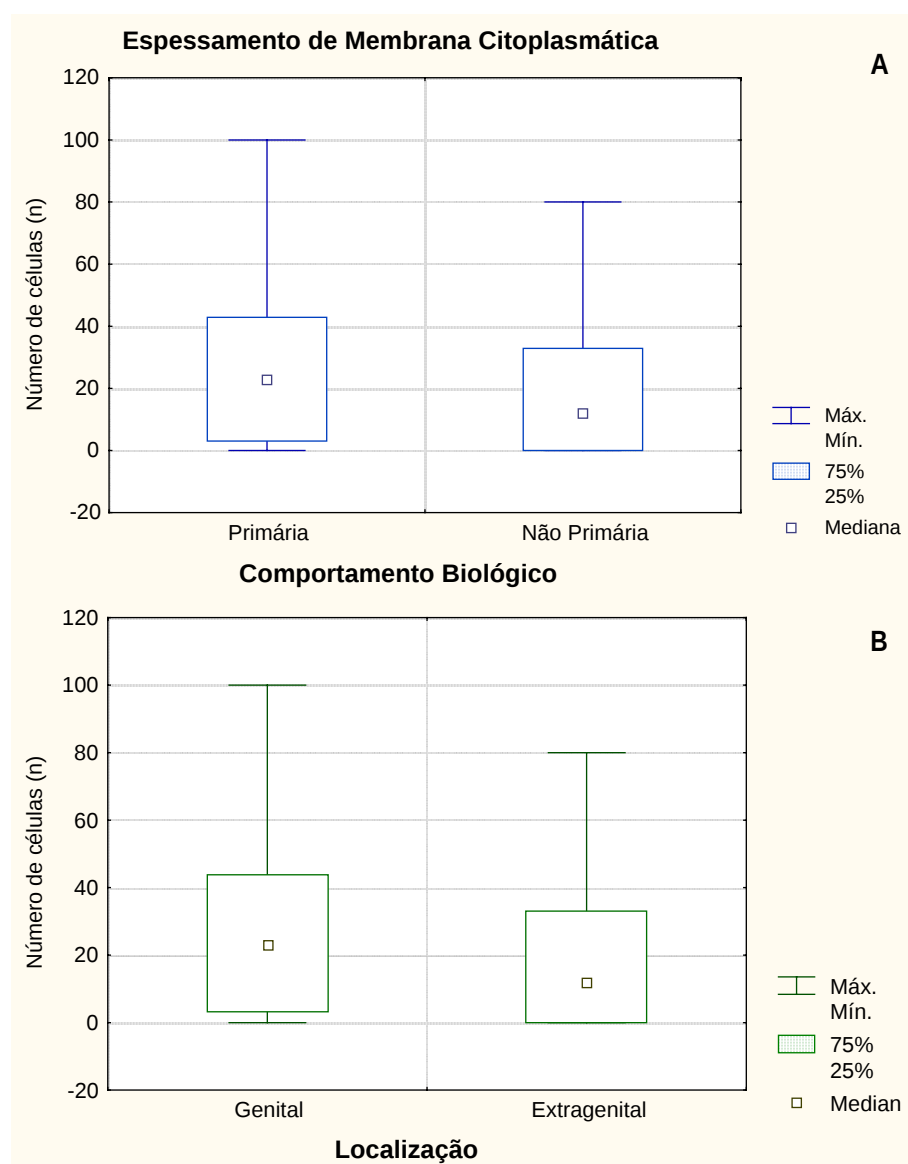


FIGURA 25 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com espessamento de membrana citoplasmática em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com comportamento biológico (a) e localização (b).

4.2.2.3 Critérios de Malignidade Nucleares

Todas as observações foram quantificadas em termos de número de células apresentando a característica na população contada, para a expressão de número relativo (%). Dos critérios nucleares de malignidade estudados, a presença de FISSURAS NUCLEARES e MULTINUCLEAÇÃO foram os menos freqüentes (14 e 15 casos - 8,7 e 9,4%, respectivamente); a presença de

LOBULAÇÕES NUCLEARES, NÚCLEOS RINIFORMES, BINUCLEAÇÃO e MICRONUCLEAÇÃO também ocorreu em frequência baixa, em cerca de um terço das amostras. A análise descritiva destes critérios encontra-se na Tabela 28 e exemplos dos achados estão na Figura 26. Estas variáveis foram analisadas por estatística de χ^2 , considerando a presença da alteração sem avaliar a intensidade da ocorrência, ou seja, sem levar em consideração o número de células com a característica em cada caso. A análise da frequência de núcleos riniformes, lobulação nuclear, multinucleação e micronucleação não revelou diferenças entre os grupos. Já para a presença de binucleação (Figura 27), o teste de χ^2 mostrou uma proporção de células binucleadas nas massas neoplásicas grandes (maiores de 5cm) acima da esperada pelo teste de χ^2 ($p=0,05$). Este achado está detalhado na Tabela 29 e Figura 28.

TABELA 28 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células com critérios nucleares de malignidade em amostras de tumor venéreo transmissível.

CRITÉRIO	POSITIVOS		MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	Mín. (%)	MÁX. (%)
	<i>n</i>	%					
Brotamentos	151	95,6	05	3,00	10,0	0	43
Halo perinuclear	137	86,7	80	16,25	100,0	0	100
Hipercromia	133	84,2	07	2,25	3,0	0	43
Pseudoinclusões	108	68,4	03	0,00	5,75	0	40
Espess. membr. nucl	107	67,7	20	0,25	40,0	0	100
Mitoses anormais	103	65,2	01	0,00	2,0	0	08
Mitoses normais	85	53,8	01	0,00	2,0	0	06
Núcleos riniformes	73	46,2	00	0,00	1,0	0	16
Binucleação	67	42,4	00	0,00	1,0	0	12
Lobulações nucleares	58	36,7	00	0,00	1,0	0	21
Micronucleação	36	22,8	00	0,00	0,0	0	07
Multinucleação	15	9,4	00	0,00	0,0	0	04
Fissuras nucleares	14	8,9	00	0,00	0,0	0	03

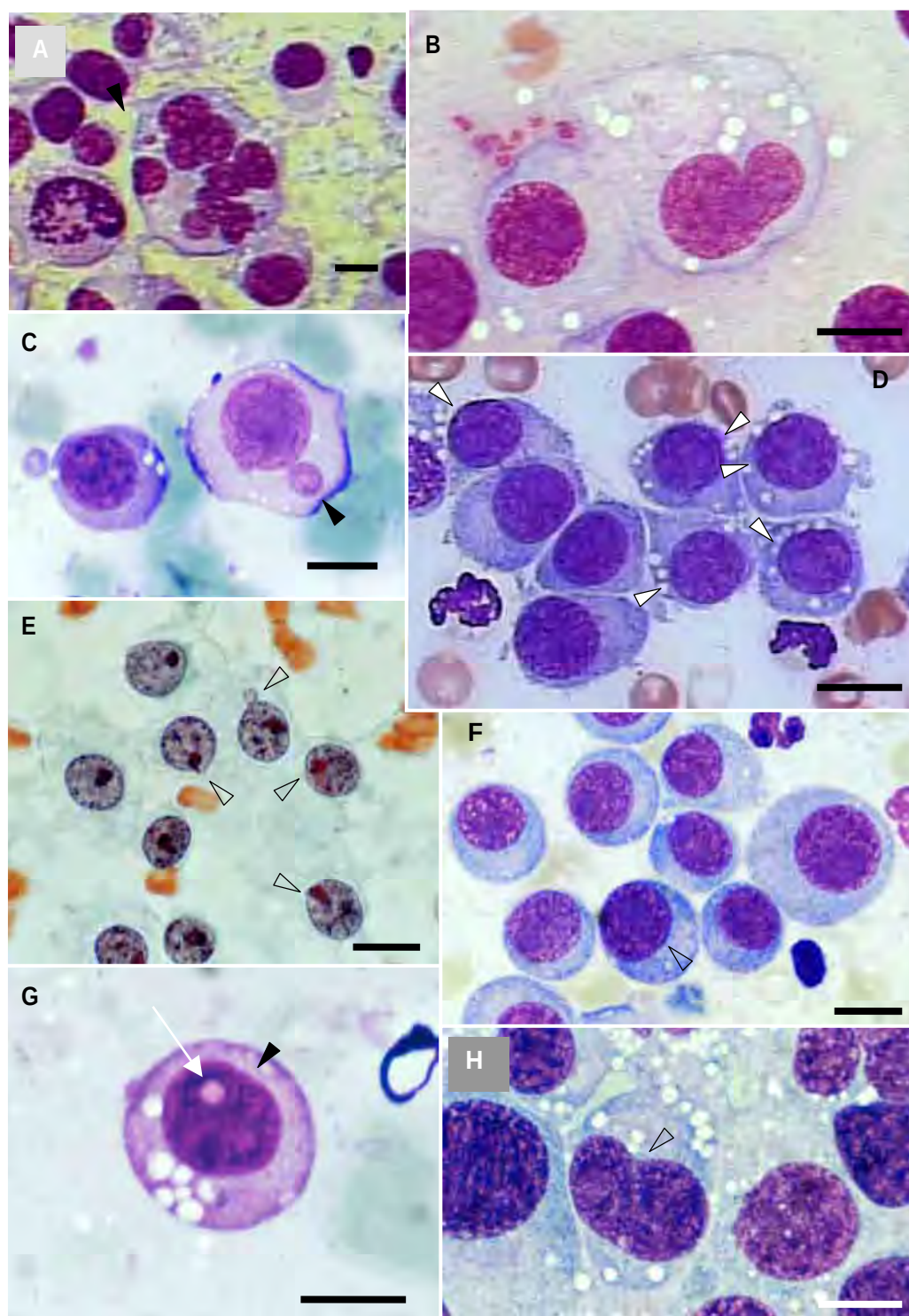


FIGURA 26 – Critérios de malignidade nucleares observados no tumor venéreo transmissível: **A**: multinucleação; as setas apontam micronúcleos entre os núcleos de diversos tamanhos; **B**: uma grande lobulação nuclear confere aspecto indentedo ao núcleo; **C**: célula binucleada apresentando um núcleo acessório bem menor que o núcleo principal (micronucleação); **D**: espessamento de membrana nuclear (setas); **E**: brotamentos nucleares de vários tamanhos evidentes em amostra corada por Shorr; **F**: hiperchromia, representada pela maior afinidade tintorial; esta célula apresenta também espessamento de membrana nuclear (seta); **G**: halo perinuclear (cabeça de seta) e pseudoinclusão nuclear (seta); **H**: núcleo riniforme, associado a fissura nuclear, nesta célula. Coloração (exceto em **E**) Giemsa; barra: 10µm.

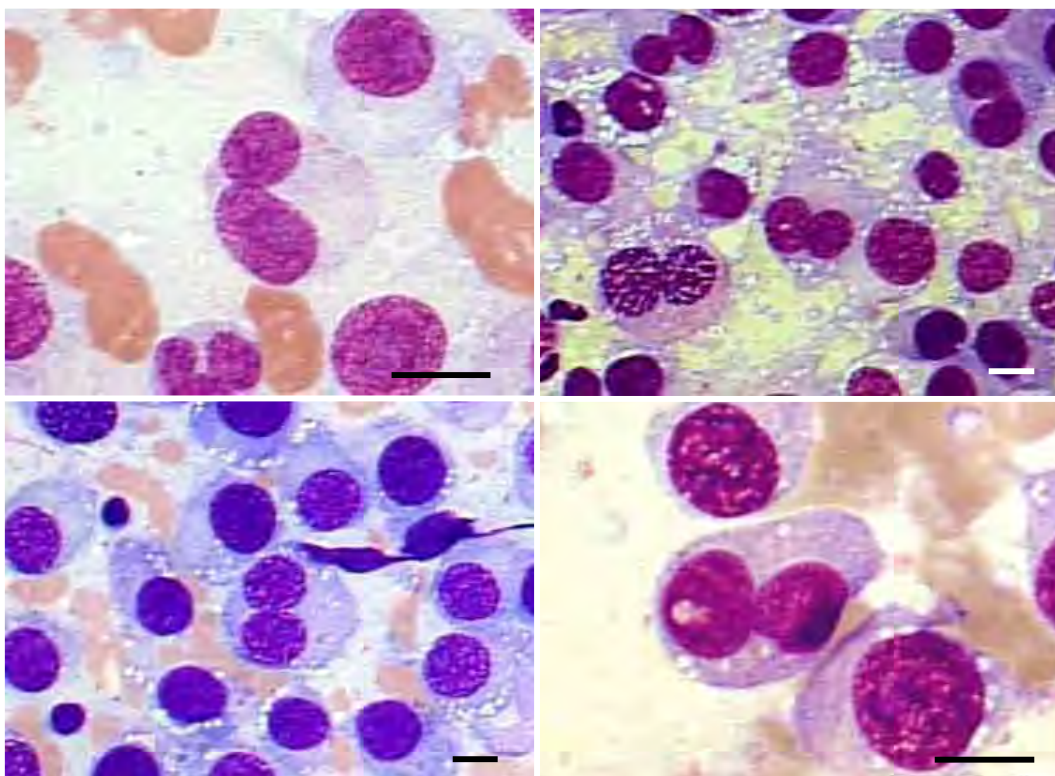


FIGURA 27 – Células binucleadas de tumor venéreo transmissível observadas em amostras citológicas coradas pelo Giemsa (barra 10µm).

TABELA 29 - Frequência de binucleação verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de acordo com o tamanho.

GRUPOS OBSERVAÇÃO	PEQUENOS		MÉDIOS		GRANDES	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AUSENTE	39	68,4	21	42,0	23	45,1
PRESENTE	18	31,6	29	58,0	28	54,9
TOTAL	57	100	50	100	51	100

p=0,05 pelo teste de χ^2

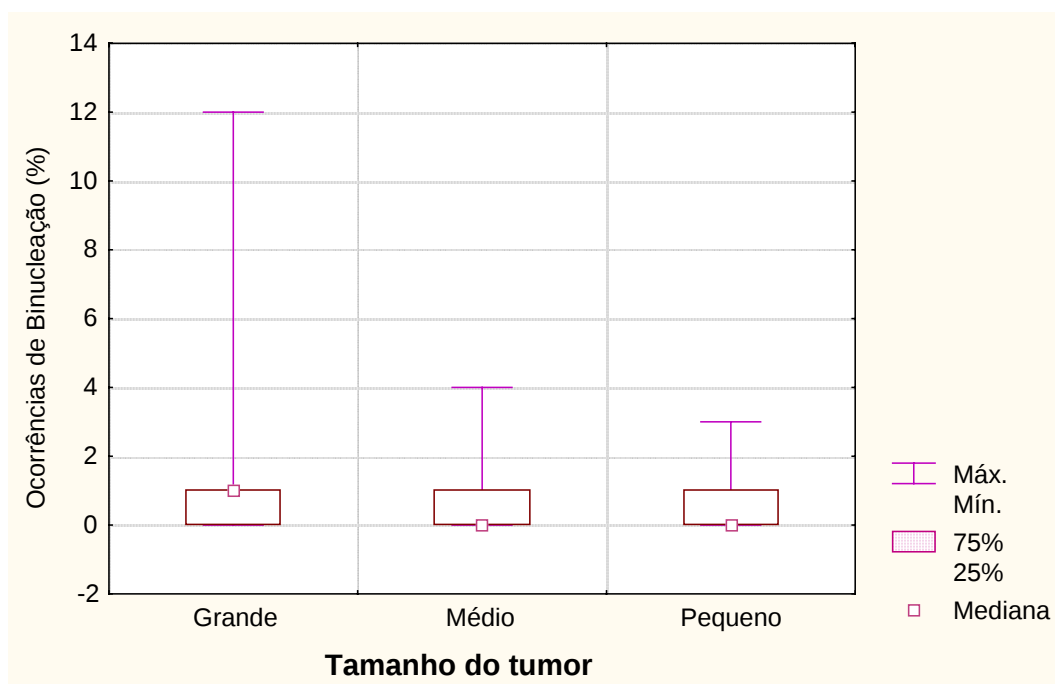


FIGURA 28 - Frequência de binucleação verificada nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível de acordo com o tamanho.

A HIPERCROMASIA, também chamada de hiperchromia, foi uma das observações nucleares mais frequentes, presente em 84% das amostras, em graus variáveis. O ESPESSAMENTO DE MEMBRANA NUCLEAR e as PSEUDOINCLUSÕES NUCLEARES estiveram presentes em 67,7 e 68,4%, respectivamente, das amostras analisadas, o último em frequência baixa por caso. Quanto às mitoses, nos casos de tumores venéreos transmissíveis estudados, foi mais frequente o aparecimento de MITOSES ANORMAIS do que NORMAIS (Figura 29), tanto em frequência quanto em números absolutos por caso, embora os valores de mediana não reflitam esse resultado, devido à grande variabilidade. Já o HALO PERINUCLEAR teve um índice de ocorrência de 87,3%, mas, assim como os demais, sem diferenças significativas quando analisados os grupos pelos testes de comparação para dados não paramétricos (Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, $p \leq 0,05$). O resumo estatístico destas variáveis está detalhado na Tabela 29,

considerando o total de 158 amostras citológicas. Os BROTAMENTOS NUCLEARES estiveram presentes em mais de 95% dos casos, com diferenças significativas entre os grupos citomorfológicos (Tabela 30, Figura 30).

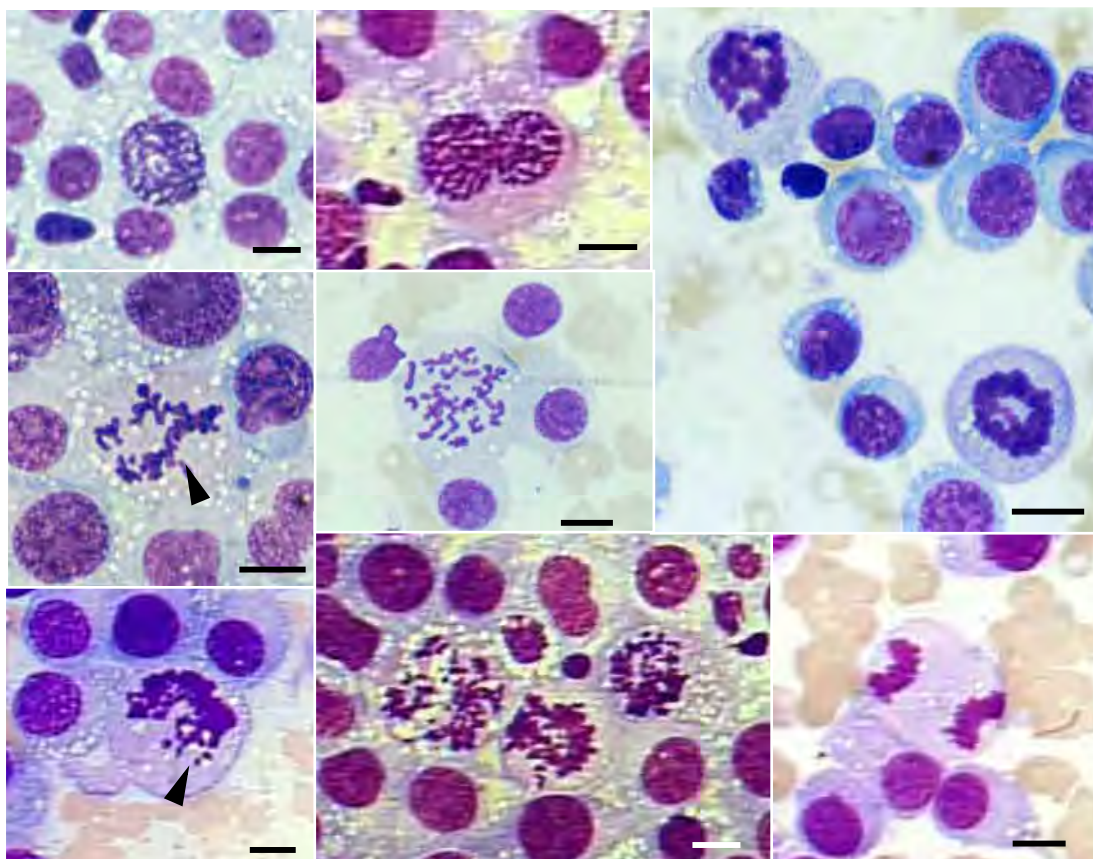


FIGURA 29 – Figuras de mitose, normais e anormais, observadas em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível. As cabeças de seta apontam *chromatin lag*. Giemsa, barra: 10µm.

TABELA 30 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células apresentando brotamentos nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos.

	MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	MÍN. (%)	MÁX. (%)
LINFOCITÓIDE	3 ^a	1	7,75	0	17
MISTO	6 ^b	3	11,00	0	28
PLASMOCITÓIDE	6 ^b	3	10,75	0	10

^{a, b} letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

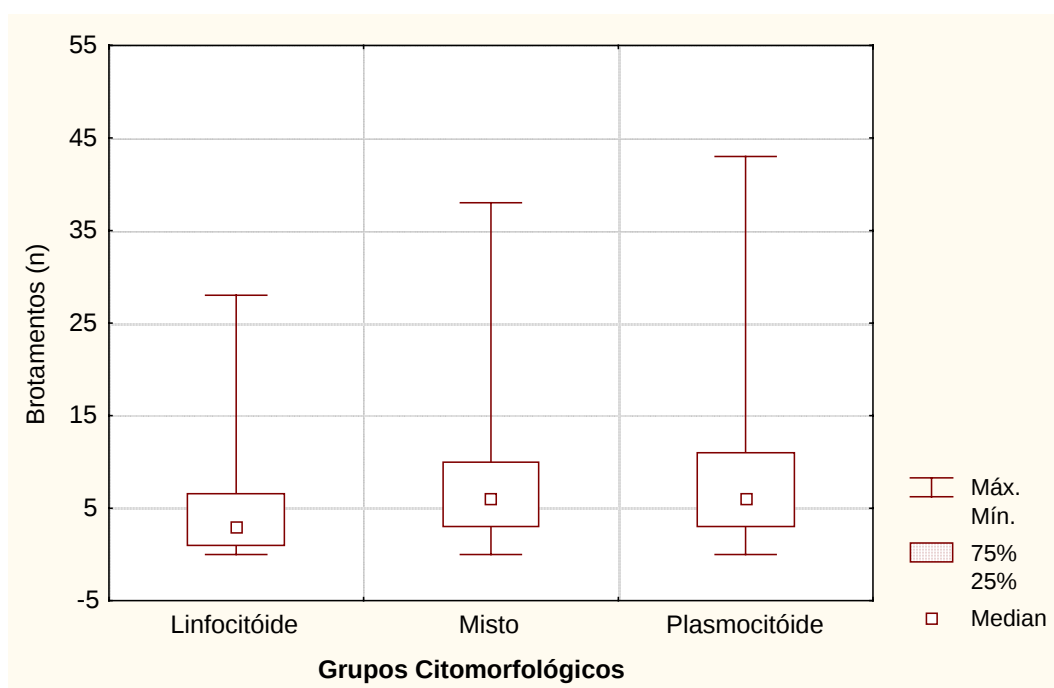


FIGURA 30 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células apresentando brotamentos nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível nos grupos citomorfológicos.

4.2.2.4 Critérios de Malignidade Nucleolares

Os critérios nucleolares de malignidade não foram observados em número significativo nas amostras estudadas; halos perinucleolares foram evidenciados em quatro casos. Não foram detectados nucléolos angulares ou

anisonucleose, apesar de terem sido observados nucléolos alongados em três casos.

4.2.3 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Para a análise do infiltrado inflamatório foram selecionadas exclusivamente as amostras citológicas sem contaminação com sangue ou tecido linfóide (aspirados de linfonodos). Também foram excluídas amostras com processo inflamatório bacteriano, por não refletirem a presença das células por ação da neoplasia. Desta forma, foram analisadas 117 amostras, avaliando o efeito dos grupos citomorfológicos, de comportamento biológico (primárias *versus* não primárias), localização (genitais *versus* não genitais), tempo de evolução (recentes, estabelecidas e recentes) e tamanho (pequenas, médias e grandes), através dos testes de comparação para dados não paramétricos (Kruskal-Wallis e Dunn ou Mann-Whitney).

A análise dos efeitos de tamanho e tempo de evolução não mostrou qualquer relação significativa com a presença de células inflamatórias ou mononucleares no tecido tumoral, observáveis pela análise citopatológica. Já no cruzamento entre os grupos citomorfológicos, foi evidenciada diferença no infiltrado de monócitos, o qual apresentou-se significativamente mais elevado nos tumores linfocitóides do que nos plasmocitóides (Tabela 31, Figura 31).

TABELA 31 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de monócitos infiltrados em amostras de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

	MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	Mín. (%)	Máx. (%)
LINFOCITÓIDE	1 ^a	1	3	0	10
MISTO	1 ^{ab}	0	2	0	7
PLASMOCITÓIDE	0 ^b	0	1	0	8

^{a, b} letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

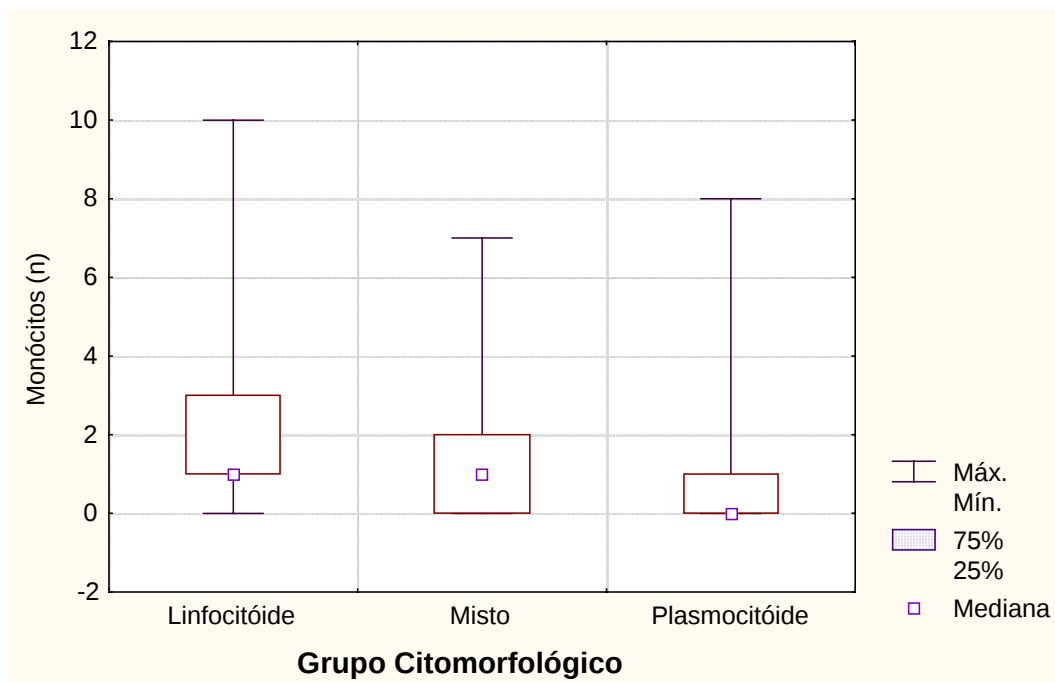


FIGURA 31 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de monócitos infiltrados em amostras de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

Na comparação entre massas genitais e extragenitais foi observada diferença significativa no infiltrado de células polimorfonucleares e mononucleares, sempre superior nos tumores genitais. Estas análises,

realizadas pelo teste de comparação de *ranks* de Mann-Whitney estão na Tabela 32 e sua representação gráfica na Figura 32.

TABELA 32 - Mediana, percentis (P_{25} : P_{75}) e probabilidade dos diferentes infiltrados celulares observados em amostras de tumor venéreo transmissível de localização genital e extragenital.

INFILTRADO		LINFÓCITOS				
LOCALIZAÇÃO	MEDIANA (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	Mín. (%)	MÁX. (%)	P*
GENITAL	7,0	3	17,0	0	73	0,04
EXTRAGENITAL	3,5	2	9,5	0	40	
INFILTRADO		PLASMÓCITOS				
GENITAL	2	0	5,0	0	20	0,04
EXTRAGENITAL	1	0	2,5	0	8	
INFILTRADO		NEUTRÓFILOS				
GENITAL	11,0	5	25,25	0	91	0,001
EXTRAGENITAL	4,5	2	8,00	0	50	
INFILTRADO		EOSINÓFILOS				
GENITAL	1	0	3,25	0	33	0,05
EXTRAGENITAL	0	0	1,00	0	19	
INFILTRADO		MONÓCITOS				
GENITAL	1	0	2,0	0	10	0,007
EXTRAGENITAL	0	0	1,0	0	4	
INFILTRADO		MACRÓFAGOS				
GENITAL	1	0	2,0	0	10	0,02
EXTRAGENITAL	0	0	1,0	0	6	

* diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney

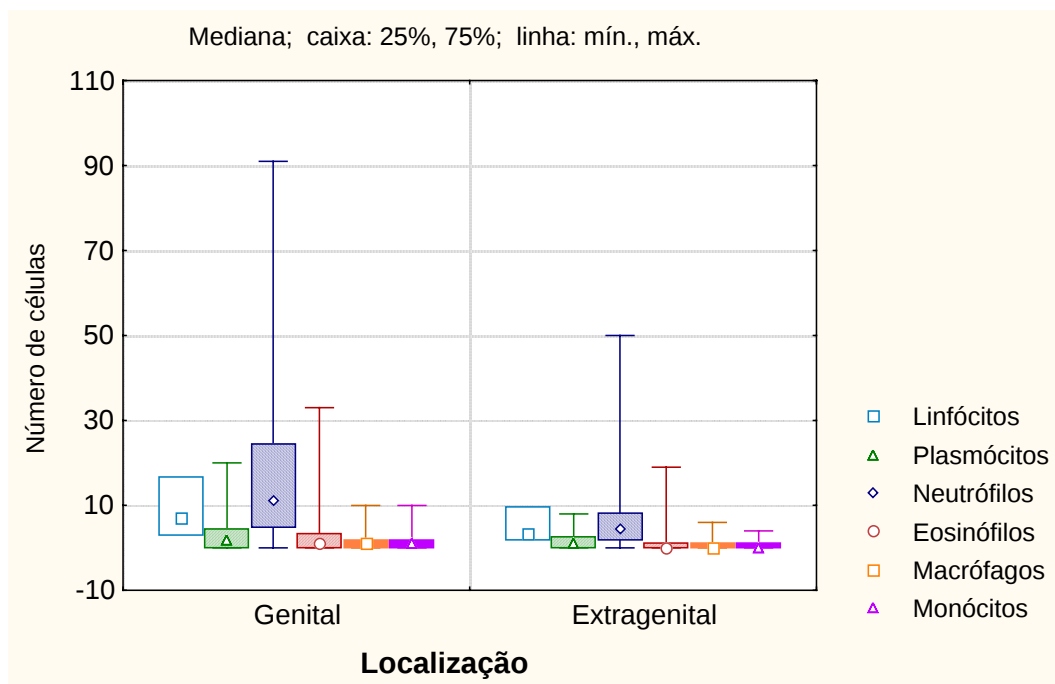


FIGURA 32 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) dos diferentes infiltrados celulares observados em amostras de tumor venéreo transmissível de localização genital e extragenital.

A análise do fator comportamento biológico (comparação entre massas primárias e não primárias) evidenciou diferenças no infiltrado de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, sempre maiores nas massas primárias (Tabela 33, Figura33).

TABELA 33 - Mediana, percentis (P_{25} : P_{75}) e probabilidade do infiltrado celular observado em amostras de tumores venéreos transmissíveis primários e não primários.

INFILTRADO			LINFÓCITOS			
LOCALIZAÇÃO	MEDIANA (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	Mín. (%)	MÁX. (%)	P*
PRIMÁRIO	7,0	3	16,5	0	40	0,026
NÃO PRIMÁRIO	3,5	1	10,0	0	73	
INFILTRADO			PLASMÓCITOS			
PRIMÁRIO	2,0	0	4,0	0	19	0,349
NÃO PRIMÁRIO	1,0	0	4,0	0	20	
INFILTRADO			NEUTRÓFILOS			
PRIMÁRIO	11,0	5	25,75	0	91	0,001
NÃO PRIMÁRIO	4,0	2	8,00	0	20	
INFILTRADO			EOSINÓFILOS			
PRIMÁRIO	1,0	0	4,0	0	10	0,024
NÃO PRIMÁRIO	0,0	0	1,0	0	10	
INFILTRADO			MACRÓFAGOS			
PRIMÁRIO	1,0	0	2,0	0	10	0,175
NÃO PRIMÁRIO	0,0	0	1,0	0	05	
INFILTRADO			MONÓCITOS			
PRIMÁRIO	1,0	0	2,0	0	10	0,004
NÃO PRIMÁRIO	0,0	0	1,0	0	04	

* probabilidade obtida pelo teste de Mann-Whitney

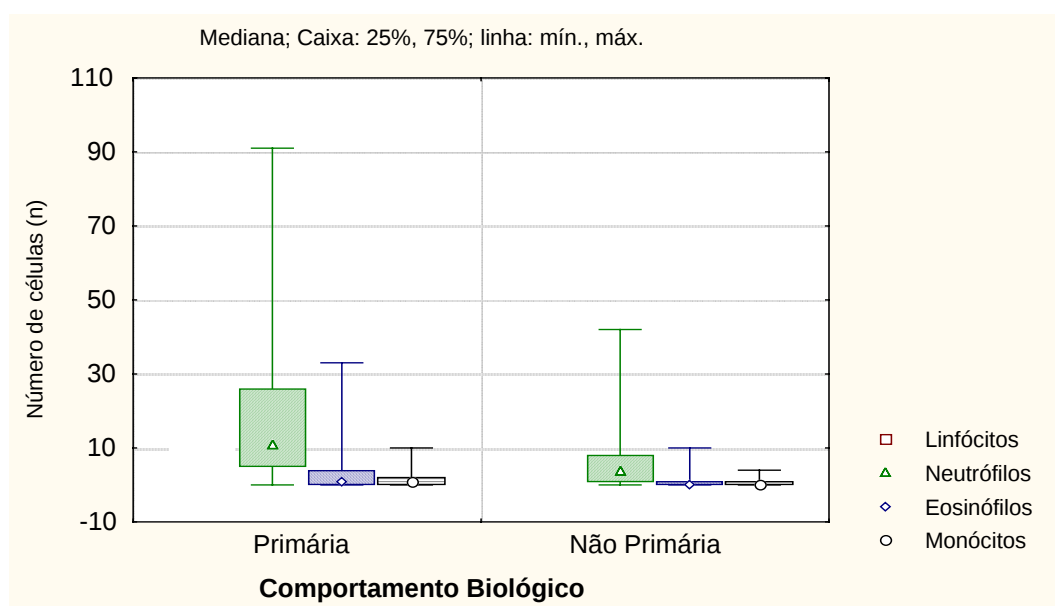


FIGURA 33 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) dos diferentes infiltrados celulares observados em amostras de tumores venéreos transmissíveis primários e não primários.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de preparados histológicos e citológicos de nove tumores foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Unesp – campus de Botucatu, com o objetivo de identificar possíveis diferenças entre as morfologias celulares.

As células do tumor venéreo transmissível apresentaram-se com poucas características distintivas de uma função específica. A membrana celular apresentava extensões citoplasmáticas curtas (microvilos, Figura 34a) ou longas (*filopodia*, Figuras 38a, b), estas geralmente dobradas sobre a superfície externa das células e conferindo uma aparência laminar às junções celulares (Figuras 38a, b).

As mitocôndrias variavam entre redondas e pequenas (Figura 37b) a grandes e ovais (Figura 38a, 38b), geralmente com poucas cristas e uma pequena quantidade de matriz granular. O complexo de Golgi (Figura 37a) e vesículas associadas estavam presentes em quantidades variáveis, seguidamente associados ao centríolo. O retículo endoplasmático rugoso foi mais freqüente que o retículo liso. Ribossomos livres ou como polissomos foram abundantes. Vacúolos citoplasmáticos e grânulos elétron-denso (Figura 37a) foram vistos em freqüência variável. Gotículas de lipídios foram bastante freqüentes (Figuras 34a, 35a, 38a), assim como o aparecimento de figuras de mielina (Figura 38a).

O núcleo, de redondo a oval (Figuras 34, 35, 36, 37), era sempre grande e geralmente excêntrico, com pouca quantidade de cromatina condensada, a não ser por aquela aderida à face interna do envoltório nuclear. Invaginações e projeções nucleares (brotamentos) foram achados freqüentes (Figuras 34a, 37b). Dentro do núcleo foram evidenciados um ou dois nucléolos,

grandes, com um padrão reticular e nucleolonema e com uma grande porção de cromatina associada (Figuras 34-36).

Na comparação entre as células dos diferentes tipos citomorfológicos, observou-se que, além da quantidade maior de citoplasma apresentada pelas células do tipo plasmocitóide, elas possuíam maiores quantidades de mitocôndrias (e estas eram igualmente maiores) que aquelas observadas nas células linfocitóides. As estruturas do complexo de Golgi e a quantidade de vesículas eram também muito mais bem elaboradas e em maior quantidade nas células plasmocitóides. Nas células linfocitóides predominavam, como principais estruturas citoplasmáticas, ribossomas e polissomas, com poucas mitocôndrias e raras saculações do complexo de Golgi, conferindo um aspecto homogêneo e monótono ao seu citoplasma (Figura 34a). As projeções citoplasmáticas tendiam a ser menores e mais escassas neste grupo citomorfológico. O núcleo não apresentou variação entre os tipos celulares.

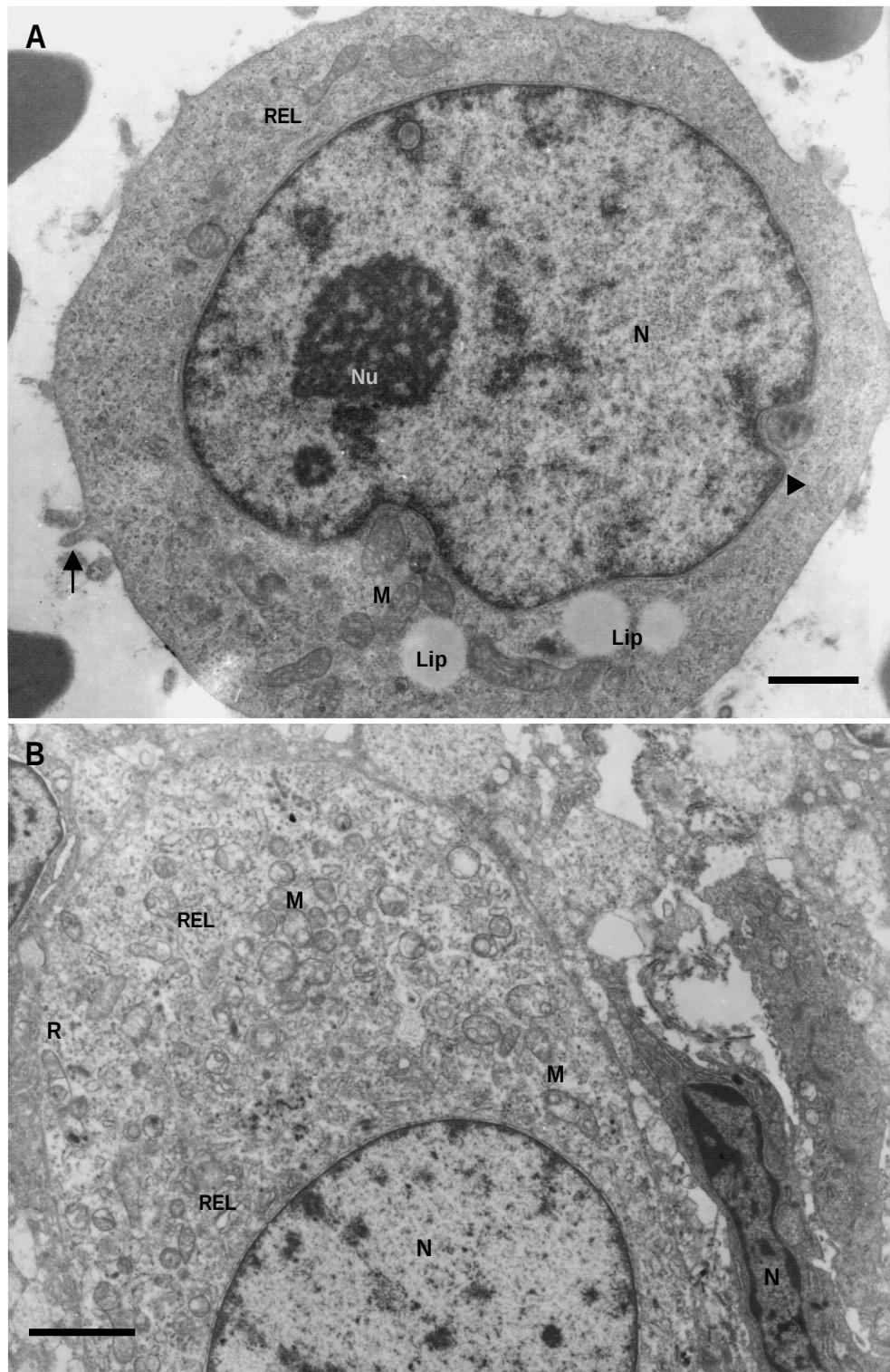


FIGURA 34 - Microscopia eletrônica de transmissão de tumor venéreo transmissível. **A:** célula de padrão linfocitóide: citoplasma preenchido por ribossomos e polissomos, com poucas organelas destacadas. São visíveis algumas mitocôndrias (M), a estrutura delicada de retículo endoplasmático liso (REL) e inclusões lipídicas (Lip). O núcleo (N) apresenta escassa cromatina condensada e um nucléolo (Nu) com padrão nucleolêmico. A seta mostra microvilos na membrana citoplasmática e a cabeça de seta indica invaginação nuclear. Barra = 1 μ m; aumento 13250x. **B:** célula plasmocitóide: o citoplasma é mais abundante, com maior quantidade de mitocôndrias (M) de vários tamanhos e formas, com poucas cristas e matriz granular; a estrutura do retículo citoplasmático liso é mais desenvolvida. Em R, ribossomos; N: núcleo. Aumento de 7750x; barra = 2 μ m.

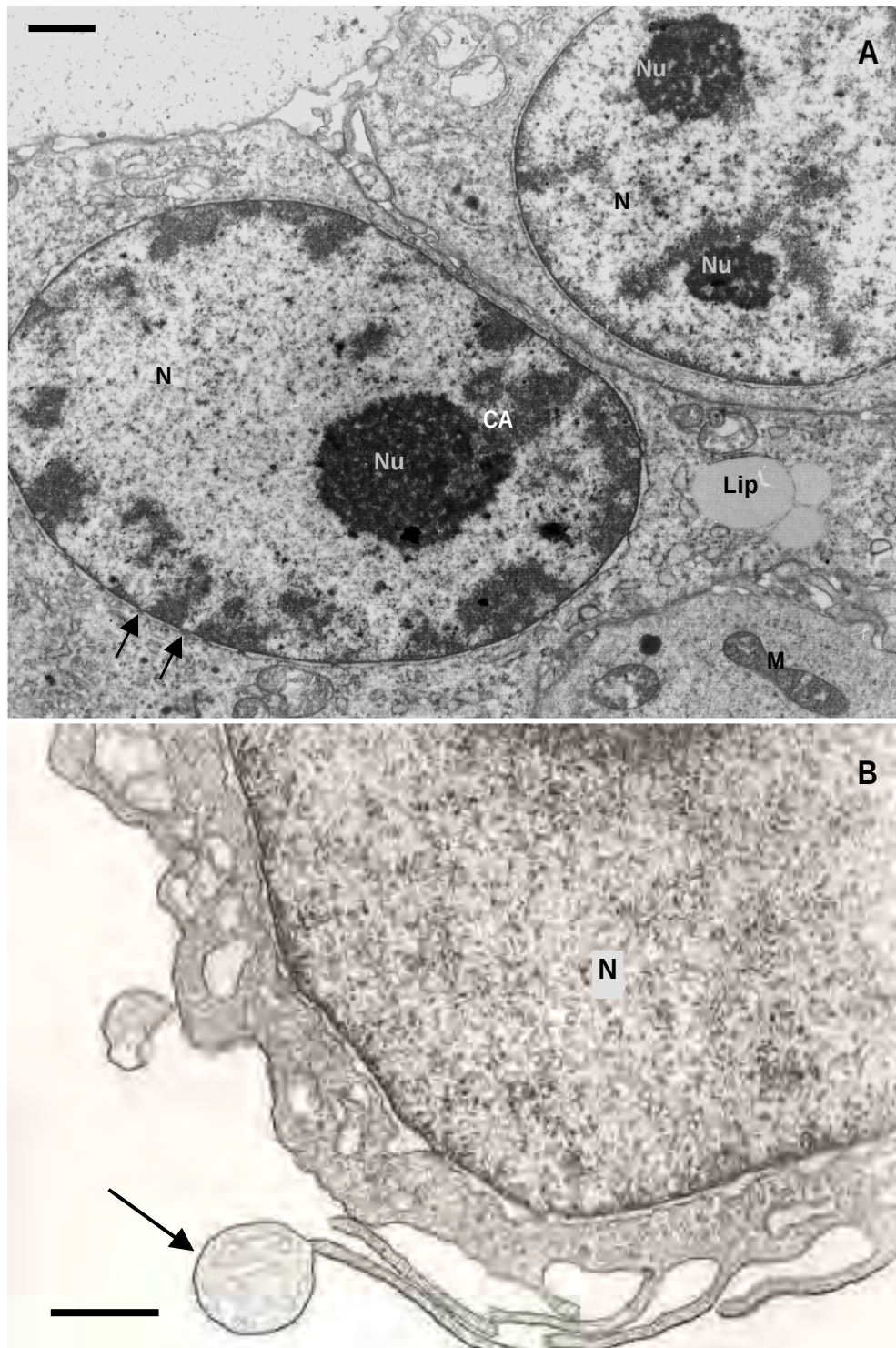


FIGURA 35 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de tumor venéreo transmissível. **A:** duas células no campo apresentando núcleos (N) grandes e excêntricos, uma delas com dois nucléolos (Nu). Observa-se a cromatina associada ao nucléolo (CA) no núcleo maior. As setas apontam poros nucleares; M: mitocôndria; Lip: inclusões lipídicas. Aumento 9750x (barra = 1µm). **B:** ampliação de 31500x de uma célula isolada de TVT, evidenciando *filopodia*. A vesícula com conteúdo citoplasmático (seta) é visualizada na microscopia ótica como corpúsculo linfoglandular. N= núcleo; Nu= nucléolo (barra = 0,5µm).

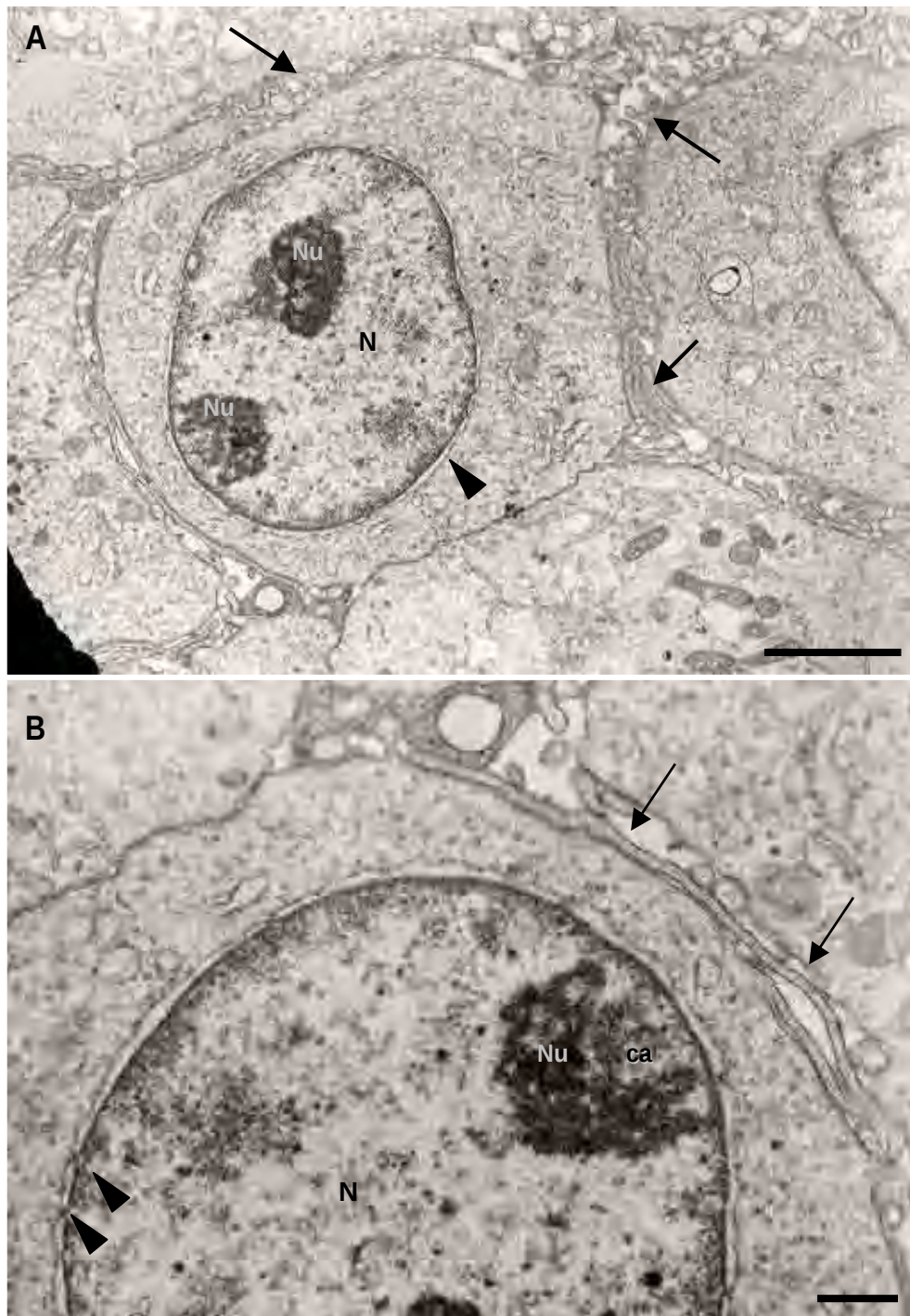


FIGURA 36 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de tumor venéreo transmissível. **A:** N= núcleo; Nu= nucléolo; cabeça de seta= espaço perinuclear. Observar projeções da membrana celular (setas) nas junções celulares (*filopodia*). Aumento 9750x (barra = 2 μ m). **B:** Maior ampliação da célula mostrada em A. N= núcleo; Nu= nucléolo; ca= cromatina associada ao nucléolo, cabeça de seta= poros nucleares. Aumento de 23000x (barra = 0,5 μ m).

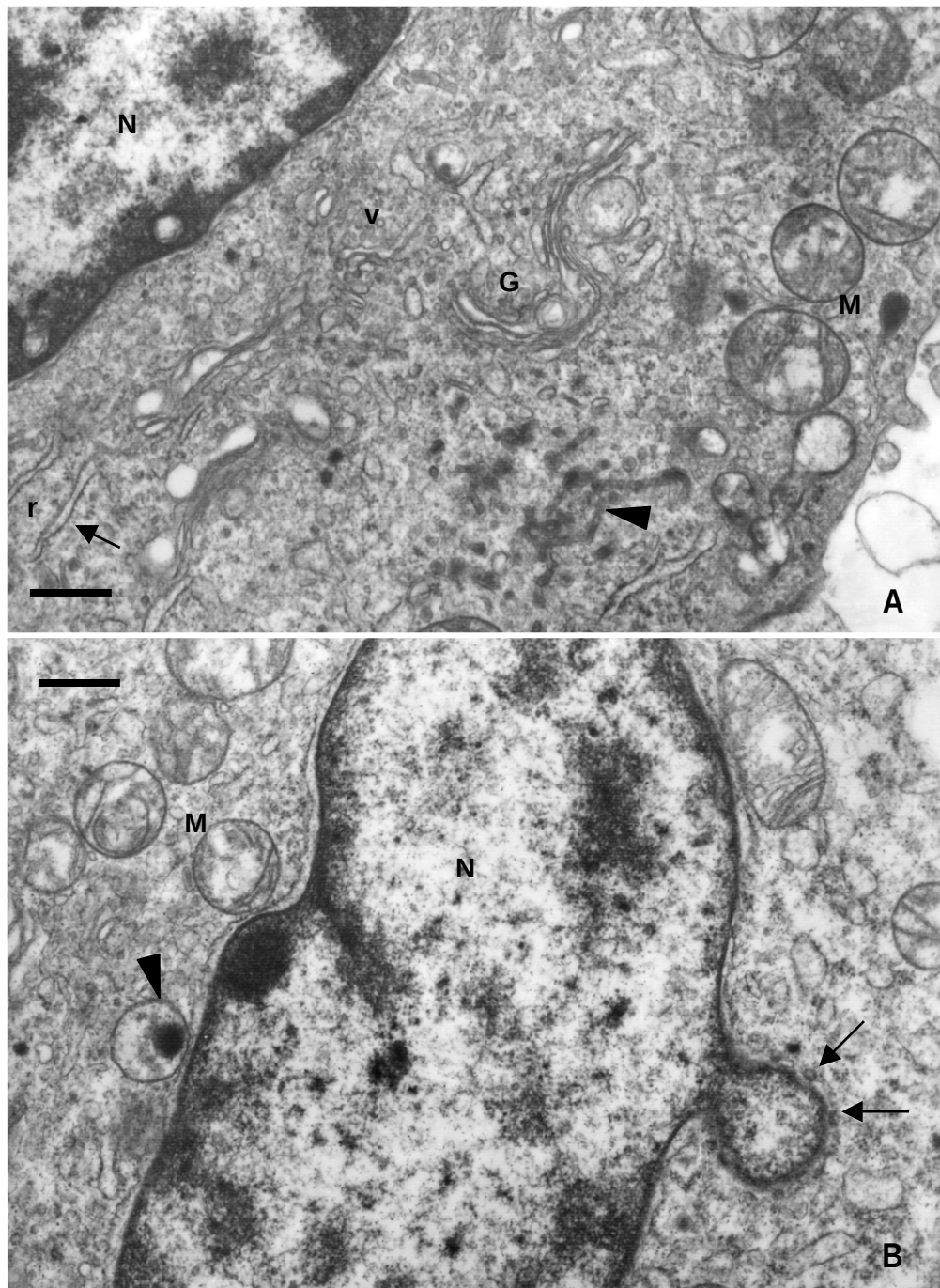


FIGURA 37 – Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão de tumor venéreo transmissível, padrão plasmocitóide. **A:** observa-se a formação em vesículas achatadas do aparelho de Golgi (G), o retículo endoplasmático rugoso (r) com os ribossomos aderidos à superfície (seta) e estruturas tubulares do retículo liso com material elétron-denso no interior (cabeça de seta). N= núcleo; M= mitocôndrias (aumento 23000x, barra= 0,5 μ m). **B:** outra amostra do mesmo tumor em A, mostrando uma lobulação nuclear. O corte tangencial permitiu a visualização dos esfínteres dos poros nucleares (setas). Notam-se as mitocôndrias (M) com poucas cristas e matriz granular. A cabeça de seta marca a presença de uma vesícula com material elétron-denso; N= núcleo (aumento de 23000x; barra= 0,5 μ m).

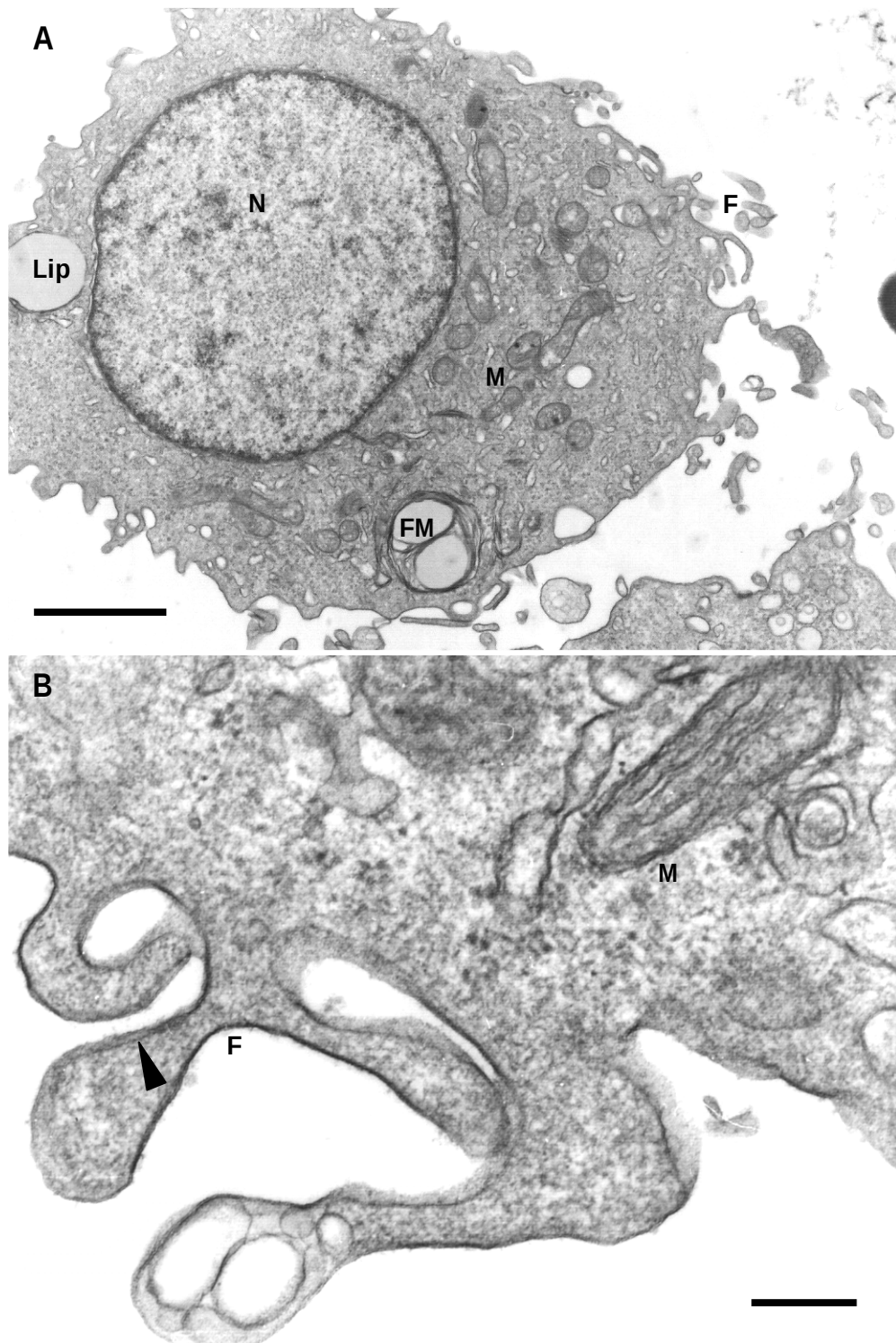


FIGURA 38 – Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão de tumor venéreo transmissível, padrão plasmocitóide. **A:** presença de figuras de mielina (FM), originada da precipitação de fosfolípidios durante o processamento da amostra; inclusões lipídicas (Lip) e grande quantidade de mitocôndrias; N= núcleo; F: *filopodia* (aumento 9750x, barra= 2 μ m). **B:** o aumento de 77500x detalha o aspecto dos *filopodia* (F) e a característica dupla camada da membrana citoplasmática (cabeça de seta). Observa-se mitocôndria (M) com cristas longitudinais e matriz densa (barra= 0,2 μ m).

4.4 IMUNOFENOTIPAGEM

Foram utilizados os anticorpos antivimentina (clone Vim 3B4), antilisozima, antiCD-163 (clone Ber-MAC3) e antiantígeno mielóide/histiocítico (clone MAC 387) para a imunofenotipagem dos preparados citológicos fixados em álcool etílico 95%.

A reação com o anticorpo antivimentina produziu marcação citoplasmática granular difusa, cuja intensidade variou de intensa (+++/++++), em 48 amostras, a discreta (+/++), em 29 casos (Figura 39). Em amostras com marcação de intensidade fraca, a coloração marrom ficava concentrada junto à região perinuclear, geralmente com uma distribuição unipolar. O percentual de células marcadas, por lâmina, foi predominantemente ++, com apenas uma amostra +.

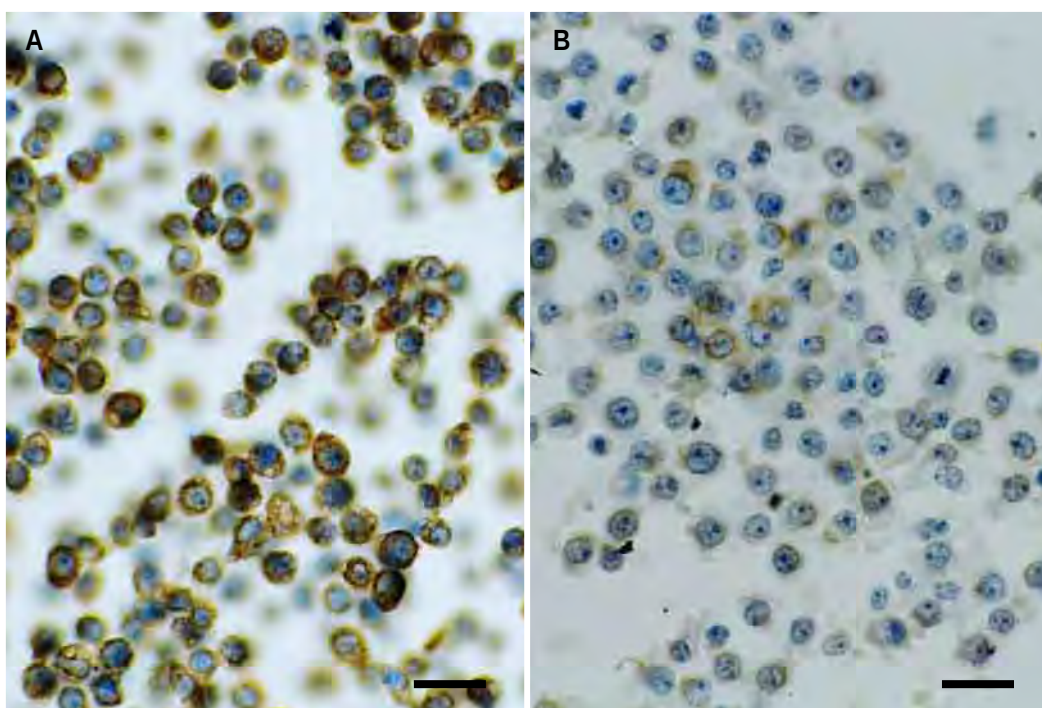


FIGURA 39 – Marcação pelo anticorpo antivimentina em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível processadas por citocentrifugação: **A**: marcação forte; **B**: marcação fraca. Método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.

As características de marcação (% e intensidade) foram analisadas por teste baseado em χ^2 , pelo cruzamento dos grupos citomorfológicos com percentual de células marcadas ($\leq 50\%$ e $> 50\%$) e com intensidade (fraca: +/ ++; forte: +++/++++). Estes cruzamentos estão apresentados na Tabela 34.

TABELA 34 - Frequência de células marcadas e intensidade de marcação pelo anticorpo antivimentina nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível nos três grupos citomorfológicos.

		PERCENTUAL DE MARCAÇÃO							
OBSERVAÇÃO	GRUPOS	LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
$\leq 50\%$		10	20,8	12	25,0	26	54,2	48	100
$> 50\%$		9	31,0	9	31,0	11	38,0	29	100
	TOTAL	19	–	21	–	37	–	77	–
		INTENSIDADE DE MARCAÇÃO							
FRACA		4 ^a	33,4	7 ^a	58,3	1 ^b	8,3	12	100
FORTE		15	23,1	14	21,5	36	55,4	65	100
	TOTAL	19	–	21	–	37	–	77	–

^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Goodman ($p=0,01$).

O anticorpo antilisozioma produziu marcações citoplasmáticas intensas e grosseiras (Figura 40), com marcações positivas em mais de 75% das células de cada amostra (percentual de marcação +++), sendo que apenas dois casos mostraram menos de 50% das células marcadas. Quanto à intensidade da reação, esta foi forte (+++) ou muito forte (++++). A comparação entre os grupos por teste de χ^2 nos dois parâmetros avaliados (percentual e intensidade)

não revelou diferenças significativas. A estatística descritiva para esta variável está na Tabela 35.

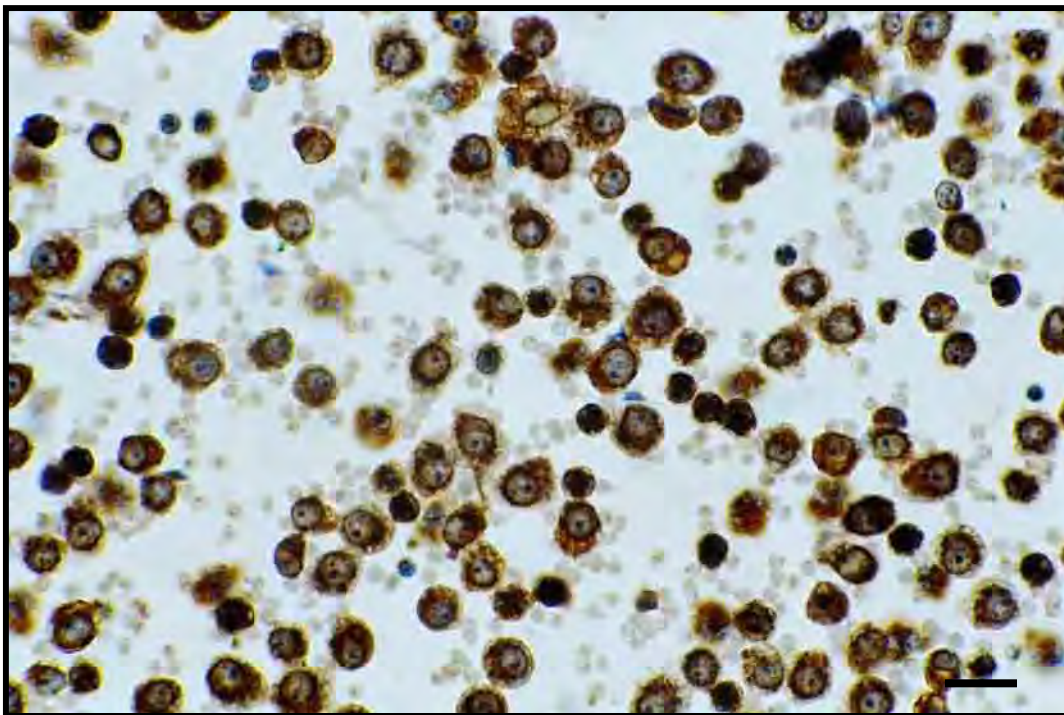


FIGURA 40 – Marcação pelo anticorpo antilisozima em amostra citológica de tumor venéreo transmissível processada por citocentrifugação; método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.

TABELA 35 – Mediana e percentis da freqüência de células marcadas e intensidade de marcação pelo anticorpo antilisozima nas amostras citológicas de tumor venéreo transmissível.

PARÂMETRO	<i>n</i>	MEDIANA (%)	P ₂₅ (%)	P ₇₅ (%)	Mín. (%)	MÁX. (%)
PERCENTUAL	86	+++	+++	+++	+	+++
INTENSIDADE	86	++++	++++	++++	++	++++

Para investigar uma provável origem histiocítica do tumor venéreo transmissível foram utilizados os anticorpos CD163 e MAC387, ambos

marcadores de macrófagos e, para o MAC387, também de tecido mielóide. Como são anticorpos dedicados a um tecido específico, a avaliação da reatividade das células de TVT foi sempre comparada com a marcação apresentada pelos macrófagos (ambos anticorpos) e neutrófilos (MAC387) infiltrados no tecido neoplásico, para cada amostra. Foi observada que a marcação do tecido-alvo (macrófagos e/ou células mielóides, conforme o anticorpo) foi bastante irregular, com reações fortes e fracas na mesma lâmina. As células de TVT apresentaram marcação de membrana, fraca e irregular, mas em alguns casos a marcação foi forte e também citoplasmática, principalmente com o anticorpo CD163 (Ber-MAC3).

O percentual de células marcadas pelo anticorpo CD163 variou entre 5 e 96%, com mediana de 28,4% (Figura 41). Já para o anticorpo MAC387 o percentual de positividade foi menor, variando entre 1 e 60%, mas com a mediana se localizando em 11,97% de positividade. Para análise estatística da frequência de marcações positivas pelo teste de Goodman, as categorias foram agrupadas em percentual de marcação $\leq 25\%$ e $>25\%$. O resultado desta análise está apresentado na Tabela 36.

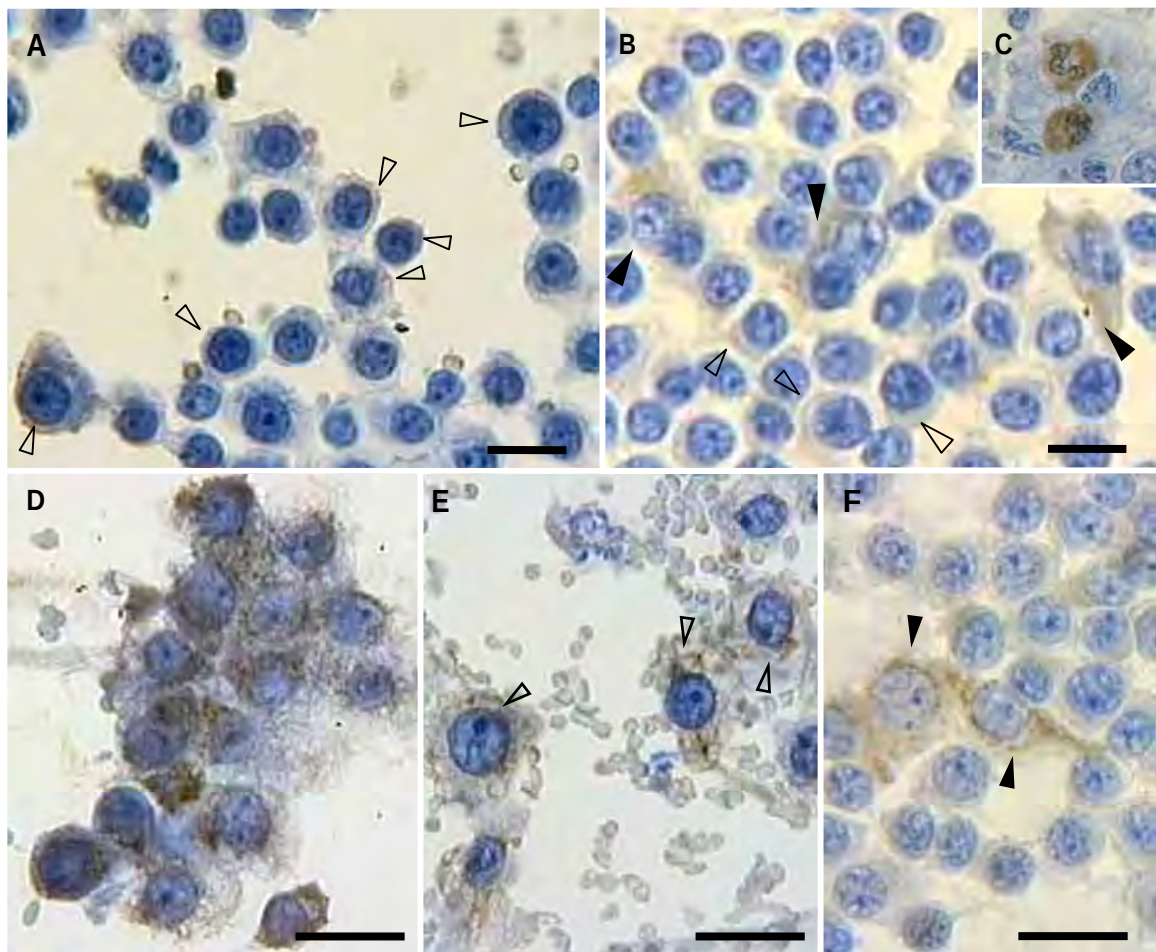


FIGURA 41 – Marcação pelos anticorpos anti-antígeno mielóide / histiocítico (A, B, C) e anti-CD163 (D, E, F) em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível processadas por citocentrifugação. Controles positivos estão na inserção (C) e em F. Setas preenchidas indicam macrófagos infiltrados no tumor (B); setas vazias apontam marcação positiva das células neoplásicas; método EnVision® HRP, cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.

TABELA 36 - Frequência de marcação das células do tumor venéreo transmissível pelos anticorpos anti-CD163 e anti-MAC387.

		CD163*							
GRUPOS OBSERVAÇÃO		LINFOCITÓIDE		MISTO		PLASMOCITÓIDE		TOTAL	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
≤25%		12	36,4	09	27,2	12	36,4	33	100
>25%		08	20,0	14	35,0	18	45,0	40	100
TOTAL		20	–	23	–	30	–	73	–
		MAC387**							
≤25%		18	31,0	20	34,5	20	34,5	58	100
>25%		03	16,7	04	22,2	11	61,1	18	100
TOTAL		21	–	24	–	31	–	76	–

(*) p=0,30 e (**) p=0,13 pelo teste de Goodman

Os cruzamentos entre grupos, analisado por teste de ANOVA em *ranks*, tanto para percentual de marcação quanto para o escore de células marcadas, apontou, para o anticorpo MAC387, diferenças entre os grupos citomorfológicos, de localização e de comportamento biológico (Tabela 37), com o maior percentual de marcação ocorrendo nos tumores plasmocitóides, extragenitais e não primários.

TABELA 37 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células positivas para a marcação com o anticorpo MAC387 em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com grupo citomorfológico, comportamento biológico e localização.

CITOMORFOLOGIA						
	<i>n</i>	MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	Mín. (%)	Máx. (%)
LINFOCITÓIDE	21	08,09 ^a	3,83	14,24	0	48,9
MISTO	24	12,72 ^{ab}	7,14	20,25	0	32,8
PLASMOCITÓIDE	31	15,67 ^b	8,85	32,41	0	60,3
LOCALIZAÇÃO						
GENITAL	52	09,33 ^c	5,39	18,37	0	60,3
EXTRAGENITAL	24	22,18 ^d	13,12	33,33	0	51,7
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO						
PRIMÁRIA	51	09,30 ^e	5,23	15,64	0	32,81
NÃO-PRIMÁRIA	25	27,78 ^f	13,55	35,45	0	48,9

^{a,b} letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos citomorfológicos pelo teste de Dunn ($p=0,03$)

^{c,d} letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos de acordo com a localização pelo teste de Mann-Whitney ($p=0,001$)

^{e,f} letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos de acordo com o comportamento biológico pelo teste de Mann-Whitney ($p<0,001$)

Já a análise dos grupos para o anticorpo CD163 evidenciou diferenças significativas na comparação das massas de acordo com o tamanho e, embora não tenham sido estatisticamente diferentes, pôde-se observar que as massas genitais e primárias exibiram percentual de marcação inferior aos dos tumores extragenitais e não primários (Tabela 38).

TABELA 38 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) do percentual de células positivas para a marcação com o anticorpo CD163 em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com tamanho, comportamento biológico e localização.

TAMANHO						
	<i>n</i>	MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	Mín. (%)	Máx. (%)
PEQUENAS	26	36,58 ^a	23,74	53,57	11,18	79,39
MÉDIAS	22	28,11 ^{ab}	18,30	49,55	13,24	55,11
GRANDES	24	19,98 ^b	12,53	37,08	1,42	96,34
LOCALIZAÇÃO						
GENITAL	49	25,70 ^c	17,21	40,58	0	96,3
EXTRAGENITAL	24	37,34 ^c	13,12	33,33	0	85,7
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO						
PRIMÁRIA	49	25,70 ^e	18,22	40,73	1,42	96,3
NÃO-PRIMÁRIA	24	36,58 ^e	17,90	52,04	0	85,7

^{a,b} letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos citomorfológicos pelo teste de Dunn ($p=0,033$)

^c letras iguais representam diferenças não significativas entre os grupos de acordo com a localização pelo teste de Mann-Whitney ($p=0,09$)

^e letras iguais representam diferenças não significativas entre os grupos de acordo com o comportamento biológico pelo teste de Mann-Whitney ($p=0,215$)

4.5 AVALIAÇÃO DE DANOS DE DNA

O teste do cometa foi realizado ao abrigo da luz sob condições alcalinas como reportado por SINGH *et al.* (1988). As lâminas coradas com brometo de etídio foram analisadas em microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 516-560nm e filtro de barreira de 590nm. Foram analisadas cinquenta células por amostra quanto à intensidade de fluorescência da cauda do cometa, por análise de imagem digitalizada¹, no Laboratório do Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Unesp Botucatu. Para a execução do teste

¹ Comet Assay II, Perceptive Instruments. Haverhill Suffolk, UK.

foram analisadas 35 amostras, onze do grupo linfocitóide e doze de cada um dos outros dois tipos.

Foi avaliada a intensidade de danos pelo percentual de DNA na cauda, representado pelo *tail moment*, que é uma medida gerada pelo produto da intensidade de fluorescência da cauda com a distância por ela percorrida e calculado pelo programa de análise (Figura 42). A medida obtida para as cinquenta células de cada amostra foi reduzida à média e, esta, considerada o valor do caso (ver Anexo H para os dados individuais). Como teste estatístico, foi aplicado o teste de análise da variância em *ranks* de Kruskal-Wallis, com uso do teste de Dunn para comparação entre os grupos.

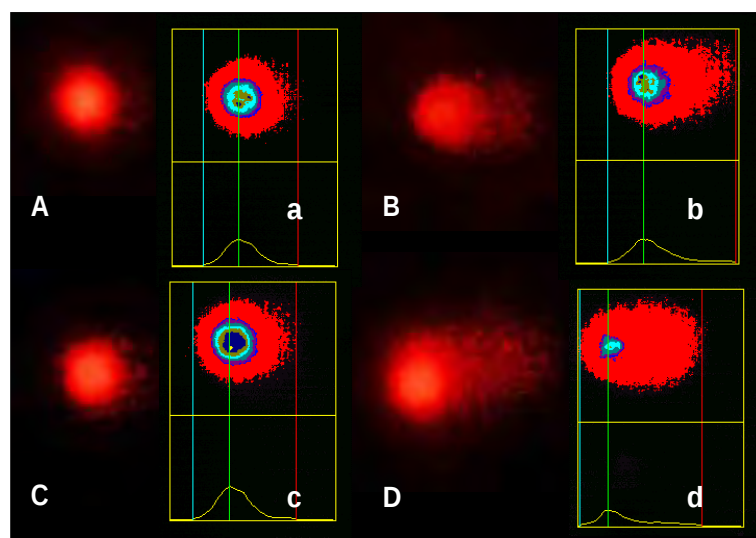


FIGURA 42 – Imagens de células de tumor venéreo transmissível submetidas ao teste do cometa, observadas em microscopia de fluorescência (**A-D**) e a correspondente análise gerada pelo programa de análise Comet Assay II® (**a-d**), exibindo os diferentes graus de danos de DNA, representado pela migração e intensidade de fluorescência da "cauda".

A ocorrência de danos (formação dos cometas) foi verificada nos três grupos citomorfológicos (Figura 43). Na avaliação do *tail moment*,

observou-se que a mediana dos valores obtida no grupo linfocitóide foi inferior a do grupo misto, e significativamente menor quando comparada ao grupo plasmocitóide ($p=0,01$). Os dados da análise estão na Tabela 39 e na Figura 44.

TABELA 39 - Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da percentagem de DNA na cauda (*tail moment*) em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com o grupo citomorfológico.

	<i>n</i>	MEDIANA (%)	P_{25} (%)	P_{75} (%)	Mín. (%)	Máx. (%)
LINFOCITÓIDE	11	0,737 ^a	0,437	1,118	0,185	2,420
MISTO	12	0,699 ^{ab}	0,639	1,301	0,345	2,589
PLASMOCITÓIDE	12	1,251 ^b	1,094	1,402	1,038	4,368

^{a,b} letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos citomorfológicos pelo teste de Dunn ($p=0,01$)

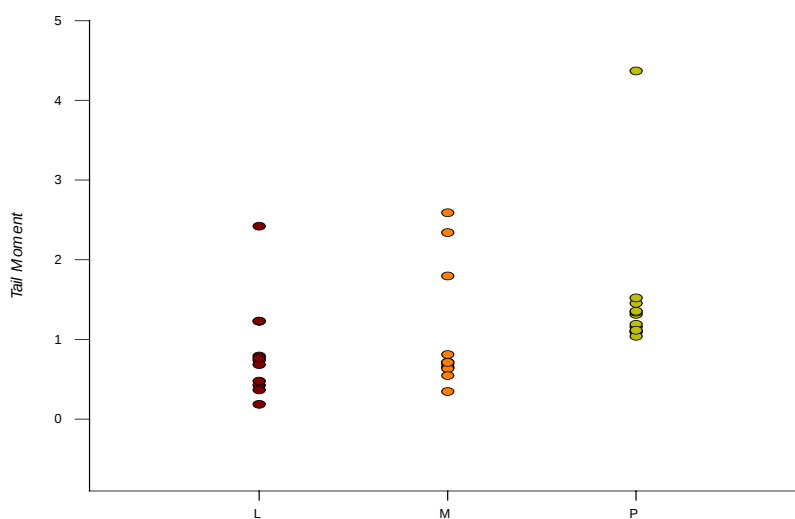


FIGURA 43 - Percentagem (média por caso) de DNA na cauda (*tail moment*) observadas em amostras de tumor venéreo transmissível, de acordo com o grupo citomorfológico.

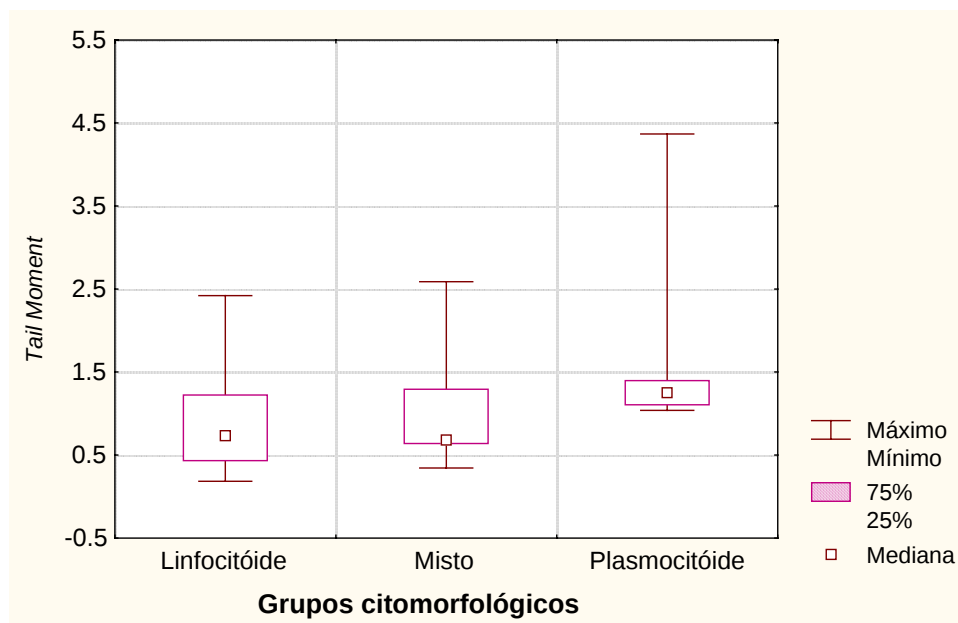


FIGURA 44 - Comparação entre a mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da percentagem de DNA na cauda (*tail moment*) em amostras de tumor venéreo transmissível dos três grupos citomorfológicos.

Complementando o estudo da ocorrência de danos no DNA, foi feita a análise de correlação da percentagem de DNA da cauda com a frequência de células linfocitóides e plasmocitóides (obtida pelo exame das lâminas coradas com Giemsa) utilizando a correlação de Spearman. Foi observada correlação significativa ($p < 0,05$), embora o coeficiente de correlação tenha sido baixo ($r = 0,352$). A correlação das células plasmocitóides com o *tail moment* foi positiva e, na associação de células linfocitóides com *tail moment*, negativa.

5 DISCUSSÃO

5.1 PROPEDÊUTICA SEMIOLÓGICA

O tumor venéreo transmissível é tido como uma das neoplasias mais freqüentes em cães (HAMIR, 1986; SOBRAL *et al.*, 1998); isto foi igualmente observado em nosso estudo, quando puderam ser acompanhados 132 pacientes portadores da neoplasia.

5.1.1 SEXO, IDADE E RAÇA

Os pacientes estudados foram 60 machos e 72 fêmeas (45,4% e 54,6%, respectivamente), com idades variando entre um e 18 anos, com a maior concentração na faixa entre dois e quatro anos. Apesar do maior número de fêmeas, isso não pode ser considerado como predisposição sexual, muito embora SOBRAL *et al.* (1998) afirmem que fêmeas são mais predispostas; já VARASCHIN *et al.* (2001) afirmaram que machos são mais predispostos. Entretanto, a maior parte dos autores assume que não há predisposição sexual (CALVERT, 1983; COHEN, 1985; DAS & DAS, 2000), uma vez que em alguns casos há mais diagnósticos feitos em machos (BOSCOS, 1988; ROGERS *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 2002), outros em fêmeas (MORALES & GONZÁLEZ, 1995; GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Um levantamento feito da casuística do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP de Botucatu, abrangendo o período de 1994 a 2002 (AMARAL *et al.*, no prelo), obteve 52% de ocorrência em machos.

Essa variação na prevalência sexual em um mesmo local comprova que a neoplasia não apresenta uma clara predisposição sexual.

A faixa etária predominante, entre dois e quatro anos, está de acordo com o descrito por CALVERT (1983), MORALES & GONZÁLES (1995), ROGERS (1997), ROGERS *et al.* (1998), SOBRAL *et al.* (1998) e DAS & DAS (2000), que apontam como idade de maior risco aquela em que os animais apresentam maturidade sexual, ou seja, adultos jovens, entre dois e quatro anos, diminuindo consideravelmente após os seis anos de idade.

Com relação à raça, não foi observada uma predisposição racial; a imensa maioria dos animais era sem raça definida (79%), refletindo diretamente o perfil de doença venérea associada a animais de vida livre e com pouco controle higiênico-sanitário por parte dos proprietários. Esta observação é corroborada por MORALES & GONZÁLES (1995) e ROGERS (1997). A variação de raças portadoras da neoplasia, apresentada pelos diversos autores, relaciona-se mais às aquelas populares em uma determinada região do que a uma possível predisposição racial. Embora alguns autores cite a ocorrência mais freqüente em cães de grande porte (ROGERS *et al.*, 1998), isso não foi observado em nossa casuística (BRANDÃO *et al.*, 2002).

5.1.2 PERFIL CLÍNICO E HÁBITOS DE CRIAÇÃO

Com base nas informações fornecidas pelos proprietários sobre história clínica pregressa, hábitos de criação, histórico reprodutivo, animais-contato e densidade populacional na residência, foi possível traçar o perfil típico do paciente com tumor venéreo transmissível: em geral eram animais com livre acesso à rua, viviam em regiões com abundante população de cães errantes e tinham controle reprodutivo precário, limitado ao confinamento

doméstico das fêmeas, ou ausente, na totalidade dos machos. Os proprietários demonstravam, na maioria dos casos, incapacidade em descrever o histórico clínico de seus animais. Isto está de acordo com o descrito por HIGGINS (1966), COHEN (1985), ROGERS (1997), SOBRAL *et al.* (1998), BOSCOS *et al.* (1999), TINUCCI-COSTA (1999b), SOUSA *et al.* (2000) e DAS & DAS (2000), que descreveram o maior risco de cães que vivem em áreas com alta densidade populacional, livre acesso à rua e baixo controle reprodutivo.

Somente 15% dos cães estavam em condição física ruim, geralmente associada à erliquiose: a grande maioria dos animais apresentava-se clinicamente sadia (exceto pela presença de massa tumoral) e com peso adequado ao porte, ainda que 34% dos proprietários tenham observado uma discreta redução no peso de seus animais. BRIGHT *et al.* (1983), HAMIR (1985), YANG (1987) e FERREIRA *et al.* (2000) relataram a boa condição corporal de cães com tumor venéreo transmissível, mesmo naqueles que evoluíram com metástase.

A presença de secreção genital hemorrágica, aumento de volume genital ou presença de massa visível e, nas massas nasais, epistaxe, respiração ruidosa e deformidade facial eram as apresentações clínicas mais comuns. Estas observações também foram feitas por outros pesquisadores (NDIRITU *et al.*, 1977; BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; FOWLER *et al.*, 1997; ROGERS *et al.* 1998; MACEWEN, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2002; DAS & DAS, 2000), que também concordam quanto ao aspecto macroscópico das lesões observadas neste experimento.

Os locais de apresentação das massas neoplásicas, tanto nos machos como nas fêmeas, está de acordo com o registrado por HIGGINS,

(1966), COHEN (1978), CALVERT (1983), BOOTH (1994), ROGERS, (1997), ROGERS *et al.* (1998), MACEWEN (2001) e DAS & DAS (2000).

Dos tumores de localização nasal, todos apresentavam envolvimento bilateral, com lise óssea e progressão ao seio maxilar ou invasão do palato e cavidade oral, muitas vezes com perda dentária associada. Estas observações também foram feitas por WEIR *et al.* (1978), BRIGHT *et al.* (1983), HAMIR (1985), AMBER & ADEYANJU (1986), PÉREZ *et al.* (1994) e GINEL *et al.* (1995), em seus relatos de ocorrência extragenital do TVT.

As lesões oculares apresentavam um crescimento a partir da conjuntiva, sendo que em um caso as células neoplásicas também se localizaram nas estruturas intra-oculares. Envolvimento da conjuntiva ocular foi reportado por BOSCOS *et al.* (1998), e a ocorrência de TVT intra-ocular foi bem documentada por MILLER *et al.* (1990), PEREIRA *et al.* (2000), FERREIRA *et al.* (2000) e RODRIGUES *et al.* (2001), com evolução semelhante à observada neste experimento.

5.1.3 ESTAGIAMENTO CLÍNICO DA NEOPLASIA

5.1.3.1 Massas primárias

Os tumores genitais foram os mais freqüentes, com 89,6% dos casos, seguidos pelos de localização nasal (5,9%). Foram observados, ainda, casos primários oculares, anais e subcutâneos. Três cães apresentavam a neoplasia primária em mais de um local (genital e de conjuntiva ocular, genital e nasal, genital e anal). Embora ainda persista alguma discussão a esse respeito, parece-nos mais lógico considerar todos esses casos como primários,

devido à transmissão por implante celular. ROGERS *et al.* (1998) registraram que, de 29 casos primários de TVT, dois eram nasais, o que representa a mesma proporção observada em nossa casuística. WEIR *et al.* (1978), descrevendo dois casos de TVT nasal sem presença de massas genitais, não descartam a possibilidade de que uma provável massa genital tenha involuído espontaneamente. Considerando os nossos dados, isso não nos parece muito provável. NDIRITU *et al.* (1977), BRIGHT *et al.* (1983), HAMIR (1985), AMBER *et al.* (1986), PÉREZ *et al.* (1994) e GINEL *et al.* (1995), que também descreveram casos de TVT nasal, consideraram que existe a chance de ocorrer implante de células neoplásicas na mucosa nasal, tanto de outro cão portador, em decorrência de hábitos sociais, como um auto-implante de uma massa genital pré-existente. Apenas um dos pacientes do nosso estudo apresentava massa genital simultânea. Um ponto que chama a atenção, entretanto, é que o TVT nasal só foi visto em machos, tanto em nossos dados, quanto nos relatos de literatura citados. Um estudo envolvendo um maior número de casos é necessário para que se estabeleça uma relação entre a localização nasal e o sexo.

Os dois casos de TVT anal ocorreram em cães com dermatopatias (um apresentava escabiose e outro dermatite alérgica) e, portanto, apresentavam lesões cutâneas pré-existentes que permitiram o implante das células neoplásicas. O mesmo foi observado por BATAMUZI & BITTEGEKO (1991), quando descreveram a ocorrência de TVT genital e anal em uma cadela com dermatite alérgica à picada de pulgas.

Os dois casos cutâneos que foram considerados primários ocorreram em cães sem TVT genital, porém com histórico de lesões cutâneas por brigas; ambos apresentavam vários nódulos cutâneos, mas o primeiro a

aparecer estava vinculado a uma escoriação que não cicatrizou, tornou-se nodular e ulcerou. Em um dos casos, o animal que provocou a lesão tinha comprovadamente secreção prepucial sero-sanguinolenta e foi o provável “doador” de células neoplásicas. Isto está de acordo com as observações de HIGGINS (1966) sobre a ocorrência de TVT cutâneo. A necessidade de haver lesão de continuidade nas mucosas e na pele para que ocorra o implante do tumor tem sido bem documentada (COHEN, 1978; BOSCOS, 1988; BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; ROGERS, 1997). ALBANESE *et al.* (2002) relataram a ocorrência de TVT cutâneo primário em um cão, porém este apresentava também leishmaniose com manifestações cutâneas.

5.1.3.2 Metástases

Do total de pacientes em estudo, 33 (25%) apresentavam disseminação do tumor primário, valor um pouco superior ao que tem sido reportado, variando entre 0 e 17% nos casos de ocorrência natural (ROGERS, 1997, MACEWEN, 2001).

A forma metastática mais freqüente foi a subcutânea, com 13 casos (31% das metástases). Achado semelhante foi registrado por BRANDÃO *et al.* (2002), relatando 127 casos de TVT, dos quais 22 foram massas cutâneas. As metástases cutâneas estão bem descritas na literatura consultada (ODUYE *et al.*, 1973; NDIRITU *et al.*, 1977; PANDEY *et al.* 1989; MILLER *et al.*, 1990; KROGER *et al.*, 1991; AYYAPPAN *et al.*, 1994; GUEDES *et al.*, 1996; BOSCOS *et al.*, 1999). Nos machos, a invasão neoplásica foi observada mais freqüentemente em linfonodos inguinais e, nas fêmeas, no tecido mamário – nestas localizações houve diferença significativa entre os sexos. Não foram encontrados relatos de tumor venéreo transmissível mamário, mas a metástase

em linfonodos regionais e distantes está bem estabelecida (ODUYE *et al.*, 1973; NDIRITU *et al.*, 1977; YANG, 1987; AYYAPPAN *et al.*, 1994; ROGERS *et al.*, 1998; DAS & DAS, 2000). Nos nossos casos, só foram verificadas metástases em linfonodos em duas fêmeas (inguinal em uma, ilíaco interno na outra), enquanto que os nove machos apresentaram metástases nos linfonodos inguinais. Esta distribuição parece estar relacionada à drenagem linfática da genitália externa, feita exclusivamente para os linfonodos inguinais, nos machos, e para linfonodos inguinais e ilíacos internos, nas fêmeas. A vinculação da distribuição das metástases com as diferenças na drenagem linfática nos dois sexos foi proposta por ODUYE *et al.* (1973). Como não foram feitos ultrassons abdominais em todos os casos, é possível que um maior número de fêmeas apresentasse metástases no linfonodo ilíaco interno. As células neoplásicas, de alguma forma, conseguem ultrapassar os linfonodos inguinais e fixam-se no tecido mamário.

5.1.3.3 Classificação das massas neoplásicas amostradas

Aproximadamente dois terços dos tumores amostrados foram de localização genital e primários (63,8% e 64,4%, respectivamente), com apenas 6,4% de recorrência e 25% de metástases. Isto está de acordo com o comportamento do tumor venéreo transmissível (MACEWEN, 2001). Com relação ao tamanho, houve pequeno predomínio dos tumores menores de 3cm (39,4%) e um número semelhante entre tumores até 5cm e aqueles maiores de 5cm. Cerca de metade das massas (52,5%) já tinha mais de dois meses de evolução quando os cães foram encaminhados ao atendimento médico veterinário, alguns casos tendo mais de dois anos de evolução. Como aqui, o tempo de médio de

apresentação dos sinais clínicos antes do atendimento observado por ROGERS *et al.* (1998) e BRANDÃO *et al.* (2002) foi de mais de dois meses.

5.2 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA

5.2.1 EXAME CITOLÓGICO

Das amostras colhidas das 188 massas tumorais, 158 foram analisadas por microscopia ótica para determinação do padrão citomorfológico. O uso do exame citológico para o diagnóstico de neoplasias de células redondas foi recomendado por DUNCAN & PRASSE já em 1979, quando estes autores o consideraram mais vantajoso que o exame histopatológico. Desde então, o exame citológico tem sido recomendado como essencial para o diagnóstico (MILLER *et al.*, 1990; KROGER *et al.*, 1991; MEINKOTH & COWELL, 2002) e acompanhamento do tratamento (BATAMUZI & KESSY, 1993; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000) do tumor venéreo transmissível, sendo usado largamente: BRANDÃO *et al.* (2002) reportaram que 94,6% dos casos foram diagnosticados por exame citológico.

O padrão citomorfológico mais freqüente foi o plasmocitóide, com 52,5% dos casos, seguido pelo padrão misto (29,1%) e, por último, o linfocitóide (18,4%). Foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos linfocitóide e plasmocitóide na comparação entre a localização (genital e extragenital) e entre as categorias de comportamento biológico. O grupo linfocitóide apresentou uma concentração de 82,1% dos tumores na localização genital, enquanto que no grupo plasmocitóide, este número reduziu-se para 58,8%; o grupo linfocitóide apresentou somente 11,5% de massas não-primárias, contra 43,5% nos tumores do grupo plasmocitóide. Como

este é o primeiro estudo abrangente que pretende verificar diferenças entre os padrões citomorfológicos, não existem dados de literatura que possam ser confrontados; entretanto, MOHANTY & RAJYA (1977) descreveram a ocorrência de dois tipos morfológicos distintos de células de TVT em cultura *in vitro*, um pequeno, com núcleo redondo a oval e vesicular, e outro, com células grandes e de núcleo grande e hipercromático. BOSCOS *et al.* (1999) relataram a presença de células ovóides no tumor venéreo transmissível cutâneo – esta descrição assemelha-se bastante ao padrão plasmocitóide, que nos nossos achados foi significativamente superior, nas massas extragenitais, ao padrão linfocitóide, o qual é mais próximo da morfologia habitualmente descrita para a neoplasia.

Como a linha de corte do número de células para a inclusão nos grupos foi relativamente arbitrária, realizou-se, além da comparação entre os grupos citomorfológicos, a análise estatística do percentual de células linfocitóides e plasmocitóides *versus* localização do tumor e comportamento biológico. Esta análise revelou diferenças significativas – existe predomínio de células linfocitóides nas massas genitais (mediana: 42 células) quando comparadas às extragenitais (mediana: 38), e nas massas primárias (mediana: 42 células) quando comparadas às não primárias (med.: 37 células). As células plasmocitóides apresentam uma mediana significativamente superior nos tumores não primários (med.: 63) quando comparadas aos primários (med.: 58 células). Estes achados corroboram a análise anterior, e fazem crer que o limite estabelecido para a divisão dos grupos foi adequado.

A observação do percentual de células dos dois tipos citomorfológicos ficou ainda mais interessante quando a análise foi limitada às massas primárias, comparando-se aquelas em que os pacientes tinham

metástase com as que não tinham. Nesta comparação, a diferença entre o percentual de células linfocitóides foi altamente significativo ($p=0,01$), com medianas de 46,5%, nos casos sem metástase e 40% nos casos com metástase. O percentual de células plasmocitóides foi, igualmente, altamente significativo ($p=0,008$), com medianas de 53,5 e 61%, nos casos sem e com metástases, respectivamente.

Estas comparações indicam a associação entre o fenótipo plasmocitóide com a localização extragenital, com massas não primárias (metástases ou recorrências) e com a capacidade de desenvolver metástases. De todas as massas analisadas, só duas de localização extragenital, metastáticas, enquadraram-se no grupo linfocitóide e somente dois casos primários de morfologia linfocitóide desenvolveram metástases – estas foram de um dos outros dois grupos. Confirmando nossa observação, ROGERS (1997) salientou que as massas primárias e as metastáticas podem não ter aparência citológica idêntica. FERREIRA *et al.* (2000) e PEREIRA *et al.* (2000) descreveram casos de TVT intraocular em que o padrão histológico foi tão “incomum” que houve necessidade de estudos imunoistoquímicos para a confirmação do diagnóstico. Ainda que a descrição seja genérica, este padrão incomum pode ser a manifestação do tipo plasmocitóide. Finalmente, corroborando nossos achados, está a hipótese de ROGERS *et al.* (1998), que supõem existir diferentes linhagens de tumor venéreo transmissível com relação às características que influenciam o comportamento biológico, como a habilidade de metastatizar.

5.2.2 DETERMINAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE

5.2.2.1 Critérios Gerais de Malignidade

Conforme descrito anteriormente, as características gerais de malignidade avaliadas foram padrão de cromatina, anisocitose, anisocariose, macrocariose, basofilia ou eosinofilia citoplasmática e vacúolos citoplasmáticos e seu padrão de distribuição nas células, além do *número* de nucléolos e a presença ou não de corpúsculos linfoglandulares e de arranjo polar.

CROMATINA: se nas células normais a cromatina tende a ser regularmente dispersa pelo núcleo, nas células malignas encontra-se anormalmente agregada (MORRINSON, 1998). A cromatina do tumor venéreo transmissível tem sido descrita como finamente agregada (WEIR *et al.*, 1978; ALBANESE *et al.*, 2002), granular (WELLMAN, 1990), marginal (ROGERS, 1997), grosseira (COWELL & TYLER, 1989; MEINKOTH & COWELL, 2002), agregada ou encordoadas (DUNCAN & PRASSE, 1979; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2000b; MACEWEN, 2001). Efetivamente, estes vários padrões foram observados, ainda que não tenha havido nenhuma diferença na sua distribuição entre os grupos.

ANISOCITOSE, ANISOCARIOSE E MACROCARIOSE: a avaliação destes critérios é bem estabelecida como forma de avaliar a malignidade de uma amostra celular (CARTER & VALLI, 1990; MEYER & HARVEY, 1998; MEINKOTH & COWELL, 2002), ainda que os autores esclareçam que algum grau de anisocitose é esperado em qualquer tecido e que esta não é uma boa medida para diferenciar neoplasias benignas de malignas (McKINLEY, 2004). Já a anisocariose, especialmente na presença de núcleos maiores de 10µm, é característica das neoplasias malignas (WELLMAN, 1990; MEINKOTH & COWELL,

2002). A anisocariose de moderada a intensa no tumor venéreo transmissível, tal qual observada neste experimento, foi descrita por MEINKOTH & COWELL (2002). A macrocariose esteve presente em 21,5% das amostras analisadas, com uma frequência um pouco maior no grupo plasmocitóide, ainda que não tenha sido estatisticamente significativa. A ocorrência de macrocariose foi mais freqüente nos tumores antigos, nas massas extragenitais e nas não primárias, nestas com $p=0,09$, próximo ao nível de significância ($p\leq 0,05$). A macrocariose resulta da multiplicação do conteúdo de DNA nuclear (CARTER & VALLI, 1990; REAGAN & SOMRAK, 1993; McKINLEY, 2004). ERÜNAL-MARAL *et al.* (2000), que acompanharam com citologia esfoliativa o diagnóstico e tratamento de 12 cadelas com TVT vaginal, relataram a ocorrência de macrocitose.

BASOFILIA E EOSINOFILIA CITOPLASMÁTICAS: o estado metabólico da célula influencia a cor do citoplasma (REAGAN & SOMRAK, 1993). Células imaturas ou altamente ativadas possuem citoplasma basofílico (DENICOLA & REAGAN, 1998). O citoplasma das células de tumor venéreo transmissível é descrito como azul claro a incolor (DUNCAN & PRASSE, 1979; ROGERS, 1997; SANTOS *et al.*, 2001), azul claro a moderadamente basofílico (WELLMAN, 1990; GONZÁLEZ *et al.*, 2000b; ALBANESE *et al.*, 2002) ou acinzentado a azul claro (MEINKOTH & COWELL, 2002). ERÜNAL-MARAL *et al.* (2000) descreveram basofilia citoplasmática nos tumores estudados; entretanto, nenhum relato se refere à eosinofilia citoplasmática, observada em quase 20% das amostras deste experimento, muitas vezes associada à basofilia, na mesma célula (metacromasia). Eosinofilia citoplasmática é apresentada eventualmente por plasmócitos (*flame cells*) que apresentam grandes quantidades de proteínas (imunoglobulinas) dissolvidas no citoplasma (HARVEY, 2001) – a eosinofilia observada nas células de TVT pode ser, igualmente, devida a um conteúdo citoplasmático protéico específico.

VACÚOLOS CITOPLASMÁTICOS: a presença de vacúolos citoplasmáticos é a característica morfológica que diferencia o tumor venéreo transmissível das demais neoplasias de células redondas (DUNCAN & PRASSE, 1979; ROGERS, 1997; DENICOLA & REAGAN, 1998, ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000; MEINKOTH & COWELL, 2002). O conteúdo dos vacúolos não foi estabelecido (SANTOS *et al.*, 2001), mas, com base nos achados da microscopia eletrônica, supõe-se tratar de gotículas lipídicas. Em um quarto dos tumores estudados, havia menos da metade das células vacuolizadas e, em dois casos, os vacúolos estavam ausentes. ROGERS (1997) observou que em um pequeno número de casos os vacúolos citoplasmáticos não estão presentes, o que dificulta o diagnóstico. ERÜNAL-MARAL *et al.* (2000) e ALBANESE *et al.* (2002) descreveram que os vacúolos localizavam-se predominantemente junto ao bordo citoplasmático, em um padrão de “ferradura”, mas DUNCAN & PRASSE (1979) também mostraram outras formas de distribuição.

NÚMERO DE NUCLÉOLOS: os tumores antigos apresentaram frequência significativamente maior de células com mais de um nucléolo do que os tumores recentes, o que pode refletir uma maior atividade de transcrição e translação (CARTER & VALLI, 1990). A presença dos nucléolos é o reflexo da atividade sintética da célula, já que eles estão envolvidos na síntese protéica e, quando presentes em maior número ou em maior tamanho, representam ativação celular (McKINLEY, 2004). Apesar de terem sido observados alguns casos com até cinco nucléolos, a grande maioria dos tumores apresentou um ou dois nucléolos, o que está de acordo com os relatos de DUNCAN & PRASSE (1979), COWELL & TYLER (1989), WELLMAN (1990), ROGERS (1997), ERÜNAL-MARAL *et al.* (2000), ALBANESE *et al.* (2002) e MEINKOTH & COWELL (2002).

CORPÚSCULOS LINFOGLANDULARES: a presença de corpúsculos linfoglandulares foi um achado consistente, verificado em 80% dos casos, variando de pequenos e escassos a grandes “bolhas” de citoplasma dispersas por entre as células. Apesar de serem relacionados a tecido linfóide normal ou neoplásico (McKINLEY, 2004) eles também são vistos em outras neoplasias. Segundo MEINKOTH & COWELL (2002), as células linfóides, especialmente os linfoblastos, são frágeis e rompem-se durante a preparação das lâminas, produzindo os corpúsculos linfoglandulares. Nas amostras citológicas de TVT, todavia, estas estruturas foram visualizadas mesmo nos casos em que a presença de células rompidas não era evidente. Além disso, as projeções citoplasmáticas apresentadas pelas células muitas vezes pareciam destacar-se e originar os corpúsculos a partir de uma célula íntegra. Os corpúsculos linfoglandulares foram vistos igualmente nas amostras de microscopia eletrônica de transmissão, algumas literalmente brotando a partir das projeções citoplasmáticas. HILL *et al.* (1984) fizeram a mesma observação e consideraram-na um mecanismo de escape da vigilância epidemiológica do hospedeiro. Pouco tempo depois, em 1985, HILL & YANG observaram que os microvilos das células de TVT contêm o antígeno tumor-associado e concluíram que a liberação destes processos pode ser um mecanismo de liberação do antígeno tumoral, evidenciado pela presença de atividade antigênica no material extracelular.

ARRANJO POLAR: esta característica foi observada em 29,1% das amostras de células neoplásicas, com frequência no grupo plasmocitóide superior à do grupo linfocitóide. A literatura consultada não apresentou equivalentes para este critério. Em células neoplásicas, a paracromatina, que contém a eucromatina (envolvida na síntese de RNA), é representada por espaços claros entre os agregados de heterocromatina (que se cora

fortemente), pode aparecer ampliada e conferir um aspecto vesicular ao núcleo (REAGAN & SOMRAK, 1993; MCKINLEY, 2004). O motivo pelo qual estas áreas assumem a localização nos pólos do núcleo permanece em aberto e merece futuras investigações.

5.2.2.2 Critérios de Malignidade Citoplasmáticos

O citoplasma reflete o papel funcional da célula e, freqüentemente, sua origem anatômica. Se as características citoplasmáticas são indispensáveis para a determinação da diferenciação celular (o que não se aplica às células do tumor venéreo transmissível), existem muito poucas características citoplasmáticas que auxiliam na diferenciação entre lesões benignas e malignas (MCKINLEY, 2004). Os critérios citoplasmáticos incluídos no estudo não evidenciaram, em sua maioria, nenhuma informação que pudesse esclarecer um comportamento mais ou menos agressivo de um determinado padrão morfológico.

CÉLULAS GIRINO: uma das mais freqüentes características citoplasmáticas de malignidade observadas, foi significativamente superior no grupo linfocitóide que no plasmocitóide. REAGAN & SOMRAK (1993) afirmaram que o formato da célula relaciona-se com a ação dos microtúbulos, com a rigidez da membrana citoplasmática e com a pressão exercida pelas células contíguas. Neste contexto, completaram, células neoplásicas ovóides são freqüentemente associadas a neoplasias com alta taxa de divisão celular. Considerando-se o comportamento biológico mais favorável do grupo linfocitóide, parece provável que a ocorrência de células girino, com uma extremidade alongada, represente um arranjo de baixa pressão celular.

5.2.2.3 Critérios de Malignidade Nucleares

Os critérios de malignidade nucleares, apesar de não terem apresentado diferenças entre os grupos, caracterizam o tumor venéreo transmissível como uma neoplasia maligna, já que essas alterações não somente mostram a capacidade de biossíntese celular, mas também refletem morfologicamente as alterações genéticas secundárias à transformação neoplásica (McKINLEY, 2004).

A HIPERCROMASIA, ou hipercromia, esteve presente em 84% das amostras, em graus variáveis e sem diferença entre os grupos. ERÜNAL-MARAL *et al.* (2000), igualmente verificaram o aparecimento de hipercromasia em amostras citológicas de TVT. Esta característica está associada ao aumento do conteúdo de DNA nuclear em preparação para a divisão celular (McKINLEY, 2004). O ESPESSAMENTO DE MEMBRANA NUCLEAR e as PSEUDOINCLUSÕES NUCLEARES estiveram presentes em 67,7 e 68,4% das amostras analisadas, respectivamente. O espessamento de membrana nuclear, uma característica bem associada à malignidade, está relacionado à formação de agregados de cromatina que se aderem à membrana nuclear (marginção), dando-lhe um aspecto engrossado (McKINLEY, 2004). Relatos desta alteração não foram encontrados na literatura consultada sobre o TVT. As pseudoinclusões (inclusões citoplasmáticas intranucleares) são associadas com algumas neoplasias, como o carcinoma papilar da tireóide em humanos (McKINLEY, 2004). Embora não tenha sido citada nas descrições do tumor, esta alteração pôde ser reconhecida nas imagens que ilustravam os relatos de WELLMAN (1990), ROGERS (1997), DENICOLA & REAGAN (1998) e MEINKOTH & COWELL (2002).

O aparecimento de MITOSES ANORMAIS foi maior que as NORMAIS, tanto em frequência quanto em números absolutos por caso. A presença de um alto índice mitótico, associado com a presença de figuras de mitose anormais, especialmente com *lag chromatin*, é uma característica bem estabelecida no tumor venéreo transmissível (WEIR *et al.*, 1978; DUNCAN & PRASSE, 1979; ROGERS, 1997; DENICOLA & REAGAN, 1998; ALBANESE *et al.*, 2002; MEINKOTH & COWELL, 2002). DENICOLA & REAGAN (1998) observaram que no TVT, embora seja comum a apresentação de um grande número de mitoses anormais, o comportamento biológico costuma ser benigno. Talvez este não seja um forte indicador de malignidade para o TVT, como também não é para outras neoplasias.

A frequência de binucleação verificada nas amostras citológicas foi maior nas massas grandes. Não se encontrou, na literatura pesquisada, nenhuma associação de morfologia celular ou critério de malignidade com o tamanho do tumor. Desta forma, a importância biológica deste achado deve ser melhor avaliada.

O HALO PERINUCLEAR ocorreu em 87,3% das amostras, ainda que fosse discreto na absoluta maioria dos casos. A literatura consultada não se refere a esse achado em células de tumor venéreo transmissível, talvez porque na citopatologia veterinária não seja habitual a busca criteriosa de características de malignidade que foram caracterizadas, inicialmente, na citologia esfoliativa vaginal, em virtude do extenso trabalho de Papanicolaou (GREENING, 1993).

As alterações de forma e/ou número de núcleos por célula (MULTINUCLEAÇÃO, LOBULAÇÕES NUCLEARES, NÚCLEOS RINIFORMES, MICRONUCLEAÇÃO) foram observadas em números variáveis nas diversas amostras, sem diferenças

entre os grupos. O formato nuclear geralmente é bem preservado em tecidos não malignos. À medida que o tecido torna-se maligno, aumenta a chance de ocorrerem núcleos discretamente ou acentuadamente indentados (lobulações, núcleos riniformes e fissuras nucleares), bem como de surgirem formas nucleares bizarras (DENICOLA & REAGAN, 1998). O achado destas lesões, mais uma vez, mostra o potencial maligno do tumor venéreo transmissível. HASLER & WEBER (2000) descreveram a presença de indentações nucleares discretas em um caso de TVT. A multinucleação, por si só, não é uma forte característica de malignidade, especialmente naqueles tipos celulares que apresentam mais de um núcleo, como macrófagos e alguns tecidos epiteliais (DENICOLA & REAGAN, 1998), entretanto, a multinucleação é vista em tumores malignos e torna-se especialmente importante e significativa quando existe variação no tamanho dos núcleos de uma mesma célula e, mais ainda, na presença de micronucleação associada com multinucleação (DENICOLA & REAGAN, 1998; MEINKOTH & COWELL, 2002). Este tipo de arranjo foi verificado em várias amostras.

Os BROTAMENTOS NUCLEARES estiveram presentes em mais de 95% dos casos, com o grupo linfocitóide obtendo uma mediana significativamente inferior a dos demais. Brotamentos nucleares indicam locais de amplificação gênica e têm sido considerados um mecanismo único de formação de micronúcleos, como uma forma de eliminar segmentos de DNA amplificados em excesso (SHIMIZU *et al.*, 1998; FENECH & CROTT, 2002; BINDU *et al.*, 2003). Desta forma, eles representam a ocorrência de mutações genéticas, observadas em cultura de células e em células irradiadas; em células neoplásicas, como é o caso, embora presentes, não são comumente descritos.

5.2.3 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Na avaliação citológica do tumor venéreo transmissível as células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos) estão sempre presentes, visualizadas em maior ou menor número (DUNCAN & PRASSE, 1979; ROGERS, 1997; TINUCCI-COSTA, 1999a, ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). Entretanto, a avaliação destes números não tem sido freqüente e os estudos, em geral, comparam tumores em progressão e em regressão, tentando estabelecer uma correlação entre a regressão tumoral e o infiltrado inflamatório presente. As células inflamatórias, especialmente os linfócitos, têm sido relacionadas com a manifestação da regressão tumoral e, desta forma, representam um bom prognóstico (PÉREZ *et al.*, 1998; TINUCCI-COSTA, 1999a, GONZÁLEZ *et al.*, 2000a; GONZÁLEZ *et al.*, 2000b; LIAO *et al.*, 2003). Nossos achados confirmam este dado, uma vez que os números de células inflamatórias, linfóides e mielóides, estiveram significativamente aumentados nos grupos de comportamento biológico mais favorável (nas massas primárias, genitais e no tipo citomorfológico linfocitóide). Embora presentes em menores números, o infiltrado de macrófagos é maior nos tumores em regressão (PÉREZ *et al.*, 1998), o que sugere que estas células desempenhem algum processo modulador no processo de resposta do hospedeiro ou, mesmo, favorecendo o desenvolvimento da neoplasia (TINUCCI-COSTA, 1999a).

No cruzamento entre os grupos citomorfológicos, foi evidenciada diferença no infiltrado de monócitos, o qual apresentou-se significativamente mais elevado nos tumores linfocitóides do que nos plasmocitóides. PÉREZ *et al.* (1998), estudando o infiltrado inflamatório em amostras de TVT em progressão e em regressão, não observaram maiores

números de monócitos nos tumores em regressão, mas CHANDLER & YANG (1981) observaram maiores números de monócitos circulantes nos pacientes com TVT em regressão.

Na comparação entre massas genitais e extragenitais foi observada diferença significativa no infiltrado de células polimorfonucleares e mononucleares, sempre superior nos tumores genitais. A análise do fator comportamento biológico (comparação entre massas primárias e não primárias) evidenciou diferenças no infiltrado de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, sempre maiores nas massas primárias. LIAO *et al.* (2003) identificaram que os tumores venéreos transmissíveis implantados experimentalmente, quando em progressão, produzem uma molécula solúvel que induz apoptose dos linfócitos B circulantes e, deste modo, conseguem evadir-se (ao menos inicialmente) da resposta imunológica do hospedeiro, por impedir a ação citotóxica mediada por anticorpos (realizada pelos linfócitos T, estimulados pelas imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B). TINUCCI-COSTA (1999a), utilizando marcadores imunoistoquímicos, identificou infiltrado de linfócitos T ($CD3^+$ e citotóxicos [$CD8^+$]), linfócitos B e macrófagos em diferentes estágios de ativação em amostras de TVT primários, transplantados ou refratários à quimioterapia. GONZÁLEZ *et al.* (2000a) observaram aumento significativo no número de linfócitos e também de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (GONZÁLEZ *et al.*, 2000b) em amostras celulares de TVT em processo de regressão induzido por quimioterapia. Interessantemente, eosinófilos (e também mastócitos, ainda que em menor número) têm sido observados infiltrando os tumores venéreos transmissíveis, provavelmente pela produção de algum fator quimiotático específico produzido pelas células neoplásicas (HILL *et al.*, 1984).

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os achados da microscopia eletrônica não diferiram daqueles relatados na literatura consultada, ainda que o enfoque das observações tenha sido bastante diferente. A membrana celular apresentava extensões citoplasmáticas curtas (microvilos) ou longas (*filopodia*), estas geralmente dobradas sobre a superfície externa das células, conferindo uma aparência laminar às junções celulares e freqüentemente desprendendo-se das células. KENNEDY *et al.* (1977) descreveram estas projeções e HILL *et al.* (1984) observaram estas estruturas, especialmente nas células que não se apresentavam firmemente aderidas às células vizinhas, e sugeriram tratar-se de uma forma da célula neoplásica evadir-se da resposta imune do hospedeiro. PLACKE *et al.* (1987) destacaram a aparente interdigitação destes prolongamentos de membrana entre as células adjacentes, de forma idêntica à observada neste experimento.

KENNEDY *et al.* (1977), após o acompanhamento da evolução de tumores venéreos transmissíveis, de 14 a 71 dias pós-implantação experimental, usando microscopia eletrônica de transmissão, concluíram que, à medida que o tumor cresce, o formato das células tende a mudar de redondo para irregular, assemelhando-se a fibroblastos. As células de formato irregular ou alongado não foram observadas nas amostras examinadas por microscopia eletrônica neste experimento, porém esta pode ser mais uma diferença relacionada ao comportamento do TVT de ocorrência natural daqueles transplantados experimentalmente.

As mitocôndrias variaram entre redondas e pequenas a grandes e ovais, geralmente com poucas cristas e uma pequena quantidade de matriz granular. Estas características também foram descritas por HARMELIN *et*

al. (2002), descrevendo a morfologia ultra-estrutural de células de TVT implantadas em camundongos da linhagem SICD. Já PLACKE *et al.* (1987) observaram matriz mitocondrial agranular em uma amostra de TVT metastático intracranial. Complexo de Golgi e vesículas associadas presentes em quantidades variáveis, retículo endoplasmático rugoso, ribossomos e polissomos abundantes, vacúolos citoplasmáticos, grânulos elétron-densos, vacúolos de lipídios: todas estas características foram descritas pelos pesquisadores MURRAY *et al.* (1969), COCKRILL & BEASLEY (1975), OTOMO *et al.* (1981), AMBER *et al.* (1985), PLACKE *et al.* (1987) e HARMELIN *et al.* (2002).

Presença de núcleo redondos ou ovais, grandes e geralmente excêntricos, com pouca cromatina condensada, foi uma informação constante na literatura consultada. Neste experimento, invaginações e projeções nucleares (brotamentos) foram achados freqüentes, porém observados eventualmente por OTOMO *et al.* (1981). Dentro do núcleo foram evidenciados um ou dois nucléolos, grandes, com um padrão reticular e nucleolonema e com uma grande porção de cromatina associada. O mesmo foi descrito por COCKRILL & BEASLEY (1975), HILL *et al.* (1987) e HARMELIN *et al.* (2002).

A comparação entre as células dos diferentes tipos citomorfológicos não tem equivalentes na literatura consultada; entretanto, as características dos diferentes tipos não são exclusivas e, assim, na análise dos relatos existentes, podemos encontrar descrições que sugerem a predominância de um ou outro tipo morfológico. Aparentemente, existe um estado de ativação metabólica das células plasmocitóides quando comparadas às linfocitóides. HILL *et al.* (1987) comentaram sobre a atividade sintética e metabolismo ativo apresentado pelas células de tumor venéreo, inclusive demonstrando síntese protéica aumentada em algumas células, a ponto de distender a membrana

nuclear. Isto não foi observado nas amostras analisadas neste experimento; entretanto, a diferença de número e tamanho das organelas citoplasmáticas vista em um e no outro tipo morfológico nos induzem a pensar em diferentes estágios de diferenciação celular.

5.4 IMUNOFENOTIPAGEM

A utilização das amostras celulares preparadas por citocentrifugação e fixadas em álcool mostrou-se adequada para a realização da técnica de imunocitoquímica. Esta observação já fora feita por CANIATTI *et al.* (1996), que consideraram a técnica um método prático, econômico e acurado para o diagnóstico e imunofenotipagem do linfoma canino.

A reação com o anticorpo antivimentina produziu marcação citoplasmática granular difusa, cuja intensidade variou de intensa, em 48 amostras, a discreta, em 29 casos. A marcação fraca nos tumores plasmocitóides foi significativamente inferior aos demais. O uso do anticorpo monoclonal antivimentina humana para a detecção deste grupo de filamentos intermediários em tecidos caninos está estabelecido desde 1989, pela publicação feita por MOORE *et al.*, corroborada pouco depois por DESNOYERS *et al.* (1990). A positividade da reação com este anticorpo permite a classificação do tecido como de origem mesenquimal (WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998), como ocorre em tecidos humanos (LEADER *et al.*, 1987). O fato de o tumor venéreo transmissível ser de origem mesenquimal e, portanto, reagir positivamente com o anticorpo antivimentina, foi descrito por SANDURSKY *et al.* (1987), sendo confirmado subsequenteemente por GIMENO *et al.* (1995), MOZOS *et al.* (1996), MARCHAL *et al.* (1997) e TINUCCI-COSTA (1999a).

GIMENO *et al.* (1995) descreveram que, dos cinco casos de TVT testados, um apresentou uma reação fortemente positiva; MARCHAL *et al.*

(1997) encontraram quatro casos negativos, em 14 testados, sem detalhar observações sobre a intensidade de coloração. Já MOZOS *et al.* (1996) verificaram forte marcação, ainda que em um percentual variável de células, em 25 tumores; TINUCCI-COSTA (1999a) obteve uma marcação forte em todos os seis tumores testados, assim como SANDURSKY *et al.* (1987), em cinco casos. À parte as variações de tipo de tecido (cortes histológicos incluídos em parafina ou amostras citológicas), recuperação antigênica, clone e fabricante do anticorpo ou diluição utilizada, este foi o estudo que investigou o maior número de amostras, permitindo que as diferenças de intensidade de marcação se tornassem mais evidentes. A superexpressão de vimentina tem sido ligada a um estado mais agressivo e de maior potencial metastático em vários tumores, entre eles o carcinoma hepatocelular (HU *et al.*, 2004) e o câncer de próstata (SINGH *et al.*, 2003). O fato dos tumores com o fenótipo considerado mais agressivo de TVT terem apresentado poucas amostras com a marcação mais fraca sugere alguma ligação da expressão deste filamento intermediário com o comportamento da neoplasia, que merece maior investigação.

O anticorpo antilisoзима produziu marcações citoplasmáticas intensas e grosseiras, de intensidade forte (+++) ou muito forte (++++), sem diferenças significativas entre os grupos. Em medicina, a lisoзима é considerada um marcador de macrófagos/histiócitos e de leucócitos mielóides (SUZUKI *et al.*, 2003). O uso do anticorpo antilisoзима humana para a marcação de tecidos caninos normais foi estabelecida por MOORE (1986a), que observou a marcação de monócitos, neutrófilos, macrófagos e epitélio tubular renal. Este mesmo autor (1986b) observou a marcação positiva em desordens histiocíticas caninas, como histiocitose sistêmica, histiocitose maligna e paniculite granulomatosa. Esta reatividade foi confirmada por THOOLEN *et al.*, em 1992, e por BROWN *et al.*, em 1994, ambos grupos trabalhando com histiocitose maligna. A

positividade das células do tumor venéreo transmissível à marcação com o anticorpo antilisoizima foi observada primeiramente por MOZOS *et al.* (1996), que obtiveram marcação positiva em dez de 25 (40%) tumores testados, diferente da positividade em todos os casos analisados observada no presente experimento e igualmente obtida por MARCHAL *et al.* (1997). Entretanto, TINUCCI-COSTA (1999a) não obteve marcação positiva em nenhum dos tumores testados, atribuindo o fato ao método empregado na fixação ou na recuperação antigênica do material, o que realmente é provável, já que o anticorpo aqui utilizado foi o mesmo usado por TINUCCI-COSTA (1999a).

A imunorreatividade das células de TVT para lisoizima tem sido considerada como uma evidência da origem histiocítica desta neoplasia (MOZOS *et al.*, 1996; MARCHAL *et al.*, 1997). Entretanto, esta interpretação foi discutida por MACLACHLAN & KENNEDY (2002), uma vez que a lisoizima não é exclusiva de macrófagos, marcando igualmente neutrófilos, glândulas serosas e outros tipos celulares. Baseados em uma informação pessoal de P.F. Moore, estes autores propuseram que as células de TVT sejam leucócitos imaturos, provavelmente de origem mielóide, que expressam CD45 e CD45RA.

Apesar disso, outros pesquisadores têm obtido evidências adicionais da origem histiocítica. MARCHAL *et al.* (1997) obtiveram marcação positiva para o anticorpo ACM1, o qual marca uma ampla variedade de macrófagos teciduais caninos, em 11 de 14 tumores testados. TINUCCI-COSTA (1999a) obteve reação positiva das células neoplásicas com os marcadores de macrófagos antiMAC-1, antiMAC-2 e antimacrófago clone Ber-MAC3, variando entre 10 e 40% de células marcadas.

Neste experimento, os dois marcadores de macrófagos utilizados mostraram-se efetivos para a marcação das células de TVT, em percentual e intensidade variáveis de caso para caso. O percentual de células

marcadas pelo anticorpo Ber-MAC3, comercializado como CD163, variou entre 5 e 96%, e pelo anticorpo MAC387, entre 1 e 60%.

A marcação pelo anticorpo antiantígeno mielóide/histiocítico (MAC387) apresentou diferenças significativas, com o maior percentual ocorrendo nos grupos plasmocitóide, extragenital e não primário. Entretanto, PÉREZ *et al.* (1998) utilizando este mesmo anticorpo em cortes histológicos de TVT, não obtiveram marcação das células neoplásicas, somente dos macrófagos infiltrados no tumor. Isto pode ter ocorrido em razão de diferenças no processamento do material – foram utilizadas aqui amostras de células fixadas em álcool, que é considerado um fixador tecidual mais adequado para a técnica de imunocito(histo)química que a formalina (MOORE *et al.*, 1989). Outra diferença foi o protocolo de recuperação antigênica empregado: enquanto PÉREZ *et al.* (1998) usaram tripsina, no presente experimento foi utilizada recuperação por calor em banho-maria, que é considerada uma das melhores formas de desmascaramento de antígenos.

Apesar do anticorpo MAC387 ser largamente utilizado como um marcador de histiócitos, alguns estudos apontam sua não especificidade: LOFTUS *et al.* (1991) encontraram marcação positiva em sarcomas de tecidos moles, adenocarcinomas e carcinomas de células basais. Segundo GUIGNARD *et al.* (1996), este anticorpo reconhece três proteínas da família S100 em neutrófilos humanos. O tumor venéreo transmissível apresenta positividade para a proteína S100, segundo dados apresentados por TINUCCI-COSTA (1999a). Desta forma, ao se fazer a avaliação da positividade encontrada aqui, além do indicativo de origem histiocitóide (ou mielóide, segundo MACLACHLAN & KENNEDY [2002]), não se pode esquecer a possibilidade de uma marcação inespecífica. A diferença de marcação entre os grupos, observada neste experimento, pode representar diferentes linhagens ou estágios de ativação

das células neoplásicas, da mesma forma que histiócitos em várias condições reativas expressam diferentes fenótipos (O'LAUGHLIN *et al.*, 1992).

Já a análise dos grupos para o anticorpo CD163 evidenciou diferença entre as massas pequenas e grandes, com maior número de células positivas nas massas pequenas e, ainda que não significativas, marcações superiores nas massas extragenitais e nas não primárias. TINUCCI-COSTA (1999a), trabalhando com este anticorpo, obteve marcação positiva somente na amostra de tumor refratário à terapia, porém a técnica foi aplicada em cortes de congelação, sem recuperação antigênica, e em um pequeno número de casos. A bibliografia consultada não apontou nenhum tipo de associação entre imunomarcção e o tamanho do tumor. A única informação a respeito de interações com tamanho da massa neoplásica, foi a de YANG *et al.* (1991), que encontraram uma associação positiva entre o tamanho e os níveis de antígenos tumorais circulantes, mas nenhum relato refere-se à imunomarcção. O significado biológico do presente achado precisa ser estabelecido em estudos futuros.

A origem histiocítica do tumor venéreo transmissível tem sido sugerida, também, com base no comportamento das células neoplásicas. ALBANESE *et al.* (2002) relataram um caso de TVT cutâneo no qual as células tumorais estavam parasitadas por amastigotas de *Leishmania*, assim como os macrófagos que infiltravam a massa neoplásica. Achado semelhante foi relatado por CATONE *et al.* (2003), em um caso de TVT genital de um cão com leishmaniose severa e não-responsiva à terapia. Estes relatos coincidem com a observação feita em um dos casos estudados no presente experimento, no qual foi verificada a presença de amastigotas de *Leishmania* parasitando as células neoplásicas em um caso de TVT metastático.

5.5 AVALIAÇÃO DE DANOS DE DNA

O teste do cometa vem sendo largamente aplicado para a avaliação de genotoxicidade e reparo de DNA, monitoramento ambiental e biomonitoramento e, ainda, em aplicações clínicas na análise de efeitos de exposição ambiental, ocupacional ou dieta (ROJAS *et al.*, 1999; KASSIE *et al.*, 2000; COLLINS, 2004). Entretanto, sua aplicação em medicina veterinária ainda é tímida, com poucos trabalhos publicados (KREJA *et al.*, 1996; HEATON & RANSLEY, 2001; ALVES *et al.*, 2004).

WILKENING *et al.* (2003) utilizaram recentemente o teste do cometa como parte de um protocolo de comparação do metabolismo de pró-mutagênicos entre hepatócitos humanos normais e uma linhagem celular de hepatoma, observando que as células normais são mais sensíveis a este tipo de lesão e, portanto, apresentam mais lesões no DNA após o tratamento. Como no presente experimento nenhum tipo de tratamento foi aplicado às células, este tipo de inferência não pôde ser feito. BALTACI *et al.* (2003) estudaram a extensão do dano de DNA em adenocarcinomas colorretais, avaliado pelo teste do cometa, encontrando diferença significativa entre as células neoplásicas e os controles. Entretanto, no que diz respeito ao TVT, não existe um tecido normal que possa servir de controle negativo, já que a origem histológica desta neoplasia ainda não foi estabelecida. Neste sentido, a aplicação dada ao teste do cometa no presente estudo é inovadora porque procurou comparar, com base em critérios morfológicos, três populações celulares de uma neoplasia de ocorrência natural e investigar diferenças na manifestação ou não de danos no DNA entre elas.

A associação entre neoplasia e mutações genotípicas está bem estabelecida (LOEB, 2001). As alterações citogenéticas do tumor venéreo

transmissível em relação ao genótipo canino normal são descritas desde a década de 1960, em tumores de ocorrência natural e em cultura de células (WEBER *et al.*, 1965; ADAMS *et al.*, 1981; HASLER & WEBER, 2000). A presença de uma translocação no oncogene *c-myc*, presente em amostras do tumor em três continentes (KATZIR *et al.*, 1985; AMARIGLIO *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 1999; PORTELA *et al.*, 2003), tem sido considerada a “assinatura” molecular desta neoplasia.

Na avaliação do teste do cometa observou-se que a presença de danos (ainda que discreta) ocorreu nos três grupos citomorfológicos, porém no grupo plasmocitóide a quantidade de danos foi significativamente maior que nas células do grupo linfocitóide. A diferença significativa de danos no DNA entre os tipos celulares do TVT aponta para a existência de linhagens celulares distintas, na qual o tipo plasmocitóide está associado com maior quantidade de quebras de DNA.

O teste do cometa poderá ser utilizado futuramente como ferramenta para a investigação da capacidade das células plasmocitóides e linfocitóides reagirem frente à agressão com drogas quimioterápicas, *in vitro*, dando seqüência a esta linha de pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Com base nos achados obtidos durante o experimento, podemos concluir que:

1. As características citomorfológicas dos diferentes padrões celulares de tumor venéreo transmissível permitem a distinção dos tipos celulares linfocitóide e plasmocitóide.
2. Os achados de prevalência dos tipos citomorfológicos segundo sua localização e comportamento biológico e a população celular dos tumores com e sem metástases apontam para a maior habilidade das células plasmocitóides desenvolverem-se em sítios extragenitais e metastatizarem.
3. As características de malignidade apresentadas pelo TVT independem do padrão citomorfológico predominante, exceto as células em girino, que foram características dos tumores linfocitóides, os quais são também menos propensos à manifestação de anomalias nucleares que os plasmocitóides.
4. O infiltrado de células polimorfonucleares e linfoplasmocitário é mais abundante nos tumores primários e genitais, favorecendo resposta clínica satisfatória e isto é um indicador de bom prognóstico.
5. A ultra-estrutura das células do tumor venéreo transmissível aponta para uma maior capacidade metabólica das células plasmocitóides, pela presença de maior número de organelas.
6. A diferença de marcação para o anticorpo anti-vimentina, mais intensa nos tumores plasmocitóides, associadas à diferença de marcação para o anticorpo anti-antígeno mielóide/histiocitário, mais freqüente nos tumores plasmocitóides, extragenitais e não primários, corrobora a suspeita de linhagem celular mais agressiva.

7. A diferença entre quantidade de danos de DNA pelo teste do cometa entre os tipos plasmocitóide e linfocitóide comprova que os primeiros possuem maiores quantidades de quebras, sugerindo maior malignidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.W., SAPP, W.J., CARTER, L.P. Cytogenetic observations on the canine venereal tumor in long-term culture. **Cornell Vet.**, v.71, p.336-346, 1981.

ALBANESE, F. et al. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin? **Vet. Dermatol.**, v.13, p.243-246, 2002.

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

ALVES, A. et al. Acute bacterial cystitis does not cause deoxyribonucleic acid damage detectable by the alkaline comet assay in urothelial cells of dogs. **Vet. Pathol.**, v.41, n.3, p.299-301, 2004.

AMARAL, A.S. et al. Exame citológico como método diagnóstico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo retrospectivo: 1994-2002). Submetido à **Rev. Port. Ciênc. Vet.**

AMARIGLIO, E.N. et al. Identity of rearranged line/c-myc junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.8136-8139, 1991.

AMBER, E.I., ADEYANJU, J.B. Oronasal transmissible venereal tumor in a dog. **Mod. Vet. Pract.**, v.67, p.154, 1986.

AMBER, E.I., ISITOR, G.N., ADEYANJU, J.B. Viral-like particles associated with naturally occurring transmissible venereal tumor in two dogs: preliminary report. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.12, p.2613-2615, 1985.

AYYAPPAN, S. et al. Metastatic transmissible venereal tumour in a dog: a case report. **Indian Vet. J.**, v.71, p.265-266, 1994.

BACCHI, C.A., NEGRETTE, M.S. Absence of reactions for cytokeratin in the immunoperoxidase test for canine transmissible venereal tumour. **Rev. Med. Vet. (B. Aires)**, v.71, p.158-160, 1990.

BALTACI, V. et al. Assessment of cytogenetic aberrations and comet assay in colorectal adenocarcinomas. **Tumori**, v.89, n.3, p.305-310, 2003.

BATAMUZI, E.K., BITTEGEKO, S.B.P. Anal and perianal transmissible venereal tumours in a bitch. **Vet. Rec.**, v.129, p.556, 1991.

BATAMUZI, E.K., KESSY, B.M. Role of exfoliative cytology in the diagnosis of canine transmissible venereal tumour. **J. Small Anim. Pract.**, v.34, p.399-401, 1993.

BATAMUZI, E.K., KRISTENSEN, F. Urinary tract infection: the role of canine transmissible venereal tumour. **J. Small Anim. Pract.**, v.37, n.6, p.276-279, 1996.

BINDU, L. et al. Radiation-induced changes in oral carcinoma cells - a multiparametric evaluation. **Cytopathology**, v.14, p.287-293, 2003.

BLOOM, F., PAFF, G.H., NOBACK, C.R. The transmissible venereal tumor of the dog: studies indicating that the tumor cells are mature end cells of reticuloendothelial origin. **Amer. J. Pathol.**, v.27, n.1, p.119-130, 1951.

BOOTH, M.J. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch. **J. Small Anim. Pract.**, v.35, n.1, p.39-42, 1994.

BOSCOS, C.M. Canine transmissible venereal tumour: clinical observations and treatment. **Anim. Familiaris**, v.3, p.10-15, 1988.

BOSCOS, C.M., TONTIS, D.K., SAMARTZI, F.C. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. **Canine Pract.**, v.24, n.4, p.6-11, 1999.

BOSCOS, C.M. et al. Ocular involvement of transmissible venereal tumor in a dog. **Vet. Ophthalmol.**, v.1, p.167-170, 1998.

BRANDÃO, C.V.S. et al. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998 - 2000). **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v.5, n.1, p.25-31, 2002.

BRIGHT, R.M. et al. Transmissible venereal tumor of the soft palat in a dog. **J. Vet. Med. Assoc.**, v.183, n.8, p.893-895, 1983.

BROWN, D.E. et al. Cytology of canine malignant histiocytosis. **Vet. Clin. Pathol.**, v.23, p.118-122, 1994.

BURINI, C.H.P. **Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida**. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 162p.

CALVERT, C.A. Transmissible venereal tumor in the dog. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy**. Philadelphia : Saunders, 1983. p.413-415.

CALVERT, C.A., LEIFER, C.E., MACEWEN, E.G. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v.181, p.163-164, 1982.

CAMACHO, A.A., LAUS, J.L. Estudo sobre a eficiência da vincristina no tratamento de cães com tumor venéreo transmissível. **Ars Vet.**, v.3, n.1, p.37-42, 1987.

CANIATTI, M. et al. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. **Vet. Pathol.**, v.33, n.2, p.204-212, 1996.

CARTER, R.F., VALLI, V.E.O. Taking a biopsy. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.20, n.4, p.769-794, 1990.

CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. **Vet. Res. Commun.**, v.27, p.549-553, 2003.

CHANDLER, J.P., YANG, T.J. Canine transmissible venereal sarcoma: distribution of T and B lymphocytes in blood, draining lymph nodes and tumours at different stages of growth. **Br. J. Cancer**, v.44, p.514-521, 1981.

CHOI, Y. et al. Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor. **Anim. Genet.**, v.30, n.1, p.51-53, 1999.

CLEMO, F.A.S. et al. Immunoreactivity of canine epithelial and nonepithelial neoplasms with monoclonal antibody B72.3. **Vet. Pathol.**, v.32, p.147-154, 1995.

COCKRILL, J.M., BEASLEY, J.N. Transmission of transmissible venereal tumor of the dog to the coyote. **Amer. J. Vet. Res.**, v.40, n.3, p.409-410, 1979.

COCKRILL, J.M., BEASLEY, J.N. Ultrastructural characteristics of canine transmissible venereal tumor at various stages of growth and regression. **Am. J. Vet. Res.**, v.36, p.677-681, 1975.

COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. **Adv. Cancer Res.**, v.43, p.75-112, 1985.

COHEN, D. The transmissible venereal tumor of the dog – a naturally occurring allograft? : a review. **Isr. J. Med. Sci.**, v.14, n.1, p.14-19, 1978.

COHEN, D., SHALEV, A., KRUP, M. Lack of β_2 -microglobulin on the surface of canine transmissible venereal tumor cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.72, n.2, p.395-401, 1984.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molec. Biotechnol.**, v.26, n.3, p.249-261, 2004.

COWELL, R.L., TYLER, R.D. Cytology of cutaneous lesions. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.19, n.4, p.769-794, 1989.

DALECK, C.L.M. et al. Novos estudos sobre o tratamento do tumor venéreo transmissível canino (TVT). **Ars Vet.**, v.3, n.2, p.203-209, 1987a.

- DALECK, C.L.M. et al. Avaliação de diferentes métodos diagnósticos do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães. **Ars Vet.**, v.3, n.2, p.187-194, 1987b.
- DAS, U., DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Vet. Res. Commun.**, v.24, p.545-556, 2000.
- DASS, L.L., SAHAY, P.N. Surgical treatment of canine transmissible venereal tumour : a retrospective study. **Indian Vet. J.**, v.66, p.255-258, 1989.
- DENICOLA, D., REAGAN, W.J. Using cytology in the diagnosis of cancer. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1998. Chap.9, p.79-94.
- DESNOYERS, M.M., HAINES, D.M., SEARCY, G.P. Immunohistochemical detection of intermediate filament proteins in formalin fixed normal and neoplastic canine tissues. **Can. J. Vet. Res.**, v.54, n.3, p.360-365, 1990.
- DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W. Cytology of canine cutaneous round cell tumors : mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. **Vet. Pathol.**, v.16, n.6, p.673-679, 1979.
- ERÜNAL-MARAL, N., FINDIK, M., ASLAN, S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.**, v.107, n.5, p.175-180, 2000.
- FENECH, M., CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage-fusion-bridges cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v.504, p.131-136, 2002.
- FENTON, M.A., YANG, T.J. Role of humoral immunity in progressive and regressive and metastática growth of the canine transmissible venereal sarcoma. **Oncology**, v.45, n.3, p.210-213, 1988.
- FERREIRA, A.J.A. et al. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, v.41, n.4, p.165-168, 2000.
- FOWLER, K.A. et al. Diagnostic exercise: neoplastic mass of the vagina and vulva in a dog. **Lab. Anim. Sci.**, v.47, n.5, p.534-536, 1997.
- FURLONG, M.A. et al. Synovial-type giant cell tumors of the vertebral column: a clinicopathologic study of 15 cases, with a review of the literature and discussion of the differential diagnosis. **Human Pathol.**, v.34, n.7, p.670-679, 2003.
- GANDOTRA, V.K., CHAUHAN, F.S., SHARMA, R.D. Occurrence of canine transmissible venereal tumor and evaluation of two treatments. **Indian Vet. J.**, v.70, p.854-857, 1993.
- GATTER, K.C. Diagnostic immunocytochemistry: achievements and challenges. **J. Pathol.**, v.159, p.183-190, 1989.

GIMENO, E.J. et al. Intermediate filament expression and lecitin histochemical features of canine transmissible venereal tumour. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.103, p.645-650, 1995.

GINEL, P.J. et al. Primary transmissible venereal tumour in the nasal cavity of a dog. **Vet. Rec.**, v.136, n.9, p.222-223, 1995.

GOLDSCHMIDT, M.H., HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. (Ed.) **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Ames, Iowa : Iowa State, 2002. Chap.2, p.45-117.

GONZÁLEZ, G. et al. Neoplasias en aparato reproductor en perras: estudio retrospectivo de 6 años. **Veterinaria Méx.**, v.28, n.1, p.31-34, 1997.

GONZÁLEZ, C. et al. Respuesta leucocitaria local en tumor venereo transmissible del canino en fase progresiva y en regresion inducida com vincristina. **Avanc. Cienc. Vet.**, v.15, n.1, p.45-53, 2000a.

GONZÁLEZ, C.M. et al. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **J. Comp. Pathol.**, v.122, p.241-248, 2000b.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**, v.7, n.2, p.247-254, 1965.

GREENINGS, S. Clinical cytology and cytotechnology. In: KEEBLER, C.M., SOMRAK, T.S. **The manual of cytotechnology**. 7.ed. Chicago : American Society of Clinical Pathologists, 1993. Chap.2, p.5-16.

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

GUEDES, R.M.C. et al. Tumor venéreo transmissível (TVT) extragenital em um cão : relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, n.3, p.369-374, 1996.

GUIGNARD, F., MAUEL, J., MARKERT, M. The monoclonal antibody Mac 387 recognizes three S100 proteins in human neutrophils. **Immunol. Cell Biol**, v.74, n.1, p.105-107, 1996.

HAMIR, A.N. Neoplasms of dogs in Papua New Guinea. **Aust. Vet. J.**, v.63, n.10, p.342-343, 1986.

HAMIR, A.N. Primary penile and nasal transmissible venereal tumours in a dog. **Aust. Vet. J.**, v.62, n.12, p.430-432, 1985.

HARME LIN, A. et al. Lack of MHC expression and retention of ultrastructural characteristics by xenograft transmissible venereal tumor cells in SCID mice. **Vet. Immunol. Immunother.**, v.86, p.245-249, 2002.

HARVEY, J.W. **Atlas of veterinary hematology**. Philadelphia : Saunders, 2001. 228p.

HASLER, A.H., WEBER, W.T. Theriogenology question of the month. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v.216, n.10, p.1557-1559, 2000.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas**. Botucatu, 2004. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 90p.

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.

HIGGINS, D.A. Observations on canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas. **Vet. Rec.**, n.79, p.67-71, 1966.

HILL, D.L., YANG, T.J. Immunoelectron microscopic localization of a tumor-associated antigen (TAA) in the canine transmissible venereal sarcoma by anti-TAA-antiferitin hybrid antibodies. **J. Natl. Cancer Instit.**, v.75, n.4, p.725-732, 1985.

HILL, D.L., YANG, T.J., WACHTEL, A. Canine transmissible venereal sarcoma: tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. **Vet. Pathol.**, v.21, p.39-45, 1984.

HOQUE, M., PAWDE, A.M., SINGH, G.R. Combination chemotherapy in canine transmissible venereal tumor. **Indian Vet. J.**, v.72, p.973-975, 1995.

HSIAO, Y.W. et al. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Vet. Immunol. Immunother.**, v.6596, p.1-10, 2002.

HU, L. et al. Association of vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. **Oncogene**, v.23, n.1, p.298-302, 2004.

IDOWU, L. The chromosomes of the transmissible venereal tumour of dogs in Ibadan, Nigeria. **Res. Vet. Sci.**, v.22, p.271-273, 1977.

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

KATZIR, N. et al. "Retroposon" insertion into the cellular oncogene c-myc in canine transmissible venereal tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.1054-1058, 1985.

KENNEDY, J.R., YANG, T.J., ALLEN, P.L. Canine transmissible venereal sarcoma: electron microscopic changes with time after transplantation. **Br. J. Cancer**, v.36, n.3, p.375-385, 1977.

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. **Mutat. Res.**, v.359, p.63-70, 1996.

KROGER, D., GREY, R.M., BOYD, J.W. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. **Canine Pract.**, v.16, n.6, p.17-21, 1991.

LAGING, C., KRONING, T. Observations on the canine transmissible venereal tumour. Retrospective study of tumours send to Institute für Tierpathologie of Ludwig-Maximilians University between 1975 and 1987. **Tieraerztl. Prax.**, v.17, p.85-87, 1989.

LEADER, M. et al. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. **Histopathology**, v.11, n.1, p.63-72, 1987.

LIAO, K.W. et al. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.92, p.149-162, 2003.

LOEB, L.A. A mutator phenotype in cancer. **Cancer Res.**, v.61, p.3230-3239, 2001.

LOFTUS, B. et al. Mac387: its non-specificity as a tumour marker or marker histiocytes. **Histopathology**, v.19, n.3, p.251-255, 1991.

MACEWEN, E.G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia : Saunders, 2001. Cap.29C, p.651-656.

MACLACHLAN, N.J., KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: MEUTEN, D.J. (Ed.) **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Ames, Iowa : Iowa State, 2002. Chap.11, p.547-573.

MANNING, P.J., MARTIN, P.D. Metastasis of canine transmissible venereal tumor to the adenohypophysis. **Pathol. Vet.**, v.7, n.2, p.148-152, 1970.

MARCHAL, T. et al. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.57, p.1-11, 1997.

MATTII, L., BARALE, R., PETRINI, M. Use of comet test in the avaluation of multidrug resistance of human cell lines. **Leukemia**, v.12, n.4, p.627-632, 1998.

McKINLEY, E.T. General cytologic prionciples. In: ATKINSON, B.F. **Atlas of diagnostic cytopathology**. 2.ed. Philadelphia : Saunders, 2004. Chap.1, p.1-30.

MEINKOTH, J.H., COWELL, R.L. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. **Vet. Clin. North Amer.: Small Anim. Pract.**, v.32, p.1209-1235, 2002.

MEYER, D.J., HARVEY, J.W. The microscopic examination of tissue specimens obtained with fine-needle aspiration biopsy. In; —. **Veterinary laboratory medicine**. 2.ed. Philadelphia : Saunders, 1998. Chap.15, p.265-282.

MIKAELIAN, I., GIRARD, C., IVASCU, I. Transmissible venereal tumor: a consequence of sex tourism in a dog. **Can. Vet. J.**, v.39, p.591, 1998.

MILLER, W.W., ALBERT, R.A., BOOSINGER, T.R. Ocular metastasis of a transmissible venereal tumor. **Canine Pract.**, v.15, n.3, p.19-21, 1990.

MOHANTY, G.C., RAJYA, B.S. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cells *in vitro*. **Vet. Pathol.**, v.14, p.420-425, 1977.

MOORE, A.S., MADEWELL, B.R., LUND, J.K. Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms. **Amer. J. Vet. Res.**, v.50, n.1, p.88-92, 1989.

MOORE, P.F. Characterization of cytoplasmic lysozyme immunoreactivity as a histiocytic marker in normal canine tissues. **Vet. Pathol.**, v.23, n.6, p.763-769, 1986a.

MOORE, P.F. Utilization of cytoplasmic lysozyme immunoreactivity as a histiocytic marker in canine histiocytic disorders. **Vet. Pathol.**, v.23, n.6, p.757-762, 1986b.

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.

MORALES, E., GONZÁLEZ, C. Frecuencia de tumor venéreo transmissible en perros de la ciudad de México entre 1985 y 1993. **Veterinaria Méx.**, v.26, n.3, p.173-275, 1995.

MOZOS, E. et al. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Vet. Pathol.**, v.33, p.257-263, 1996.

MUELLER, R.S., WEST, K., BETTENAY, S.V. Immunohistochemical evaluation of mononuclear infiltrates in canine lupoid onychodystrophy. **Vet. Pathol.**, v.41, n.1, p.37-43, 2004.

MURRAY, M., JAMES, Z.H., MARTIN, W.B. A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumour. **Res. Vet. Sci.**, v.10, p.565-568, 1969.

NDIRITU, C.G., MBOGWA, S.W., SAYER, P.D. Extragenitally located transmissible venereal tumor in dogs. **Mod. Vet. Pract.**, v.98, n.11, p.940-946, 1977.

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

NUNES, J.E.V. et al. Resposta clínica da terapia com sulfato de vincristina em tumor venéreo transmissível - TVT - em caninos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 10, 1987, Guarujá. **Anais...** Guarujá: ANCLIVEPA, 1987. p.10.

O'LAUGHLIN, S. et al. Macrophages (histiocytes) in various reactive and inflammatory conditions express different antigenic properties. **Human Pathol.**, v.23, n.12, p.1410-1418, 1992.

ODUYE, O.O. et al. Metastatic transmissible venereal tumour in dogs. **J. Small Anim. Pract.**, v.14, p.625-637, 1973.

OTOMO, K. et al. Histological and ultrastructural findings of regressing canine venereal tumor after repeated transplantation. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.43, p.823-832, 1981.

OWEN, L.N. **World Health Organization TNM classification of tumors in domestic animals**. Geneva : WHO, 1980.

PANDEY, S.K. et al. Incidence, treatment approach and metastasis of canine transmissible venereal sarcoma. **Indian J. Anim. Sci.**, v.59, n.5, p.510-513, 1989.

PEREIRA, J.S. et al. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. **Vet. Ophthalmol.**, v.3, p.43-47, 2000.

PÉREZ, J. et al. Primary extragenital occurrence of transmissible venereal tumors: three case reports. **Canine Pract.**, v.19, n.1, p.7-10, 1994.

PÉREZ, J., DAY, M.J., MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.64, p.133-147, 1998.

PLACKE, M.E., HILL, D.L., YANG, T.J. Cranial metastasis of canine transmissible venereal sarcoma. **J. Vet. Med. Ser. A**, v.34, p.125-132, 1987.

POLI, P. et al. 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.

PORTELA, R.F. et al. Molecular detection of canine transmissible venereal tumor by PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, 24, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Patologia. s. 08-02.

- REAGAN, J.W., SOMRAK, T.S. Evaluation of the cell sample. In: KEEBLER, C.M., SOMRAK, T.S. **The manual of cytotechnology**. 7.ed. Chicago : American Society of Clinical Pathologists, 1993. Chap.4, p.31-37.
- RECHAVI, G., KATZIR, N., RAMOT, B. Kaposi's sarcoma among AIDS patients: transmissible venereal tumour by cell engraftment? **Med. Hypotheses**, v.34, n.4, p.380-341, 1991.
- RICHEUX, F. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of capsaicin in human neuroblastoma cells SHSY-5Y. **Arch. Toxicol.**, v.73, n.7, p.403-409, 1999.
- RICKARDS, D.A. Cryotherapy on a transmissible venereal tumor in a male dog. **Canine Pract.**, v.10, n.6, p.37-39, 1983.
- ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (I). **Cães e Gatos**, n.75, p.15-16, 1998.
- ROCHA, N.S. et al. Citologia aspirativa por agulha fina como método de auxílio durante a cirurgia. **Cães e Gatos**, n.98, p.22-23, 2001.
- RODRIGUES, G.N., ALESSI, A.C., LAUS, J.L. Intraocular transmissible venereal tumor in a dog. **Ciênc. Rur.**, v.31, p.141-143, 2001.
- ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumour. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.19, n.9, p.1036-1045, 1997.
- ROGERS, K.S., WALKER, M.A., DILLON, H.B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.34, n.6, p.463-470, 1998.
- ROJAS, E., LOPEZ, M.C., VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay methodology and applications. **J. Chromatogr. B**, v.722, p.225-254, 1999.
- SANDURSKY, G.E., CARLTON, W.W., WIGHTMAN, K.A. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. **Vet. Pathol.**, v.24, p.495-499, 1987.
- SANTOS, F.G.A. et al. Apoptose no tumor venéreo transmissível canino: características morfológicas e evidênciação bioquímica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.5, p.557-562, 2001.
- SEM, T.B., MITRA, M., GUHA, C. Treatment of canine transmissible venereal tumour with cyclophosphamide: a case report. **Indian Vet. J.**, v.71, p.1120-1122, 1994.
- SHIMIZU, N. et al. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.**, v.140, n.6, p.1307-1320, 1998.
- SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, p.184-191, 1988.

SINGH, S. et al. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. **Cancer Res.**, v.63, p.2306-2311, 2003.

SOBRAL, R.A., TINUCCI-COSTA, M., CAMACHO, A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal. **Ars Vet.**, v.14, n.1, p.1-10, 1998.

SOUSA, J. et al. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Arch. Vet. Sci.**, v.5, p.41-48, 2000.

SUZUKI, M. et al. A comparative pathological study on canine necrotizing meningoencephalitis and granulomatous meningoencephalomyelitis. **J. Vet. Med. Sci.**, v.65, n.11, p.1233-1239, 2003.

TAYLOR, C.R., COTE, R.J. (Eds.) **Immunonecropsy: a diagnostic tool for the surgical pathologist**. 2.ed. Philadelphia : Saunders, 1994. 533p.

THOOLEN, R.J.M.M. et al. Malignant fibrous histiocytomas in dogs and cats: na immunohistochemical study. **Res. Vet. Sci.**, v.53, p.198-204, 1992.

TINUCCI-COSTA, M. **Utilização do fator de transferência dialisável (TFd) e RNA imune na imunoterapia de cães portadores naturais do tumor venéreo transmissível (TVT)**. Jaboticabal, 1994. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. 129p.

TINUCCI-COSTA, M. **Tumor venéreo transmissível canino: estudos imuno-histoquímicos e de transplantações xenogênicas e alogênicas**. Ribeirão Preto, 1999a. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 149p.

TINUCCI-COSTA, M. Canine transmissible venereal tumor. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP**, v.2, n.3, p.46-52, 1999b.

VARASCHIN, M.S. et al. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clínico-patológicas. **Clín. Vet.**, ano 6, n.32, p.332-38, 2001.

WEBER, W.T. et al. Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.35, p.537-547, 1965.

WEIR, E.C. et al. Extragenital occurrence of transmissible venereal tumor in the dog: literature review and case reports. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.14, n.54, p.532-536, 1978.

WELLMAN, M.L. The cytologic diagnosis of neoplasia. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.20, n.4, p.919-938, 1990.

WILKENING, S., STAHL, F., BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metab. Dispos.**, v.31, n.8, p.1035-1042, 2003.

WILLIAMSON, M.M., MIDDLETON, D.J. Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation, and histogenesis. **Vet. Dermatol.**, v.9, p.43-48, 1998.

WRIGHT, P.J., PARRY, B.W. Cytology of the canine reproductive system. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.19, p.851-874, 1989.

YANG, T.J. Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v.190, n.5, p.555-556, 1987.

YANG, T.J., CHANDLER, J.P., DUNNE-ANWAY, S. Growth stage dependent expression of MHC antigens of canine transmissible venereal sarcoma. **Br. J. Cancer**, v.55, n.2, p.131-134, 1987.

YANG, T.J., PALKER, T.J., HARDING, M.W. Tumor size, leukocyte adherence inhibition and serum levels of tumor antigen in dogs with the canine transmissible venereal sarcoma. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.33, p.255-262, 1991.

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

ANEXO A

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG _____, permito a participação do meu animal no experimento do projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA, ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO, IMUNOCITOQUÍMICA E LESÕES DE DNA NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL” e autorizo a colheita de material celular para a realização de exames. Compreendo que a participação é voluntária e que tenho o direito de não o permitir, sem que isso acarrete quaisquer prejuízos ao meu atendimento. Informo que estou consciente e perfeitamente esclarecido quanto aos riscos que o procedimento trará ao cão abaixo identificado, de minha responsabilidade.

Nome do animal: _____ Sexo: _____

Raça: _____ Idade: _____

Botucatu, / __ / ____ Assinatura: _____

ANEXO C - PROTOCOLO SEMIOLÓGICO

PROJETO DE PESQUISA EM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL														
RG			Data	/ /		Caso nº								
Proprietário														
Endereço														
Telefone					Cidade									
Nome			Sexo		Raça			Idade						
Queixa principal														
Acesso à rua?					☐ não ☐ sim	Obs.:								
Contato com outros cães?					☐ não ☐ sim									
Controle reprodutivo?					☐ não ☐ sim									
Emagrecimento progressivo?					☐ não ☐ sim									
Massa hemorrágica?					☐ não ☐ sim									
Massa friável?					☐ ã obs ☐ não ☐ sim									
Tratamento anti-neoplásico prévio					☐ não ☐ sim									
Crescimento atual					☐ rápido ☐ lento ☐ estável									
Tempo de crescimento					☐ até 3 semanas ☐ 3 a 8 semanas ☐ + de 8 semanas	☐ R ☐ E ☐ A								
Localização da massa														
					☐ G ☐ E									
Massa única?					☐ sim ☐ não	Comportamento biológico		☐ P ☐ M ☐ R						
Tamanho estimado														
					☐ P ☐ M ☐ G									
Estado geral					Exame físico									
☐ ótimo ☐ bom ☐ regular ☐ ruim														
Mucosas										☐ róseas ☐ pálidas ☐ ictericas ☐ congestas				
Linfonodos										☐ normais ☐ aumentados				
Temperatura		FC		FR										
Hidratação										☐ n ☐ ↓ 5% ☐ ↓ 8% ☐ ↓ 12%				
Consciência										☐ alerta ☐ apatia ☐ estupor ☐ coma				
Observações														

CAAF	Agulha	☐ 13x4,5	☐ 20x5	☐ 25x6	☐ 25x7	Citocentrífuga	☐ não	☐ sim
						Biópsia	☐ não	☐ sim
☐ imunocitoquímica ☐ cometa ☐ micr. eletrônica						Microscopia eletrônica	☐ não	☐ sim
Tratamento utilizado			Dose					
☐ redução total		☐ redução parcial		☐ inalterado		☐ aumentado		☐ S ☐ PS ☐ R

DESCRIÇÃO DE MASSAS ADICIONAIS				Caso nº	
Localização da massa					☐ G ☐ E
Ordem de aparecimento			Comportamento biológico		☐ P ☐ M ☐ R
Tamanho estimado					☐ P ☐ M ☐ G
Massa hemorrágica?			☐ não	☐ sim	
Massa friável?			☐ ñ obs	☐ não	☐ sim
Crescimento atual			☐ rápido	☐ lento	☐ estável
Tempo de crescimento			☐ até 3 semanas	☐ 3 a 8 semanas	☐ + de 8 semanas
					☐ R ☐ E ☐ A

CAAF	Agulha	☐ 13x4,5	☐ 20x5	☐ 25x6	☐ 25x7	Citocentrífuga	☐ não	☐ sim
						Biópsia	☐ não	☐ sim
☐ imunocitoquímica ☐ cometa ☐ micr. eletrônica						Microscopia eletrônica	☐ não	☐ sim
Tratamento utilizado			Dose					
☐ redução total		☐ redução parcial		☐ inalterado		☐ aumentado		☐ S ☐ PS ☐ R

ANEXO D

TNM ADAPTADO PARA O TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

TUMORES DA GENITALIA EXTERNA: MACHOS

T: TUMOR PRIMÁRIO: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

T0: sem evidência de tumor

T1: tumor <3 cm no seu diâmetro máximo

T2: 3-5cm

T3: >5cm ou tumor com invasão profunda

T4: invasão local

N: LINFONODOS REGIONAIS (INGUINAIS): (exame cirúrgico)

N0: sem evidência de envolvimento de linfonodos regionais

N1: linfonodos ipsilaterais móveis

N2: linfonodos bilaterais móveis

N3: linfonodos imóveis

M: METÁSTASE DISTANTE: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

M0: sem evidência de metástase

M1: metástase detectada. Local:

TUMORES DA GENITALIA EXTERNA: FEMEAS

T: TUMOR PRIMÁRIO: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

T0: sem evidência de tumor

T1: tumor <3cm no seu diâmetro máximo, superficial

T2: 3-5cm, invasão mínima

T3: >5cm ou tumor com invasão profunda

T4: invasão local (pele, períneo, uretra, parede paravaginal, canal anal)

N: LINFONODOS REGIONAIS (INGUINAIS, SACRAIS, ILÍACOS INTERNOS): (exame cirúrgico)

N0: sem evidência de envolvimento de linfonodos regionais

N1: linfonodos ipsilaterais móveis

N2: linfonodos bilaterais móveis

N3: linfonodos imóveis

M: METÁSTASE DISTANTE: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

M0: sem evidência de metástase

M1: metástase detectada Local:

TUMORES DE CAVIDADE NASAL / SEIOS

M : exame clínico-cirúrgico, rx tórax

T: TUMOR PRIMÁRIO: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

T0: sem evidência de tumor

T1: tumor ipsilateral, destruição óssea ausente ou mínima

T2: tumor bilateral ou destruição óssea moderada

T3: invasão local

N: LINFONODOS REGIONAIS (SUBMANDIBULAR, CERVICAL ANTERIOR E FARINGEAL): (exame cirúrgico)

N0: sem evidência de envolvimento de linfonodos regionais

N1: linfonodos ipsilaterais móveis

N1a: nodos não considerados ter crescimento

N1b: nodos considerados ter crescimento

N2: linfonodos bilaterais móveis

N2a: nodos não considerados ter crescimento

N2b: nodos considerados ter crescimento

N3: linfonodos imóveis

M: METÁSTASE DISTANTE: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

M0: sem evidência de metástase

M1: metástase detectada Local:

TUMORES CUTÂNEOS

T: TUMOR PRIMÁRIO: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

T0: sem evidência de tumor

T1: tumor < 2cm no diâmetro máximo, superficial ou exofítico

T2: tumor com 2-5 cm no diâmetro máximo, ou com invasão mínima, independentemente do tamanho.

T3: tumor > 5cm ou com invasão do subcutâneo independentemente do tamanho.

T4: tumor invadindo outras estruturas, como fáscia muscular, osso ou cartilagem.

Tumores ocorrendo simultaneamente devem ter seu número registrado. O tumor de categoria T mais alta é selecionado e o número de tumores registrado entre parênteses. Tumores sucessivos devem ser classificados separadamente.

N: LINFONODOS REGIONAIS (DE ACORDO COM A LOCALIZACAO): (exame cirúrgico)

N0: sem evidência de envolvimento de linfonodos regionais

N1: linfonodos ipsilaterais móveis

N1a: nodos não considerados ter crescimento

N1b: nodos considerados ter crescimento

N2: linfonodos bilaterais móveis

N2a: nodos não considerados ter crescimento

N2b: nodos considerados ter crescimento

N3: linfonodos imóveis

M: METÁSTASE DISTANTE: (exame clínico-cirúrgico, rx tórax)

M0: sem evidência de metástase

M1: metástase detectada Local:

REGIÕES ANATÔMICAS E LINFONODOS REGIONAIS RESPECTIVOS:

- a. pálpebras, orelhas e focinho: cervical (bilateral)
- b. face (exceto anteriores), cabeça e pescoço: cervical (bilateral),
submandibular (bilateral), auricular (bilateral)
- c. membro anterior: axilar e pré-escapular (unilaterais)
- d. tronco anterior ao umbigo: axilar e pré-escapular (ambos bilaterais)
- e. tronco posterior ao umbigo: inguinal (bilateral)
- f. membro posterior: inguinal e poplíteo (unilateral)

ANEXO E - FICHA DE AVALIAÇÃO CITOLÓGICA

CASO		LÂMINA	
Células Linfocitóides		Células Plasmocitóides	
Céls. nuas		Céls. fuso	
Proj. citoplasm.		Mitoses anormais	
Céls. Girino		Mitoses normais	
Espículas nucl		Núcleo riniforme	
Brotamentos		Binucleação	
Pseudoinclusões		Multinucleação	
Anel de sinete		Micronucleação	
Fissura nuclear		Halo perinuclear	
Canibalismo		Esp. membr. ncl	
Hipercromia		Esp. Membr. citopl	
Linfócitos		Plasmócitos	
Neutrófilos		Eosinófilos	
Monócitos		Macrófagos	
Mastócitos		Núcleolos / cél.	
Cromatina	☐ densa ☐ granular ☐ grosseira ☐ frouxa		
Anisocitose	☐ ausente ☐ discreta ☐ moderada ☐ intensa		
Anisocariose	☐ ausente ☐ discreta ☐ moderada ☐ intensa		
Macrocariose	☐ ausente ☐ discreta ☐ moderada ☐ intensa		
Basofilia	☐ ausente ☐ discreta ☐ moderada ☐ intensa		
Eosinofilia	☐ ausente ☐ discreta ☐ moderada ☐ intensa		
Vacíolos	☐ regulares ☐ irregulares	%	
Corp. linfogl.	☐ pres. ☐ aus.	Arranjo polar	☐ pres. ☐ aus.
Observações			

ANEXO F

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

1 COLHEITA DAS AMOSTRAS

O tecido deve ser manipulado com muito cuidado para evitar artefatos. Após a retirada da amostra, deve-se recortá-la em fragmentos com tamanho máximo de 1mm de espessura. Deve-se usar metade de uma gilete nova para o recorte do material. Os fragmentos não devem ser pegos com pinça, pois podem ser esmagados. Devem ser colocados no fixador imediatamente após a colheita.

2 FIXAÇÃO SEQUENCIAL DAS AMOSTRAS

Esse método combina a fixação com o glutaraldeído e a pós-fixação com tetróxido de ósmio. Imediatamente após a colheita as amostras devem ser fixadas por imersão em solução de glutaraldeído 2,5% (tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3) no mínimo por três horas.

A seguir, devem ser pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% (tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,4) e, para tal, realiza-se o seguinte procedimento:

- Tampão fosfato 0,1M pH 7,3 c três vezes de cinco minutos
- Tetróxido de ósmio 1% (novo) 2 horas em saco escuro
- Água destilada lavar três vezes de cinco minutos
- Uranila duas horas

2.1 SOLUÇÕES DE FIXAÇÃO E PÓS-FIXAÇÃO

2.1.1 SOLUÇÃO DE GLUTARALDEÍDO 2,5%

a. Tampão Fosfato 0,2M pH 7,3

- Fosfato de sódio monobásico 0,2M 23ml
- Fosfato de sódio dibásico 0,2M 77ml
- Água destilada *qsp* 200ml

b. Fixador

- Glutaraldeído 25% 10ml
- Tampão fosfato 0,2M pH 7,3 90ml

c. Solução de glutaraldeído 2,5% em cacodilato de sódio

d. Solução de tetróxido de ósmio

- Tetróxido de ósmio ampola 1g
- Água destilada 50ml
- Tampão fosfato 0,2m pH 7,3 50ml

Quebrar a ampola de tetróxido de ósmio em vidro escuro contendo a água destilada. Acrescentar o tampão fosfato. Deixar 15 horas em refrigeração, para a completa dissolução dos cristais. Separar em alíquotas de 1ml que podem ser estocadas em congelador.

e. Solução de Uranila

2.2 DESIDRATAÇÃO

Os fragmentos são desidratados por passagens em séries crescentes de álcool etílico ou de acetona.

2.2.1 DESIDRATAÇÃO COM ÁLCOOL ETÍLICO

- Álcool 50° 15 minutos
- Álcool 75° 15 minutos
- Álcool 95° 15 minutos
- Álcool absoluto 2 passagens de 15 minutos
- Acetona + resina pura (1:1) 24 horas
- Resina pura 1 hora na estufa 37°C, sem tampa

2.2.2 DESIDRATAÇÃO COM ACETONA

- Acetona 50% 2 passagens de 10 minutos
- Acetona 70% 2 passagens de 10 minutos
- Acetona 90% 2 passagens de 15 minutos
- Acetona 100% 3 passagens de 15 minutos
- Acetona + resina pura (1:1) 24 horas
- Resina pura 1 hora na estufa 37°C, sem tampa

2.3 INCLUSÃO

As amostras são impregnadas e incluídas em resina Araldite ou Epóxi 812. os blocos de resina com as amostras devem permanecer na estufa 60°C por 24 horas até que a resina polimerize.

2.4 PREPARO DA RESINA

2.4.1 ARLDITE

- Araldite¹ 54ml / 61,24g
- DDSA² 46ml / 47,14g

- DMP30³ 1,5 a 2ml

2.4.2 EPÓXI 812

- Epon 812 45ml
- DDSA 30ml
- NMA 25ml
- DMP30 1 a 1,5ml

2.5 CORTES SEMIFINOS

2.5.1 PREPARO DOS BLOCOS

Os blocos de inclusão limpos devem ser submetidos à redução da superfície de corte. Esse processo é conhecido como trimagem ou *toilete*.

2.5.2 PREPARO DAS NAVALHAS DE VIDRO

2.5.3 MICROTOMIA

Os cortes semifinos devem ser realizados em ultramicrotomo e possuir cerca de 0,5 a 1µm (vermelho, amarelo ou verde).

2.5.4 COLORAÇÃO

Os cortes obtidos são corados com azul de metileno – Azur II. O corante deve ser colocado sobre o corte e ser aquecido até que se forme um halo metálico ao redor do corante.

Para o preparo do corante de azul de metileno – Azur II, deve ser diluído a 1% em solução de bórax a 1% (solução A), enquanto que a solução B é a diluição do Azur II a 1% em água. A solução de uso é a mistura 1:1 das soluções A e B.

Nos cortes corados deve ser feita a seleção da área para o corte ultrafino.

2.6 CORTES ULTRAFINOS

2.6.1 PREPARO DOS BLOCOS

Os blocos de inclusão limpos devem ser submetidos à nova *toilete*, de acordo com as especificações obtidas durante a seleção da área de corte.

¹ Polysciences, cat. # 00552.

² Polysciences cat. # 00563.

³ Polysciences cat # 00553.

2.6.2 MICROTOMIA

Os cortes ultrafinos são obtidos no ultramicrotomo usando a navalha de diamante. Os cortes ultrafinos devem possuir cerca de 70nm (prata) de espessura. Eles são colocados em grades (telas) de cobre (podem ser de ouro, níquel ou platina) formadas por uma fina malha metálica.

2.6.3 CONTRASTE DOS CORTES ULTRAFINOS

Os cortes, já nas telas, sofrem o processo de coloração ou contraste com acetato de uranila (CO_2 sensível) e citrato de chumbo 0,2%.

a. Solução de citrato de uranila:

Para Araldite, solução saturada (5-7%) em água destilada ou álcool 50%. Para Epóxi, solução a 1-2% em água destilada ou álcool 50%.

O contraste com a solução de uranila é feito colocando-se cada tela numa gota da solução durante 30 minutos.

b. Solução de citrato de chumbo:

- Nitrato de chumbo 1,33g
- Citrato de sódio 1,76g
- Água destilada *qsp* 50ml
- Solução de NaOH 1N 8ml

Misturar nitrato de chumbo, citrato de sódio e 30ml de água destilada em um balão volumétrico e agitar vigorosamente até assumir aspecto leitoso (cerca de 20-60 minutos). Adicionar o NaOH e misturar por inversão. Completar o volume para 50ml com água destilada e deixar em repouso durante 24 horas, no mínimo.

O contraste com a solução de citrato de chumbo é feito colocando-se cada tela numa gota da solução por 5-30 minutos (geralmente 20 minutos). Diferenciar com solução de NaOH 0,02N, lavar em água corrente e deixar secar.

2.7 FOTOMICROGRAFIAS

A avaliação dos espécimes é realizada efetivamente através das fotomicrografias obtidas no Microscópio Eletrônico de Transmissão, operado a 60kV.

ANEXO G

PROTOCOLO PARA ALKALINE SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS ASSAY (TESTE DO COMETA)

1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NO TESTE DO COMETA

01. Agarose (ponto de fusão normal)
02. Agarose *Low Melting Point*
03. Brometo de etídio
04. DMSO
05. EDTA
06. HCL (ácido clorídrico)
07. NaOH (hidróxido de sódio)
08. NaCL (cloreto de sódio)
09. N-Lauroyl-Sarcosine
10. PBS (livre de Ca^{++} e Mg^{++})
11. Tris
12. Triton X-100

2 PREPARO DE SOLUÇÕES

2.1 SOLUÇÃO DE LISE (ESTOQUE)

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

Ajustar o pH para **10**, Completar para 1000 ml com H_2O destilada.
Acrescentar 10 g de N-Lauroyl Sarcosine 1%.

Conservação: temperatura ambiente, abrigada da luz (vidro âmbar).

2.2 SOLUÇÃO DE LISE (Uso)

- Triton X-100 1 ml
- DMSO 10ml
- Solução de lise estoque 100ml *qsp*

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

2.3 SOLUÇÃO DE ELETROFORESE

Para esta solução, deve-se preparar antecipadamente as soluções de EDTA (solução A) e NaOH (solução B). A solução de eletroforese deve ser preparada na hora do uso.

- Solução A (EDTA) 5ml
- Solução B (NaOH)..... 30ml
- Água destilada gelada 1000ml *qsp*

Ajustar o pH em 13.

2.3.1 SOLUÇÃO DE EDTA (A)

- EDTA 14,89 g
- Água destilada 200ml

Ajustar o pH em 10. Conservar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz (vidro âmbar).

2.3.2 SOLUÇÃO DE NaOH (B)

- NaOH 200 g
- Água destilada 500ml

Conservar em temperatura ambiente a ao abrigo da luz (vidro âmbar).

2.4 SOLUÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO

- Tris 0,4M 48,5g
- Água destilada 1000ml *qsp*

Ajustar o pH em 7,5. Conservar em temperatura ambiente, ao abrigo da luz (vidro âmbar).

2.5 SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO

2.5.1 SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO - ESTOQUE

- Brometo de etídio 10mg
- Água destilada 50ml

Conservar em temperatura ambiente a ao abrigo da luz.

2.5.2 SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO - USO

- Solução de Estoque 1ml
- Água destilada 9ml

Conservar em temperatura ambiente a ao abrigo da luz.

2.6 AGAROSE - PONTO DE FUSÃO NORMAL

- Agarose PFN 300mg
- PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} 20ml

Homogeneizar e aquecer no microondas, deixando ferver duas ou três vezes. Colocar o gel já diluído no banho-maria a 60°C. Com o auxílio de uma pinça, mergulhar as lâminas limpas no gel sem deixar escorrer. Colocá-las na posição horizontal em frente a um aquecedor, deixando-as secar por algumas horas. Conservar em geladeira a 4°C ou temperatura ambiente.

2.7 AGAROSE - BAIXO PONTO DE FUSÃO (LOW MELTING POINT)

- Agarose LMP 100mg
- PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} 20ml

Diluir a agarose LMP. Aquecê-la no microondas sem deixar ferver, transferí-la para banho-maria a 37°C para uso imediato. Conservar em geladeira a 4°C.

3 PREPARO DAS LÂMINAS

Apagar todas as luzes do laboratório. Pipetar 5µl de sangue (ou da amostra) e transferí-lo para um eppendorf. Misturar 100µl de agarose LMP a 37°C e homogeneizar junto com o sangue. Pingar delicadamente a mistura feita sobre uma lâmina preparada com agarose ponto de fusão normal e cobrir com uma lamínula grande (24x60), soltando-a gentilmente sobre a lâmina. Deixar na geladeira por 5 minutos. Retirar cuidadosamente a lamínula. Mergulhar a lâmina na solução de lise (uso) recém preparada. Deixar na solução de lise no mínimo 1 hora e no máximo 4 semanas. Esta é solução hipotônica que quebra a membrana e deixa somente o material nuclear (nucleóide).

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

4 ELETROFORESE

Preparar a Solução de Eletroforese e esperar chegar a 4°C. Envolver a cuba de eletroforese em gelo, mantendo-a no mínimo a 4°C. Retirar as lâminas da solução de lise, lavá-las com PBS -- colocar em uma cuba com PBS (uso) por aproximadamente 5 minutos, para retirar os cristais que se formam, e colocá-las na cuba de eletroforese. Padronizar qual lado será deixado para o pólo negativo para que os cometas não corram para lados opostos.

Colocar a solução tampão de eletroforese até cobrir as lâminas. Deixar as lâminas na cuba descansando por 20 minutos. Programar a fonte de eletroforese com:

- 25v, 20 minutos
- Manter a miliamperagem – 300mA

A miliamperagem e a potência serão reguladas com a quantidade de solução de eletroforese colocada na cuba. Monitorar a cuba durante o tempo de corrida eletroforética: se passar de 300 mA, retirar solução de eletroforese, e se estiver abaixo, acrescentar solução. Retirar cuidadosamente as lâminas da cuba e colocá-las em um trilho de coloração. Lavá-las cuidadosamente com solução de neutralização, 3 vezes de 5 minutos, com cuidado para não romper a agarose. Mergulhar as lâminas em Etanol 100% para fixação. Deixar secar em temperatura ambiente. As lâminas podem ser conservadas em temperatura ambiente ou geladeira.

5 COLORAÇÃO

Para coloração das lâminas, utilizar 50µl de solução de Brometo de Etídio (uso), pingando diretamente sobre a lâmina. Cobrir com uma lamínula grande (24x60). As lâminas devem ser lidas imediatamente após a coloração. Ao retirar as lamínulas da lâmina, mergulhá-las em etanol 100%. Se for preciso reanalisar a lâmina, pode ser repetido o procedimento de coloração, sem perder a qualidade da análise.

6 ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas são analisadas em um microscópio de fluorescência, que permite a visualização das imagens dos nucleóides 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 podem ser 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%)

ANEXO H - DADOS DOS PACIENTES ESTUDADOS

CASO	TNM	RG	RAÇA	SEXO	IDADE	CIDADE	LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA
1	T3N0M0	109112	srd	macho	10	Botucatu	genital
2	T3N3M0	111433	srd	macho	6	Botucatu	genital
3	T4N0M0	111479	srd	fêmea	2	Tatuí	genital
4	T2N3M0	99170	srd	macho	3	Botucatu	genital
5	T3N0M0	111519	srd	fêmea	4	Botucatu	genital
6	T1N0M0	111527	srd	fêmea	1	Botucatu	genital
7	T2N1M1	biotério	srd	fêmea	11	Botucatu	genital
8	T2N3M1	111028	srd	macho	adulto	Botucatu	genital
9	T2N0M0	94325	srd	macho	8	Botucatu	genital
10	T3N1M0	biotério	srd	fêmea	2	Diadema	genital
11	T2N0M0	biotério	Rottweiler	fêmea	4	Boituva	genital
12	T1N0M1	59094	srd	macho	10	Botucatu	genital
13	T2N0M1	111991	srd	macho	8	Botucatu	genital
14	T4N1M1	112016	srd	fêmea	8	Areiópolis	genital
15	T2N0M0	112337	srd	fêmea	1	Botucatu	genital
16	T1N0M0	94577	Husky	fêmea	3	Igaraçu do Tietê	genital
17	T2N1M1	112442	srd	fêmea	3	Bofete	genital
18	T1N0M0	112440	srd	fêmea	2	Botucatu	genital
19	T3N0M0	111259	Fila Brasileiro	macho	3	Bauru	nasal
20	T3N0M0	112596	srd	macho	5	Botucatu	genital
21	T3N0M0	111118	srd	macho	1	Botucatu	nasal
22	T2N1M0	112137	srd	fêmea	adulto	Barra Bonita	anal
23	T3N1M1	112726	Pastor Belga	fêmea	4	Botucatu	genital
24	T3N0M0	112741	srd	macho	adulto	Porangaba	genital
25	T4N0M0	112790	srd	fêmea	8	Botucatu	genital
26	T2N2M0	112793	srd	macho	6	São Manuel	genital
27	T2N0M0	97255	srd	macho	2	Botucatu	genital
28	T2N0M0	112826	srd	fêmea	10	Botucatu	genital
29	T3N3M0	98181	Fox Paulistinha	macho	3	Botucatu	genital
30	T3N1M1	112936	srd	fêmea	3	Botucatu	genital
31	T2N0M0	112998	srd	macho	2	Botucatu	genital
32	T1N3M0	113036	srd	macho	5	Barra Bonita	genital
33	T3N2aM1	112141	Pastor Alemão	macho	5	Botucatu	nasal
34	T4N0M0	100243	srd	fêmea	3	Botucatu	genital
35	T3N0M1	111367	srd	fêmea	6	Botucatu	subcutâneo
36	T1N0M0	113116	Cocker	fêmea	4	Lençóis Paulista	genital
37	T3N0M0	113252	srd	fêmea	8	Tatuí	genital
38	T1N0M0	77324	srd	fêmea	5	Botucatu	genital
39	T2N0M0	113314	srd	fêmea	9	Pardinho	genital
40	T1N0M0	113345	srd	macho	1	Botucatu	genital
41	T1N0M0	67423	srd	fêmea	9	São Manuel	genital

42	T2NOM1	113445	srd	fêmea	1	Agudos	genital
CASO	TNM	RG	RAÇA	SEXO	IDADE	CIDADE	LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA
43	T2NOM0	113456	srd	fêmea	7	Botucatu	genital
44	T2NOM0	113572	srd	fêmea	7	Lençóis Paulista	genital
45	T3NOM0	113677	srd	fêmea	6	São Paulo	genital
46	T1NOM0	113703	Poodle	fêmea	2	Botucatu	genital
47	T3NOM0	104605	srd	macho	2	São Manuel	genital
48	T3NOM0	113973	Weimaraner	fêmea	5	Botucatu	genital
49	T2NOM0	108214	Weimaraner	macho	4	Botucatu	genital
50	T3NOM0	114026	srd	fêmea	6	Lençóis Paulista	genital
51	T1NOM0	113746	srd	fêmea	2	São Manuel	genital
52	T1NOM0	103203	srd	fêmea	1	Botucatu	genital
53	T3NOM0	114377	srd	macho	7	Botucatu	genital
54	T2NOM0	102676	srd	macho	2	Botucatu	genital
55	T1N1M0	114438	srd	macho	5	São Pedro	ocular
56	T2NOM0	114559	Fox Paulistinha	macho	10	Botucatu	genital
57	T2NOM0	114549	srd	macho	10	Botucatu	genital
58	T3NOM0	114633	srd	fêmea	2	Pardinho	genital
60	T3NOM0	114683	srd	fêmea	6	Botucatu	genital
61	T1NOM0	112600	srd	macho	7	Lençóis Paulista	nasal
62	T2NOM0	114675	Poodle	fêmea	4	Areiópolis	genital
63	T2NOM0	114907	Fila Brasileiro	fêmea	5	Botucatu	genital
64	T3NOM0	113131	Cocker	macho	4	Barra Bonita	nasal
65	T3NOM0	115087	srd	macho	adulto	Botucatu	genital
66	T3NOM0	115127	srd	fêmea	adulto	Botucatu	genital
67	T2N1M0	115144	srd	macho	6	Botucatu	genital
68	T1NOM0	112088	Poodle	macho	2	Botucatu	genital
69	T1NOM0	115320	Boxer	macho	4	Botucatu	genital
70	T3NOM0	115304	Dálmata	fêmea	11	Botucatu	genital
71	T3NOM0	115525	Poodle	fêmea	4	Botucatu	genital
72	T1NOM0	85110	srd	fêmea	12	Lençóis Paulista	genital
73	T2NOM0	115586	srd	macho	2	Boituva	nasal
74	T3NOM0	107331	srd	fêmea	4	Boituva	genital
75	T1NOM1	93220	srd	fêmea	7	Anhembi	genital
76	T2NOM0	117048	Boxer	fêmea	2	Botucatu	genital
77	T2NOM1	115750	srd	macho	6	Lençóis Paulista	subcutâneo
78	T1NOM0	117085	srd	macho	4	São Manuel	genital
78	T3N1M0	117085	srd	macho	4	São Manuel	nasal
79	T1NOM0	116797	srd	fêmea	7	Botucatu	genital
80	T3NOM1	116952	Boxer	fêmea	4	Botucatu	genital
81	T3NOM0	117696	srd	fêmea	6	Botucatu	genital
82	T2NOM0	117165	srd	macho	adulto	Botucatu	genital
83	T2NOM0	117158	srd	fêmea	6	Agudos	genital
84	T3NOM0	117231	srd	macho	9	Botucatu	genital
85	T2NOM0	117206	srd	fêmea	10	Botucatu	genital
86	T1NOM0	117311	srd	fêmea	13	Botucatu	genital
87	T3NOM1	117438	srd	macho	6	Lençóis Paulista	genital
87	T4NOM0	117438	srd	macho	6	Lençóis Paulista	ocular
88	T3NOM1	117566	Pastor Alemão	fêmea	3	Itatinga	genital
89	T2N3M0	117681	srd	macho	1	Botucatu	genital

90	T2N0M1	117779	Pastor Alemão	fêmea	3	Piratinga	genital
Caso	TNM	RG	RAÇA	SEXO	IDADE	CIDADE	LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA
91	T1N0M0	117838	srd	fêmea	3	Botucatu	genital
92	T1N0M0	118135	srd	macho	11	Botucatu	genital
93	T2N3M1	118211	srd	macho	idoso	Botucatu	genital
93	T2N0M0	118211	srd	macho	idoso	Botucatu	genital
94	T1N1M1	118548	Sheepdog	fêmea	adulta	Lençóis Paulista	genital
95	T3N0M1	118500	srd	macho	2	Botucatu	genital
96	T3N2M1	118543	Boxer	fêmea	4	Botucatu	genital
97	T1N0M0	80986	srd	macho	7	Botucatu	genital
98	T3N0M0	119363	srd	macho	1	Botucatu	genital
99	T3N0M0	121038	Dachshund	macho	4	Águas São Pedro	nasal
100	T2N1M0	121025	srd	macho	3	Botucatu	genital
101	T2N0M0	121162	srd	macho	adulto	Porangaba	genital
102	T2N0M0	121188	srd	fêmea	18	Barra Bonita	genital
103	T3N0M0	125007	srd	macho	4	Igarapu do Tietê	genital
104	T4N2M1	125036	srd	macho	4	Itatinga	genital
105	T2N3M1	115720	srd	fêmea	2	Botucatu	genital
106	T3N0M0	125287	srd	fêmea	4	Botucatu	genital
107	T2N0M0	biotério	srd	fêmea	adulta	Ignorada	genital
108	T1N0M0	biotério	Pointer	fêmea	3	Botucatu	genital
109	T2N0M1	biotério	srd	fêmea	adulta	ignorada	genital
110	T4N1M1	125759	srd	fêmea	1	Itatinga	genital
111	T1N0M0	126099	srd	macho	7	Botucatu	genital
112	T2N3M0	biotério	srd	fêmea	adulta	Botucatu	genital
113	T2N0M0	biotério	srd	macho	adulto	Botucatu	genital
114	T1N0M0	126265	Poodle	macho	adulto	Bauru	genital
115	T1N3M1	126534	srd	macho	3	Barra Bonita	genital
116	T2N0M0	126546	Boxer	fêmea	9	São Manuel	genital
117	T3N3M0	126453	srd	macho	6	Botucatu	genital
118	T1N0M0	126641	srd	fêmea	3	Barra Bonita	genital
119	T3N0M0	biotério	srd	fêmea	adulta	Botucatu	genital
120	T1N0M0	126678	srd	fêmea	8	Bauru	genital
121	T2N2M0	107311	srd	macho	4	Botucatu	genital
122	T2N0M0	126805	srd	fêmea	4	Botucatu	Genital
S06	T1N0M0	116831	Poodle	fêmea	6	Botucatu	genital
S01	T2N0M0	81401	srd	macho	6	Botucatu	genital
S02	T1N0M0	116303	srd	macho	4	Botucatu	genital
S04	T3N0M0	116556	srd	macho	5	Botucatu	genital
S05	T3N2M0	116716	srd	fêmea	10	Botucatu	genital
S16	T1N0M0	117574	srd	fêmea	2	Botucatu	genital
S22	T2N0M0	120309	srd	macho	2	Pederneiras	genital
S27	T2N0M0	121314	srd	fêmea	2	Botucatu	genital
S28	T2N0M0	121212	srd	fêmea	6	Botucatu	genital
S29	T1N0M0	129748	srd	macho	5	Avaré	genital
S30	T2N0M0	biotério	srd	fêmea	adulta	ignorada	genital

ANEXO I

DADOS INDIVIDUAIS DO TESTE DO COMETA

CASO	TAIL MOMENT	TAIL INTENSITY	GRUPO CITOMORFOLÓGICO	COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO
16	0,3659	3,9899	Linfocitóide	Primário	Genital
18	0,7643	7,2383	Linfocitóide	Primário	Genital
19	0,7367	6,2198	Linfocitóide	Primário	Extragenital
21	0,4238	4,5335	Linfocitóide	Primário	Extragenital
26	0,4762	6,6626	Linfocitóide	Primário	Genital
31	1,2265	9,8244	Linfocitóide	Primário	Genital
33a	2,3397	14,4693	Misto	Não primário	Extragenital
34	2,4203	13,9039	Linfocitóide	Primário	Genital
42	1,5205	11,5465	Plasmocitóide	Primário	Genital
45	0,7910	6,9143	Linfocitóide	Primário	Genital
65	0,1848	2,5864	Linfocitóide	Primário	Genital
66	0,7142	7,6719	Misto	Primário	Genital
75	0,3445	4,7119	Misto	Primário	Genital
79	1,3401	11,0913	Plasmocitóide	Primário	Genital
80a	0,7110	6,4290	Misto	Não primário	Extragenital
87d	4,3679	22,4529	Plasmocitóide	Não primário	Extragenital
98	2,5888	15,1363	Misto	Primário	Genital
99	1,3135	13,9834	Plasmocitóide	Não primário	Extragenital
101	1,1575	9,8574	Plasmocitóide	Primário	Genital
105	0,6867	5,7460	Misto	Primário	Genital
105b	0,6322	5,5341	Misto	Não primário	Extragenital
105a	0,8079	6,6582	Misto	Não primário	Extragenital
107	1,0941	7,7660	Plasmocitóide	Primário	Genital
108	1,0941	7,7660	Plasmocitóide	Primário	Genital
109	1,2297	13,6956	Linfocitóide	Primário	Genital
109a	1,7943	11,4996	Misto	Não primário	Extragenital
109b	0,5447	4,8344	Misto	Não primário	Extragenital
110	1,4513	11,8886	Plasmocitóide	Primário	Genital
110a	1,1154	10,0833	Plasmocitóide	Não primário	Extragenital
111	1,0379	9,2884	Plasmocitóide	Primário	Genital
113	0,6460	5,6000	Misto	Primário	Genital
114	1,3533	12,2037	Plasmocitóide	Primário	Genital
116	0,6821	6,7638	Linfocitóide	Primário	Genital
117a	1,1887	12,1912	Plasmocitóide	Não primário	Extragenital
118	0,6493	6,4301	Misto	Primário	Genital

ANEXO J

DADOS ESTATÍSTICOS DOS CRITÉRIOS CITOLÓGICOS DE MALIGNIDADE

Frequências observadas dos padrões de cromatina e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos

PADRÃO DE CROMATINA								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,67
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Densa	29	26,13	7	15,22	36	22,78		
Granular	27	24,32	14	30,43	41	25,95		
Grosseira	27	24,32	13	28,26	40	25,95		
Frouxa	28	25,23	13	28,26	41	25,32		
Total	111	100	46	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,84
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Densa	26	23,85	10	20,41	36	22,78		
Granular	26	23,90	15	30,61	41	25,95		
Grosseira	29	26,61	11	22,45	40	25,95		
Frouxa	28	25,64	13	26,53	41	25,32		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO								p = 0,55
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Densa	13	22,81	13	26	10	19,61	36	22,78
Granular	19	33,33	8	16	14	27,45	41	25,95
Grosseira	13	22,81	15	30	12	23,53	40	25,95
Frouxa	12	21,05	14	28	15	29,41	41	25,32
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,88
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Densa	6	25,00	11	28,95	16	21,62	33	24,26
Granular	7	29,17	7	18,42	17	22,97	31	22,79
Grosseira	9	37,50	11	28,95	16	21,62	36	26,47
Frouxa	2	8,33	9	23,68	25	33,78	36	26,47
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de anisocitose e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

ANISOCITOSE								
LOCALIZAÇÃO							p = 0,75	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausente	6	5,41	0	0	6	3,80		
Discreta	53	47,75	27	58,71	80	50,63		
Moderada	44	39,64	17	36,97	61	38,61		
Intensa	8	7,21	3	6,52	11	6,96		
Total	111	100	46	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO							p = 0,95	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausente	6	5,50	0	0	6	3,80		
Discreta	53	48,62	27	55,10	80	50,63		
Moderada	44	40,37	17	34,69	61	38,61		
Intensa	6	5,51	5	10,21	11	6,96		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO							p = 0,22	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausente	2	3,51	4	8	0	0	6	3,80
Discreta	25	43,86	28	56	27	52,94	80	50,63
Moderada	28	49,12	14	28	19	37,25	61	38,61
Intensa	2	3,51	4	8	5	9,81	11	6,96
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO							p = 0,14	
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausente	0	0	4	10,54	2	2,70	6	4,41
Discreta	11	45,83	22	57,91	36	48,65	69	50,73
Moderada	12	50,00	11	28,96	29	39,19	52	38,23
Intensa	1	4,17	1	2,69	7	9,46	9	6,62
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de anisocariose e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

ANISOCARIOSE								
LOCALIZAÇÃO							p = 0,84	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Discreta	58	52,3	23	50	81	51,26		
Moderada	44	39,6	21	45,5	65	41,14		
Intensa	9	8,1	3	6,5	12	7,59		
Total	111	100	46	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO							p = 0,83	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Discreta	57	52,3	24	49	81	51,26		
Moderada	46	42,2	19	38,8	65	41,14		
Intensa	6	5,5	6	12,2	12	7,59		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO							p = 0,67	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Discreta	27	47,4	28	56	26	50,9	81	51,26
Moderada	27	47,4	18	36	20	39,3	65	41,14
Intensa	3	5,2	4	8	5	9,8	12	7,59
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO							p = 0,01	
	RECENTE	%	ESTABELECIDA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Discreta	8	33,33	27	71,05	36	44,5	71	52,20
Moderada	15	62,50	10	26,31	30	37,5	55	40,44
Intensa	1	4,17	1	2,64	8	10,0	10	7,35
Total	24	100	38	100	80	100	136	100

Frequências observadas de macrocariose e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

MACROCARIOSE								
LOCALIZAÇÃO							p = 0,15	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausente	91	81,98	33	70,21	124	78,48		
Presente	20	18,02	14	29,79	34	21,52		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO							p = 0,09	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausente	90	83,33	34	68	124	78,48		
Presente	18	16,67	16	32	34	21,52		
Total	108	100	50	100	158	100		
TAMANHO							p = 0,76	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausente	44	77,19	41	82	39	76,47	124	78,48
Presente	13	22,81	9	18	12	23,53	34	21,52
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO							p = 0,38	
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausente	19	79,167	33	86,84	56	75,67	108	79,42
Presente	5	20,833	5	13,16	18	24,32	28	20,59
Total	24	100	38	100	74	100	136	20,59

Frequências observadas de basofilia citoplasmática e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

BASOFILIA CITOPASMÁTICA								
LOCALIZAÇÃO							p = 0,77	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausente	76	68,47	34	72,34	110	69,62		
Presente	35	31,53	13	27,66	48	30,38		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO							p = 0,60	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausente	74	67,89	36	73,47	110	69,62		
Presente	35	32,11	13	26,53	48	30,38		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO							p = 0,68	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausente	42	73,68	33	66	35	68,63	110	69,62
Presente	15	26,32	17	34	16	31,37	48	30,38
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO							p = 0,26	
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausente	14	58,33	27	71,05	56	75,68	97	71,33
Presente	10	41,67	11	28,95	18	24,32	39	28,67
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de eosinofilia citoplasmática e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos

EOSINOFILIA CITOPLASMÁTICA								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,40
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausente	89	80,18	41	87,23	130	82,28		
Presente	22	19,82	6	12,77	18	17,72		
Total	111	100	47	100	148	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,32
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausente	87	88,99	43	87,75	130	82,28		
Presente	22	20,01	6	12,25	18	17,72		
Total	109	100	49	100	148	100		
TAMANHO								p = 0,43
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausente	44	77,20	42	84	44	86,27	130	82,28
Presente	13	22,80	8	16	7	13,73	18	17,72
Total	57	100	50	100	51	100	148	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,10
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausente	19	79,167	28	73,68	66	89,19	113	83,08
Presente	5	20,833	10	26,32	8	10,81	23	16,92
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas da ocorrência de células vacuolizadas e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

PERCENTUAL DE VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,90
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
≤ 50%	29	26,1	12	25,5	41	25,9		
> 50%	82	73,9	35	74,5	117	74,1		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,21
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
≤ 50%	32	29,3	9	18,4	41	25,9		
> 50%	77	70,7	40	81,6	117	74,1		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO								p = 0,15
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
≤ 50%	18	31,6	8	16	15	29,4	41	25,9
> 50%	39	68,4	42	84	36	70,6	117	74,1
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,34
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
≤ 50%	8	33,3	7	18,4	22	29,7	37	27,2
> 50%	16	76,7	31	81,6	52	70,3	99	72,8
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas do número de nucléolos e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

NÚMERO DE NUCLÉOLOS								
LOCALIZAÇÃO							p = 0,34	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Um	88	79,28	41	87,23	129	81,65		
+ de um	23	20,72	6	12,77	29	18,35		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO							p = 0,51	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Um	87	79,82	42	85,71	129	81,65		
+ de um	22	20,18	7	14,29	29	18,35		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO							p = 0,20	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Um	50	87,72	41	82	38	74,51	129	81,65
+ de um	7	12,28	9	18	13	25,49	29	18,35
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO							p = 0,03	
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Um	23	95,8	34	89,47	56	75,68	113	83,09
+ de um	1	4,2	4	10,53	18	24,32	23	16,91
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de corpúsculos linfoglandulares e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

CORPÚSCULOS LINFOGLANDULARES								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,75
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausentes	23	20,72	8	17,01	31	19,62		
Presentes	88	79,28	39	82,98	127	80,38		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,96
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausentes	22	20,19	9	18,37	31	19,62		
Presentes	87	79,81	40	81,63	127	80,38		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO								p = 0,04
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausentes	13	22,81	4	8	14	27,45	31	19,62
Presentes	44	77,19	46	92	37	72,55	127	80,38
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,45
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausentes	6	25	5	13,16	16	21,62	27	19,85
Presentes	18	75	33	86,84	58	78,38	109	80,15
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas da ocorrência de arranjo polar da paracromatina e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

ARRANJO POLAR DA PARACROMATINA							
LOCALIZAÇÃO						p = 0,49	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%	
Ausentes	81	72,9	31	65,9	112	70,8	
Presentes	30	27,1	16	34,1	46	29,2	
Total	111	100	47	100	158	100	
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO						p = 0,11	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%	
Ausentes	82	75,2	30	61,2	112	70,8	
Presentes	27	24,8	19	38,8	46	29,2	
Total	109	100	49	100	158	100	
TAMANHO						p = 0,86	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL
Ausentes	41	71,9	34	68	37	72,5	112
Presentes	16	28,1	16	32	14	27,5	46
Total	57	100	50	100	51	100	158
TEMPO DE EVOLUÇÃO						p = 0,69	
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL
Ausentes	18	75	27	71,1	49	66,2	94
Presentes	6	250	11	28,9	25	33,8	42
Total	24	100	38	100	74	100	136

Frequências observadas da ocorrência de células em fuso e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

CÉLULAS EM FUSO							
LOCALIZAÇÃO						p = 0,81	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%	
Ausentes	97	87,4	41	87,2	138	87,3	
Presentes	14	12,6	6	12,8	20	12,7	
Total	111	100	47	100	158	100	
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO						p = 0,38	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%	
Ausentes	93	85,3	45	91,8	138	87,3	
Presentes	16	14,7	4	8,2	20	12,7	
Total	109	100	49	100	158	100	
TAMANHO						p = 0,83	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL
Ausentes	51	89,5	43	86	44	86,3	138
Presentes	6	10,5	7	14	7	13,7	20
Total	57	100	50	100	51	100	158
TEMPO DE EVOLUÇÃO						p = 0,20	
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL
Ausentes	22	91,7	36	94,7	62	83,7	120
Presentes	2	8,3	2	5,3	12	17,3	16
Total	24	100	38	100	74	100	136

Frequências observadas da ocorrência de células nuas e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

CÉLULAS NUAS								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,76
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausentes	73	65,8	29	61,7	102	64,6		
Presentes	38	34,2	18	38,3	56	35,4		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,96
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausentes	71	65,1	31	63,3	102	64,6		
Presentes	38	34,9	18	36,7	56	35,4		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO								p = 0,94
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausentes	37	64,9	33	66	32	62,7	102	64,6
Presentes	20	35,1	17	34	19	37,3	56	35,4
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,81
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausentes	17	70,8	25	65,8	47	63,5	89	65,4
Presentes	7	29,2	13	34,2	27	36,5	47	34,6
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas da ocorrência de núcleo riniformes e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

NÚCLEOS RINIFORMES								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,70
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausentes	56	50,4	26	55,3	82	51,9		
Presentes	55	49,6	21	44,7	76	48,1		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,18
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausentes	61	55,9	21	42,8	82	51,9		
Presentes	48	44,1	28	57,2	76	48,1		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO								p = 0,08
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausentes	32	56,1	30	60	20	39,2	82	51,9
Presentes	25	43,9	20	40	31	60,8	76	48,1
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,09
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausentes	15	62,5	25	65,8	34	45,9	74	54,4
Presentes	9	37,5	13	34,2	40	54,1	62	45,6
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de binucleação e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

BINUCLEAÇÃO								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,12
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL		%	
Ausentes	59	53,1	32	68,1	91		57,6	
Presentes	52	46,9	15	31,9	67		42,4	
Total	111	100	47	100	158		100	
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,25
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL		%	
Ausentes	59	54,1	32	65,3	91		57,6	
Presentes	50	45,9	17	34,7	67		42,4	
Total	109	100	49	100	158		100	
TAMANHO								p = 0,05
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausentes	39	68,4	29	58	23	46,1	91	57,6
Presentes	18	31,6	21	42	28	54,9	67	42,4
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,69
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausentes	15	62,5	23	60,5	40	54,1	78	57,4
Presentes	9	37,5	15	39,5	34	45,9	58	42,6
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de multinucleação e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

MULTINUCLEAÇÃO								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,57
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL		%	
Ausentes	99	89,2	44	93,6	143		90,51	
Presentes	12	10,8	3	3,4	15		9,49	
Total	111	100	47	100	158		100	
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,93
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL		%	
Ausentes	99	90,8	44	89,7	143		90,51	
Presentes	10	9,2	5	10,3	15		9,49	
Total	109	100	49	100	158		100	
TAMANHO								p = 0,15
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausentes	55	96,5	44	88	44	86,3	143	90,51
Presentes	2	3,5	6	12	7	13,7	15	9,49
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,21
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausentes	24	100	34	89,5	65	87,8	123	90,4
Presentes	0	0	4	10,5	9	12,2	13	9,6
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de micronucleação e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

MICRONUCLEAÇÃO								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,93
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausentes	86	77,5	36	76,6	122	77,2		
Presentes	25	22,5	11	23,4	36	22,8		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,89
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausentes	85	78	37	75,5	122	77,2		
Presentes	24	22	12	24,5	36	22,8		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO								p = 0,21
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausentes	48	84,2	35	70	39	76,5	122	77,2
Presentes	9	15,8	15	30	12	23,5	36	22,8
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,96
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausentes	19	79,2	29	76,3	57	77	105	77,2
Presentes	5	20,8	9	23,7	17	23	31	22,8
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de mitoses normais e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

MITOSES NORMAIS								
LOCALIZAÇÃO								p = 0,33
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%		
Ausentes	48	43,2	25	53,2	73	46,2		
Presentes	63	56,8	22	46,8	85	53,8		
Total	111	100	47	100	158	100		
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO								p = 0,77
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%		
Ausentes	49	44,9	24	49	73	46,2		
Presentes	60	55,1	25	51	85	53,8		
Total	109	100	49	100	158	100		
TAMANHO								p = 0,75
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL	%
Ausentes	28	49,1	21	42	24	47,1	73	46,2
Presentes	29	50,9	29	58	27	52,9	85	53,8
Total	57	100	50	100	51	100	158	100
TEMPO DE EVOLUÇÃO								p = 0,82
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL	%
Ausentes	12	50	19	50	33	44,6	64	47,1
Presentes	12	50	19	50	41	55,4	72	52,9
Total	24	100	38	100	74	100	136	100

Frequências observadas de mitoses anormais e valor da probabilidade calculada pelo teste de qui-quadrado nos diferentes grupos.

MITOSSES ANORMAIS							
LOCALIZAÇÃO						p = 0,50	
	GENITAL	%	EXTRAGENITAL	%	TOTAL	%	
Ausentes	41	36,9	14	29,8	55	34,8	
Presentes	70	63,1	33	70,2	103	65,2	
Total	111	100	47	100	158	100	
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO						p = 0,84	
	PRIMÁRIO	%	NÃO PRIMÁRIO	%	TOTAL	%	
Ausentes	39	35,8	16	32,7	55	34,8	
Presentes	70	64,2	33	67,3	103	65,2	
Total	109	100	49	100	158	100	
TAMANHO						p = 0,004	
	PEQUENO	%	MÉDIO	%	GRANDE	%	TOTAL %
Ausentes	21	36,8	9	18	25	49	34,8
Presentes	36	63,2	41	82	26	51	65,2
Total	57	100	50	100	51	100	158 100
TEMPO DE EVOLUÇÃO						p = 0,81	
	RECENTE	%	ESTABELECIDADA	%	ANTIGA	%	TOTAL %
Ausentes	7	29,2	13	34,2	27	36,5	47 34,6
Presentes	17	70,8	25	65,8	47	63,5	89 65,4
Total	24	100	38	100	74	100	136 100

Valores da mediana e percentis P_{25} - P_{75} (em percentual de células) e probabilidade dos critérios citológicos de malignidade, analisados pelo teste de Mann-Whitney, na comparação entre massas primárias e não primárias.

	<i>n</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
PERCENTUAL DE VACUOLIZAÇÃO					
PRIMÁRIAS	109	80	50	95	0,017
NÃO PRIMÁRIAS	49	90	70	100	
HIPERCROMIA					
PRIMÁRIAS	109	7	2	12,25	0,414
NÃO PRIMÁRIAS	49	9	3	14,25	
ESPESSAMENTO DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICA					
PRIMÁRIAS	109	23	3	44,25	0,088
NÃO PRIMÁRIAS	49	12	0	33,25	
MITOSSES ANORMAIS					
PRIMÁRIAS	109	1	0	2	0,437
NÃO PRIMÁRIAS	49	1	0	2	
MITOSSES NORMAIS					
PRIMÁRIAS	109	1	0	2	0,586
NÃO PRIMÁRIAS	49	1	0	2	
ESPESSAMENTO DE MEMBRANA NUCLEAR					
PRIMÁRIAS	109	12	0	29,5	0,292
NÃO PRIMÁRIAS	49	7	0	17,0	
HALO PERINUCLEAR					
PRIMÁRIAS	109	80	17,0	100	0,701
NÃO PRIMÁRIAS	49	81	13,5	100	
PSEUDOINCLUSÕES					
PRIMÁRIAS	109	3	0,00	6	0,752
NÃO PRIMÁRIAS	49	3	0,75	5	

Continuação...	<i>n</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
BINUCLEAÇÃO					
PRIMÁRIAS	109	0	0	1	0,430
NÃO PRIMÁRIAS	49	0	0	1	
NÚCLEOS RINIFORMES					
PRIMÁRIAS	109	0	0	1	0,310
NÃO PRIMÁRIAS	49	1	0	1	
LOBULAÇÃO					
PRIMÁRIAS	109	0	0	1	0,353
NÃO PRIMÁRIAS	49	0	0	1	
PROJEÇÕES CITOPASMÁTICAS					
PRIMÁRIAS	109	22	7,75	33,00	0,406
NÃO PRIMÁRIAS	49	15	5,00	33,25	
BROTAMENTOS NUCLEARES					
PRIMÁRIAS	109	5	3	10	0,205
NÃO PRIMÁRIAS	49	6	3	14	
CÉLULAS NUAS					
PRIMÁRIAS	109	0	0	2	0,955
NÃO PRIMÁRIAS	49	0	0	2	
CÉLULAS EM GIRINO					
PRIMÁRIAS	109	1	0	5	0,156
NÃO PRIMÁRIAS	49	1	0	3	

Valores da mediana e percentis P₂₅:P₇₅ (em percentual de células) e probabilidade dos critérios citológicos de malignidade, analisados pelo teste de Mann-Whitney, na comparação entre massas genitais e extragenitais.

	<i>n</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
PERCENTUAL DE VACUOLIZAÇÃO					
GENITAIS	111	85	51,25	95	0,268
EXTRAGENITAIS	47	90	53,75	100	
HIPERCROMIA					
GENITAIS	111	7	2	12	0,142
EXTRAGENITAIS	47	9	4	15	
ESPESSAMENTO DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICA					
GENITAIS	111	23	3	43,5	0,084
EXTRAGENITAIS	47	12	0	33,0	
MITOSES ANORMAIS					
GENITAIS	111	1	0	2	0,412
EXTRAGENITAIS	47	1	0	2	
MITOSES NORMAIS					
GENITAIS	111	1	0	2,00	0,222
EXTRAGENITAIS	47	0	0	1,75	
ESPESSAMENTO DE MEMBRANA NUCLEAR					
GENITAIS	111	12	0	28,75	0,277
EXTRAGENITAIS	47	7	0	23,75	
HALO PERINUCLEAR					
GENITAIS	111	74	11,25	100	0,614
EXTRAGENITAIS	47	90	20,25	100	
PSEUDOINCLUSÕES					
GENITAIS	111	3	0	6,00	0,632
EXTRAGENITAIS	47	2	0	4,75	
BINUCLEAÇÃO					
GENITAIS	111	0	0	1	0,133
EXTRAGENITAIS	47	0	0	1	

Continuação...	<i>n</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
----------------	----------	---------	-----------------	-----------------	----------

NÚCLEOS RINIFORMES					
GENITAIS	111	0	0	1	0,242
EXTRAGENITAIS	47	0	0	1	
LOBULAÇÃO					
GENITAIS	111	0	0	1	0,684
EXTRAGENITAIS	47	0	0	1	
PROJEÇÕES CITOPASMÁTICAS					
GENITAIS	111	22	7,25	31,00	0,827
EXTRAGENITAIS	47	16	4,25	40,75	
BROTAMENTOS NUCLEARES					
GENITAIS	111	5	2,25	10	0,165
EXTRAGENITAIS	47	6	3,25	14	
CÉLULAS NUAS					
GENITAIS	111	0	0	2,00	0,630
EXTRAGENITAIS	47	0	0	3,75	
CÉLULAS EM GIRINO					
GENITAIS	111	1	0	5	0,226
EXTRAGENITAIS	47	1	0	3	

Valores da mediana e percentis P_{25} : P_{75} (em percentual de células) e probabilidade dos critérios citológicos de malignidade, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, na comparação entre massas de diferentes tamanhos.

	<i>n</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
PERCENTUAL DE VACUOLIZAÇÃO					
PEQUENAS	57	80	48,75	100	0,626
MÉDIAS	50	85	75,00	100	
GRANDES	51	90	42,50	100	
HIPERCROMIA					
PEQUENAS	57	7	2	12	0,651
MÉDIAS	50	8	4	12	
GRANDES	51	6	2	15	
ESPESSAMENTO DE MEMBRANA CITOPASMÁTICA					
PEQUENAS	57	18	0,00	42,25	0,623
MÉDIAS	50	23	5,00	40,00	
GRANDES	51	16	2,25	39,75	
MITOSES ANORMAIS					
PEQUENAS	57	1	0	2	0,059
MÉDIAS	50	1	1	2	
GRANDES	51	1	0	2	
MITOSES NORMAIS					
PEQUENAS	57	1	0	1,25	0,360
MÉDIAS	50	1	0	2,00	
GRANDES	51	1	0	2,00	
ESPESSAMENTO DE MEMBRANA NUCLEAR					
PEQUENAS	57	10,0	0	26,0	0,366
MÉDIAS	50	9,5	0	34,0	
GRANDES	51	4,0	0	24,5	
HALO PERINUCLEAR					
PEQUENAS	57	88	16,75	100	0,905
MÉDIAS	50	95	15,00	100	
GRANDES	51	52	17,75	100	
PSEUDOINCLUSÕES					
PEQUENAS	57	2	0	5,00	0,482
MÉDIAS	50	3	1	7,00	
GRANDES	51	3	0	6,75	
Continuação...	<i>n</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
BINUCLEAÇÃO					
PEQUENAS	57	1	0	1	0,063

MÉDIAS	50	0	0	1	
GRANDES	51	0	0	1	
<i>NÚCLEOS RINIFORMES</i>					
PEQUENAS	57	0 ^a	0	1	
MÉDIAS	50	0 ^a	0	1	0,038
GRANDES	51	1 ^a	0	2	
<i>LOBULAÇÃO</i>					
PEQUENAS	57	0	0	1	
MÉDIAS	50	0	0	1	0,384
GRANDES	51	0	0	1	
<i>PROJEÇÕES CITOPASMÁTICAS</i>					
PEQUENAS	57	16	5	31,75	
MÉDIAS	50	20	8	34,00	0,555
GRANDES	51	24	7	33,00	
<i>BROTAMENTOS NUCLEARES</i>					
PEQUENAS	57	5	2,75	10,00	
MÉDIAS	50	5	3,00	9,00	0,463
GRANDES	51	7	3,00	14,25	
<i>CÉLULAS NUAS</i>					
PEQUENAS	57	0	0	2,25	
MÉDIAS	50	0	0	2,00	0,831
GRANDES	51	0	0	2,00	
<i>CÉLULAS EM GIRINO</i>					
PEQUENAS	57	1,0 ^a	0	5	
MÉDIAS	50	2,5 ^a	1	5	0,046
GRANDES	51	1,0 ^a	0	3	

^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (p<0,05)

Valores da mediana e percentis P₂₅:P₇₅ (em percentual de células) e probabilidade dos critérios citológicos de malignidade, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, na comparação entre massas de diferentes tempos de evolução clínica.

	<i>n</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
<i>PERCENTUAL DE VACUOLIZAÇÃO</i>					
RECENTES	24	80	35	90	
ESTABELECIDAS	38	90	60	100	0,176
ANTIGAS	74	85	50	100	
<i>HIPERCROMIA</i>					
RECENTES	24	9	3,5	14	
ESTABELECIDAS	38	8	3,0	12	0,893
ANTIGAS	74	7	2,0	13	
<i>ESPESSAMENTO DE MEMBRANA CITOPASMÁTICA</i>					
RECENTES	24	19	2,5	34,5	
ESTABELECIDAS	38	30	6,0	47,0	0,201
ANTIGAS	74	12	0,0	39,0	
<i>MITOSES ANORMAIS</i>					
RECENTES	24	1	0	2	
ESTABELECIDAS	38	1	0	2	0,877
ANTIGAS	74	1	0	1	
<i>MITOSES NORMAIS</i>					
RECENTES	24	0,5	0	1	
ESTABELECIDAS	38	0,5	0	2	0,494
ANTIGAS	74	1,0	0	2	
Continuação...	<i>N</i>	MEDIANA	P ₂₅	P ₇₅	<i>p</i>
<i>ESPESSAMENTO DE MEMBRANA NUCLEAR</i>					
RECENTES	24	11,0	1,5	37,5	
ESTABELECIDAS	38	9,5	0,0	20,0	0,356
ANTIGAS	74	5,5	0,0	22,0	

HALO PERINUCLEAR					
RECENTES	24	97,5	23,5	100	0,638
ESTABELECIDAS	38	85,5	15,0	100	
ANTIGAS	74	64,5	16,0	100	
PSEUDOINCLUSÕES					
RECENTES	24	1,0	0	4	0,135
ESTABELECIDAS	38	2,5	0	5	
ANTIGAS	74	3,0	0	7	
BINUCLEAÇÃO					
RECENTES	24	0	0	1	0,571
ESTABELECIDAS	38	0	0	1	
ANTIGAS	74	0	0	1	
NÚCLEOS RINIFORMES					
RECENTES	24	0 ^a	0	1	0,055
ESTABELECIDAS	38	0 ^a	0	1	
ANTIGAS	74	1 ^a	0	1	
LOBULAÇÃO					
RECENTES	24	0 ^a	0	0	0,009
ESTABELECIDAS	38	0 ^{ab}	0	1	
ANTIGAS	74	0 ^b	0	1	
PROJEÇÕES CITOPLASMÁTICAS					
RECENTES	24	26,5 ^a	9,5	43	0,043
ESTABELECIDAS	38	24,5 ^a	7,0	40	
ANTIGAS	74	15,0 ^a	6,0	28	
BROTAMENTOS NUCLEARES					
RECENTES	24	5	1,5	9	0,250
ESTABELECIDAS	38	5	3,0	10	
ANTIGAS	74	6	3,0	12	
CÉLULAS NUAS					
RECENTES	24	0	0	3	0,876
ESTABELECIDAS	38	0	0	2	
ANTIGAS	74	0	0	2	
CÉLULAS EM GIRINO					
RECENTES	24	2	0	8,5	0,380
ESTABELECIDAS	38	1	0	3,0	
ANTIGAS	74	1	0	4,0	

^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$)