

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM
MICROARRANJO DE TECIDO (TMA) DE LINFOMAS NÃO-
HODGKIN EM CÃES CONFORME OS CRITÉRIOS DA
HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF HEMATOPOIETIC
TUMOURS OF DOMESTIC ANIMALS (WHO)**

THAIS ROSALEN FERNANDES

Botucatu- SP

Junho de 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM
MICROARRANJO DE TECIDO (TMA) DE LINFOMAS NÃO-
HODGKIN EM CÃES CONFORME OS CRITÉRIOS DA
HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF HEMATOPOIETIC
TUMOURS OF DOMESTIC ANIMALS (WHO)**

THAIS ROSALEN FERNANDES

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

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

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Fernandes, Thais Rosalen.

Classificação morfológica e imunoistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de linfomas não-Hodgkin em cães conforme os critérios da Histological Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals (WHO) / Thais Rosalen Fernandes. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Júlio Lopes Sequeira

Capes: 50503006

1. Cão - Doenças. 2. Hodgkin, Linfoma não. 3. Morfologia - Classificação. 4. Marcadores biológicos de tumor.. 5. Animais domésticos - Doenças.

Palavras-chave: Cão; Classificação morfológica; Linfoma; TMA.

Thaís Rosalen Fernandes

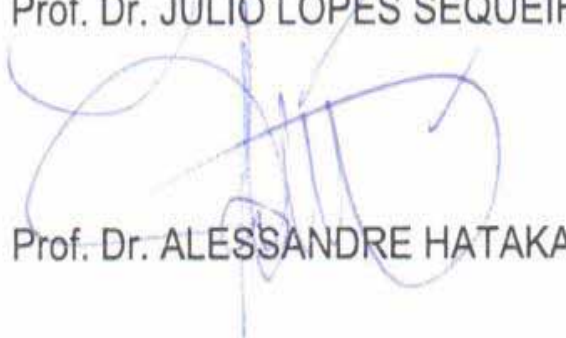
Título: CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM MICROARRANJO DE TECIDO (TMA) DE LINFOMAS NÃO-HODGKIN EM CÃES CONFORME OS CRITÉRIOS DA HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF HEMATOPOIETIC TUMOURS OF DOMESTIC ANIMALS (WHO)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. JÚLIO LOPES SEQUEIRA



Prof. Dr. ALESSANDRE HATAKA



Profa. Dra. SARA MARIA DE CARVALHO E SUZANO

Data da defesa: 30 de junho de 2014.

ESTA PESQUISA FOI FINANCIADA PELAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:

Universidade Estadual Paulista – **UNESP**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**

Fundação para o Desenvolvimento da UNESP – **FUNDUNESP**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**

Dedicatória

DEDICO...

*Ao meu querido pai, João Carlos Fernandes, e mãe, Margarete Rosalen
Fernandes pelo apoio incondicional em todos os momentos e pelo que sou hoje..
Amo vocês...*

Agradecimientos

MEUS ETERNOS AGRADECIMENTOS...

Ao Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira por me orientar, pelos conhecimentos transmitidos durante esses dois anos, mas acima de tudo pela paciência que me dedicou nos momentos de desespero. Todo meu reconhecimento e gratidão.

À Profa. Dra. Renee Laufer Amorim por me ouvir nos momentos difíceis e me aconselhar de forma tão oportuna e carinhosa. Dedico todo meu carinho e amizade.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, e toda a equipe do Laboratório de Pesquisa do Hospital A.C. Camargo/São Paulo/SP, Carlos, Severino e Sueli pelo auxílio técnico necessário para o desenvolvimento do projeto e por toda disponibilidade.

À querida Maria Valeria Morales Dalanezi, do Serviço de Patologia Veterinária/FMVZ/UNESP/Botucatu, pela prontidão em ajudar e pela paciência dedicada. É bom saber que temos amigos!!!

À Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, pela amizade sincera, convívio e apoio nas horas mais difíceis e decisivas do meu trabalho. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao Carlos Eduardo, pela ajuda nos relatórios. Sempre obrigado.

À Maria Cláudia, pelo auxílio nas análises histopatológicas e imunoistoquímicas. Mais uma vez obrigada!

Ao Rafael Torres, pelo auxílio nas reações imunoistoquímicas e por toda disponibilidade. Serei sempre grata.

A todos os pós-graduandos e residentes do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, pelo acolhimento.

Ao Maury Raul, Claudinei Domingues e Soninha pelo carinho e auxílio técnico direto e indireto.

À FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, pela oportunidade; ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, ao Serviço de Patologia Veterinária pela acolhida.

*As minhas queridas e eternas amigas de Botucatu, **Lidianne Narducci Monteiro, Larissa de Castro Demoner e Carolina Quarterone**, com quem eu vivi os quatro anos que residi em Botucatu. Nossas histórias e confissões, hoje se tornaram lembranças, mas estarão sempre dentro do meu coração. Pra sempre minha segunda família.*

*As minhas irmãs **Carla Rosalen Fernandes e Fernanda Rosalen Fernandes**; meu sobrinho **Enzo**, e minha querida e amada **Vô Anna** por todo amor, carinho, incentivo e preocupação, mesmo distante. Meu amor por vocês é incondicional.*

*Ao meu namorado **João Paulo Pereira de Santana**, por todo amor, carinho e compreensão, pelo auxílio e pelos finais de semana na faculdade, sua presença foi muito importante pra que eu chegasse ao fim.*

*Por fim, mas com certeza o mais importante, à **Deus** por guiar todos os meus passos nessa minha caminhada e todos os dias da minha vida.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos segundo JACOBS et al. (2002).....	7
Tabela 2: Estadiamento Clínico dos Linfomas Caninos proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY et al., 1984).....	8
Tabela 3: Diluições para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79a, anti-PAX5, anti-Ki-67 (MIB-1), anti-Caspase-3 e anti-p53.....	28
Tabela 4: Distribuição racial dos 46 cães com linfoma.	32
Tabela 5: Distribuição por sexo dos 46 cães com linfoma.	33
Tabela 6: Idade, número de casos e percentual dos 46 cães com linfoma.....	34
Tabela 7: Estadiamento clínico dos cães com linfoma conforme os padrões propostos pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY et al., 1984).....	35
Tabela 8: Classificação anatômica dos 46 animais com linfoma canino.....	35
Tabela 9: Imunofenotipagem dos 46 animais com linfoma canino.....	36
Tabela 10: Comparação entre os marcadores de linfoma B, anti-CD79a e anti-PAX5 nos 18 casos de linfoma B.	36
Tabela 11: Número de casos, média e desvio padrão do marcador de proliferação anti-ki-67 (MIB 1) de acordo com o grau de malignidade nas classificação de Kiel e WHO.	37
Tabela 12: Número de casos, média e desvio padrão do marcador de proliferação anti-ki-67 (MIB 1) de acordo com o grau de malignidade nas classificação de Kiel e WHO.	37
Tabela 13: Número de casos e mediana do marcador de apoptose anti-caspase-3 de acordo com o grau de malignidade na classificação de Kiel e WHO.	38
Tabela 14: Número de casos e mediana do marcador de apoptose anti-caspase-3 de acordo com o imunofenótipo na classificação de Kiel e WHO...	38
Tabela 15: Grau de malignidade dos 46 casos de linfomas caninos.	40
Tabela 16: Linfomas caninos T e B de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).	40

Tabela 17: Linfomas caninos T e B de acordo com a classificação de WHO (VALLI et al., 2002).	41
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição por raça dos 46 cães com linfoma.....	33
Figura 2: Distribuição dos cães com linfoma em relação ao sexo.....	34
Figura 3: Idade dos cães com linfoma canino.	34
Figura 4: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B <i>Classificação de Kiel – Linfoma Centrolástico. HE BAR 50µm.</i>	43
Figura 5: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B <i>Classificação de Kiel – Linfoma Immunoblástico. HE BAR 50µm.</i>	44
Figura 6: LINFOMA LINFOBLÁSTICO B <i>Classificação de Kiel – Linfoma Linfoblástico. HE BAR 50µm.</i>	44
Figura 7: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS – <i>Classificação de Kiel – Linfoma T Pleomórfico de Células Médias e Grandes. HE BAR 50µm.</i>	45
Figura 8: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS – <i>Classificação de Kiel – Linfoma Immunoblástico T. HE BAR 50µm.</i>	45
Figura 9: LINFOMA LINFOBLÁSTICO T – <i>Classificação de Kiel – Linfoma Linfoblástico T. HE BAR 50µm.</i>	46
Figura 10: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS- Positividade para o anticorpo anti-CD3, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris <i>BAR 50µm.</i>	46
Figura 11: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o anticorpo anti-CD79a, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris <i>BAR 50µm.</i>	47
Figura 12: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o anticorpo anti-PAX5, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris <i>BAR 50µm.</i>	47
Figura 13: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o anticorpo anti-ki-67 (MIB 1), Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris <i>BAR 50µm.</i>	48
Figura 14: LINFOMA LINFOCÍTICO- Positividade para o anticorpo anti-ki-67 (MIB 1), Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris <i>BAR 50µm.</i>	48

Figura 15: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS- Positividade para o anticorpo anti-caspase3, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR 50µm* 49

Figura 16: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS- Positividade para o anticorpo anti-p53 (DO7), Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR 50µm*. 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Neoplasias linfoides de acordo com a Classificação da Organização Mundial de Saúde conforme VALLI et al., (2011).....	19
Quadro 2: Classificação de Kiel atualizada, nos tipos mais frequentes de linfoma conforme PONCE et al., (2010).....	20

Sumário

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Linfoma canino.....	5
2.2 Imunofenotipagem dos linfomas (CD79a, CD3, PAX5).....	8
2.3 Relevância da determinação da proliferação celular, da apoptose e da expressão de p53.....	10
2.4 Microarranjo em tecido (TMA- Tissue microarray technique).....	13
2.5 Classificações histológicas dos linfomas caninos	15
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Regulamentação do estudo	25
4.2 Procedência do material	25
4.3 Estadiamento clínico e classificação anatômica dos Linfomas	25
4. 4 Exame histopatológico	26
4.5 Aplicação das classificações dos Linfomas Não-Hodgkin Humanos nos linfomas caninos	26
4.6 Utilização da imunoistoquímica.....	26
4.6.1 Imunofenotipagem dos linfomas	26
4.6.2 Avaliação imunoistoquímica dos índices de proliferação celular, de apoptose e a expressão do p-53.....	27
4.7 Microarranjo de tecido (TMA).....	29
4.8 Análise microscópica	30
4.9 Análise estatística	30

5. RESULTADOS	31
5.1 Imunofenotipagem	36
5.2 Índice de proliferação celular pelo método Ki-67 (MIB-1)	37
5.3 Índice de apoptose pelo método da Caspase-3.....	38
5.4 Expressão de p53	39
5.5 Microarranjo de tecido (TMA).....	39
5.6 Aplicação das classificações de Kiel e WHO nos linfomas caninos.....	40
6. DISCUSSÃO	50
6.1 Dados clínicos dos animais.....	51
6.2 Imunofenotipagem	53
6.3 Índice de proliferação celular pelo método Ki-67 (MIB-1)	55
6.4 Índice de apoptose pelo método da Caspase-3.....	56
6.5 Expressão de p53	57
6.6 Microarranjo de tecido (TMA).....	58
6.7 Aplicação das classificações de Kiel e WHO nos linfomas caninos.....	59
7. CONCLUSÕES	61
8. REFERÊNCIAS	63

Resumo

FERNANDES, T.R **Classificação morfológica e imunoistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de linfomas não-Hodgkin em cães conforme os critérios da histological classification of hematopoietic tumours of domestic animals (WHO)**. Botucatu, 2014. 89p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os linfomas estão entre as neoplasias mais frequentes na espécie canina e apresentam diversas características em comum com o linfoma do homem, e por isso, as classificações utilizadas se baseiam naquelas propostas para os linfomas humanos. O aumento no número de casos de linfoma nos seres humanos durante as últimas décadas torna o estudo comparativo entre as duas espécies de extrema importância, já que ambas compartilham o mesmo ambiente, estando sujeitas às mesmas influências ambientais, o que torna o cão um sentinela biológico muito útil. Objetiva-se neste trabalho aplicar os critérios da World Health Organization (WHO) aos linfomas caninos comparando-os aos da classificação de Kiel atualizada, utilizando a avaliação imunoistoquímica para expressão de marcadores biológicos do câncer (Ki-67, Caspase-3 e p53) pelo método de Tissue microarray (TMA), comparando-o ao método convencional, além de avaliar a eficiência do PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) como marcador de linfomas B em comparação ao CD79a. No presente trabalho, concluímos que os critérios estabelecidos pela Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (WHO) permitem a correlação com os tipos de linfoma descritos pela classificação de Kiel. O método de TMA permite a avaliação de marcadores de proliferação e apoptose nos linfomas caninos independentemente do diâmetro dos *cores*. Para os linfomas B caninos o anticorpo anti-PAX-5 mostrou-se mais eficiente como marcador do que o anticorpo anti-CD79a, devendo ser associado ao painel de imunofenotipagem.

Palavras-chave: classificação morfológica, cão, linfoma, TMA.

Abstract

FERNANDES, T.R **Morphologic and immunohistochemical classification in tissue microarray (TMA) of non-Hodgkin lymphoma in dogs according to the criteria of histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals (WHO)**. Botucatu, 2014. 89p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Lymphomas are among the most common neoplasms in dogs and have several features in common with lymphoma of human, and therefore, the classifications used are based on those proposed for human lymphomas. The increase in the number of cases of lymphoma in humans during the last decades makes the comparison between the two kinds of extreme importance, since both share the same environment and are subject to the same environmental influences, which makes the dog a biological sentinel very useful. Objective of this work is to apply the criteria of the World Health Organization (WHO) for canine lymphoma comparing them to the updated Kiel classification, using the immunohistochemical evaluation for biological markers of cancer (Ki-67, p53 and Caspase-3) by the method of Tissue microarray (TMA), compared to the conventional method, and to evaluate the efficiency of PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) as a marker of B-cell lymphomas compared to CD79a. In the present study, we conclude that the criteria established by Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (WHO) allow correlation with the types of lymphoma described by the Kiel classification. The method allows the evaluation of MRI markers of proliferation and apoptosis in canine lymphoma regardless of the diameter of colors. For B-cell lymphomas canine anti-Pax-5 antibody was more efficient than the marker anti-CD79a antibody should be associated with immunophenotyping panel.

Key-words: morphological classification, dog, lymphoma, TMA.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios linfohematopoiéticos são comuns nos cães, e o linfoma não-Hodgkin canino (cNHL) apresenta a maior incidência, perfazendo um total de 83% de todas as neoplasias hematopoiéticas (VAIL e WITHROW, 2007).

No homem, diversas classificações foram desenvolvidas ao longo dos anos para este tipo de neoplasia e a razão disto sempre esteve no surgimento de novos conhecimentos relativos aos mecanismos de regulação celulares e ao reconhecimento de novas categorias de tumores (VALLI, 2007).

A classificação mais recente dos linfomas humanos é baseada na classificação da World Health Organization (WHO) proposta por International Agency for Research on Cancer (JAFFE et al., 2008) e leva em consideração uma ampla gama de características histopatológicas, citológicas, imunofenóticas, genóticas e clínicas.

Em termos de medicina veterinária, a proposta de classificação mais recente é a Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (WHO) que define as características anatômicas, arquiteturais e citológicas das neoplasias hematopoiéticas, inclusive dos linfomas, e que se baseia na classificação citada acima (VALLI et al., 2002). Deve-se ressaltar, no entanto, que grupos de pesquisa importantes ainda consideram a classificação de Kiel atualizada um sistema muito útil para a classificação dos linfomas caninos (PONCE et al., 2010).

Recentemente foi observado que o Pax5 (proteína ativadora específica de células B- BSAP), foi detectada por método imunoistoquímico nos linfomas caninos. Sendo assim podendo se tornar em marcador adicional para os linfomas B do cão (WILLMANN et al., 2009).

Paralelamente à utilização dos sistemas de classificação, a avaliação dos linfomas caninos, semelhantemente ao que ocorre no homem, inclui a detecção da expressão de marcadores biológicos e sua correlação com o comportamento da neoplasia (SUZANO, 2007). Portanto, nos linfomas há a necessidade de se avaliar, além da morfologia celular e do imunofenótipo, o índice de proliferação celular e a taxa de apoptose das células neoplásicas (KIUPEL et al., 1999).

Conforme o exposto, a avaliação imunoistoquímica é imprescindível na determinação do comportamento biológico dos linfomas.

Um grande impulso na avaliação imunoistoquímica de amostras tumorais foi obtido com o desenvolvimento da TMA (tissue microarray technique), que permite a avaliação simultânea de um grande número de amostras processadas sob as mesmas condições, proporcionando economia de reagentes, de tempo e das próprias amostras (KELLER et al., 2007).

Desta forma, mostra-se necessário que se aprofundem os estudos sobre a aplicabilidade das classificações propostas para os linfomas caninos e sobre os métodos de avaliação dos marcadores biológicos destas neoplasias.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfoma canino

O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum nos cães (DOBSON et al., 2001). Os linfomas são neoplasias caracterizadas pela proliferação clonal de linfócitos malignos, e originam-se principalmente de órgãos linfoides, como medula óssea, timo, baço, fígado e linfonodos (VAIL e YOUNG, 2007). Esses tumores formam um grupo heterogêneo de neoplasias que apresentam características morfológicas e imunofenóticas distintas (WILLMANN et al., 2009).

Os linfomas estão entre as neoplasias mais frequentes na espécie canina (VONDEHAAR e MORRISON, 1998). Nos cães, ocorrem de 13 a 33 casos em cada 100.000 cães/ano (SOZMEN et al., 2005). Nos humanos, os linfomas não-Hodgkin (NHLs) também são comuns e sua incidência tem aumentado nas últimas quatro décadas (FRIEDBERG et al., 2008). Segundo o instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o número de casos duplicou nos últimos 25 anos, tendo a estimativa de 9.790 casos novos no ano de 2014 (INCA, 2014).

Nos humanos e nos cães, os NHLs mostram características comuns (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a). O aumento no número de casos de linfoma nos seres humanos durante as últimas décadas torna o estudo comparativo entre as duas espécies de extrema importância, já que ambas compartilham o mesmo ambiente, estando sujeitas às mesmas influências ambientais, o que torna o cão um sentinela biológico muito útil. Deve-se destacar ainda, que o ciclo de vida mais curto destes animais permite que se observem mais precocemente as possíveis modificações no comportamento dos linfomas ao longo dos próximos anos.

Estes tumores ocorrem com frequência em animais entre cinco e 11 anos (JACOBS et al., 2002), com uma média de oito anos de idade (PONCE et al., 2010), sem predileção por sexo (VONDERHAAR e MORRISON, 1998; PONCE et al., 2010). Contudo, levantamentos recentes apontam para uma maior ocorrência em cães machos (VALLI et al., 2013).

Há evidências de predisposição racial, principalmente em animais das raças Boxer, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier, Chow Chow, Pastor alemão, Poodle, São Bernardo, Beagle, Golden Retriever e Bulldog (TESKE, 1994; VONDERHAAR e MORRISON, 1998; FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Valli et al., (2013) observou uma maior ocorrência em cães de porte grande, com uma incidência de 75,6%. Neste estudo as raças mais prevalentes foram o Boxer, mestiços, Labrador Retriever e Golden Retriever. O mesmo estudo observou maior prevalência, entre os cães de pequeno porte, para as raças Shih-Tzu, Beagle e Cocker Spaniel.

Estudos revelam ainda que certas raças de cães tiveram aumento estatisticamente significativo do risco de desenvolver linfoma, em comparação com o risco médio de todos os cães. Isto sugere que os fatores de risco hereditários para a doença foram introduzidos com a derivação de raças específicas. Outras evidências que sustentam a existência de fatores hereditários fortemente incorporados para esta doença em cães pode ser inferido pela agregação familiar observada em Bullmastiff, Rottweiler, e Scottish Terrier (TESKE et al., 1994). É possível, no entanto, que os dados demográficos, incidência e dinâmica da doença canina possam ter mudado do passado para a atualidade (MERLO et al., 2008).

A etiologia deste tipo de neoplasia é desconhecida (TESKE, 1994), embora existam estudos que tentam comprovar, sem muito sucesso, a presença de agentes virais (FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Diferente do que ocorre na espécie canina, em outras espécies como seres humanos, roedores, felinos, bovinos, aves e alguns primatas, a etiologia viral já foi identificada (SEQUEIRA et al., 1999).

Recentemente, foi observado um vírus tipo herpes em cinco casos de linfoma de células B em cão. No entanto, o significado de agentes virais na patogênese do linfoma canino continua indeterminado, devido a etapas não cumpridas na transmissão experimental e ausência de evidência epidemiológica para sugerir a transmissibilidade nos linfomas caninos (HUANG et al., 2012).

Ademais, alguns trabalhos consideram como fatores de risco para o desenvolvimento do linfoma a exposição à fumaça do tabaco ou a emissão de resíduos, bem como a utilização de produtos químicos no ambiente habitado por cães (GAVAZZA et al., 2001).

Anatomicamente, os linfomas caninos são classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário ou extranodal (JACOBS et al., 2002) (Tabela 1). Um estudo de cães com linfoma constatou que em 82,4% dos casos foram observados sinais clínicos de envolvimento de linfonodo, seja linfadenopatia generalizada ou localizada, que caracterizam a forma multicêntrica do linfoma. O linfoma multicêntrico canino é considerado uma neoplasia clinicamente agressiva quando comparada ao linfoma não-Hodgkin humano (VAIL e MACEWEN, 2000).

A doença extranodal foi observada em 17,6% de 608 casos (PONCE et al., 2010). No Brasil, a predominância da forma multicêntrica também é relatada (SEQUEIRA et al., 1999).

Tabela 1: Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos segundo JACOBS et al. (2002).

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

O estadiamento clínico dos linfomas caninos é realizado durante o diagnóstico clínico e auxilia na determinação do prognóstico e tratamento (DOBSON et al., 2001). Este estadiamento segue o protocolo proposto pela World Health Organization (WHO), estabelecido inicialmente para o linfoma nos seres humanos, e posteriormente utilizado para a espécie canina (SEQUEIRA e FRANCO, 1992) (Tabela 2). Estádios mais avançados são observados em casos de linfoma de alto grau, onde os animais apresentam sinais sistêmicos da doença (VALLI et al., 2013).

O linfoma canino sempre se apresenta em estágios avançados da doença (III-V) no momento do diagnóstico, e normalmente apresenta um curso clínico agressivo (MARCONATO et al., 2013).

Tabela 2: Estadiamento Clínico dos Linfomas Caninos proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY et al., 1984).

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

2.2 Imunofenotipagem dos linfomas (CD79a, CD3, PAX5)

A determinação do imunofenótipo dos linfomas em humanos se tornou essencial na classificação, devido à relação com o comportamento biológico e a resposta à terapia (FOURNEL-FLEURY et al., 2002). A imunofenotipagem

identifica um grupo de glicoproteínas de superfície chamadas *clusters of differentiation* (CD). Para a identificação desses antígenos é necessário o uso de anticorpos específicos (TESKE et al., 1994).

Nos linfomas caninos, o emprego dos anticorpos anti-CD3 e anti-CD79a, marcadores de células T e células B, respectivamente, permitem que esta determinação seja feita em material fixado em formol e incluído em parafina (SUZANO et al., 2008). Raramente, o linfoma não expressa o CD3 ou CD79a, quando ocorre, a origem não é determinada e esse linfoma é classificado como sendo formado por células “nulas” (MORRISSON e NEUBERGER, 2001).

Estudos constataram que em geral, os linfomas de células T apresentam prognóstico pior do que seus equivalentes de células B, mas a interpretação da imunofenotipagem deve ser sempre correlacionada ao subtipo morfológico. Assim, um linfoma de células T pleomórfico, o subtipo mais comum entre os linfomas de células T, tem tipicamente, um curso clínico menos favorável ao paciente do que um linfoma de células B polimórfico centroblástico, o subtipo mais comum entre os linfomas de células B. No entanto, ao considerar subtipos menos comuns de células B e de células T, os cães com linfoma de células T claras pequenas geralmente sobrevivem por mais tempo do que aqueles diagnosticados com linfoma linfoblástico B Burkitt-like, considerado muito agressivo (PONCE et al., 2004).

Atualmente, a imunofenotipagem é indispensável para determinar o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin de acordo com as classificações atuais, Kiel (LENNERT e FELLER, 1990), Real (HARRIS et al., 1994) e WHO (JAFJE et al., 2001). De acordo com a literatura veterinária, 60-80% dos linfomas em cães são de células B (TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a), enquanto os linfomas de células T representam de 35 a 40% (MODIANO et al., 2005).

Recentemente, verificou-se que o Pax5, uma proteína ativadora específica de células B (BSAP), foi detectada por método imunoistoquímico em 100% dos linfomas caninos, em estudo comparativo com o marcador CD79a. Neste estudo, a marcação nuclear de Pax5 foi de moderada a forte em 70 a 95% das células linfoides, não sendo observada marcação citoplasmática ou de membrana (WILLMANN et al., 2009).

A Pax5 é um membro da família dos fatores de transcrição. Nas células hematopoiéticas, a expressão do Pax5 é específica das células da linhagem B. Esta expressa em estágios iniciais do desenvolvimento das células B e permanece ativa nos estágios tardios do desenvolvimento das células B, mas esta ausente em nos estágios finais de diferenciação de células plasmocitoides (FOSS et al., 1999; HORCHER et al., 2001).

Estudos em humanos revelam claramente que a expressão de Pax5 é restrita aos linfomas de células B (KRENACS et al., 1998). As células neoplásicas revelam marcação positiva nuclear com intensidade variando de moderada a forte em mais de 70% das células malignas em todos os casos avaliados (HERBECK et al., 2011).

Nos cães, as células dos linfomas B mostraram marcação nuclear consistente, acima do obtido com CD79a, constatando que o Pax5 serve como um marcador adicional de células B para os linfomas não-Hodgkin caninos, que permanecem não classificados por outros métodos imunoistoquímicos (WILLMANN et al., 2009).

2.3 Relevância da determinação da Proliferação Celular, da Apoptose e da Expressão de p53

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

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

Métodos imunoistoquímicos são empregados para detecção de proteínas associadas à proliferação celular, tanto nas neoplasias humanas, como na medicina veterinária (ALVES et al., 1999, KELLER et al., 2007). Um dos marcadores mais utilizados é o antígeno Ki-67 (MIB-1) (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a). O antígeno Ki-67 é uma grande proteína do 345 Kd que está presente em todas as fases do ciclo celular, apresentando um nível

máximo durante a mitose. Devido a sua meia-vida curta, cerca de 1 hora, raramente é detectável nas células no G0 (ZACCHETTI et al., 2003).

Na espécie canina, a quantificação do antígeno Ki-67 pode resultar em um aumento na acurácia das classificações dos linfomas caninos. Uma correlação positiva foi observada entre a proporção de células positivamente marcadas pelo Ki-67 e a morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade (FOURNEL-FLEURY et al., 1997b).

A taxa de células neoplásicas que estão em proliferação nos linfomas não-Hodgkin está relacionada com os diferentes tipos morfológicos e com o grau de malignidade. Geralmente, os tumores de alto grau possuem um índice de proliferação celular maior do que os de grau baixo (COMAZZI et al., 2013, FOURNEL-FLEURY et al., 1997b). Fato este constatado por Suzano et al., (2008), que evidenciou em neoplasias de alto grau de malignidade uma média de células marcadas pelo Ki-67 de 43,19% e nas neoplasias de baixo grau de 14,09%.

Ademais Sokolowska et al. (2012), constataram que a maioria dos linfomas apresentava alta atividade de proliferação (39 de 45). D estes, 27 casos tinham de 50-70% de células positivas para Ki-67; a alta expressão de ki-67 (>70% de células positivas para ki-67) foi vista com menos frequência em apenas 12 casos. A expressão moderada (20-50% de células) foi observada em cinco casos e apenas um caso teve menos de 20% de células positivas.

Em humanos, este marcador apresenta uma alta heterogeneidade, o que resulta em dados conflitantes sobre seu valor prognóstico nos linfomas (COMAZZI et al., 2013).

O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais, sendo um deles o número de células perdidas. Assim, além dos marcadores de proliferação celular, outro índice muito importante relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é a apoptose (PHILLIPS et al., 2000).

Um dos métodos de quantificar a frequência de células tumorais que estão em apoptose é avaliar a expressão de algumas enzimas relacionadas diretamente com o evento da apoptose, as chamadas caspases (SUZANO, 2007). As caspases estão presentes no citoplasma da maioria das células, nas formas inativas como uma cadeia única de polipeptídeos e são ativadas

quando esta cadeia é quebrada, o que leva a apoptose (ROBERT e FRIEDLANDER, 2003).

A caspase-3 está relacionada com a apoptose em muitos distúrbios hematopoiéticos na espécie humana, inclusive nas leucemias e nos linfomas. Alguns estudos sugerem que, tanto o nível da sua expressão como a sua forma de marcação intracitoplasmática tem relação com a progressão tumoral.

Um estudo relatou que os linfomas de alto grau de malignidade apresentam uma expressão maior de caspase-3 que as neoplasias de baixo grau (DUKERS et al., 2002). Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento. (DONOGHUE et al., 1999). São raros os estudos da expressão da caspase-3 nas neoplasias caninas. Suzano (2007), concluiu que o índice apoptótico pode ser avaliado pela expressão da caspase-3, e que o mesmo mostra grande variação, não havendo diferenças entre os graus e imunofenótipos das neoplasias.

Outro marcador imunoistoquímico relacionado com a apoptose é a marcação da proteína p53 mutante nas células neoplásicas (ALVES et al., 1999).

A proteína p53 selvagem está localizada no núcleo da célula e se liga a sequências específicas de DNA. Após o dano no DNA e outras lesões celulares, a p53 desempenha um papel importante na reparação do DNA e a transcrição celular. As células que têm mutação no p53 são resistentes a antineoplásicos padrões que induzem danos no DNA, como a quimioterapia e radioterapia (LOWE et al., 1993).

As mutações neste gene são as lesões gênicas mais frequentes nas neoplasias da espécie humana e canina (SOKOLOWSKA et al., 2005). As mutações do gene p53 estão associadas com diversas neoplasias linfoides e não linfoides, como osteossarcoma e vários carcinomas (GAMBLIN et al., 1997).

A expressão da proteína p53 mutante pode ser um importante fator prognóstico, como moduladora da resposta neoplásica à quimioterapia ou à radioterapia nos casos de linfoma não-Hodgkin em humanos (SOKOLOWSKA et al., 2005).

Em humanos, há relatos de que a expressão da proteína p53 alterada é superior a 30% nos linfomas de alto grau de malignidade de origem B (INAMURA et al., 1994). Na medicina veterinária, Sueiro et al., (2004), afirmaram que 60% dos casos de linfomas estudados em cães foram positivos para a expressão do p53, contudo, não foi observada correlação deste achado com os imunofenótipos e os graus de malignidade das neoplasias. Já Suzano (2007), constatou que a expressão do p53 nos linfomas caninos não é rara, não havendo diferenças entre os graus e imunofenótipos das neoplasias. Contudo, Sokolowska et al., (2005), relataram diferenças significativas na expressão do p53 em linfomas de células B e de células T.

Ademais, Dhaliwal et al., (2013), não mostraram qualquer associação entre o grau histológico e a expressão do p53. Um estudo recente realizou uma análise quantitativa em cães com linfoma, no qual os animais foram divididos em dois grupos, o primeiro sensível a quimioterapia e o segundo resistente a quimioterapia. Neste estudo, foram comparados os níveis de expressão e a frequência da mutação do gene p53, porém não houve diferença significativa na frequência da mutação do gene p53 entre os grupos (TOMIYASU et al., 2010).

Assim, na medicina veterinária, o papel desempenhado pelo p53 nas diferentes neoplasias é controverso, sendo escassos os estudos que apresentam este tipo de abordagem e ainda menos definido nos linfomas caninos.

2.4 Microarranjo em tecido (TMA- Tissue microarray technique)

Ao longo da última década, a técnica de microarranjo em tecido (TMA) tem se tornado um método utilizado para avaliar a associação entre os biomarcadores e os achados clinicopatológicos dos tumores, recuperação do paciente e resposta ao tratamento (ECKEL-PASSOW et al., 2010).

O TMA consiste em um arranjo de amostras para estudo morfológico e imunoistoquímico que foi introduzida por Kononen et al. (1998), sendo, a seguir, aprimorada e difundida por Bubendorf (2001). Esta técnica facilita a avaliação de um grande número de amostras de um tumor em condições idênticas, além de economizar reagentes, amostras teciduais e tempo, o que

melhora muito a eficiência e reduz os custos (MILANES-YEARSLEY et al., 2002).

Uma grande desvantagem do TMA é a quantidade limitada do tecido analisado, que pode comprometer a representatividade da amostra. Experimentos de validação, realizados em amostras de tumores humanos tem demonstrado graus variáveis de concordância entre o TMA e o corte inteiro. Esta variação deve-se a fatores como a avaliação de diferentes tipos de tumores e marcadores, a distribuição não uniforme de um determinado marcador em um determinado tipo de tumor (heterogeneidade do tumor), o método de pontuação aplicada, as diferenças na abordagem estatística e o número de biópsias tomadas para cada tumor (ZU et al., 2005).

Embora o TMA seja amplamente utilizado na Medicina Humana, ainda não existe consenso sobre quantas biopsias devem ser utilizadas para determinação de um valor confiável para uma percentagem positiva (GOETHALS et al., 2006). Além disso, pouca atenção é dada ao tamanho da biopsia. A maioria dos estudos utiliza um diâmetro padrão de 0,6 mm, e poucos dados estão disponíveis sobre o uso de *cores* maiores e a concordância entre todo corte e o TMA (KELLER et al., 2007).

Segundo Eckel-Passow et al., (2010), a TMA pode não ser apropriada para avaliar a expressão de alguns biomarcadores e, portanto, se faz necessária a comparação entre a avaliação de todo o corte e o TMA.

Keller et al., (2007) avaliaram a acurácia do TMA nos linfomas caninos em uma abordagem artificial, comparando os *cores* de 0,6 e 1,2 mm para os marcadores Ki-67 e caspase-3. O modelo constatou que o *core* de 1,2 mm proporciona um maior grau de precisão, pois possibilita a leitura de quatro campos, enquanto o *core* de 0,6 mm permite a avaliação de apenas um campo, esta acurácia é resultado de uma maior área amostrada. Em contrapartida, quando um número de campos igual é analisado, o *core* de 0,6 mm é superior ao *core* de 1,2 mm, isto ocorre porque os campos dos *cores* de 0,6 mm estão espalhados por uma área maior do espécime do que os *cores* de 1,2 mm.

Sendo assim, o autor concluiu que na maioria das situações onde será necessária a contagem de células é mais conveniente a utilização de *cores* de 0,6 mm do que *cores* de 1,2 mm (KELLER et al., 2007).

Nesse estudo, uma similaridade inesperada e surpreendente foi observada entre as previsões calculadas para os dois antígenos examinados, especialmente considerando sua escala e distribuição dos valores percentuais positivos desiguais. Esta semelhança pode ser apenas uma coincidência, mas sugere que o grau de precisão só é parcialmente dependente do marcador analisados (KELLER et al., 2007).

Os autores concluíram ainda que a escolha de quatro áreas de 0,6 mm e duas de 1,2 mm representam de forma adequada às secções inteiras sem aumentar o tempo e o esforço (KELLER et al., 2007).

2.5 Classificações histológicas dos linfomas caninos

Os linfomas não-Hodgkin no homem apresentam inúmeras características em comum com os linfomas dos cães, particularmente em relação à epidemiologia, etiologia, clínica, morfologia e imunofenótipo. Graças a essas semelhanças, os esquemas para classificações morfológicas propostas para o homem são utilizados com sucesso por diversos autores para diagnosticar os linfomas da espécie canina (TESKE, 1994). Portanto, na abordagem do linfoma canino e da evolução destes sistemas ou tipos de classificação empregados, torna-se necessário traçar um paralelo com o desenvolvimento das classificações dos linfomas humanos.

Desde a proposta inicial de um sistema de classificação morfológica e clínica para os linfomas humanos, descrita por Gall e Mallory (1942), até a mais recente proposta pela WHO (JAFFE et al., 2001), a evolução dos sistemas de classificação tem acompanhado e incorporado os avanços científicos obtidos em diversas áreas do conhecimento.

Na América do Norte, após os esforços iniciais na década de 40, foi introduzida a classificação de Rappaport que incorporava o conceito da arquitetura folicular ou nodular e sua relação com o prognóstico favorável (RAPPAPORT et al., 1956). A classificação de Rappaport, nome pelo qual ficou conhecida, obteve uma grande aceitação na América, onde 40% dos linfomas adultos eram foliculares e, portanto adquiria importância clínica. Apesar disso, muitos consideram hoje que esta classificação tenha sido um passo atrás em termos de evolução na compreensão e classificação destes tumores. O

sistema de classificação de Rappaport foi incorporado no capítulo referente a neoplasias linfoides que consta da primeira Classificação dos Tumores dos Animais Domésticos da Organização Mundial da Saúde. Vários autores utilizaram esta classificação em linfomas caninos (HOMBERG et al., 1976; WELLER et al., 1980; APPELBAUM et al., 1984; GREENLEE et al., 1990), inclusive no Brasil (SEQUEIRA e FRANCO, 1992).

Embora ocorra certa discrepância quanto à frequência de cada um dos tipos, nas diversas casuísticas predominaram os tipos difusos de células grandes (histiocítico e indiferenciado), sendo o arranjo folicular pouco comum, assim não se pode inferir se este realmente possui valor prognóstico para os cães.

Com o aumento do conhecimento dos aspectos imunológicos dos linfomas, e um melhor entendimento da maturação e diferenciação das células linfoides, foram desenvolvidos, quase que simultaneamente, os sistemas de classificação de Lukes-Collins na América do Norte (LUKES e COLLINS, 1974) e a classificação de Kiel na Europa (GERARD-MARCHANT et al., 1974). Ambas categorizam as células segundo a sua origem T ou B (DEHNER, 1995).

A classificação de Kiel estabelece que as neoplasias linfoides são as contrapartidas malignas das células benignas em seus vários estágios de diferenciação e recebem suas denominações de acordo com estas características (VALLI, 2007) e, além disso, categoriza as neoplasias em grau alto ou baixo (VAIL e YOUNG, 2007). Portanto, a classificação incorporava o imunofenótipo e propunha que o tipo citológico determinava a progressão clínica. Não era considerado o padrão arquitetural folicular ou difuso.

Os “citos” (exemplo: linfocítico, centrocítico) ou “citóides” (exemplo: plasmocitóide) estavam incluídos nos linfomas de baixo grau; enquanto que os “blastos” (exemplo: centroblasto, imunoblasto, linfoblasto) incluíam-se entre os linfomas de alto grau, mais agressivos. Os linfomas de baixo grau eram constituídos por células de tamanho pequeno ou com predomínio destas em uma população que pode incluir algumas células blásticas. Por outro lado, os linfomas de alto grau são constituídos por células grandes. No entanto, as principais limitações da classificação de Kiel são as dificuldades no diagnóstico citológico dos vários subtipos (LANDGREN et al., 2004).

O período que se seguiu, permitiu o surgimento de inúmeros sistemas de classificações, além das já existentes, o que tornou a comunicação entre patologistas, e também entre os oncologistas, extremamente difícil (DEHNER, 1995). Por isso, foi proposta pela American National Cancer Institute em 1982 a Working Formulation for Clinical Usage (WF), com o intuito de unificar a terminologia e estabelecer uma relação com a biologia do tumor.

A WF classificava as neoplasias em foliculares ou difusas, dividindo-as em três níveis relacionados à sobrevida do paciente, porém, sem considerar a origem B ou T das células (NTI, 1982). Posteriormente, em 1994, foi proposta pelo International Lymphoma Study Group, a Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL). Esta, mais abrangente, leva em conta as características imunológicas, as alterações genéticas e as características clínicas. Seu objetivo era um sistema que não apresentasse diferenças entre os países ou regiões (HARRIS et al., 1994). Esta abordagem foi posteriormente adotada, com pequenas modificações, pela World Health Organization (WHO) e introduzida como WHO Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues em 2001 e 2008 (GOOD e GASCOYNE, 2008).

A classificação REAL-WHO mantém a morfologia como critério básico, porém, estabelece que cada entidade listada é considerada como uma doença específica, sendo, portanto, abordada desta forma (VALLI, 2007).

Nas diferentes classificações propostas para o linfoma não-Hodgkin em humanos, considera-se o padrão de crescimento (folicular ou difuso), a constituição celular (células pequenas ou grandes, clivadas ou não clivadas, diferenciação plasmocitária) e grau de malignidade (baixo, médio ou alto) (FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

As classificações utilizadas no estudo dos linfomas caninos têm seguido os esquemas daquelas propostas para os linfomas humanos (PONCE et al., 2010). A evolução destas últimas tem sido acompanhada pelos hematopatologistas veterinários, que as utilizaram e utilizam considerando seus critérios originais ou adaptando-as aos cães. Assim o emprego das classificações de Rappaport, Kiel, Lukes-Collins, Working Formulation, REAL e WHO são relatados em diversos trabalhos antigos e recentes (GREENLEE et

al., 1990; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; SUEIRO et al., 2004; PONCE et al., 2010; VALLI et al., 2011).

Em 2002, foi publicada a *Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals*, que se baseia na classificação da WHO para os linfomas humanos. Nesta classificação os linfomas dos animais, inclusive de cães, são subdivididos por imunofenótipos e graus, com a intenção de que haja correspondência entre os tipos descritos, o comportamento biológico e a resposta à terapia, assim como é observado nos tumores humanos (VALLI et al., 2002).

A classificação da WHO lista mais de 30 subtipos, e muitos deles se assemelham aos subtipos humanos. No entanto, embora histotipos específicos foram descritos, o reconhecimento de entidades patológicas específicas com base em uma combinação de morfologia, imunofenotipagem, genética, molecular, e as características clínicas ainda não está estabelecida em oncologia veterinária (COMAZZI et al., 2013).

Segundo Sueiro et al., (2004), a utilização da *Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals* da WHO, pode facilitar a comunicação entre os patologistas humanos e veterinários, tanto para propósitos de diagnóstico como de pesquisa. Entretanto, o valor prognóstico desta classificação ainda não foi validado por estudos clínicos e não há consenso entre os laboratórios de patologia veterinária quanto à sua adoção (DOBSON et al., 2001).

Um estudo comparativo recente testou a aplicação do sistema *Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals* da WHO para a classificação de linfomas por veterinários experientes, mas não hematopatologistas (Tabela 3). A taxa de consenso entre os patologistas foi de 83%, concluindo-se que, mesmo os não especialistas, podem alcançar um alto grau de acurácia na aplicação desta classificação (VALLI et al., 2011). Todavia, ainda são poucos os estudos que correlacionam as classificações existentes. Desta forma, a classificação proposta pela WHO permanece pouco utilizada, tanto na rotina de diagnóstico quanto em pesquisas sobre o linfoma canino.

Por outro lado, um estudo recente realizado em 608 casos de linfoma em cães, comparou a classificação de Kiel atualizada (Tabela 4) e a classificação da REAL-WHO humana. Foi observado que a maioria das

entidades clínico-morfológicas, inicialmente caracterizadas pela classificação de Kiel, apresentam uma similaridade com as relatadas pelo sistema de classificação da WHO. No entanto, a comparação direta entre as duas classificações parece ainda difícil, devido à necessidade de se ampliar as informações sobre os dados clínicos e a resposta celular ao tratamento. (PONCE et al., 2010).

Desta forma, observa-se que não existe consenso entre os pesquisadores sobre qual o sistema de classificação é mais aplicável aos linfomas caninos, tornando-se necessária ainda a consideração das classificações de Kiel atualizada e do sistema da WHO proposto para os animais domésticos como parâmetros para avaliação dessas neoplasias.

Quadro 1: Neoplasias linfoides de acordo com a Classificação da WHO conforme VALLI et al. (2011).

Células B

Neoplasia de células B precursora

Linfoma/Leucemia linfoblástico B

Neoplasia de células B madura (periférica)

Prolinfocítica/Leucemia linfocítica crônica de células B

Linfoma/Leucemia linfocítica pequena

Linfoma linfoplasmocítico

Linfoma esplênico B de zona marginal

Plasmocitoma/Mieloma

Linfoma B de zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa

Linfoma de zona marginal nodal

Linfoma folicular

Linfoma de células do manto

Linfoma B difuso de grandes células

Linfoma B mediastinal

Linfoma de Burkitt/Leucemia de Burkitt

Linfoma de células B alto grau

Linfoma tipo Burkitt

Linfoma efusivo primário

Células T ou Neoplasia de células Natural killer

Neoplasia de células T precursora

Linfoblástico T precursor

Linfoma/Leucemia

Neoplasia de células natural killer e células T madura (periférica)

Leucemia prolinfocítica de células T

Leucemia linfocítica granular grande

Leucemia de células natural killer agressiva

Linfoma de células T periférico, inespecífico

Linfoma/Leucemia de células T adulta

Linfoma de células T intestinal

Linfoma de células T hepatoesplênico

Linfoma de células T tipo paniculite subcutâneo

Síndrome de Sezary/Micose fungoide

Linfoma de grandes células anaplásico, tipo primário cutâneo T ou nulo

Linfoma de células T periféricas, inespecífico

Linfoma de células T angioimunoblástico

Linfoma de células T anigiocêntrico

Quadro 2: Classificação de Kiel atualizada, nos tipos mais frequentes de linfoma conforme PONCE et al. (2010).

Classificação de Linfoma (Kiel atualizada)

Células B

Baixo grau de malignidade

Linfoma B de células pequenas

Linfoma linfocítico

Linfoma prolinfocítico

Linfoma linfoplasmocítico

Linfoma de zona marginal

Linfoma centroblasto-centrocítico

Alto grau de malignidade

Centroblástico monomórfico

Subtipo folicular

Subtipo difuso

Centroblástico polimórfico

Imunoblástico

Anaplásico/Mediastinal

Tipo Burkitt

Plasmocitoide

Células pequenas não específico

Células T

Linfoma de células T precursor: linfoblástico

Linfoma de células T madura

Baixo grau de malignidade

Prolinfocítico

Pleomórfico de células pequenas

Zona T

Alto grau de malignidade

Pleomórfico misto

Pleomórfico de grandes células

Imunoblástico

Plasmocitoide

Agressivo de célula granular

Não específico

Linfoma cutâneo

Cutâneo de células T, baixo grau

Cutâneo de células T, alto grau

Neoplasia de células nulas

Trabalhos revelaram que o linfoma difuso de células B é subtipo mais comum, seguido pelo linfoma de zona marginal, linfoma de células T periféricas, linfoma de zona T e linfoma de células T linfoblástico (FRANTZ et al., 2012; PONCE et al. 2010; VALLI et al., 2011).

Objetivos

3 OBJETIVOS

- Aplicar os critérios da Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (WHO) aos linfomas caninos e compara-los aos critérios da classificação de Kiel atualizada.

- Testar em ambas as classificações à avaliação da expressão imunoistoquímica de marcadores biológicos do câncer (Ki-67, Caspase-3 e p53) pelo método de tissue microarray (TMA) e pelo método convencional, comparando os resultados.

- Testar a eficiência do PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) como marcador de linfomas B em cães, comparando-o com o marcador CD79a.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Regulamentação do estudo

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética e experimentação animal da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, São Paulo, sob protocolo número 55/2012.

4.2 Procedência do material

Foram selecionados casos de linfoma no Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, provenientes do arquivo de tecidos parafinados dos casos diagnosticados no período de 2004 a 2013. As amostras recebidas durante o desenvolvimento do projeto (2011 a 2013) foram fixadas em solução de formaldeído tamponada a 10%, em temperatura ambiente por 48 horas e rotineiramente processadas e incluídas em parafina segundo protocolo padrão adotado pelo serviço.

Foram levantados dados a partir dos prontuários dos animais como raça, sexo, idade, classificação anatômica e o estadiamento clínico. A classificação anatômica foi determinada segundo JACOBS et al., (2002) (Tabela 11) e o estadiamento clínico de acordo com o modelo proposto pela WHO (Tabela 12) (WHO; TNM Classification of Tumours in Domestic Animals, Geneva, 1980).

Após a seleção dos casos, as lâminas foram selecionadas a partir do arquivo de lâminas do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, e analisadas para a confirmação do diagnóstico de linfoma. Sendo selecionados 46 casos.

4.3 Estadiamento clínico e classificação anatômica dos Linfomas

O estadiamento clínico e a classificação anatômica foram realizados conforme protocolo estabelecido pela *World Health Organization* (WHO; TNM Classification of tumors in domestic animals, Geneva, 1980 e conforme Jacobs et al., 2002).

4. 4 Exame histopatológico

Com o objetivo de classificar as lesões, foram realizados novos cortes histológicos com três micrômetros (μm) de espessura, em micrótomo automático (Leica 2155), colocados em estufa para desparafinizar e, posteriormente, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). Cortes do mesmo material foram submetidos à técnica de imunoistoquímica.

4.5 Aplicação das Classificações dos Linfomas Não-Hodgkin nos Linfomas Caninos

Para cada caso, utilizou-se a classificação histopatológica de acordo com os critérios propostos pela WHO (VALLI et al., 2002) e também segundo a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1992).

4.6 Utilização da Imunoistoquímica

4.6.1 Imunofenotipagem dos Linfomas:

A imunofenotipagem dos linfomas foi realizada a partir da padronização em amostras de tonsila normal e de linfoma caninos. Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e reidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes e, posterior lavagem em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0, em câmara microprocessada de pressão Pascal (DAKO, EUA), durante 30 segundos a 125°C. Em seguida, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água corrente.

Na sequência as lâminas foram incubadas em quatro banhos de peróxido de hidrogênio 3% (10V) durante 5 minutos cada, para o bloqueio da peroxidase endógena, e então lavadas em água corrente por 5 minutos. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas, realizado com o kit Novolink, durante 20 minutos a 37°C.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 13) em câmara úmida, por 18 horas a 4°C, após esse período foram lavadas em solução tampão de TRIS pH 7,4 (D5637 – Sigma Chemical CO), três vezes durante cinco minutos e incubadas com o anticorpo pós-primário do kit Novolink, por 30 minutos, em câmara úmida, a 37°, seguido de lavagem com solução tampão de TRIS (D5637 – Sigma Chemical CO), três vezes durante cinco minutos.

A detecção do sinal foi realizada com o polímero do kit Novolink, durante 30 minutos, em câmara úmida, a 37°, seguido de lavagem com TRIS três vezes por cinco minutos cada.

Para amplificação do sinal, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB) do kit Novolink (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra). Os cortes foram corados com hematoxilina de Harrys e desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- Anti-CD3 (Dako): Anticorpo policlonal humano que reconhece uma molécula (antígeno C3) ligada ao receptor das células T.
- Anti-CD79a (Dako): Anticorpo monoclonal humano que reconhece um polipeptídeo que faz parte do complexo receptor de antígeno dos linfócitos B.
- Anti-PAX5 (BDBiosciences): Anticorpo monoclonal humano que reconhece uma proteína ativadora específica de células B.

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

Foram utilizados como marcadores de proliferação e apoptose os seguintes anticorpos primários:

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

- p53 (DO7): a mutação resulta em maior expressão da proteína no núcleo celular e esse aumento pode ser detectado por meio da imunohistoquímica.

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

Diluição dos anticorpos utilizados:

Cada anticorpo foi diluído em diluente de anticorpo (DAKO, EUA). As diluições estão representadas na tabela 3:

Tabela 3: Diluições para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79a, anti-PAX5, anti-Ki-67 (MIB-1), anti-Caspase-3 e anti-p53.

Anticorpos	Diluição estabelecida
Anti CD-3, policlonal (Dako)	1:500
Anti CD79a, monoclonal (Dako)	1:300
Anti PAX5, monoclonal (BDBiosciences)	1:1000
Anti-Ki-67 (MIB-1), monoclonal (Dako)	1:50
Anti-Caspase-3, policlonal (Cell Signaling)	1:200
Anti-p-53, monoclonal (Novocastra)	1:50

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

As marcações do p53 foram consideradas positivas quando houve marcação em mais do que 10% das células neoplásicas (SUEIRO et al., 2004).

4.7 Microarranjo de tecido (TMA)

A partir dos cortes corados com HE, as áreas de interesse para o estudo imunoistoquímico das amostras foram marcadas nas lâminas e identificadas nos blocos doadores. A TMA foi confeccionada no Serviço de Patologia e Medicina Legal Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). As áreas identificadas nos blocos doadores foram retiradas e transferidas para dois blocos receptores.

Para cada caso foram retirados três cilindros de 1,0mm de diâmetro e 1,5 mm de diâmetro de áreas distintas do tumor. Em cada bloco receptor foram incluídas também amostras de linfonodo normal como controle e uma amostra de tecido placentário normal para orientação do bloco (KELLER et al., 2007).

Para a construção dos TMAs foi utilizado uma estação de trabalho TMA (TMA builder, Histopathology Inc., Hungary). Após a construção, cortes de 3 µm serão obtidos e aderidos as lâminas histológicas carregadas positivamente (Positive charged adhesion slides, Amitel®, Brasil), parafinizadas e armazenadas a -20 °C até sua utilização nas reações imunoistoquímicas. Um corte do início e do final do bloco receptor será corado em HE e revisado para confirmar a presença de áreas morfológicas representativas das lesões originais.

As amostras contidas nas lâminas de TMA foram submetidas à reação imunoistoquímica seguindo o protocolo padronizado no Laboratório de Patologia do Serviço de Patologia da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, utilizando-se os anticorpos anti-ki67, anti-caspase3 e anti-p53.

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

As marcações do p53 foram consideradas positivas quando houve marcação em mais do que 10% das células neoplásicas (SUEIRO, et al., 2004).

4.8 Análise microscópica

Foi utilizado um microscópio de luz modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), dispondo de câmera digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) acoplada ao um microcomputador. As imagens foram processadas pelo programa computacional de análise de imagem Axiovision 4.6.3 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

4.9 Análise estatística

Empregou-se o teste de Lilliefors para o marcador anti-ki67 e anti-caspase3; o teste exato de Fisher para os marcadores anti-CD3, anti-CD79a, anti-PAX5 e anti-p53; o teste de Mann-Whitney para o marcador anti-caspase3; o teste t student para anti-ki67. Para a avaliação do TMA foi utilizado o teste kappa com pesos. Para todos os testes as diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando os valores de P forem inferiores a 0,05.

Resultados

5. RESULTADOS

Durante o levantamento da pesquisa, foram selecionados no total 94 casos diagnosticados como linfoma no período de 2004 a 2013. Entretanto, 25 casos apresentavam material insuficiente para a realização do protocolo proposto, alguns blocos estavam bastante desgastados e/ou não apresentavam profundidade para que fosse realizado o corte inteiro, além da confecção do TMA, sendo assim excluídos da pesquisa. Ainda, três casos foram excluídos, pois ao serem revisados foi concluído que não se tratavam de linfomas e sim de outras alterações neoplásicas. Por fim, dois casos foram excluídos devido à ausência de informações que permitissem a realização do estadiamento. Sendo assim, foram somados 62 casos. Dos 62 casos, 16 foram excluídos por não apresentarem marcação para o anticorpo anti-ki67, impossibilitando a avaliação da proliferação celular. Por fim, totalizando 46 casos de linfoma canino.

5.1 Dados clínicos dos animais

Foram utilizados 46 animais no presente estudo, destes, 12 animais eram sem raça definida (SRD), sete animais eram da raça Boxer, cinco da raça Rottweiler, quatro da raça Pastor Alemão, três da raça Labrador e três da raça Basset. Os outros 11 animais pertenciam a outras raças (Tabela 4 e Figura 1).

Tabela 4: Distribuição racial dos 46 cães com linfoma.

RAÇAS	Nº DE CASOS	%
SRD	12	26
Outros	12	26
Boxer	7	15
Rottweiler	5	11
Pastor Alemão	4	9
Labrador	3	6,5
Basset	3	6,5
TOTAL	46	100

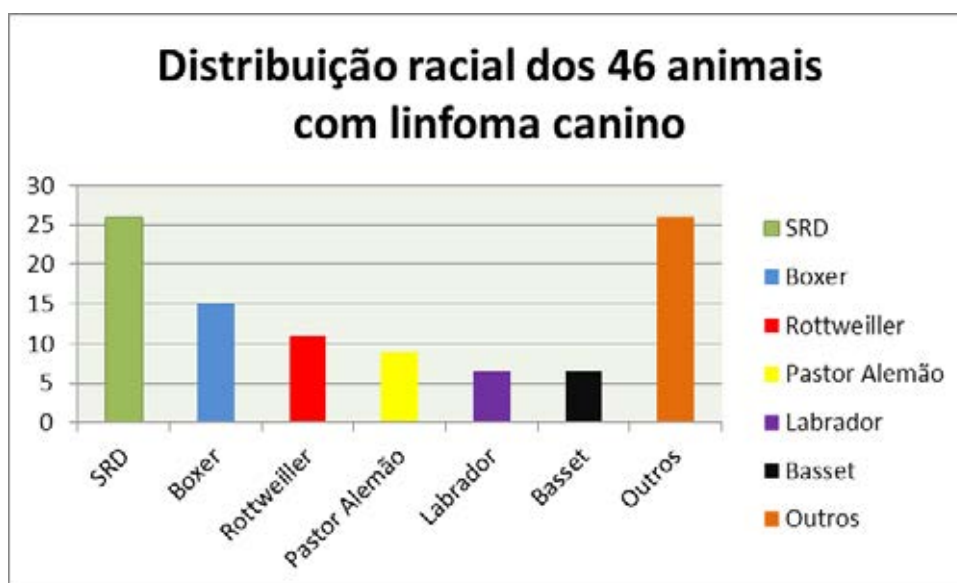


Figura 1: Distribuição por raça dos 46 cães com linfoma.

Quanto ao sexo dos animais, 25 eram machos e 21 eram fêmeas (Tabela 5 e Figura 2). A idade dos animais variou de um a 14 anos, sendo que 48% dos animais tinham idade entre quatro a sete anos, 37% idade acima de oito anos e 15% tinham entre um a três anos (Tabela 6 e Figura 3).

Tabela 5: Distribuição por sexo dos 46 cães com linfoma.

SEXO	NºDE CASOS	%
Machos	25	54
Fêmea	21	46
TOTAL	46	100



Figura 2: Distribuição dos cães com linfoma em relação ao sexo.

Tabela 6: Idade, número de casos e percentual dos 46 cães com linfoma.

IDADE	Nº DE CASOS	%
1 a 3 anos	7	15
4 a 7 anos	22	48
Acima de 8 anos	17	37
TOTAL	46	100

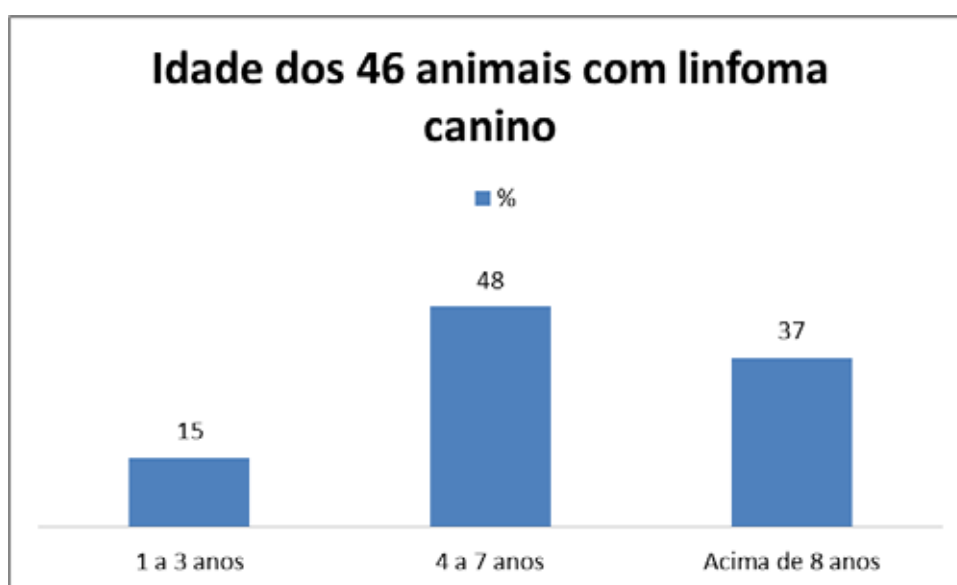


Figura 3: Idade dos cães com linfoma canino.

Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários dos animais e utilizados para estabelecer estadiamento clínico.

O estadiamento e a classificação anatômica foram realizados em todos os animais, sendo que 27 animais estavam no estágio V (59%), 11 no estágio IV (24%) e oito no estágio III (17%) (Tabela 7).

Tabela 7: Estadiamento clínico dos cães com linfoma conforme os padrões propostos pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY et al., 1984).

ESTADIAMENTO CLÍNICO	Nº DE CASOS	%
Estádio III	8	17
Estádio IV	11	24
Estádio V	27	59
TOTAL	46	100

Com relação à classificação anatômica, 38 animais (83%) apresentaram a forma multicêntrica com comprometimento de vários órgãos, incluindo linfadenopatia localizada ou generalizada, hepatomegalia e esplenomegalia. O acometimento do mediastino foi observado em três animais (6,5%), apresentando a forma tímica, com comprometimento do timo e linfonodos mediastínicos. Três animais (6,5%) foram classificados na forma solitária com comprometimento de apenas um órgão, como rim e baço. E, por fim, um animal (2%) foi classificado na forma digestiva e na forma cutânea (Tabela 8).

Tabela 8: Classificação anatômica dos 46 animais com linfoma canino.

CLASSIFICAÇÃO ANATÔMICA	Nº DE CASOS	%
Multicêntrico	38	83
Tímica	3	6,5
Solitária	3	6,5
Digestiva	1	2

Cutânea	1	2
TOTAL	46	100

5.2 Imunofenotipagem

Dos 46 casos de linfoma deste estudo, 28 eram linfomas T (Figura 10) e 18 linfomas B (Tabela 9), totalizando 60,9% e 39,1%, respectivamente.

Quanto à marcação dos linfomas B, o anticorpo anti-CD79a apresentou marcação positiva em 16 casos (Figura 11), enquanto que 18 casos apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-Pax5 (Figura 12) (Tabela 10).

Tabela 9: Imunofenotipagem dos 46 animais com linfoma canino.

IMUNOFENÓTIPO	Nº DE CASOS	%
Linfoma T	28	60,9
Linfoma B	18	39,1
TOTAL	46	100

Tabela 10: Comparação entre os marcadores de linfoma B, anti-CD79a e anti-PAX5 nos 18 casos de linfoma B.

ANTICORPO	Nº DE CASOS	%
Anti-CD79a	16	89
Anti-PAX5	18	100

Ao correlacionar o grau de malignidade com o imunofenótipo pelo teste exato de Fisher, não houve associação entre o grau e imunofenótipo, resultados estatisticamente não significativos ($p=0,72$).

Quando analisamos o grau de malignidade, alto e baixo grau em correlação com os marcadores anti-CD3, anti-CD79a e anti-PAX5, pelo teste exato de Fisher, não houve associação entre o grau de malignidade e a expressão dos marcadores, resultados estatisticamente não significativos ($p=0,72$; $0,70$; $0,72$) respectivamente.

5.3 Índice de proliferação celular pelo método Ki-67 (MIB-1)

De acordo com a classificação de Kiel e a classificação de WHO, nas neoplasias de alto grau de malignidade, a média de células em proliferação marcadas pelo ki-67 foi de $51,35 \pm 22,32$ (Figura 13), e nos casos de baixo grau de malignidade a média foi de $13,95 \pm 10,19$ (Figura 8), resultado estatisticamente significativo ($p < 0,01$), pelo teste t student (Tabela 11).

Tabela 11: Número de casos, média e desvio padrão do marcador de proliferação anti-ki-67 (MIB 1) de acordo com o grau de malignidade nas classificação de Kiel e WHO.

ki-67	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
ALTO GRAU	37	51,35a	22,32
BAIXO GRAU	9	13,95b	10,19

Médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente, ao nível de 1%, pelo teste t student.

Ao comparar o imunofenótipo, a média de células em proliferação marcadas pelo Ki-67 foi de $41,66 \pm 30,00$ para os linfomas B e de $45,55 \pm 22,29$ para os linfomas T (Figura 14, Tabela 12). Os imunofenótipos não diferem quanto à expressão de ki-67 ($p = 0,62$).

Tabela 12: Número de casos, média e desvio padrão do marcador de proliferação anti-ki-67 (MIB 1) de acordo com o imunofenótipo nas classificação de Kiel e WHO.

ki-67	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
B	18	41,66	30,00
T	28	45,55	22,29

O percentual de células positivas para o Ki-67 entre os linfomas de alto grau foi de 20,4 a 94,1%, sendo o maior um caso de linfoma linfoblástico. Entre

os linfomas de baixo grau o percentual variou de 2,08 a 37,2%, sendo o menor um caso de linfoma linfoplasmocítico.

5.4 Índice de apoptose pelo método da Caspase-3

Ao analisarmos o índice de células em apoptose pelo método da caspase-3 (Figura 15) nas classificações de Kiel e WHO, observou-se que nas neoplasias de alto grau de malignidade a mediana de células positivas para a Caspase-3 foi de 2,40% e nos casos de baixo grau de malignidade foi de 1,00% (Tabela 13), sendo a expressão da Caspase-3 maior nos linfomas de alto grau de malignidade ($p=0,04$), pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 13: Número de casos e mediana do marcador de apoptose anti-caspase-3 de acordo com o grau de malignidade na classificação de Kiel e WHO.

Caspase3	Nº	MÉDIA
ALTO GRAU	37	2,40
BAIXO GRAU	9	1,00

Teste Mann-Whitney.

Entre os diferentes imunofenótipos, a mediana da caspase-3 foi 1,33 para os linfomas B e de 1,46 para os linfomas T (Tabela 14). Os imunofenótipos não diferiram quanto à expressão da Caspase-3, resultado estatisticamente não significativo ($p=0,60$), pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 14: Número de casos e mediana do marcador de apoptose anti-caspase-3 de acordo com o imunofenótipo na classificação de Kiel e WHO.

Caspase3	Nº	MÉDIA
B	18	1,33
T	28	1,46

Teste Mann-Whitney.

5.5 Expressão de p53

Dos 46 casos de linfoma canino, 12 casos apresentaram a expressão da proteína p-53 mutante (Figura 16), perfazendo um percentual de 26,08%. Destes 12 casos, oito casos eram linfomas T e quatro casos eram de linfomas B, correspondendo a 66% e 34%, respectivamente. Não houve associação entre o imunofenótipo e a expressão do p53, resultados estatisticamente não significativos ($p=0,74$), pelo teste exato de Fisher.

Quanto ao grau de malignidade, 11 casos de linfoma eram de alto grau de malignidade e um caso de baixo grau de malignidade. Não houve associação entre o grau de malignidade e a expressão de p53, resultados estatisticamente não significativos ($p=0,41$).

Foi considerada marcação positiva os casos que apresentaram mais de 10% de células positivas.

5.6 Microarranjo de tecido (TMA)

A avaliação do marcador de proliferação ki-67 e do marcador de apoptose Caspase3 nos *cores* de TMA de 1,0 mm e 1,5 mm apresentou a média semelhante à descrita para o corte inteiro, quando realizado em triplicata. Contudo, exceção foi observada em três casos, um por apresentar apenas necrose no *core* representado, outro por ter se perdido com o desgaste do bloco e o terceiro apresentava infiltração de células neoplásicas nos rins, subestimando a contagem dos marcadores.

A concordância geral dos valores de Ki-67 e Caspase3 foi excelente ($\kappa=0,99$), com resultados estatisticamente significativos ($p<0,01$), tanto para o *core* de 1,0 mm quanto para o *core* de 1,5 mm. Os mesmos valores foram observados ao se comparar a TMA de 1,0 mm e a TMA de 1,5 mm, com concordância geral excelente ($\kappa=0,99$), com resultados estatisticamente significativos ($p<0,01$).

Ao correlacionar a expressão do p53 no corte inteiro e na TMA de 1,0 mm, observou-se fraca concordância entre o corte inteiro e a TMA de 1,0 mm ($\kappa=0,23$). A TMA apresentou dois casos positivos para p53, identificando apenas 17% dos tumores positivos (sensibilidade). Os mesmos valores foram

observados ao se comparar o corte inteiro e a TMA de 1,5 mm. Sendo assim, houve total concordância entre a TMA de 1,0 mm e de 1,5 mm.

5.7 Aplicação das classificações de Kiel e WHO nos linfomas caninos

Os casos de linfoma foram classificados de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e de acordo com a classificação proposta pela WHO (VALLI et al., 2002).

Foram graduados conforme a malignidade 46 casos de linfoma canino. Dentre os casos analisados observou-se o predomínio de linfomas de alto grau de malignidade, perfazendo um total de 37 casos, seguidos pelos linfomas de baixo grau com nove casos (Tabela 15).

Tabela 15: Grau de malignidade dos 46 casos de linfomas caninos.

GRADUAÇÃO	Nº DE CASOS	%
Alto grau	37	80,4
Baixo grau	9	19,6
TOTAL	46	100

Foram classificados 40 casos de linfoma canino. Os linfomas caninos foram classificados em tipos de acordo com as características celulares (Tabela 16 e 17).

Tabela 16: Linfomas caninos T e B de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990).

KIEL	Nº DE CASOS	%
Linfomas T		
Imunoblástico	15	37,5
T pleomórfico	3	7,5
Linfoblástico	2	5

Linfocítico	1	2,5
Zona T	1	2,5
T cerebriforme	1	2,5
Angiocêntrico	1	2,5
Linfoma B		
Centroblástico	6	15
Imunoblástico	4	10
Linfoblástico	2	5
Linfocítico	1	2,5
Zona marginal	1	2,5
Linfoplasmocítico	1	2,5
Centrocítico	1	2,5
TOTAL	40	100

Tabela 17: Linfomas caninos T e B de acordo com a classificação de WHO (VALLI et al., 2002).

WHO	Nº DE CASOS	%
Linfoma T		
Células T periféricas	19	47,5
Linfoblástico T	2	5
Linfocítico T	1	2,5
Micose fungoide	1	2,5
T extranodal	1	2,5
Linfoma B		
Difuso de grandes células B	10	27,5
Linfocítico	1	2,5
Zona marginal	1	2,5
Linfoplasmocítico	1	2,5
Linfoblástico B	2	5
Células do manto	1	2,5
TOTAL	40	100

De acordo com a classificação de Kiel, 19 casos de linfoma eram de alto grau de malignidade, e foram classificados como imunoblástico, linfoblástico, cerebriforme e angiocêntrico. Cinco casos de linfoma T eram de baixo grau de malignidade e foram classificados como zona T, pleomórfico e linfocítico.

Dos 16 casos de linfoma B, 12 casos são de alto grau de malignidade, classificados como centroblástico (Figura 4), imunoblástico (Figura 5) e linfoblástico (Figura 6). E quatro casos são de baixo grau de malignidade classificados como zona marginal, linfoplasmocítico, centrocítico e linfocítico.

Os casos de linfoma classificados como Linfoma Difuso de Grandes células, na maioria, foram classificados como polimórfico, contendo uma mistura de centroblastos e imunoblastos. Os tumores monomórficos foram menos frequentes, sendo constituídos predominantemente (mais de 90%) por centroblastos. Estas células linfoides possuem tamanho médio ou grande, núcleo redondo ou oval, vesicular, contendo cromatina fina. Entre dois a quatro nucléolos são observados próximos a membrana nuclear (nucléolos periféricos). O citoplasma, geralmente é escasso, variando de anfofílico a basofílico.

Na variante imunoblástica, os imunoblastos constituem mais de 90% das células neoplásicas e apresentam-se como células grandes, em que o núcleo mostra nucléolo único e central, e citoplasma basofílico. Já a variante anaplásica caracteriza-se pela presença de células grandes, ovais ou poligonais que possuem núcleos bizarros e pleomórficos. Na classificação de Kiel entre os linfomas enquadrados nesta categoria estavam os Linfomas Centroblásticos, Imunoblásticos e Anaplásicos.

Os linfomas de células T periféricas são observados espectro citológico entre o monomórfico e o polimórfico. Porém, a maioria dos casos consistia de crescimento constituído por células de tamanho médio ou grande, com núcleo irregular, pleomórfico, variando entre o vesicular e o hipercromático, nucléolo proeminente e muitas figuras de mitose. Na classificação de Kiel entre os linfomas enquadrados nesta categoria estavam os Linfomas T Pleomórficos (Figura 7), T Imunoblásticos (Figura 8) e de Zona T.

Os linfomas linfoblásticos são caracterizados por pequenos blastos com citoplasma escasso, núcleo redondo ou irregular, com cromatina nuclear densa e nucléolo indistinto. Caracterizado por crescimento difuso, com

frequentes figuras de mitose e padrão de “céu estrelado”. Na classificação de Kiel – Linfoblástico T (Figura 9).

Nos linfomas linfocíticos, o crescimento neoplásico mostra uma mistura de pequenos linfócitos e pró-linfócitos, com predomínio dos primeiros. Os linfócitos neoplásicos mostram tamanho pequeno, pouco maior do que o de um linfócito normal, com núcleo redondo e cromatina agregada, citoplasma escasso e basofílico. Os pró-linfócitos apresentam-se como células cujo tamanho varia entre o pequeno e o médio, possuem núcleo com cromatina agregada e nucléolo evidente, citoplasma basofílico e discreto. Na classificação de Kiel – Linfoma de Linfócitos Pequenos.

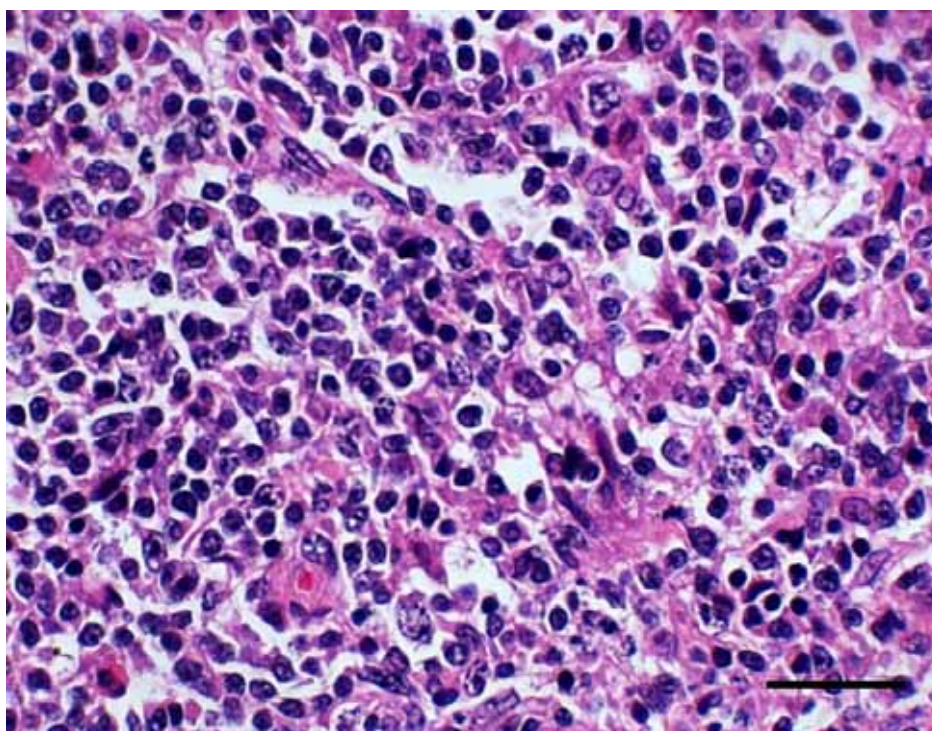


Figura 4: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B *Classificação de Kiel – Linfoma Centroblástico. HE BAR 50µm.*

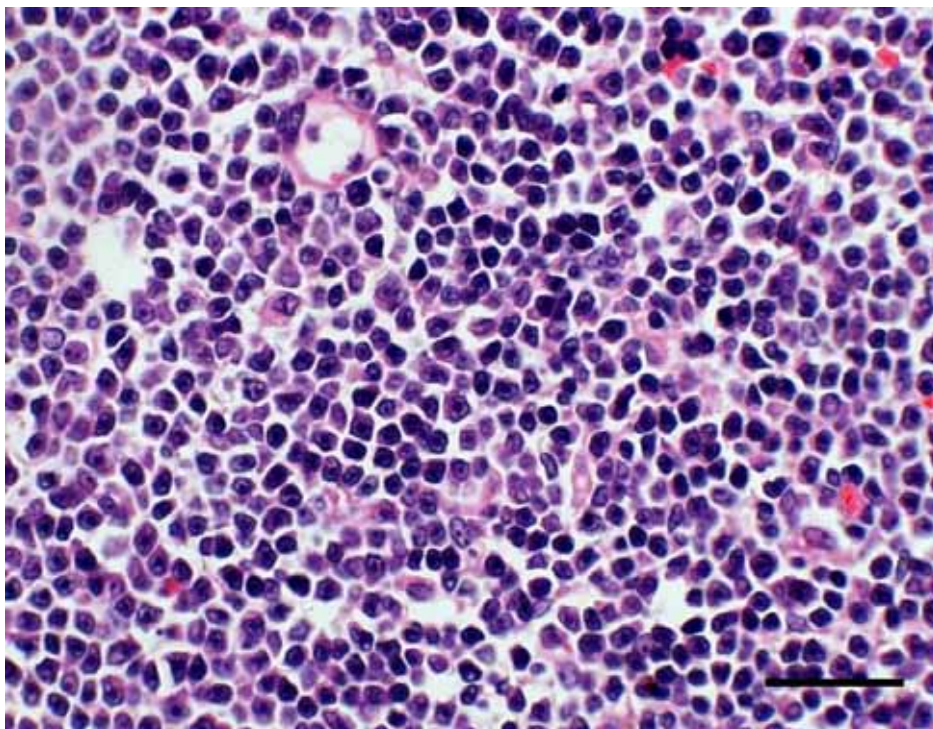


Figura 5: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B *Classificação de Kiel* – *Linfoma Imunoblástico*. HE BAR 50 μ m.

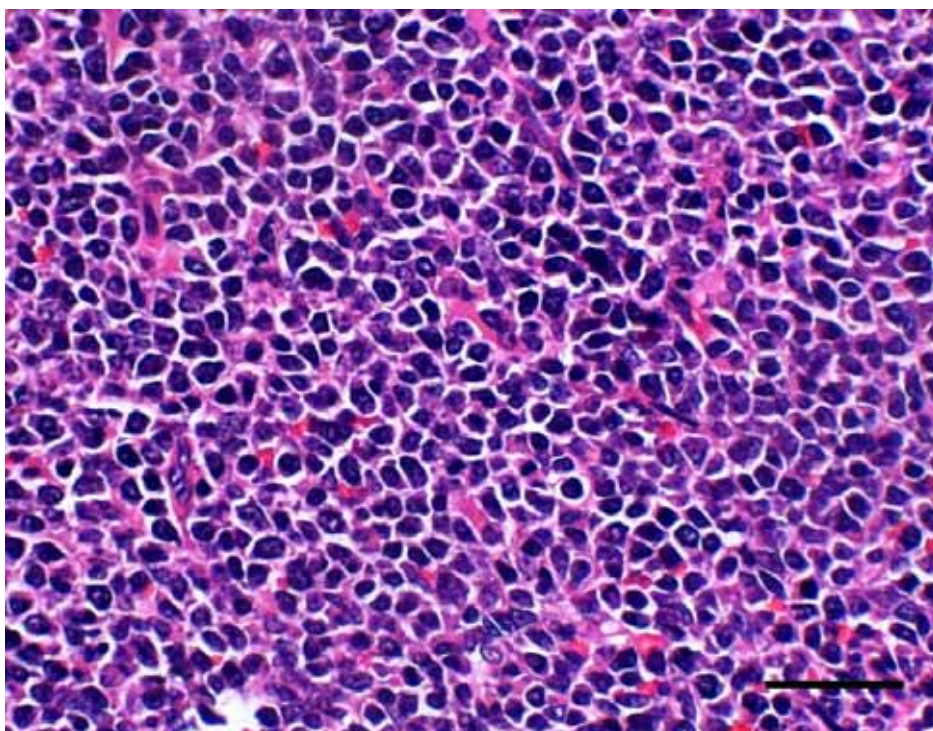


Figura 6: LINFOMA LINFOBLÁSTICO B *Classificação de Kiel* – *Linfoma Linfoblástico*. HE BAR 50 μ m.

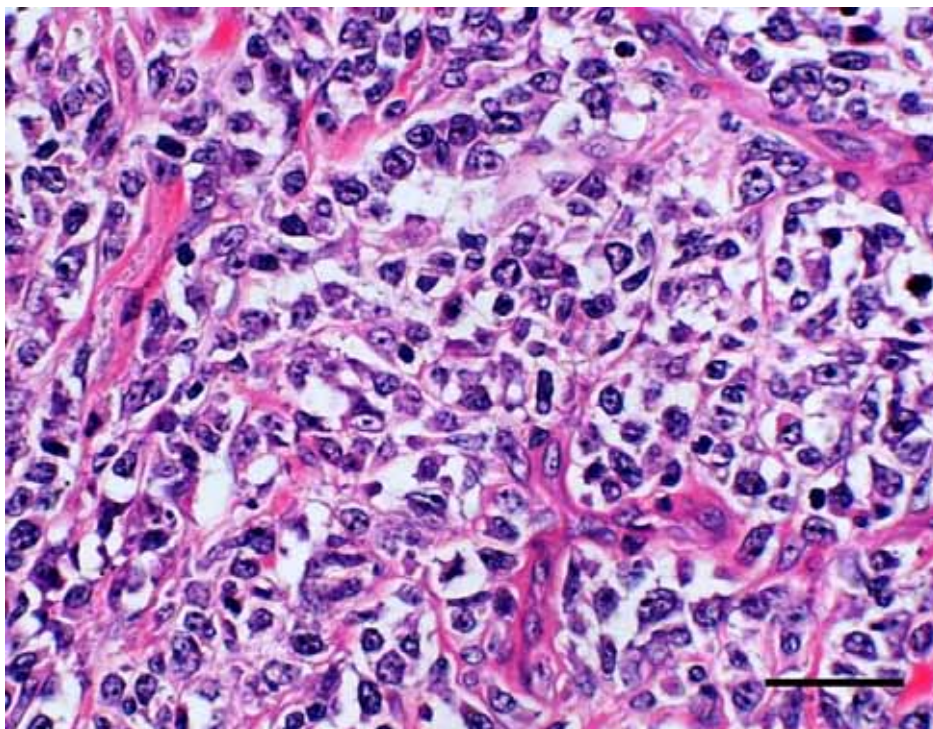


Figura 7: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS –*Classificação de Kiel – Linfoma T Pleomórfico de Células Médias e Grandes. HE BAR 50µm.*

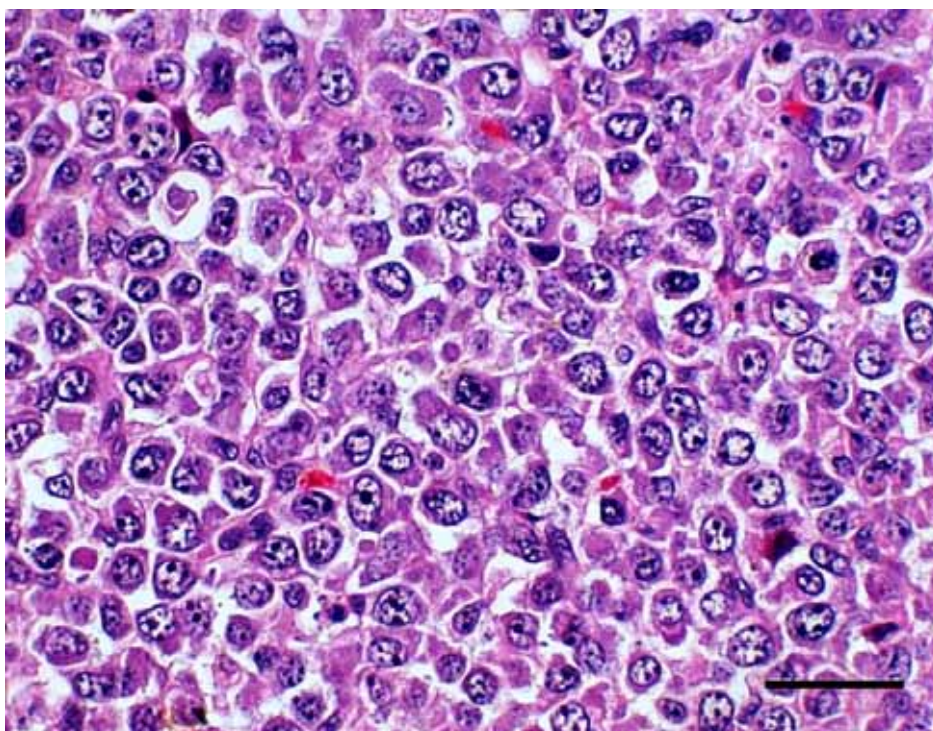


Figura 8: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS – *Classificação de Kiel – Linfoma Imunoblástico T. HE BAR 50µm.*

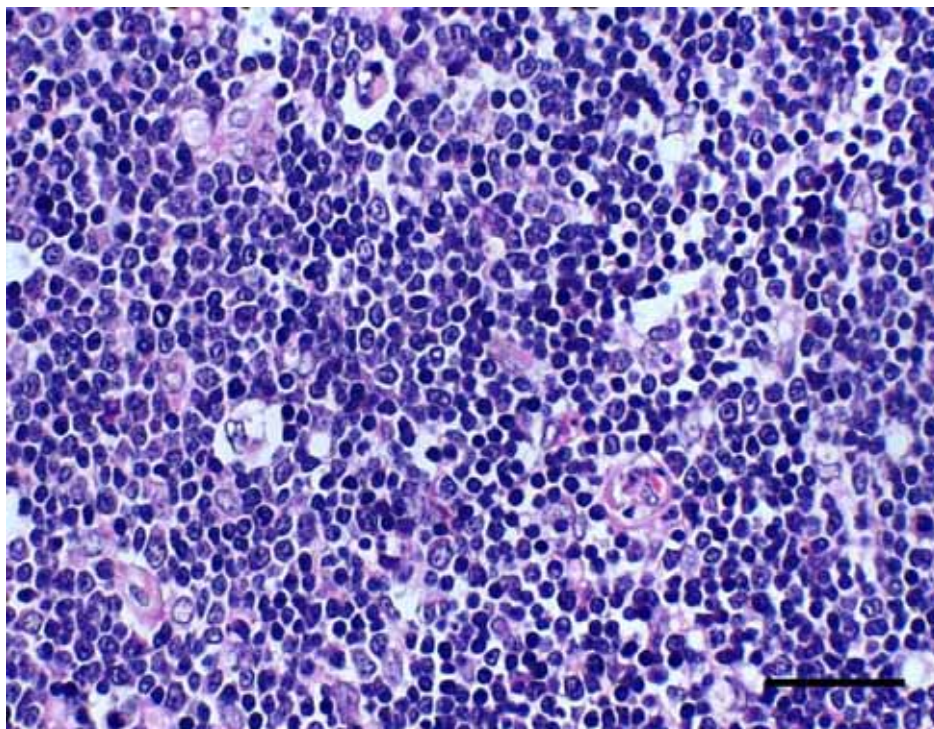


Figura 9: LINFOMA LINFOBLÁSTICO T – *Classificação de Kiel – Linfoma Linfoblástico T. HE BAR 50µm.*

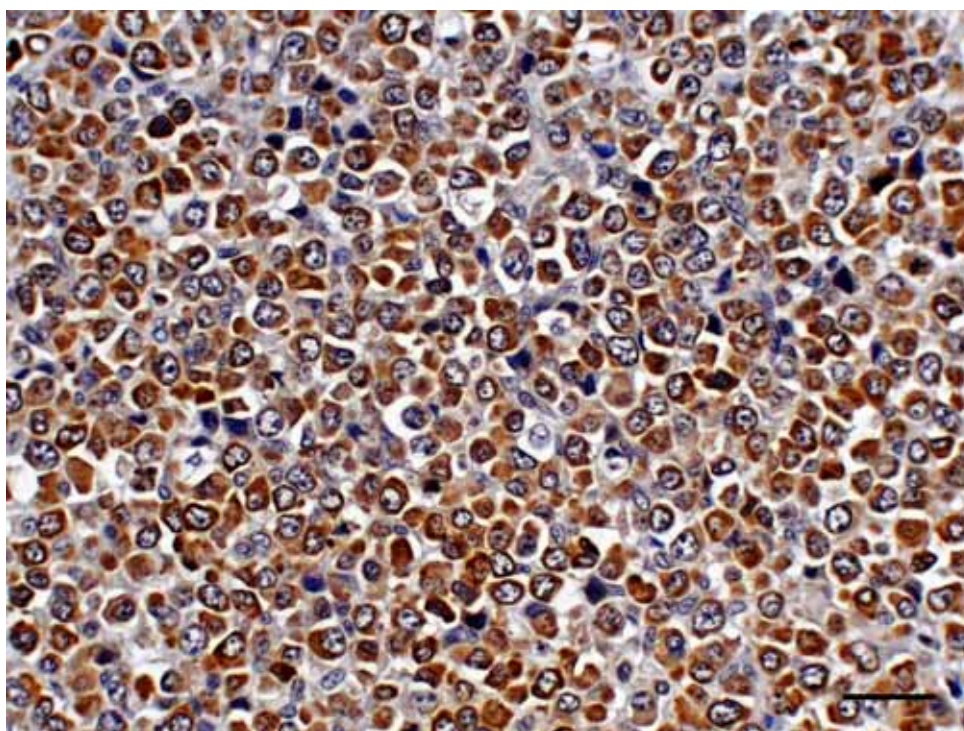


Figura 10: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS- Positividade para o anticorpo anti-CD3, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR 50µm.

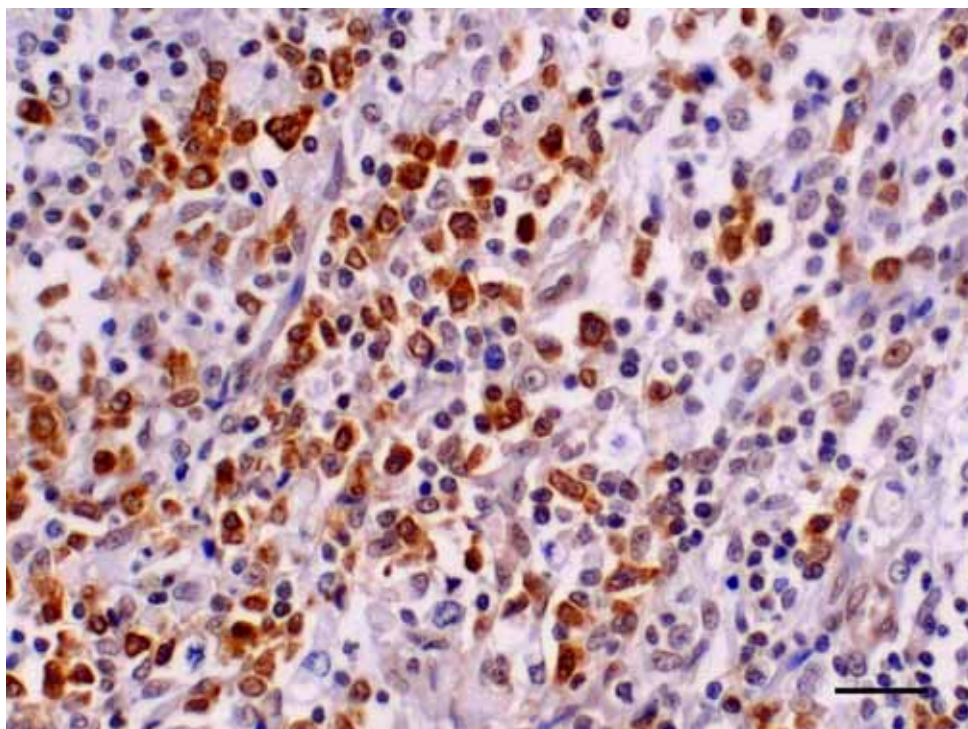


Figura 11: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o anticorpo anti-CD79a, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR 50 μ m.

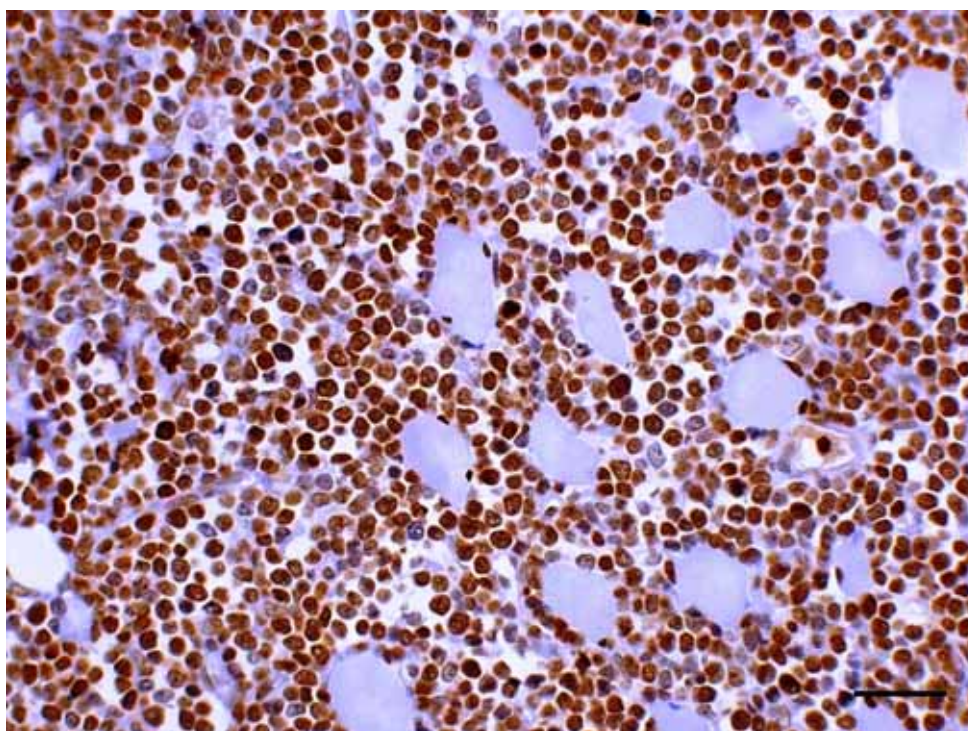


Figura 12: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o anticorpo anti-PAX5, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris BAR 50 μ m.

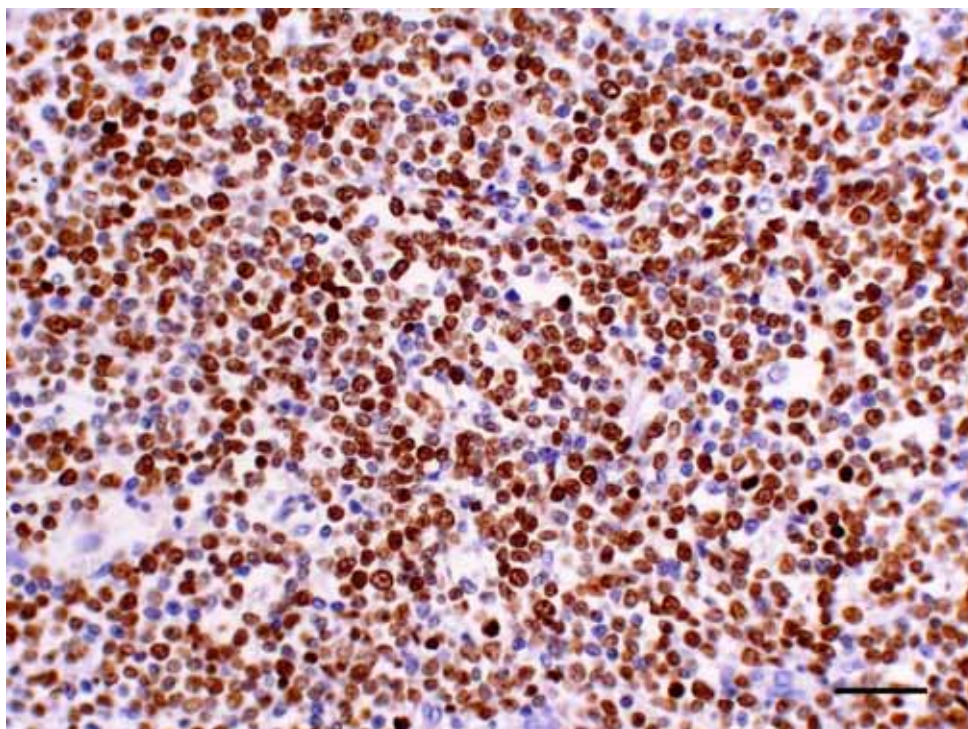


Figura 13: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o anticorpo anti-ki-67 (MIB 1), Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR 50 μ m*.

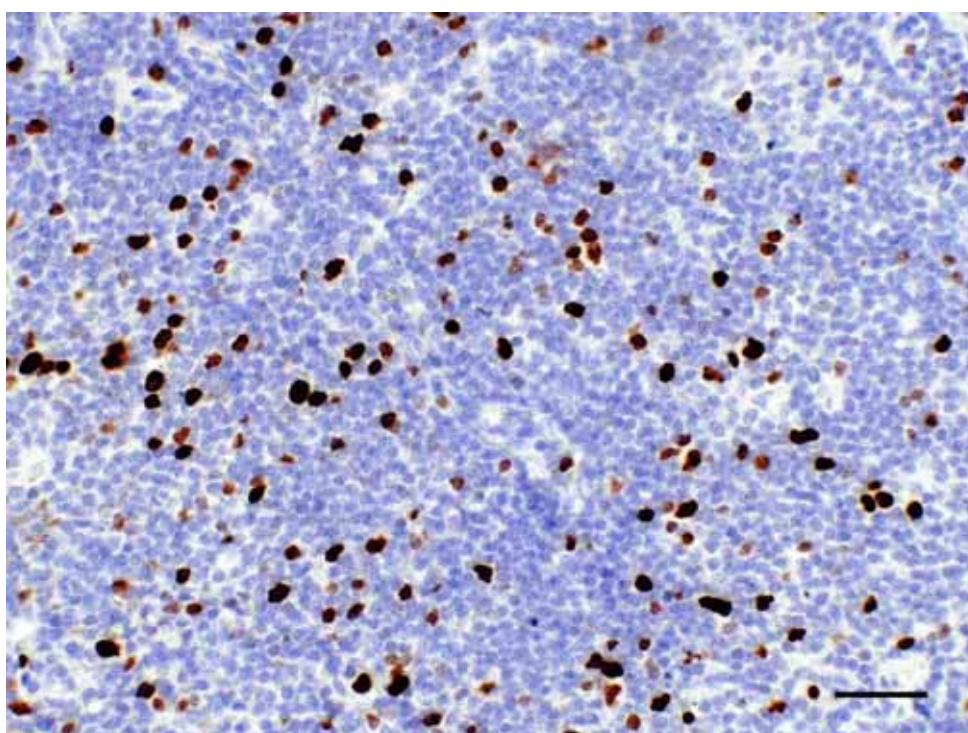


Figura 14: LINFOMA LINFOCÍTICO- Positividade para o anticorpo anti-ki-67 (MIB 1), Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR 50 μ m*.

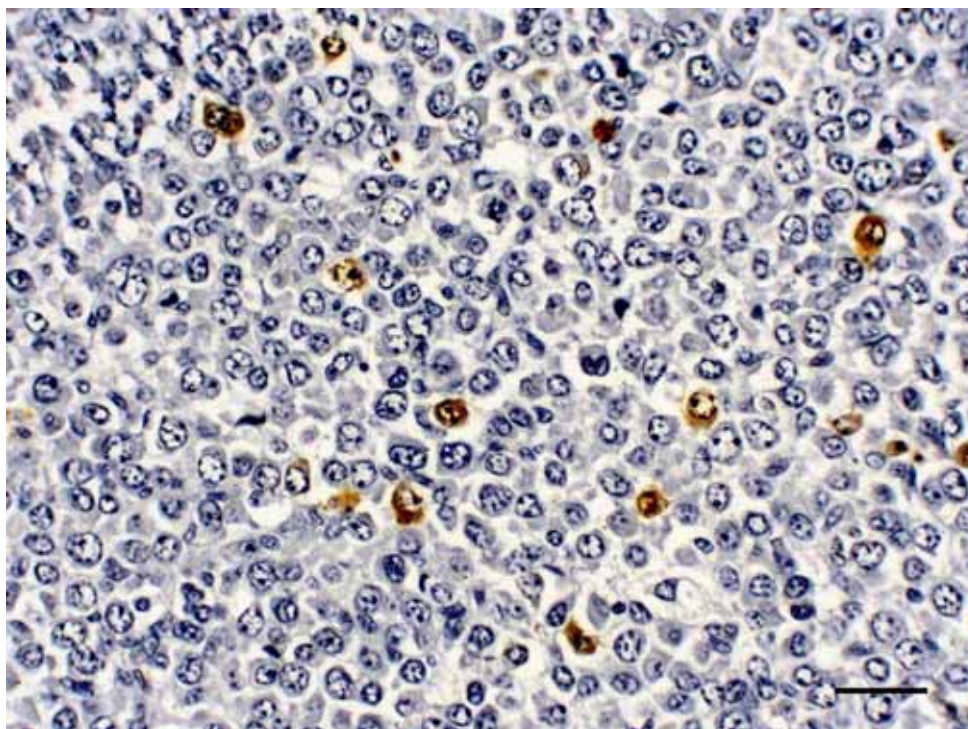


Figura 15: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS- Positividade para o anticorpo anti-caspase3, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR 50 μ m*

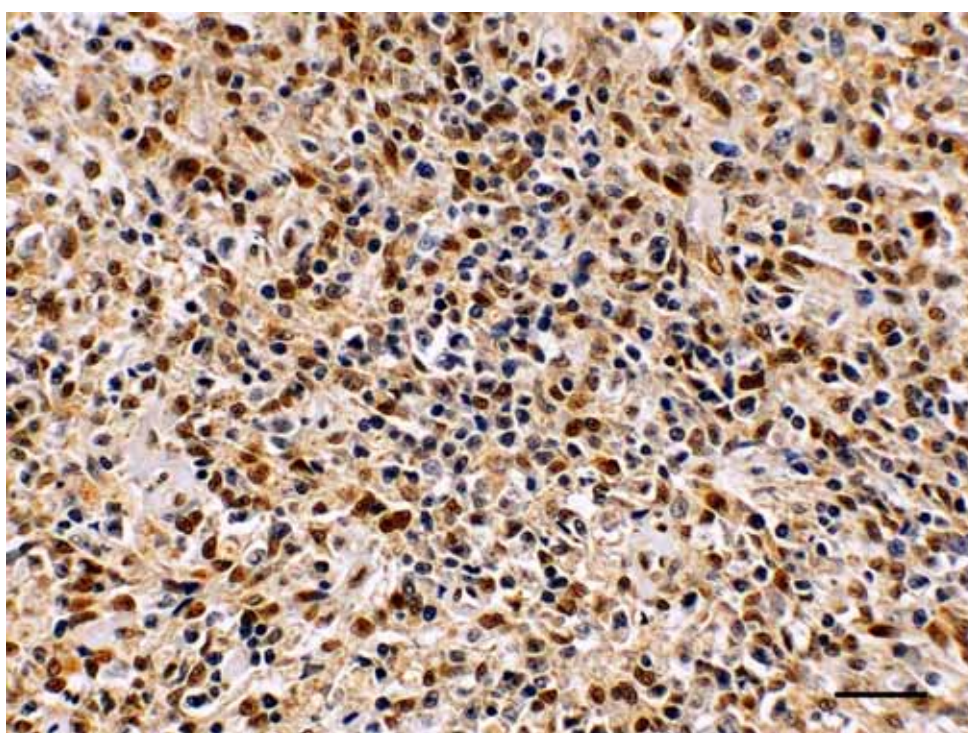


Figura 16: LINFOMA DE CÉLULAS T PERIFÉRICAS- Positividade para o anticorpo anti-p53 (DO7), Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR 50 μ m*.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os linfomas estão entre as neoplasias mais frequentes na espécie canina (VONDEHAAR e MORRISON, 1998). Nos humanos, NHLs também são comuns e sua incidência tem aumentado nas últimas quatro décadas (FRIEDBERG et al., 2008).

Nos humanos e nos cães, os NHLs mostram características comuns (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a). O aumento no número de casos de linfoma nos seres humanos durante as últimas décadas torna o estudo comparativo entre as duas espécies de extrema importância, já que ambas compartilham o mesmo ambiente, o que torna o cão um sentinela biológico muito útil. Deve-se destacar ainda, que o ciclo de vida mais curto destes animais permite que se observem mais precocemente as possíveis modificações no comportamento dos linfomas ao longo dos próximos anos.

6.1 Dados clínicos dos animais

No presente estudo observou-se uma maior frequência de linfoma em cães SRD (12 casos- 26%), seguido por cães da raça Boxer (sete casos- 15%, Rottweiler (cinco casos- 11%) e Pastor Alemão (quatro casos- 9%). Os demais animais pertenciam a outras raças. Estudos recentes apontam para predisposição racial em animais da raça Boxer, mestiços, Labrador Retriever, Golden Retriever, Shih-Tzu, Beagle e Cocker Spaniel (VALLI, et al., 2013). Os achados do presente estudo são semelhantes aos observados em outros trabalhos. Vezzali et al. (2009) também observou uma maior ocorrência em cães SRD.

A correlação entre a ocorrência do linfoma na raça Boxer, particularmente ocorrência dos linfomas T é consistente com o observado na literatura (LURIE et al., 2004; MODIANO et al., 2005), tal achado também foi observado em nosso estudo.

Dentre os animais estudados a maioria eram cães de porte médio ou grande. Tal achado corrobora com o observado na literatura onde 75,6% dos animais pertencem a raças de porte grande (VALLI, et al., 2013).

Os dados observados no presente estudo são semelhantes aos levantamentos anteriores na região (SEQUEIRA et al., 1999; SUZANO et al., 2004). Dessa forma, deve-se levar em consideração que a frequência observada pode estar correlacionada com a proporção de cada raça na população de cães da região estudada, do que a predisposição racial propriamente dita.

Em relação ao sexo observado nos animais neste estudo, 25 eram machos (54%) e 21 fêmeas (46%). A literatura consultada é controversa neste aspecto, já que alguns estudos afirmam não haver influência do sexo nos cães com linfoma (VONDERHAAR e MORRISON, 1998; JACOBS et al., 2002; PONCE et al., 2010), porém trabalhos mais recentes apontam para uma maior ocorrência em cães machos (VALLI, et al., 2013).

Ao avaliar a idade dos animais observou-se maior ocorrência em animais com idade entre quatro e sete anos (48%), seguido por animais com idade de oito anos (37%) e animais com um a três anos (15%). Os dados são semelhantes aos observados por SEQUEIRA e FRANCO (1992) onde a maior ocorrência foi observada em animais com idade entre quatro e 13 anos.

O estadiamento clínico foi realizado em todos os animais, e 27 animais estavam no estágio V (59%), 11 no estágio IV (24%) e oito no estágio III (17%). Tais achados são como o observado na literatura recente, onde o linfoma canino sempre se apresenta em estágios avançados da doença (III-V) no momento do diagnóstico, e normalmente apresenta um curso clínico agressivo (MARCONATO et al., 2013; VALLI et al., 2013). Ademais, estágios mais avançados são observados em casos de linfoma de alto grau, onde os animais apresentam sinais sistêmicos da doença (VALLI et al., 2013).

Nos cães, o estadiamento auxilia o planejamento e avaliação do tratamento, no estabelecimento do prognóstico e permite a comparação entre diferentes protocolos de tratamentos (VONDERHAAR e MORRISON, 1998).

Anatomicamente, os linfomas caninos são classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário ou extranodal (JACOBS et al., 2002). Em nosso estudo, 38 animais (83%) apresentaram a forma multicêntrica, seguido por três animais com a forma tímica (6,5%), três animais (6,5%) com a forma solitária, um animal (2%) com a forma digestiva e um com a forma cutânea (2%). Sendo assim, a forma multicêntrica foi a mais prevalente

dentre as formas anatômicas, este achado corrobora com o descrito na literatura (TESKE et al., 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; FOURNEL-FLEURY et al., 2002; SUEIRO et al., 2004; SUZANO, 2004; SEQUEIRA et al., 1999; VEZZALI et al., 2009).

Um estudo de cães com linfoma constatou que em 82,4% dos casos foram observados sinais clínicos de envolvimento de linfonodo, seja linfadenopatia generalizada ou localizada, que caracterizam a forma multicêntrica do linfoma. O linfoma multicêntrico canino é considerado uma neoplasia clinicamente agressiva quando comparada ao linfoma não-Hodgkin humano (VAIL e MACEWEN, 2000).

No presente estudo a forma extranodal foi pouco observada (2%), no entanto dados da literatura indicam até 17,6% dos casos com este tipo de apresentação (PONCE et al., 2010). É importante ressaltar que esta frequência é considerada baixa, quando comparada a frequência em humanos, que chegam a alcançar 30% dos casos (JAFFE et al., 1999).

6.2 Imunofenotipagem

A determinação do imunofenótipo dos linfomas humanos se tornou essencial para a classificação devido à sua relação com comportamento biológico e a resposta à terapia (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; VALLI et al., 2013). Dessa forma, as classificações, Kiel (LENNERT e FELLER, 1990), Real (HARRIS et al., 1994) e WHO (JAFFE et al., 2001) diferenciam os linfomas com base no imunofenótipo.

De acordo com a literatura veterinária, 60-80% dos linfomas em cães são de células B (TESKE et al., 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; FOURNEL-FLEURY et al., 2002; CANIATTI et al., 1996), enquanto os linfomas de células T representam de 35 a 40% (MODIANO et al., 2005), tal achado é diferente do observado neste estudo, já que dos 46 casos de linfoma utilizados neste trabalho, 28 eram linfomas T e 18 linfomas B, totalizando 60,9% e 39,1% dos casos, respectivamente.

Trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório também detectaram a predominância dos linfomas de imunofenótipo T (SUZANO, 2004), assim como MILNER et al. (1996) que refere uma frequência de 60% de linfomas T e 40% de linfomas B.

Talvez uma das suposições que se possa inferir em relação a este achado seja a variação regional, assim como o levantado para a predisposição racial anteriormente, tal fato pode estar relacionado com a ocorrência da região estudada, do que com a frequência de linfomas B e T. Além disso, é importante ressaltar que o presente estudo tem sete animais da raça Boxer e trabalhos apontam para uma maior ocorrência de linfoma T em cães da raça Boxer, este fato pode contribuir para uma maior ocorrência de linfoma T no presente estudo (LURIE et al., 2008).

Quanto à marcação imunoistoquímica dos linfomas B, o anticorpo anti-CD79a apresentou marcação positiva em 16 casos (89%), enquanto que 18 casos (100%) apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-Pax5.

O Pax5 é uma proteína ativadora específica de células B (BSAP) e foi detectada por método imunoistoquímico em 100% dos linfomas caninos. A Pax5 é um membro da família dos fatores de transcrição. Nas células hematopoiéticas, a expressão do Pax5 é específica das células da linhagem B. Esta expressa em estágios iniciais do desenvolvimento das células B e permanece ativa nos estágios tardios do desenvolvimento das células B, mas esta ausente em nos estágios finais de diferenciação de células plasmocitoides (FOSS et al., 1999; HORCHER et al., 2001). Estudos em humanos revelam claramente que a expressão de Pax5 é restrita aos linfomas de células B (KRENACS et al., 1998).

Willmann et al. (2009), em seu estudo comparou a marcação de Pax5 com o marcador CD79a. Neste estudo, a marcação nuclear de Pax5 foi de moderada a forte em 70 a 95% das células linfoides, não sendo observada marcação citoplasmática ou de membrana. Tal achado corrobora com o observado em nosso estudo, onde 100% dos linfomas foram positivos para Pax5, todos com marcação nuclear evidente.

Em outro estudo, as células neoplásicas revelaram marcação positiva nuclear com intensidade variando de moderada a forte em mais de 70% das células malignas em todos os casos avaliados (HERBECK et al., 2011).

Sendo assim, nos cães, as células dos linfomas B mostraram marcação nuclear consistente, acima do obtido com CD79a, constatando que o Pax5 serve como um marcador adicional de células B para os linfomas não-Hodgkin caninos.

6.3 Índice de proliferação celular pelo método Ki-67 (MIB-1)

Como mencionado anteriormente o estudo de neoplasia faz necessário a avaliação do índice de proliferação celular (KIUPEL et al., 1999). A proliferação celular mostra uma boa correlação com o comportamento biológico destes tumores e fornece informações que orientam o tratamento e o prognóstico (ROELS et al., 1999).

A taxa de células neoplásicas que estão em proliferação nos linfomas não-Hodgkin está relacionada com os diferentes tipos morfológicos e com o grau de malignidade. Geralmente, os tumores de alto grau possuem um índice de proliferação celular maior do que os de grau baixo (COMAZZI et al., 2013, FOURNEL-FLEURY et al., 1997b). Fato este constatado por Suzano et al., (2008), no qual as neoplasias de alto grau de malignidade obtiveram uma média de células marcadas pelo Ki-67 de 43,19% e nos casos de baixo grau de 14,09%. Tais achados também foram observados em nosso estudo, pois de acordo com a classificação de Kiel e a classificação da WHO, o índice de proliferação de Ki-67 foi correlacionado com o grau de malignidade.

Ademais, a média de células em proliferação marcadas pelo ki-67 foi de 51,35% nos casos de alto grau de malignidade; e nos casos de baixo grau de malignidade a média foi de 13,95%, achados novamente semelhantes ao visto por Suzano et al. (2008).

Além disso, Sokolowska et al. (2012), constataram que a maioria dos linfomas apresentava alta atividade de proliferação (39 de 45), fato este também observado em nosso trabalho (38 de 46), e até mesmo alguns linfomas considerados de baixo grau de malignidade chegaram a apresentar 37,2% de células positivas para o ki-67.

A expressão moderada (20-50% de células) foi observada em cinco casos e apenas um caso teve menos de 20% de células positivas. Ao correlacionarmos os nossos achados, os dados diferem do visto por

Sokolowska et al., (2005). Em nosso estudo, foram observados 11 casos com expressão de 50-70%; oito casos com expressão acima de 70%; 19 casos com expressão de 20-50% e por fim oito casos com menos de 20% de células positivas para ki-67.

Dessa forma, constatamos que a expressão da proteína ki-67 apresenta determinada heterogeneidade.

6.4 Índice de apoptose pelo método da Caspase-3

Além da proliferação celular, o crescimento tumoral também é determinado pelo número de células perdidas. Assim, um índice importante relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é a apoptose (PHILLIPS et al., 2000).

Ao analisarmos o índice de células em apoptose pelo método da caspase-3 nas classificações de Kiel e WHO, observou-se que nas neoplasias de alto grau de malignidade a mediana de células positivas para a Caspase-3 foi de 2,40% e nos casos de baixo grau de malignidade foi de 1,00, resultados estatisticamente não significativos, mesmo assim a expressão da Caspase-3 foi maior nos linfomas de alto grau de malignidade.

Entre os diferentes imunofenótipos, a mediana da caspase-3 foi 1,33 para os linfomas B e de 1,46 para os linfomas T. Os imunofenótipos não diferiram quanto à expressão da Caspase-3, resultado estatisticamente não significativo.

A caspase-3 está relacionada com a apoptose em muitos distúrbios hematopoiéticos na espécie humana, inclusive nas leucemias e nos linfomas. Alguns estudos sugerem que, tanto o nível da sua expressão como a sua forma de marcação intracitoplasmática tem relação com a progressão tumoral. Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento (DONOGHUE et al., 1999).

Já foi relatado que os linfomas de alto grau de malignidade apresentam uma expressão maior de caspase-3 que as neoplasias de baixo grau (DUKERS et al., 2002). São poucos os estudos da expressão da caspase-3 nas neoplasias caninas. Suzano (2007), concluiu que o índice apoptótico pode ser avaliado pela expressão da caspase-3, e que o mesmo mostra grande

variação, não havendo diferenças entre os graus e imunofenótipos das neoplasias. Tais achados foram também observados no presente estudo com alta variação da expressão da Caspase-3, contudo mesmo diante de resultados estatisticamente não significativos é importante salientar que a expressão foi maior em casos de alto grau de malignidade.

6.5 Expressão de p53

A proteína p53 selvagem está localizada no núcleo da célula e se liga a sequências específicas de DNA. As células que têm mutação no p53 são resistentes aos tratamentos antineoplásicos padrão que induzem danos no DNA, como a quimioterapia e radioterapia (LOWE et al., 1993). As mutações do gene p53 estão associadas com diversas neoplasias linfoides (GAMBLIN et al., 1997). Em humanos, há relatos de que a expressão da proteína p53 alterada é superior a 30% nos linfomas de alto grau de malignidade de origem B (INAMURA et al., 1994).

Em nosso estudo, dos 46 casos de linfoma canino, 12 casos apresentaram a expressão da proteína p-53 mutante, perfazendo um percentual de 26,08%. Esses valores diferem do observado na literatura consultada, sendo descritos percentuais mais altos como 40% (GAMBLIN et al. 1997), 59% (SUEIRO et al., 2004) e 72,25% (SUZANO et al., 2007).

É importante salientar que talvez o menor valor observado em nosso estudo possa ter ocorrido devido à utilização do anticorpo anti-p53, clone DO7, monoclonal, diferente do utilizado na literatura consultada. O clone DO7 é amplamente utilizado na Medicina Humana em neoplasias linfoides ou alterações linfoproliferativas (BEYLOT-BARRY et al., 1995; HASELEN et al., 1997), contudo sem relatos de sua utilização na medicina veterinária. Optou-se pela utilização desse clone devido à descontinuidade de produção do anticorpo anti-p53, clone CM1, policlonal.

Quanto à relação, em nosso estudo, entre a positividade para p53 e o imunofenótipo, dos 12 casos de linfoma positivos, oito casos eram de imunofenótipo T e quatro casos eram de imunofenótipo B, correspondendo a 66% e 34%, respectivamente. Em relação ao grau de malignidade, 11 casos de linfoma eram de alto grau de malignidade e um caso de baixo grau de

malignidade. Dessa forma, não houve associação entre o imunofenótipo e o grau de malignidade e a expressão de p53. Esses dados estão de acordo com aqueles presentes na literatura consultada, já que diversos autores também não associaram a expressão de p53 com os imunofenótipos e os graus de malignidade das neoplasias (SUEIRO et al., 2004; SUZANO et al., 2007; DHALIWAL et al., 2013). Somente Sokolowska et al., (2005), relataram diferenças significativas na expressão do p53 em linfomas de células B e de células T.

Mesmo diante de resultados estatisticamente não significativos, deve-se ressaltar que, no presente estudo, a maioria dos casos com expressão da proteína p53 mutante ocorreu em animais com linfomas de alto grau de malignidade, semelhante ao que ocorre na espécie humana.

Assim, na medicina veterinária, o papel desempenhado pelo p53 nas neoplasias linfoides é controverso.

6.6 Microarranjo de tecido (TMA)

Ao longo da última década, a técnica de microarranjo em tecido (TMA) tem se tornado um método utilizado para avaliar a associação entre os biomarcadores e os achados clínico-patológicos dos tumores, recuperação do paciente e resposta ao tratamento (ECKEL-PASSOW et al., 2010).

Embora a TMA seja amplamente utilizada na medicina humana, ainda não existe um consenso sobre quantas biopsias devem ser utilizadas para determinações confiáveis (GOETHALS et al., 2006) e pouca atenção é dada ao diâmetro dos *cores*. A maioria dos estudos utiliza um diâmetro de 0,6 mm, e poucos dados estão disponíveis sobre o uso de *cores* maiores e sobre a concordância entre as avaliações obtidas nos cortes e no método do TMA (KELLER et al., 2007).

No presente estudo ao realizarmos a comparação entre o corte inteiro e o TMA de 1,0 mm e de 1,5 mm para os marcadores de proliferação, anti-ki-67 e de apoptose anti-caspase-3, obtivemos média semelhante aos valores do corte inteiro e concordância excelente, quando feito em triplicata, tais resultados também foram observados por Keller et al. (2007). Contudo, três casos apresentaram necrose e desgaste excessivo do bloco. Segundo a literatura,

uma grande desvantagem da TMA é a quantidade limitada do tecido analisado, que pode comprometer a representatividade da amostra (ZU et al., 2005), como ocorrido nos três casos descritos acima, mesmo assim sem prejudicar a representatividade da amostra, devido à realização de amostras em triplicata.

Ao correlacionar a expressão do p53 no corte inteiro, na TMA de 1,0 mm e na TMA de 1,5 mm, observou-se fraca concordância entre o corte inteiro e os cortes analisados. Conforme o observado em experimentos de validação em humanos, os graus de concordância entre o corte inteiro e a TMA podem variar de acordo com os diferentes tipos de tumores e marcadores, a distribuição não uniforme de um determinado marcador em um determinado tipo de tumor (heterogeneidade do tumor), o método de pontuação aplicada, as diferenças na abordagem estatística e o número de biópsias tomadas para cada tumor (ZU et al., 2005).

Segundo Eckel-Passow et al., (2010), a TMA pode não ser apropriada para avaliar a expressão de alguns biomarcadores, como o observado em nosso estudo para o marcador anti-p53.

6.7 Aplicação das classificações de Kiel e WHO nos linfomas caninos

Foram classificados 40 casos de linfoma canino no presente estudo de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e com a classificação proposta pela WHO (VALLI et al., 2002).

Foi observada a predominância dos linfomas de alto grau (37/46) assim como relatado por vários autores (GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997b; SUZANO, 2004; SUZANO, 2007; PONCE et al., 2004; PONCE et al., 2010).

A maior sobrevida nos linfomas de baixo grau, com ou sem terapia conservativa, faz com que um diagnóstico específico seja imperativo (VALLI et al., 2013).

Como observado por outros autores, de acordo com a classificação da WHO, o linfoma difuso de grandes células B (27,5%) foi o tipo mais comum dos linfomas B (VEZZALI et al., 2009; PONCE et al., 2010). Em relação aos

linfomas T, no presente estudo o tipo mais frequente foi o linfoma de células T periféricas (47,5%), diferindo de alguns autores que descrevem o linfoma imunoblástico, como o de maior ocorrência (VEZZALI et al., 2009). Já Ponce et al. (2010) descreve o linfoma de células T pleomórfico como o mais prevalente.

Dentre os linfomas de grandes células B, os tipos mais comuns neste estudo foram os subtipos centrolástico polimórfico e imunoblástico, como observado por outros autores (PONCE et al., 2010; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; GREENLEE, et al., 1990).

Dentre os linfomas de células T, os tipos mais comuns foram o linfoma de células T periféricas e o linfoma linfoblástico T, como mencionado anteriormente. A ausência de testes genéticos e outros métodos diagnósticos faz com que o linfoma T pleomórfico e o linfoma T imunoblástico, sejam classificados em linfomas de células T periféricas pela classificação da WHO.

O linfoma folicular não foi observado neste estudo, sendo estes considerados raros na veterinária (PONCE et al., 2010; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; FOURNEL-FLEURY et al., 2002; GREENLEE, et al., 1990; TESKE et al., 1994). Os linfomas foliculares são bem definidos na classificação da WHO, porém este arranjo não é considerado na classificação de Kiel.

No entanto, de uma forma geral, observamos que algumas das entidades clinico-morfológicas caracterizados na classificação de Kiel apresentam correspondentes na classificação da WHO.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Os critérios estabelecidos pela Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (WHO) permitem a correlação com os tipos de linfoma descritos pela classificação de Kiel.
- A Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (WHO) associa os critérios morfológicos as características clínicas, diferentemente dos critérios exclusivamente morfológicos da classificação de Kiel, o que a torna mais abrangente.
- A Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (WHO) agrupa determinados tipos morfológicos da classificação de Kiel, como os linfomas imunoblásticos e centrolásticos, em categorias mais amplas como os linfomas de grandes células B, o que simplifica os critérios de classificação.
- O método de TMA permite a avaliação de marcadores de proliferação e apoptose nos linfomas caninos independentemente do diâmetro dos cores.
- Para os linfomas B caninos o anticorpo anti-PAX-5 mostrou-se mais eficiente como marcador do que o anticorpo anti-CD79a, devendo ser associado ao painel de imunofenotipagem.

Referências

REFERENCIAS¹

- ALVES, V.A.C.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p. 135-151.
- APPELBAUM, F.R.; SALE, G.E.; STORB, R.; CHARRIER, K.; DEEG, H.J.; GRAHAM, T.; WULFF, J.C. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. **Hematol. Oncol.**, v.2, p. 151-168, 1984.
- BEYLOT-BARRY, M.; VERGIER, B.; DEMASCAREL, A.; BEYLOT, C.; MERLIO, J.P. p53 oncoprotein expression in cutaneous lymphoproliferations. **Arch. Dermatol.**, v. 131, p. 1019-1024, 1995.
- BUBENDORF, L.; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J. Pathol.**, v. 195, p. 72-79, 2001.
- CANIATTI, M.; ROCCABIANCA, P.; SCANZIZNI, E.; PALTRINIERI, S.; MOORE, P.F. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine needle aspiration biopsy. **Vet. Pathol.**, Washington, v.33, p.204-212, 1996.
- COMAZZI, S.; GUSCETTI, F.; MARCONATO, L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. **Hematol Oncol.**, v. 32, p. 68-71, 2013.
- DEHNER, L.P. Here we go again: a new classification of malignant lymphomas. A viewpoint from the trenches. **American Journal of Clinical Pathology.**, p.539-540, 1995.
- DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; EHRHART, E.; VALLI, V.E.; DERVISIS, N.G. Clinicopathologic significance of histologic grade, pggp, and p53 expression in canine lymphoma. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 49, p. 175-184, 2013.
- DOBSON, J.M.; BLACKWOOD, L.B.; MCINNES, E.F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T.M.; TOM, B.D.M. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. **J. Small Anim. Pract.**, v.42, p. 377-384, 2001.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS - ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- DONOGHUE, S.; BADEN, H.S; LAUDER, I.; SOBOLEWSKI, S.; PRINGLE, J.H. Immunohistochemical localization of Caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphoma. **Can. Res.**, v.59, p. 5386-5391, 1999.
- DUKERS, D.F.; OUDEJANS, J.J; VOS, W.; BERGE, R.L.; MEIJER, C.J.L.M. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. **J. Pathol.** v. 196, p.307-315, 2002.
- ECKEL-PASSOW, J.E.; LOHSE, C.M.; SHEININ, Y.; CRISPEN, P.L.; KRCO, C.J.; KWON, E.D. Tissue microarrays: one size does not fit all. **Diagn. Pathol.**, v. 5, 2010.
- FOSS, H.D.; REUSCH, R.; DEMEL, G.; LENZ, G.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; HUMMEL, M.; STEIN, H. Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. **Blood.**, v. 94, p. 3108-3113, 1999.
- FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHARBANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **J. Comp. Pathol.**, v.117, n.1, p. 35-59, 1997a.
- FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; CHABANNE, L.; GHERNATI, I.; MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of ki-67 antigen. **J. Comp. Path.**, v. 117, p.61-72, 1997b.
- FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOYTHOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell Lymphoma: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Vet. Pathol.**, v.32, p. 92-109, 2002.
- FRANTZ, A.M.; SARVER, A.L.; ITO, D.; PHANG, T.L.; KARIMPOUR-FARD, A.; SCOTT, M.C.; VALLI, V.E.; LINDBLAD-TOH, K.; BURGESS, K.E.; HUSBANDS, B.D.; HENSON, M.S.; BORGATTI, A.; KISSEBERTH, W.C.; HUNTER, L.E.; BREEN, M.; O'BRIEN, T.D.; MODIANO, J.F. Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. **Vet. Pathol.**, v. 50, p. 693-703, 2013.

- FRIEDBERG, J.W.; MAUCH, P.M.; RIMSZA, L.M.; FISHER, R.I. Non-Hodgkin's lymphomas. In: GALL, E.A.; MALLORY, T.B. Malignant lymphoma: A clinicopathologic survey of 618 cases. **Am. J. Pathol.**, v.18, p.381-395, 1942.
- GERARD-MARCHANT, R.; HAMLIN, I.; LENNERT, K. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. **Lancet**. p. 406-408, 1974.
- GOETHALS, L.; PERNEEL, C.; DEBUCQUOY, A.; DE SCHUTTER, H.; BORGHYS, D.; ECTORS, N.; GEBOES, K.; MCBRIDE, W.H.; HAUSTERMANS, K.M. A new approach to the validation of tissue microarrays. **J. Pathol.**, v. 208, p. 607-614, 2006.
- GAMBLIN, R.M.; SAGARTZ, J.E.; COUTO, C.G. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, p. 857-863, 1997.
- GAVAZZA A.; PRESCIUTTINI, S.; BARALE, R.; LUBAS, G.; GUGLICIUCCI, B. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 15, p. 190-195, 2001.
- GOOD, D.J.; GASCOYNE, R.D. Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.** v.22, p.781-805, 2008.
- GRAY, K.N.; RAULSTON, G.L.; GLEISER, C.A.; JARDINE, J.H. Histologic classification as a indication of therapeutic response in malignant lymphoma of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.184, p.184-17, 1984.
- GREENLEE, P.G.; FILIPPA, D.A.; QUIMBY, F.W. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic and clinical study. **Cancer**, v.66, p. 480-490, 1990.
- GRIFFEY, S.M.; KRAEGEL, S.A.; MADEWELL, B.R. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA), ki-67 (MIB-1) and Mitotics counts. **J. Comp. Pathol.**, v.120, p.321-332, 1999.
- HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H.; BANKS, P.M.; CHAN, J.K.C.; CLEARY, M.L.; DESLOL, G.; WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C.; GROGAN, T.M.; ISAACSON, P.G.; KNOWLES, D.M.; MASON, D.Y.; MULLER-HERMELINK, H.; PILERI, S.A.; PIRIS, M.A.; RALFKIAER, E.; WARNKE, R.A. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood.**, v. 84, n.5, p.1361-1392, 1994.
- HERBECK, R.; TEODORESCU BRINZEU, D.; GIUBELAN, M.; LAZAR, E.; DEMA, A.; IONITA, H. B-cell transcription factors Pax-5, Oct-2, BOB.1, Bcl-6,

and MUM1 are useful markers for the diagnosis of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. **Rom. J. morphol. Embryol.**, v.52, n.1, p. 69-74, 2011.

HOMBERG, C.A.; MANNING, J.S.; OSBURN, B.I. Canine malignant lymphoma: comparison of morphologic and immunologic parameters. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, p. 125-153, 1976.

HORCHER, M.; SOUABNI, A.; BUSSLINGER, M. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. **Immunity**, v. 14, p. 779-790, 2001.

INAMURA, J.; MIYOSHI, I.; KOEFFLER, H.P. p53 in hematologic malignancies. **Blood**, v. 84, p.2412-1421, 1994.

HUANG, H.H.; XIAO, F.; CHEN, F.Y.; WANG, T.; LI, J.M.; WANG, J.M.; CAO, J.N.; WANG, C.; ZOU, S.H. Reassessment of the prognostic value of the International Prognostic Index and the revised International Prognostic Index in patients with diffuse large B-cell lymphoma: A multicentre study. **Exp. Ther. Med.**, v. 4, p. 475-480, 2012.

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

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

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; ISAACSON, P.G. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. **Blood**, v. 112, p. 4384-4399, 2008.

KANO, R.; INOUE, C.; OKANO, H.; YAMAZAKI, J.; TAKAHASHI, T.; WATARI, T.; TOKURIKI, M.; HASEGAWA, A. Canine CD20 gene. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 265–268, 2005.

KELLER, S.M.; KELLER, B.C.; GREEST, P.; BORGER, C.T.; GUSCETTI, F. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine lymphomas. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.19, p. 652-659, 2007.

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

- KONONEN, J.; BUDENDORF, L.; KALLIONIMENI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M.J.; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v.4, p.844-847, 1998.
- KRENACS, L.; HIMMELMANN, A.W.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; FEST, T.; RIVA, A.; WELLMANN, A.; BAGDI, E.; KEHRL, J.K.; JAFFE, E.S.; RAFFELD, M. Transcription factor B-Cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. **Blood**, v.92, p.1308-1316, 1998.
- LANDGREN, O.; PORWIT MACDONALD, A.; TANI, E.; CZADER, M.; GRIMFORS, G.; SKOOG, L.; OST, A.; WEDELIN, C.; AXDORPH, U.; SVEDMYR, E.; BJÖRKHOLM, M. A prospective comparison of fine-needle aspiration cytology and histopathology in the diagnosis and classification of lymphomas. **Hematol. J.**, v. 5, p. 69-76, 2004.
- LENNERT, K.; FELLER, A. C. **Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas**, 2ed., Berlin: Springer-Verlag, 1992, 312p.
- LOWE, S.W.; SCHMITT, E.M.; SMITH, S.W.; OSBORNE, B.A.; JACKS, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature**, v. 362, p. 847-849, 1993.
- LUKES, R.; COLLINS, R. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. **Cancer**, v.34, p.1488-1503, 1974.
- LURIE, D.M.; LUCROY, M.D.; GRIFFEY, S.M.; SIMONSON, E.; MADEWELL, B.R. T-cell-derived malignant lymphoma in the boxer breed. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 2, p. 171-175, 2004.
- LURIE, D.M.; MILNER, R.J.; SUTER, S.E.; VERNAU, W. Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 125, p. 102-110, 2008.
- MARCONATO, L.; GELAIN, M.E.; COMAZZI, S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. **Hematol. Oncol.**, v. 31, p. 1-9, 2013.
- MERLO, D.F.; ROSSI, L.; PELLEGRINO, C.; CEPPI, M.; CARDELLINO, U.; CAPURRO, C.; RATTO, A.; SAMBUCCO, P.L.; SESTITO, V.; TANARA, G.; BOCCHINI, V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 22, p. 976-984, 2008.

MILANES-YEARSLEY, M.; HAMMOND, M.E.; PAJAK, T.F.; COOPER, J.S.; CHANG, C.; GRIFFIN, T.; NELSON, D.; LARAMORE, G.; PILEPICH, M. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. **Mod. Pathol.**, v. 15, p. 1366-1377, 2002.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2014 incidência de linfoma Não-Hodgkin. Rio de Janeiro: INCA; 2014 [acesso em 1 jan 2014]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/linfoma_nao_hodgkin

MODIANO, J.F.; BREEN, M.; BURNETT, R.C.; PARKER, H.G.; INUSAH, S.; THOMAS, R.; AVERY, P.R.; LINDBLAD-TOH, K.; OSTRANDER, E.A.; CUTTER, G.C.; AVERY, A.C. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. **Cancer Res.**, v. 65, p. 5654- 5661, 2005.

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

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

PONCE, F.; MAGNOL, J.P.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FLEURY-FOURNEL, C. Canine malignant lymphoma morphological subtypes: an essential step for prognosis of dogs under chemotherapy. **Vet. J.**, v. 167, p.158–166, 2004.

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

- RAPPAPORT, H.; WINTER, W.; HICKS, E. Follicular lymphoma: A re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. **Cancer**, v.9, p.792-821, 1956.
- ROBERT, M.; FRIEDLANDER, M.D. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 1365-1375, 2003.
- ROELS, S.S.; TILMANT, R.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki-67 Proliferation Markers as Criteria for Prediction of Clinical Behaviour of Melanocytic Tumours in Cats and Dogs. **J. Comp. Pathol.**, v.121, p.13-24, 1999.
- SEQUEIRA, J.L.; FRANCO, M. Características dos linfomas caninos. **J. Anatomopatol.** v.7, n.2, p.6-8, 1992.
- SEQUEIRA, J.L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E.P.; FIGUEIREDO, L. M. A.; ROCHA, N. S. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu/SP. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n.3, p. 245-249, 1999.
- SOKOLOWSKA, J.; CYWINSKA, A.; MALICKA, E. p53 Expression in Canine Lymphoma. **J. Vet. Med.**, v. 52, p.172-175, 2005.
- SOKOŁOWSKA, J.; MICUN, J.; MALICKA, E.; LECHOWSKI, R. Proliferation activity in canine lymphomas. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 15, p. 727-724, 2012.
- SÖZMEN, M.; TASCA, S.; CARLI, E. *et al.* Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.323–329, 2005.
- SUEIRO, F. A. R.; ALESSI, A. C.; VASSALLO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **J. Comp. Path.**, v. 131, p. 207-213, 2004.
- SUZANO, S. M. C. **Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do P53 nos linfomas caninos (Tese de doutorado)**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu-SP, 2007.
- SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L.; PESSOA, A. W. P.; PORTO, C. D.; OLIVEIRA, D. E. Proliferação celular nos linfomas caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 2008.
- TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Vet. Q.**, v.16, p.209-219, 1994.
- The Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. National Cancer Institute Sponsored study of classifications of Non-Hodgkin's lymphomas:

Summary and Description of a Working Formulation for Clinical Usage. **Cancer**, v.49, p.2112-2135, 1982.

TOMIYASU, H.; GOTO-KOSHINO, Y.; TAKAHASHI, M.; FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Quantitative analysis of mRNA for 10 Different Drug Resistance Factors in Dogs with lymphoma. **J. Vet. Med. Sci.**, n. 72, v.9, p. 1165-1172, 2010.

VAIL, D. M.; MACEWEN, E. G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as model for human cancer. **Cancer Investigation**, v. 18, n. 8, p. 781-92, 2000.

VAIL, D.M.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. (eds): **Small Animal Clinical Oncology**, 4ed., St.Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.769-783.

VAIL, D.M.; WITHROW, S.J. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4ed., St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap.31, p.699-769.

VALLI, V.E.; KASS, P.H.; SAN MYINT, A.; SCOTT, F. Canine Lymphomas: Association of Classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate and treatment with survival. **Vet. Pathol.**, 2013.

VALLI, V. E.; SAN MYINT, M.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZLY, F.; DURHAM, A.; EHRHART, E. J.; JOHNSON, Y.; JONES, C.; KIUPEL, M.; LABELLE, P.; LESTER, S.; MILLER, M.; MOORE, P.; MOROFF, S.; ROCCABIANCA, P.; RAMOS-VARA, J.; ROSS, A.; SCASE, T.; TVEDTEN, H.; VERNAU, W. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization Criteria. **Vet. Pathol.**, v.48, n.1, p. 198-211, 2011.

VALLI, V.E. The Evolution of Classification Systems for Hematopoietic Neoplasms. In: VALLI, V. E. (Ed). **Veterinary Comparative Hematopathology**. Blackwell Publishing, Ames: IA, 2007. p. 3-7.

VALLI, V.E.; JACOBS, R.M.; PARODI, A.L.; VERNAU, W.; MOORE, P.F.; WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals. 2ed., **Armed Forces Institute of Pathology**, 190p, 2002.

VAN HASELEN, C.W.; VERMEER, M.H.; TOONSTRA, J.; VAN DER PUTTE, S.C.; MULDER, P.G.; VAN VLOTEN, W.A.; WILLEMZE, R. p53 and bcl-2 expression do not correlate with prognosis in primary cutaneous large T-cell lymphomas. **J. Cutan. Pathol.**, v. 24, p. 462-467, 1997.

VEZZALI, E.; PARODI, A. L.; MARCATO, P. S.; BETTINI, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non Hodgkin lymphoma according to the WHO. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 38-49, 2009.

VONDERHAAR, M.A., MORRISON, W.B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W.B. (Ed) **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. p.667-695.

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

WILLMANN, M.; MULLAUER, L.; GUIJA DE ARESPACOCCHAGA, A.; REIFINGER, M.; MOSBERGER, I.; THALHAMMER, J. G. Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B and B-cell marker. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 359-365, 2009.

ZACCHETTI, A.; VAN GARDEREN, E.; TESKE, E.; NEDERBRAGT, H.; DIERENDONCK, J. H.; RUTTEMAN, G.R. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labeling by immunohistochemistry. **APMIS** **111**, p. 430-438, 2003.

ZU, Y.; STEINBERG, S.M.; CAMPO, E.; HANS, C.P.; WEISENBURGER, D.D.; BRAZIEL, R.M.; DELABIE, J.; GASCOYNE, R.D.; MULLER-HERMLINK, K.; PITTALUGA, S.; RAFFELD, M.; CHAN, W.C.; JAFFE, E.S. Validation of tissue microarray immunohistochemistry staining and interpretation in diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk. Lymphoma**, v. 46, p. 693-701, 2005.

**Artigo submetido para publicação
na revista Arquivo Brasileiro de
Medicina Veterinária e Zootecnia
sob o título**

PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) como
marcador de células B e pan pré-B em linfomas não-
Hodgkin caninos

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.

Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.

Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.

Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.

O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo.

Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

Figura. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97.

(Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed).

Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized.

Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/>

MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

Artigo

PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) como marcador de células B e pré-B em linfomas não-Hodgkin caninos

PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) as a marker of pre-B cells and pan in canine non-Hodgkin lymphomas

Thaís Rosalen Fernandes¹, Maria Claudia Lopes da Silva¹, Julio Lopes Sequeira¹

1 Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

*Correspondente: thais_rosalen@hotmail.com

Serviço de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

Thais Rosalen Fernandes: thais_rosalen@hotmail.com

Maria Claudia Lopes da Silva:

Julio Lopes Sequeira: sequeira@fmvz.unesp.br

RESUMO- Os linfomas não Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães, dentre os quais 60-80% dos linfomas são de células B. A determinação do imunofenótipo dos linfomas humanos se tornou essencial devido à sua relação com comportamento biológico e a resposta à terapia. Recentemente foi observado que a Pax5 (proteína ativadora específica de células B- BSAP), foi detectada por método imunoistoquímico nos linfomas caninos, podendo assim se tornar um marcador adicional para os linfomas B do cão. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) como marcador de linfomas B em comparação ao marcador CD79a. Dezoito casos de linfoma B foram selecionados, sendo realizados os anticorpos anti-CD79a e anti-Pax5. Dezoito casos (100%) apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-Pax5, enquanto dezesseis casos (89%) apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-Pax5. Sendo assim,

34 nos cães, as células dos linfomas B mostraram marcação nuclear consistente, acima do
35 obtido com CD79a, constatando que o Pax5 serve como um marcador adicional de
36 células B para os linfomas não-Hodgkin caninos.

37 **Palavras-chave:** linfoma canino, imunoistoquímica, anti-Pax5.

38

39 ABSTRACT- Non-Hodgkin's lymphomas (LNHs) are the most common hematopoietic
40 neoplasms in dogs, among which 60-80% of lymphomas are of B cells. The determining
41 of the immunophenotype of human lymphomas has become essential because of their
42 relationship with biological behavior and response therapy. Recently it was observed
43 that the PAX5 (B cell specific activator protein- BSAP), was detected by
44 immunohistochemistry in canine lymphoma and can thus become an additional marker
45 for B-cell lymphomas dog. This study aimed to evaluate the efficiency of PAX5 BSAP
46 (B cell specific activator protein) as a marker of B-cell lymphomas compared to the
47 marker CD79a. Eighteen patients with B-cell lymphoma were selected, anti-CD79a
48 antibodies, and anti-PAX5 is performed. Eighteen cases (100%) showed positive
49 staining for anti-PAX5 antibody while sixteen cases (89%) showed positive staining for
50 anti-PAX5 antibody. Thus, in dogs, lymphoma B cells showed nuclear staining
51 consistent, higher than that obtained with CD79a, PAX5 noting that serves as an
52 additional marker for B-cell non-Hodgkin lymphomas

53 **Key-words:** canine lymphoma, immunohistochemical, anti-Pax5

54

55 **Introdução**

56 Os distúrbios linfohematopoiéticos são comuns nos cães, e o linfoma não-
57 Hodgkin canino (cNHL) apresenta a maior incidência, perfazendo um total de 83% de
58 todas as neoplasias hematopoiéticas (VAIL e WITHROW, 2007).

59 Atualmente, a imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas de
60 classificação deste tipo de neoplasia. Dessa maneira, o estabelecimento da origem T ou
61 B das células neoplásicas, associado a sua morfologia permitem o reconhecimento dos
62 diferentes tipos de neoplasias linfoides (SWERDLOW et al, 2008). Para a determinação
63 do imunofenótipo são utilizadas principalmente técnicas imunoistoquímicas e
64 marcadores linfoides como os anticorpos policlonal anti CD3 e monoclonal anti CD79 α ,
65 como marcadores pan T e pan B, respectivamente, tanto para o homem (JAFFE et al.,

2001; SWERDLOW et al., 2008) quanto para os animais domésticos (FOURNELFLEURY et al., 1997; VALLI et al., 2002; PONCE et al., 2010; VALLI et al., 2011).

Nos seres humanos, os linfomas B normalmente expressam vários marcadores pan B, porém a expressão de um ou mais destes marcadores pode estar ausente, impedindo ou dificultando a determinação do imunofenótipo, quando se utiliza apenas um marcador (JAFFE et al., 2001; O'MAHONY e RILEY, 2012). Para os linfomas B os mais utilizados nos linfomas humanos, além do anti CD79a, são o anti CD20 (O'MAHONY e RILEY, 2012) e o PAX-5 (anti- BSAP) (KRENACS et al., 1998; TORLAKOVIC et al., 2002) entre outros.

Recentemente foi observado que o Pax5 (proteína ativadora específica de células B- BSAP), foi detectada por método imunoistoquímico nos linfomas caninos. Sendo assim, podendo se tornar em marcador adicional para os linfomas B do cão (WILLMANN et al., 2009).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do PAX5 BSAP (B cell specific activator protein) como marcador de linfomas B em comparação ao marcador CD79a.

83

84 **Materiais e métodos**

O estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética e experimentação animal da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, São Paulo, sob protocolo número 55/2012.

Foram selecionados casos de linfoma no Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, provenientes do arquivo de tecidos parafinados. As amostras recebidas foram fixadas em solução de formaldeído tamponada a 10%, em temperatura ambiente por 48 horas e rotineiramente processadas e incluídas em parafina.

A imunoistoquímica dos linfomas foi realizada a partir da padronização em amostras de tonsila normal e de linfomas caninos. Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e reidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes e, posterior lavagem em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0, em câmara microprocessada de pressão Pascal (DAKO, EUA), durante 30 segundos a 125°C. Em

seguida, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água corrente.

Na sequência as lâminas foram incubadas em quatro banhos de peróxido de hidrogênio 3% (10V) durante 5 minutos cada, para o bloqueio da peroxidase endógena, e então lavadas em água corrente por 5 minutos. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas, realizado com o kit Novolink, durante 20 minutos a 37°C.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tab 1) em câmara úmida, por 18 horas a 4°C, após esse período foram lavadas em solução tampão de TRIS pH 7,4 (D5637 – Sigma Chemical CO), três vezes durante cinco minutos e incubadas com o anticorpo pós-primário do kit Novolink, por 30 minutos, em câmara úmida, a 37°, seguido de lavagem com solução tampão de TRIS (D5637 – Sigma Chemical CO), três vezes durante cinco minutos.

A detecção do sinal foi realizada com o polímero do kit Novolink, durante 30 minutos, em câmara úmida, a 37°, seguido de lavagem com TRIS três vezes por cinco minutos cada.

Para amplificação do sinal, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) do kit Novolink (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra). Os cortes foram corados com hematoxilina de Harrys e desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- Anti-CD79a (Dako): Anticorpo monoclonal humano que reconhece um polipeptídeo que faz parte do complexo receptor de antígeno dos linfócitos B.

- Anti-PAX5 (BDBiosciences): Anticorpo monoclonal humano que reconhece uma proteína ativadora específica de células B.

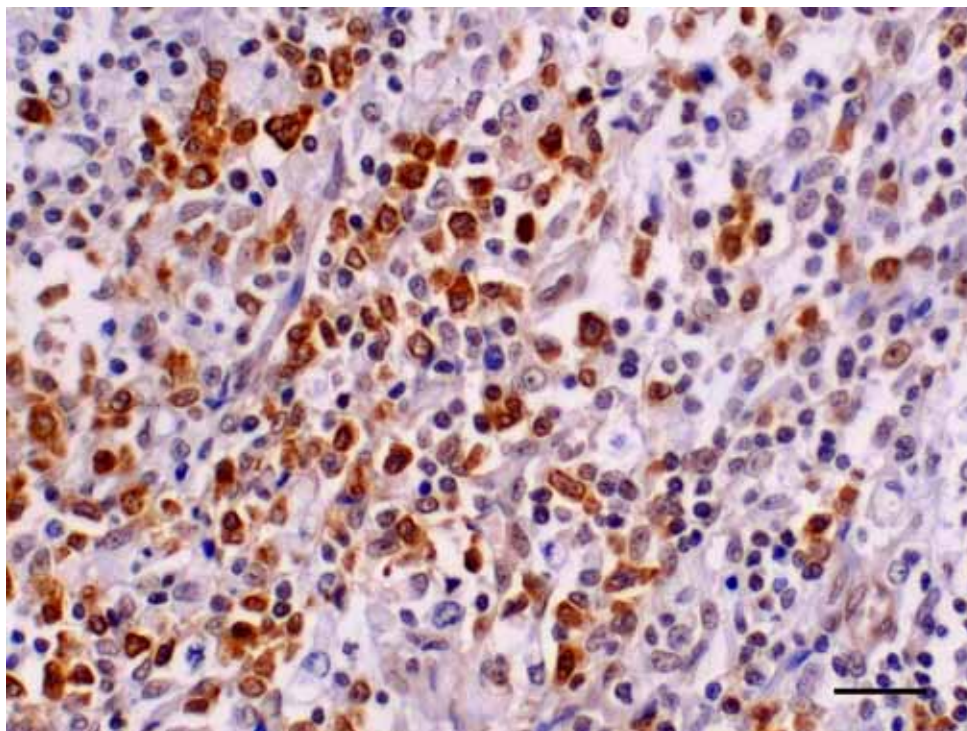
Tabela 1: Diluições para os anticorpos anti-CD79a e anti-PAX5.

Anticorpos			Clone	Diluição estabelecida
Anti	CD79a,	monoclonal	HM57	1:300
(Dako)				
Anti	PAX5,	monoclonal	24/Pax-5	1:1000
(BDBiosciences)				

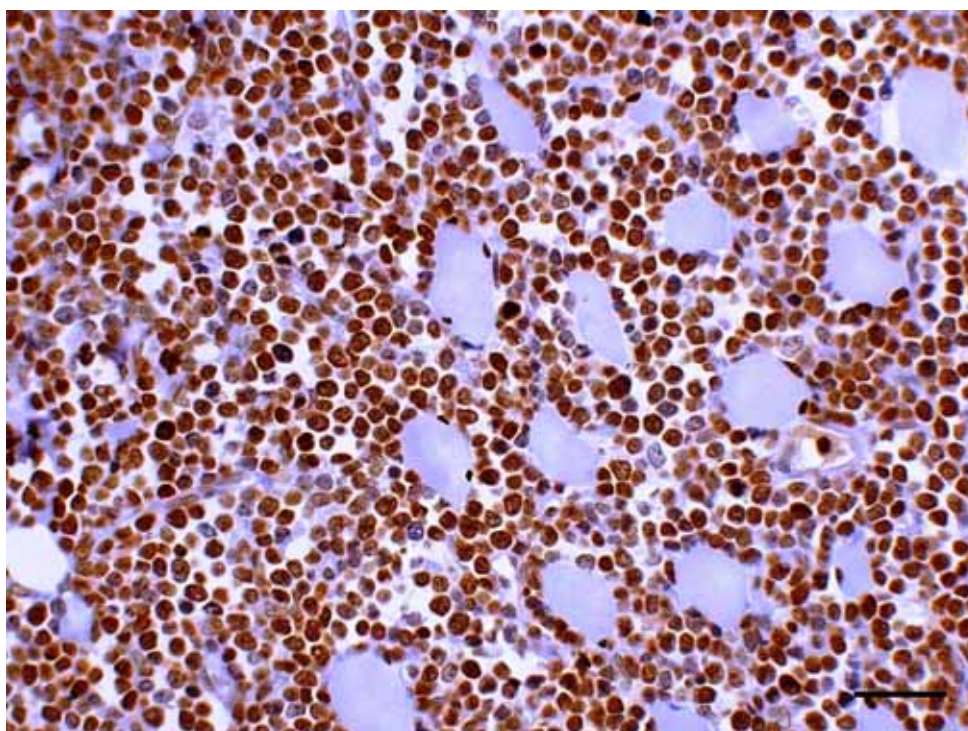
125

126 **Resultados e discussões**

127 O anticorpo anti-CD79a (Fig 1) apresentou marcação positiva em 16 casos,
128 enquanto que 18 casos apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-Pax5 (Fig
129 2, Tab 2).



130
131 **Figura 1:** LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o
132 anticorpo anti-CD79a, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR*
133 *50µm*.



134

Figura 17: LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B- Positividade para o anticorpo anti-PAX5, Novolink, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris *BAR* 50µm.

138

Tabela 2: Comparação entre os marcadores de linfoma B, anti-CD79a e anti-PAX5 nos 18 casos de linfoma B.

ANTICORPO	Nº DE CASOS	%
Anti-CD79a	16	89
Anti-PAX5	18	100

141

Os linfomas estão entre as neoplasias mais frequentes na espécie canina. Nos humanos, NHLs também são comuns e sua incidência tem aumentado nas últimas quatro décadas (FRIEDBERG et al., 2008).

Nos humanos e nos cães, os NHLs mostram características comuns (FOURNEL-FLEURY et al., 1997). O aumento no número de casos de linfoma nos seres humanos durante as últimas décadas torna o estudo comparativo entre as duas espécies de extrema importância, já que ambas compartilham o mesmo ambiente, o que torna o cão um sentinela biológico muito útil. Deve-se destacar ainda, que o ciclo de vida mais curto destes animais permite que se observem mais precocemente as possíveis modificações no comportamento dos linfomas ao longo dos próximos anos.

De acordo com a literatura veterinária, 60-80% dos linfomas em cães são de células B (TESKE et al., 1994; CANIATTI et al., 1996; FOURNEL-FLEURY et al., 1997; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

Quanto à marcação imunoistoquímica dos linfomas B, o anticorpo anti-CD79a apresentou marcação positiva em 16 casos (89%), enquanto que 18 casos (100%) apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-Pax5.

O Pax5 é uma proteína ativadora específica de células B (BSAP) e foi detectada por método imunoistoquímico em 100% dos linfomas caninos. A Pax5 é um membro da família dos fatores de transcrição. Nas células hematopoiéticas, a expressão do Pax5 é específica das células da linhagem B. Esta expressa em estágios iniciais do desenvolvimento das células B e permanece ativa nos estágios tardios do desenvolvimento das células B, mas esta ausente em nos estágios finais de diferenciação de células plasmocitoides (FOSS et al., 1999; HORCHER et al., 2001). Estudos em

humanos revelam claramente que a expressão de Pax5 é restrita aos linfomas de células B (KRENACS et al., 1998).

Willmann et al. (2009), em seu estudo comparou a marcação de Pax5 com o marcador CD79a. Neste estudo, a marcação nuclear de Pax5 foi de moderada a forte em 70 a 95% das células linfoides, não sendo observada marcação citoplasmática ou de membrana. Tal achado corrobora com o observado em nosso estudo, onde 100% dos linfomas foram positivos para Pax5, todos com marcação nuclear evidente.

Em outro estudo, as células neoplásicas revelaram marcação positiva nuclear com intensidade variando de moderada a forte em mais de 70% das células malignas em todos os casos avaliados (HERBECK et al., 2011).

Sendo assim, nos cães, as células dos linfomas B mostraram marcação nuclear consistente, acima do obtido com CD79a, constatando que o Pax5 serve como um marcador adicional de células B para os linfomas não-Hodgkin caninos.

178

179 **Conclusões**

Para os linfomas B caninos o anticorpo anti-PAX-5 mostrou-se mais eficiente como marcador do que o anticorpo anti-CD79a, devendo ser associado ao painel de imunofenotipagem.

183

184 **Agradecimentos**

Os autores agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro.

186 **Referências**

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

190

FOSS, H.D.; REUSCH, R.; DEMEL, G.; LENZ, G.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; HUMMEL, M.; STEIN, H. Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. **Blood.**, v. 94, p. 3108-3113, 1999.

195

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHARBANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Cytohistological

- 198 and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with
199 human non-Hodgkin's lymphomas. **J. Comp. Pathol.**, v.117, n.1, p. 35-59, 1997.
200
- 201 FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT,
202 C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOYTHOLLOT, I.; LEDIEU,
203 D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell Lymphoma: a morphological,
204 immunological, and clinical study of 46 new cases. **Vet. Pathol.**, v.32, p. 92-109, 2002.
205
- 206 FRIEDBERG, J.W.; MAUCH, P.M.; RIMSZA, L.M.; FISHER, R.I. Non-Hodgkin's
207 lymphomas. In: GALL, E.A.; MALLORY, T.B. Malignant lymphoma: A
208 clinicopathologic survey of 618 cases. **Am. J. Pathol.**, v.18, p.381-395, 1942.
209
- 210 HERBECK, R.; TEODORESCU BRINZEU, D.; GIUBELAN, M.; LAZAR, E.;
211 DEMA, A.; IONITA, H. B-cell transcription factors Pax-5, Oct-2, BOB.1, Bcl-6, and
212 MUM1 are useful markers for the diagnosis of nodular lymphocyte predominant
213 Hodgkin lymphoma. **Rom. J. morphol. Embryol.**, v.52, n.1, p. 69-74, 2011.
214
- 215 HORCHER, M.; SOUABNI, A.; BUSSLINGER, M. Pax5/BSAP maintains the identity
216 of B cells in late B lymphopoiesis. **Immunity**. v. 14, p. 779-790, 2001.
217
- 218 JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. **World Health**
219 **Organization Classification of Tumors- Pathology and Genetics of Tumours of**
220 **Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. IARC Press: Lyon, 2001. 351p.
221
- 222 KRENACS, L.; HIMMELMANN, A.W.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; FEST, T.;
223 RIVA, A.; WELLMANN, A.; BAGDI, E.; KEHRL, J.K.; JAFFE, E.S.; RAFFELD, M.
224 Transcription factor B-Cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed
225 in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. **Blood**, v.92, p.1308-1316, 1998.
226
- 227 O'MAHONY, O. H.; RILEY, A. CD20-negative follicular lymphoma. **Diagnostic**
228 **Histopathology**. v. 18, n. 10, p. 457-460, 2012.
229
- 230 PONCE, F.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P.; TURINELLI, V.; LEDIEU, D.;
231 BONNEFONT, C.; PASTOR, M.; DELIGNETTE, M. L.; FOURNEL-FLEURY, C. A

- 232 morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus
233 on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Vet.**
234 **Pathol.**, v.47, n.3, p. 414-433, 2010.
- 235
- 236 SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.;
237 STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. **WHO Classification of Tumours of**
238 **Haematopoietic and Lymphoid Tissues**, 4 ed. Lyon: IARC Press, 2008.
- 239
- 240 TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-
241 Hodgkin's lymphoma. **Vet. Q.**, v.16, p. .209-219, 1994.
- 242
- 243 TORLAKOVIC, E.; SLIPICEVIC, A.; ROBINSON, C.; DECOTEAU, J. F.; ALFSEN,
244 G. C.; VYBERG, M.; CHIBBAR, R.; FLØRENES, V. A. Pax-5 Expression in
245 Nonhematopoietic Tissues **American Journal of Clinical Pathology**. v. 126, n. 5,
246 p.798-804, 2006.
- 247
- 248 VAIL, D.M.; WITHROW, S.J. **Withrow & MacEwen's small animal clinical**
249 **oncology**. 4ed., St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap.31, p.699-769.
- 250
- 251 VALLI, V. E.; SAN MYINT, M.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.;
252 COLBATZLY, F.; DURHAM, A.; EHRHART, E. J.; JOHNSON, Y.; JONES, C.;
253 KIUPEL, M.; LABELLE, P.; LESTER, S.; MILLER, M.; MOORE, P.; MOROFF, S.;
254 ROCCABIANCA, P.; RAMOS-VARA, J.; ROSS, A.; SCASE, T.; TVEDTEN, H.;
255 VERNAU, W. Classification of canine malignant lymphomas according to the World
256 Health Organization Criteria. **Vet. Pathol.**, v.48, n.1, p. 198-211, 2011.
- 257
- 258 VALLI, V.E.; JACOBS, R.M.; PARODI, A.L.; VERNAU, W.; MOORE, P.F.; WHO
259 International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic
260 Animals. 2ed., **Armed Forced Institute of Pathology**, 190p, 2002.
- 261
- 262 WILLMANN, M.; MULLAUER, L.; GUIJA DE ARESPACOCCHAGA, A.;
263 REIFINGER, M.; MOSBERGER, I.; THALHAMMER, J. G. Pax5 immunostaining in
264 paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-

265 B and B-cell marker. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 359-
266 365, 2009.