

Luiz Fernando Jantzen Gaspar

**CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DO TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL CANINO CORRELACIONADA COM DANOS
CITOGENÉTICOS, TAXA DE PROLIFERAÇÃO E RESPOSTA
CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA**

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

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

Botucatu – SP

2005

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

Gaspar, Luiz Fernando Jantzen.

Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, índices de proliferação e resposta clínica à quimioterapia / Luiz Fernando Jantzen Gaspar. – 2005.

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

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Assunto CAPES: 50501062

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

CDD 636.7089665

Palavras-chave: AgNOR; CEC; Anomalias nucleares; Glicoproteína-p: Ki-67; Micronúcleos; Tumor venéreo transmissível

LUIZ FERNANDO JANTZEN GASPAR

**CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DO TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO CORRELACIONADA
COM DANOS CITOGENÉTICOS, TAXA DE PROLIFERAÇÃO E
RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

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

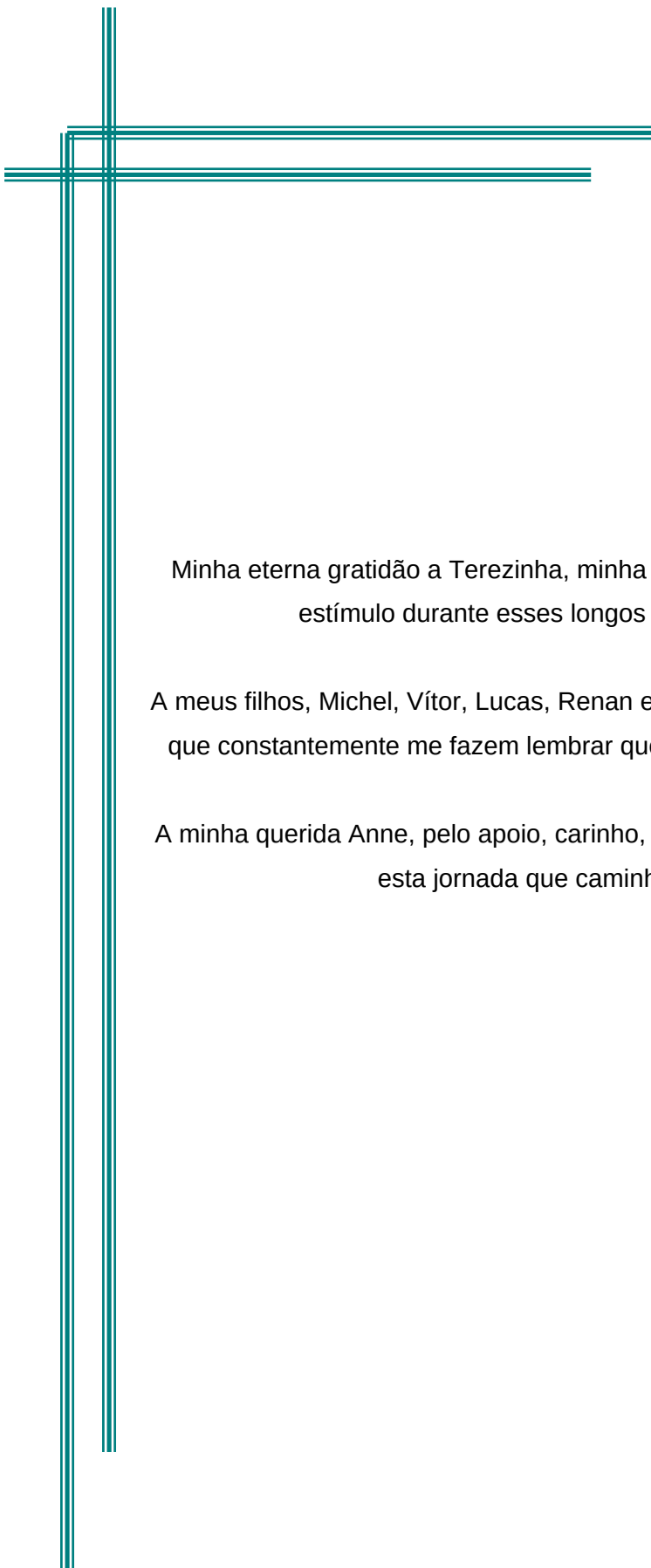
2º EXAMINADOR: Prof. Dr. Julio César Cambraia Veado, Escola de Medicina
Veterinária, UFMG

3º EXAMINADOR: Prof^a Dr^a Margarida Buss Raffi, Faculdade de Medicina
Veterinária, UFPEL

4º EXAMINADOR: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, IBB–UNESP

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

Botucatu, 28 de janeiro de 2005



Minha eterna gratidão a Terezinha, minha mãe, pelo esforço, dedicação e estímulo durante esses longos anos de minha vida.

A meus filhos, Michel, Vítor, Lucas, Renan e Gabriel, tesouros de minha vida, que constantemente me fazem lembrar que viver é eternamente aprender.

A minha querida Anne, pelo apoio, carinho, amizade e contribuições em mais esta jornada que caminhamos juntos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que esta presente em nossas vidas, a cada momento iluminando nossas mentes, compreendendo os nossos anseios e nos dando a necessária coragem para atingirmos os nossos objetivos.

À Prof^ª. Dr^ª. Noeme Souza Rocha, minha orientadora, pela confiança depositada, pelo exemplo de dedicação profissional e pessoal, sempre visando a ética e a idoneidade científica, pela orientação segura e considerações críticas que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Mello pela sua gentil recepção (UNICAMP), dirimindo dúvidas e propondo soluções.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Cotrim Sartor pelo assessoramento na padronização dos anticorpos e outras dúvidas pertinentes.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan pelas inúmeras contribuições prestadas para a padronização das técnicas de citoquímica e sugestões prestadas para o melhor desenvolvimento deste trabalho.

À Anne Santos do Amaral pela realização da técnica de imunocitoquímica e formatação do texto. A conclusão deste trabalho não seria possível sem a sua valiosa colaboração.

Ao Prof. Adalberto Crocci pelo assessoramento na elaboração das análises estatísticas.

Aos colegas Adriana, Sandra, Camila, Celmira, Flávia, Louisiane, Sara, Mércia, Edna Galega, Andréa Alice e Fábio, que através de incentivo e brincadeiras, tornaram agradável a realização das etapas deste trabalho.

Aos professores Julio e Renée, pelo apoio e amizade dispensados durante este período de convívio. Foi tão amistosa esta recepção que tive sensação de estar em meu pago, rodeado de gaúchos e prendas escutando: “Te aprocheiga pro mate tchê!”

Aos professores Regina e Raimundo, do Laboratório Clínico, pela utilização do equipamento de análise de imagens, e ao professor Reinaldo, do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biociência, pelo uso do fotomicroscópio.

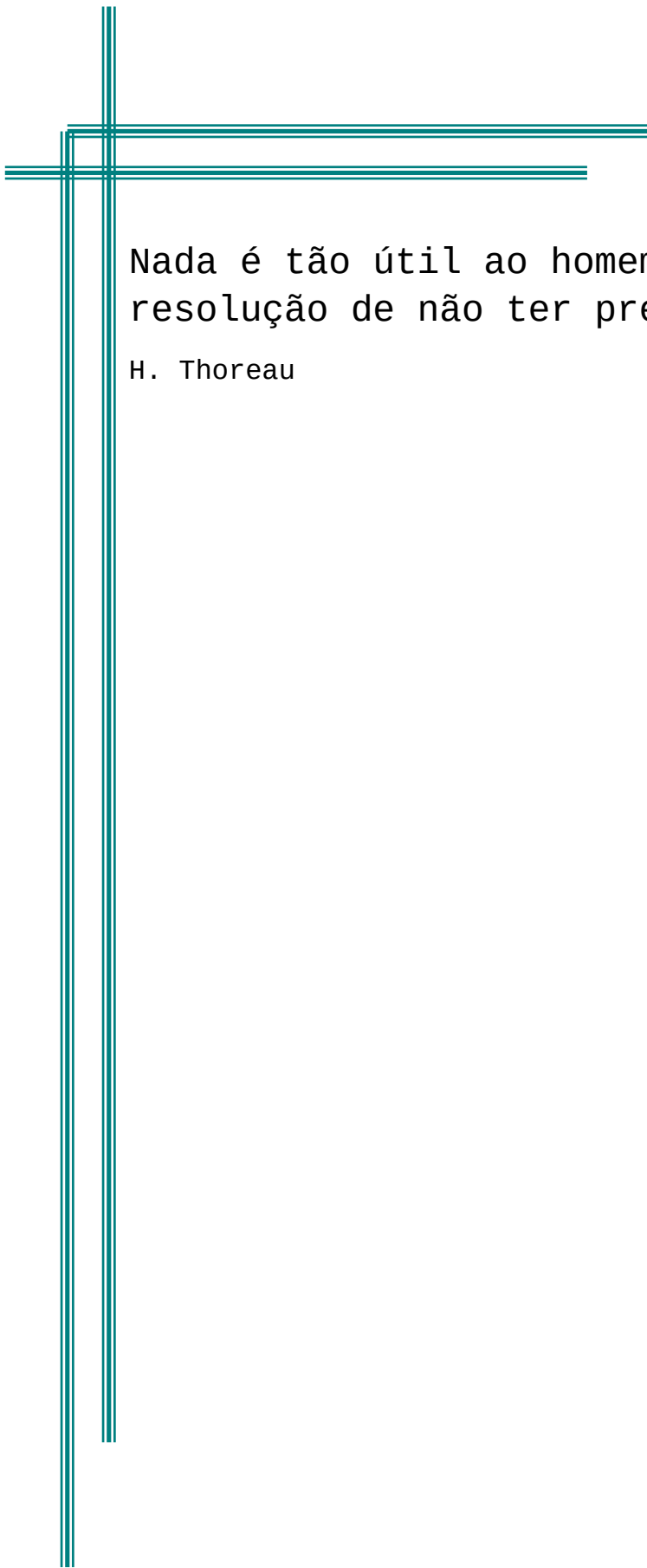
Aos residentes e ex-residentes da Patologia Veterinária, Celmira, Fábio, Camila, Marcela, Leandro e Arlete, pelo auxílio na colheita das amostras e pelo convívio fraterno.

Aos residentes e ex-residentes da Cirurgia de Pequenos Animais, pela compreensão e colaboração possibilitando o contato com os pacientes e seus proprietários.

Ao técnico Maury Raul pela sua presteza, disposição e amizade demonstradas durante convívio no Serviço de Patologia Veterinária.

À CAPES e a FAPESP, pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para realização deste projeto.



Nada é tão útil ao homem como a
resolução de não ter pressa.

H. Thoreau

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL	4
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA	5
2.1.2 BIOLOGIA CELULAR	6
2.1.3 SINAIS CLÍNICOS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	8
2.1.4 TRATAMENTO	11
2.1.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	12
2.2 BINUCLEAÇÃO E MULTINUCLEAÇÃO	16
2.3 MICRONUCLEAÇÃO E BROTAMENTO NUCLEAR	17
2.4 CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA	20
2.5 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	22
2.5.1 IMUNOCITOQUÍMICA	23
2.5.2 AGNOR	27
2.6 GLICOPROTEÍNA-P E RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA	37
3 MATERIAL E MÉTODO	43
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
3.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL	44
3.3.1 TÉCNICA DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS – CAAF	44
3.3.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL	45
3.3 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA	46
3.3.1 SELEÇÃO DO TIPO CITOMORFOLÓGICO.....	46
3.4 ANORMALIDADES NUCLEARES	47
3.4.1 CÉLULAS BINUCLEADAS, MULTINUCLEADAS E MICRONUCLEAÇÃO	48
3.4.2 BROTAMENTO E LOBULAÇÃO NUCLEAR	49
3.5 CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA (CEC) -	-
DISCRIMINAÇÃO DE NUCLÉOLOS INTERFÁSICOS	49
3.5.1 MORFOMETRIA NUCLEAR E NUCLEOLAR	50

3.6	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA	51
3.7	TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL	56
3.7.1	ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67	56
3.7.2	REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (AGNORS)	
	INTERFÁSICAS	56
3.7.2.1	Avaliação Qualitativa das AgNORS	56
3.7.2.2	Avaliação Quantitativa das AgNORS	58
3.8	AVALIAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA-P	60
3.9	RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA	61
3.10	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	62
4	RESULTADOS	64
4.1	CLASSIFICAÇÃO DO TIPO CELULAR E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO	64
4.2	ANORMALIDADES NUCLEARES	68
4.2.1	BINUCLEAÇÃO E MULTINUCLEAÇÃO	68
4.2.2	MICRONUCLEAÇÃO	70
4.2.3	BROTAMENTO E LOBULAÇÃO NUCLEAR	72
4.3	MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA	76
4.3.1	MORFOMETRIA NUCLEAR E NUCLEOLAR	76
4.4	AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL	80
4.4.1	MARCAÇÃO DO ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO KI-67	80
4.4.2	MARCAÇÃO DA REGIÃO ORGANIZADORA DO NÚCLEO INTERFÁSICO	83
4.4.2.1	Resposta à coloração	83
4.4.2.2	Parâmetros Qualitativos das AgNORS	86
4.4.2.3	Parâmetros Quantitativos das AgNORS	87
4.5	MARCAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA-P	94
4.6	RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA	99
5	DISCUSSÃO	102
5.1	BINUCLEAÇÃO E MULTINUCLEAÇÃO	102
5.2	BROTAMENTO E LOBULAÇÃO NUCLEAR	103
5.3	MICRONUCLEAÇÃO	105
5.4	MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA	106
5.5	TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL	109
5.5.1	ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO KI-67 (MIB-1)	109
5.5.2	COLORAÇÃO DAS AGNORS	112
5.5.3	ÁREA MÉDIA DE PONTOS AGNORS	114
5.5.4	ÁREAS MÉDIAS DAS AGNORS NUCLEARES E NUCLEOLARES	115
5.6	GLICOPROTEÍNA-P E RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA	117
6	CONCLUSÃO	123

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
Anexo A: Certificado de aprovação	136
Anexo B: Termo de consentimento para pesquisa	137
Anexo C: Protocolo semiológico	138
Anexo D: Ficha de avaliação citomorfológica	140
Anexo E: Dados gerais dos pacientes estudados	141

GASPAR, L.F.J. *Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia*. Botucatu, 2005. 164p. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

No presente trabalho foram avaliadas 152 massas neoplásicas de tumor venéreo transmissível procedentes do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP e do Biotério central da UNESP (campus Botucatu), no período de março de 2002 a setembro de 2004. As preparações citológicas foram coradas pelo método de Giemsa e, segundo critérios estabelecidos, foram divididos em três tipos citomorfológicos: linfocitóide, misto e plasmocitóide. Posteriormente, foram reagrupadas de acordo com comportamento biológico em primárias e não primárias. O objetivo foi identificar e comparar anormalidades nucleares (binucleação, multinucleação, brotamento, lobulação e micronucleação), avaliar parâmetros citomorfométricos através da técnica da CEC (concentração eletrolítica crítica), determinar a taxa de proliferação mediante a imunomarcação com o Ki-67 (MIB-1) e com a quantificação das AgNORs, observar a expressão da glicoproteína-p, avaliar a resposta clínica à quimioterapia, bem como, relacionar esta resposta com a expressão de glicoproteína-p. Foi observada maior frequência das lobulações nucleares no tipo plasmocitóide. A área do nucléolo e a relação nucléolo/núcleo foram maiores nas massas primárias. O Ki-67 (MIB-1) apresentou maior taxa de marcação (positividade) no tipo plasmocitóide e nas neoplasias não primárias. A média de pontos das AgNORs foi maior no tipo linfocitóide em relação aos outros dois tipos. O tipo plasmocitóide e o grupo das neoplasias não primárias tiveram um percentual de marcação da glicoproteína-p maior em relação aos outros grupos. Os tumores do grupo plasmocitóide tiveram um maior percentual de resposta parcial à terapia do que os outros grupos, enquanto os tipos linfocitóide tiveram um maior percentual de resposta completa. Os casos com resposta clínica parcial à quimioterapia apresentaram um percentual de marcação de glicoproteína-p maior do que os de resposta clínica completa. Considerando os tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, pode-se concluir que os tumores do tipo plasmocitóide apresentam mais lobulações nucleares (quebras de DNA), têm maior atividade proliferativa (Ki-67), expressam maior percentual

de marcação da glicoproteína-p, conferindo resistência tumoral e respondem menos a quimioterapia protocolar.

GASPAR, L.F.J. *Cytomorphological characterization of canine transmissible venereal tumor correlated with cytogenetical damage, proliferative indices, and clinical response to chemotherapy*. Botucatu, 2005. 164p. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In this study were evaluated 137 neoplastic masses of transmissible venereal tumor from clinical attendance at the Veterinary Hospital and Central biotery of UNESP (Botucatu campus), between March 2002 and September 2004. The cytological samples were stained by the Giemsa method and, by preestablished criteria, divided into three cytomorphological patterns: lymphocyte-like, plasma cell-like and mixed. Then, They were regrouped by biological behavior as primary or non-primary (metastatic or recurrent). The aim of the present work was to identify and compare nuclear abnormalities occurrence (binucleation, multinucleation, nuclear buds, nuclear lobulation and micronucleation), to evaluate cytomorphometric parameters by the critical electrolyte concentration (CEC) technique, to determinate proliferation ratio by immunoreaction with Ki-67 (MIB-1) antibody and AgNOR quantification. Additionally, the immunolabelling with *p*-glycoprotein antibody, and the clinical response to chemotherapy, were evaluated and correlated. The results showed a higher frequency of nuclear lobulation in the plasma-cell-like pattern. The nucleolus area and nucleolus: nucleus ratio were greater in primary masses. The proliferative index measured by Ki-67 immunocytochemistry was most elevated in the plasma-cell-like and not primary tumors. The AgNOR point average was highest in lymphocyte-like patterns. The expression of *p*-glycoprotein was highest in plasma-cell-like and non-primary masses than in the others. Similarly, the plasma-cell-like group showed a larger partial response to chemotherapy than the other two patterns, although the lymphocyte-like group presented the largest percentage of complete response. The association between *p*-glycoprotein expression and clinical response revealed that with the partial response had greater *p*-glycoprotein expressions than the total response ones. With respect to cytomorphological patterns of transmissible venereal tumor, we concluded that plasma-cell-like cells

presents more nuclear lobulations (DNA damage), have a highest proliferative activity (expressed by Ki-67 labelling), and express more *p*-glycoprotein, which provides chemotherapy resistance and lesser response to conventional protocols.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Tumor venéreo transmissível canino de morfologia linfocitóide (1A - seta) e plasmocitóide (1B).	47
FIGURA 2	– Tumor venéreo transmissível – critérios morfológicos: A : binucleação; B : multinucleação; C : micronucleação; D : brotamentos nucleares; E : lobulações nucleares (criado por Amaral, 2004).	48
FIGURA 3	– Aspecto macroscópico do tumor venéreo transmissível genital observado em fêmeas (A) e em machos (B).	65
FIGURA 4	– Tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, expressos em percentual.	66
FIGURA 5	– Características citomorfológicas do tumor venéreo transmissível: A : padrão linfocitóide; B : padrão plasmocitóide; C : padrão misto. Barra: 20µm.	67
FIGURA 6	– Tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, de acordo com o comportamento biológico.	68
FIGURA 7	– Tumor venéreo transmissível: A : célula binucleada no centro do campo; B : célula multinucleada com moldamento entre os núcleos. Giemsa, barra: 10µm.	69
FIGURA 8	– Células de tumor venéreo transmissível apresentando micronucleação (setas). A : Shorr; B , C , D : Giemsa. Barra: 10µm.	70
FIGURA 9	– Frequência (%) de micronucleação em amostras dos diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	71
FIGURA 10	– Percentual de células com micronucleação em amostras dos três grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	72
FIGURA 11	– Anormalidades nucleares do tumor venéreo transmissível: A . brotamento nuclear (setas); B . lobulação nuclear. Giemsa, barra: 10µm.	73
FIGURA 12	– Lobulações nucleares nos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide do tumor venéreo transmissível.	74
FIGURA 13	– Frequência de anormalidades nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	75

FIGURA 14 – Preparado citológico corado pela técnica de concentração eletrolítica crítica evidenciando intensa marcação do nucléolo (cabeça de seta). Barra: 20µm.	76
FIGURA 15 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) das áreas nucleolares nas amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	79
FIGURA 16 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da relação nucléolo/núcleo em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	80
FIGURA 17 – Amostras imunomarcadas pelo antígeno Ki-67 em amostras do tumor venéreo transmissível: A. marcação nuclear fraca; B: marcação nuclear forte (contra-coloração com verde de metila; barra: 20µm).	81
FIGURA 18 – Marcação do Ki-67 (MIB-1) em amostras de tumor venéreo transmissível dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide.	82
FIGURA 19 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da marcação do Ki-67 nas amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário	83
FIGURA 20 – Amostra citológica de tumor venéreo transmissível corado pela técnica da prata coloidal sem tratamento prévio com Triton X-100. Observar pobre delimitação das AgNORs; barra: 20µm.....	84
FIGURA 21 – Amostras citológicas de tumor venéreo transmissível corados pela técnica da prata coloidal: A: marcação nucleolar; B: marcação nucleolar e nuclear; C: marcação de brotamentos nucleolares; D: marcação com múltiplos nucléolos. Barra: 10µm..	85
FIGURA 22 – Padrão de distribuição das AgNORs (SHIRO <i>et al.</i> 1993): A. tipo 1 (AgNORs nucleolares); B. tipo 2 (AgNORs nucleolares e nucleares). Barra: 10µm..	87
FIGURA 23 – Médias e desvio padrões dos pontos de AgNORs por nucléolo em amostras de tumor venéreo transmissível de diferentes tipos citomorfológicos.	90
FIGURA 24 – Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da área dos pontos das AgNORs nucleolares em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	92
FIGURA 25 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da área das AgNORs nucleolares, nucleares e da célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	93

FIGURA 26 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) do número de pontos das AgNORs no núcleo e na célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	94
FIGURA 27 – Cortes histológicos de fígado canino imunocorados com anticorpo anti-glicoproteína-p (controle positivo). Barra: 20 μ m.	95
FIGURA 28 – Amostras citológicas imunocoradas com anticorpo anti-glicoproteína-p mostrando a marcação de citoplasma e membrana (barra: 10 μ m).	96
FIGURA 29 – Percentual de casos imunomarcados pela glicoproteína-p em amostras dos três diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	97
FIGURA 30 – Marcação da glicoproteína-p em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível primário e não primário..	98
FIGURA 31 – Resposta clínica de acordo como tipo citomorfológico do tumor venéreo transmissível.	100
FIGURA 32 – Percentual de casos de tumor venéreo transmissível positivos para glicoproteína-p relacionado com resposta clínica à quimioterapia.	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Anticorpos anti-Ki-67 e antiglicoproteína- <i>p</i> utilizados para a técnica de imunocitoquímica no tumor venéreo transmissível canino.	53
TABELA 2	– Indicadores avaliados nas AgNORS.	60
TABELA 3	– Número de amostras e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados.	64
TABELA 4	– Número (<i>n</i>) e percentagem (%) de células que apresentaram um núcleo ou mais de um núcleo em amostras citológicas do tumor venéreo transmissível nos diferentes grupos morfológicos.	69
TABELA 5	– Número de casos, mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência de células com micronucleação em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos três grupos citomorfológicos.	71
TABELA 6	– Número de células (<i>n</i>), mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência dos brotamentos nucleares em amostras dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide do tumor venéreo transmissível.	73
TABELA 7	– Número de células (<i>n</i>), mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência de lobulações nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide.	74
TABELA 8	– Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência de anormalidades nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	75
TABELA 9	– Médias e desvios padrões das áreas nuclear e nucleolar, da relação nucléolo/núcleo e número de nucléolos pelo método de CEC em amostras dos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	77
TABELA 10	– Médias e desvios padrões dos índices de circunferência nuclear e diâmetro nucleares e nucleolares pelo método de CEC em amostras nos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.....	78

TABELA 11 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) das medidas nucleares e nucleolares em amostras das neoplasias primárias e não primárias do tumor venéreo transmissível.	79
TABELA 12 – Número de células (n), medianas e percentis (P_{25} : P_{75}), médias e desvios padrões da marcação do Ki-67 (MIB-1) em amostras de tumor venéreo transmissível dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide.	82
TABELA 13 – Padrão de distribuição das AgNORs nos diferentes tipos citomorfológicos de amostras do tumor venéreo transmissível, segundo SHIRO <i>et al.</i> (1993).	86
TABELA 14 – Comparação das médias e desvios padrões das áreas de pontos de AgNORs por nucléolo, núcleo e total por célula em amostras dos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	88
TABELA 15 – Comparação das médias e desvios padrões das áreas das AgNORs por nucléolo, núcleo e área total por célula de amostras nos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	89
TABELA 16 – Comparação das médias e desvios padrões do número de pontos de AgNORs por nucléolo, núcleo e total por célula, em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos diferentes tipos citomorfológicos.	90
TABELA 17 – Medianas e percentis da área dos pontos das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	91
TABELA 18 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) das áreas das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	92
TABELA 19 – Valores medianos e percentis (P_{25} : P_{75}) do número de pontos das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.	93
TABELA 20 – Número de casos (n) e percentagem (%) de marcação da glicoproteína-p em amostras dos diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	97
TABELA 21 – Percentagem de marcação da glicoproteína-p em amostras de neoplasias primárias e não primárias no tumor venéreo transmissível.	98
TABELA 22 – Resposta clínica à quimioterapia entre os diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.	99

TABELA 23 – Distribuição do percentual de marcação da glicoproteína em relação à resposta clínica à quimioterapia nos animais com tumor venéreo transmissível.	101
--	-----

1 - INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma das neoplasias mais freqüentes em cães, no Brasil. Comprovando este fato, foi observado que entre o período de setembro de 2000 e agosto de 2001, dos 863 exames citológicos realizados pelo Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário de Botucatu, 72 casos tiveram o diagnóstico de TVT, numa média de seis novos casos por mês. Além disso, o comportamento agressivo de alguns tumores e o aumento na freqüência de diagnóstico de TVT com morfologia plasmocitóide apresenta um perfil diferente das descrições encontradas na literatura internacional.

Associado a estas modificações citomorfológicas, foi descrito por BOSCO *et al.* (1999) que tumores antigos não respondem à quimioterapia. A resistência à quimioterapia é um grande obstáculo no tratamento de pacientes com câncer. Esta resistência pode ser uma propriedade intrínseca das células tumorais (MORAL *et al.*, 1995) ou ser adquirida por uma população de células neoplásicas que foram sensibilizadas inicialmente por quimioterapia. A ação da glicoproteína-p é um dos mecanismos clássicos de resistência a múltiplas drogas, atribuída à mutação ou amplificação gênica (MAIA & RUMJANEK, 2004).

O TVT é um enigma biológico (GIMENO *et al.*, 1995). Baseado na sua morfologia, as células de TVT têm sido classificadas

como linfócitos, histiócitos, células reticulares ou células reticuloendoteliais maduras. A natureza incerta das células neoplásicas de TVT tem sido tema de controvérsia por décadas e ainda permanece como questão não resolvida (COHEN, 1985).

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

As similaridades observadas entre o TVT canino e o sarcoma de Kaposi, de alta incidência entre pacientes com AIDS e que também parece ter uma transmissão venérea por implante de células (RECHAVI *et al.*, 1991), faz do TVT um excelente modelo experimental para esta patologia humana. Por se tratar de um tumor reproduzível experimentalmente, pode ser mantido por várias gerações, inalteradamente, possibilitando o estudo de fenômenos relacionados à carcinogênese em uma espécie muito mais próxima à humana do que os roedores.

Com base nestas considerações, o presente trabalho teve como objetivo:

- caracterizar as diferentes morfologias celulares observadas no tumor venéreo transmissível;
- correlacionar a morfologia celular com a frequência de anormalidades nucleares;

- pesquisar a taxa de crescimento da neoplasia utilizando antígeno Ki-67 (clone MIB-1), regiões organizadoras nucleolares argentofílicas (AgNORs) e concentração crítica de eletrólitos (CEC), nas diferentes morfologias celulares;
- determinar a expressão de glicoproteína-*p* em relação à morfologia celular;
- correlacionar a morfologia das células de TVT com o padrão de agressividade do tumor e resposta clínica à quimioterapia, possibilitando, futuramente, antecipar tratamentos adequados com o diagnóstico citopatológico precoce.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia contagiosa e sexualmente transmissível que, em condições naturais, afeta somente caninos (ROGERS, 1997).

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

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

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

O TVT possui distribuição mundial, mas parece ser mais prevalente em regiões urbanas de clima temperado (COHEN, 1985; ROGERS,

1997). Estudo realizado por HAYES *et al.* (1983) evidenciou forte correlação positiva entre a prevalência de TVT e temperatura média anual e aumento de chuvas, e correlação inversa com a latitude. Ainda que a prevalência exata do TVT não seja conhecida em muitos países, esta neoplasia já foi diagnosticada nos cinco continentes, incluindo Canadá (MIKAELIAN *et al.*, 1998), Estados Unidos (FOWLER *et al.*, 1997; ROGERS *et al.*, 1998), México (SALINAS & CRUZ, 1995; CRUZ *et al.*, 1997), Grã-Bretanha (BOOTH, 1994), Espanha (PÉREZ *et al.*, 1994), Portugal (FERREIRA *et al.*, 2000), Grécia (BOSCOS *et al.*, 1999), Turquia (ERÜNAL-MARAL, 2000); Quênia (NDIRITU *et al.*, 1977), Nigéria (AMBER & ADEYANJU, 1986), Tanzânia (BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991), Papua Nova Guiné (HAMIR, 1986), Israel (COHEN *et al.*, 1978), Índia (GANDOTRA *et al.*, 1993; AYYAPPAN *et al.*, 1994), entre vários outros. No Brasil, o TVT é uma das neoplasias mais freqüentes em cães (SOBRAL *et al.*, 1998).

Ainda que a maioria dos estudos sobre o TVT de ocorrência natural não mostre clara predisposição sexual (ROGERS *et al.*, 1998), SOBRAL *et al.* (1998) reportaram maior prevalência entre fêmeas, enquanto VARASCHIN *et al.* (2001) relataram maior prevalência entre machos. O tumor ocorre mais comumente em cães sexualmente ativos, devido ao modo de transmissão, mas não parece haver predisposição racial (ROGERS, 1997). A neoplasia é diagnosticada mais freqüentemente em cães sem raça definida (SALINA & CRUZ, 1995; ROGERS *et al.*, 1998; SOBRAL *et al.*, 1998), em parte refletindo uma maior população de cães mestiços, mas também o baixo controle de cruzamentos e o fácil acesso à rua pelos animais acometidos (SOBRAL *et al.*, 1998). Tem-se observado que o TVT é mais prevalente em áreas cuja população de cães de rua é abundante (COHEN, 1985; BOOTH, 1994).

2.1.2 BIOLOGIA CELULAR

O tumor é transmitido pela implantação de células tumorais viáveis nas mucosas, especialmente se existem abrasões ou perda da integridade da superfície (COHEN, 1985). As características do coito dos cães permitem contato prolongado e a formação de escoriações na mucosa genital, tornando a cópula um modo muito eficiente de transmissão (ROGERS, 1997). Além do contato genital, o TVT também pode ser transmitido por hábitos sociais como farejar e lambe, o que explica os casos primários extragenitais nas mucosas nasal, oral e conjuntival (KROGER *et al.*, 1991; PÉREZ *et al.*, 1994). Muitas similaridades têm sido apontadas entre o TVT e o sarcoma de Kaposi, que afeta o homem, com relação ao modo de transmissão (HAYES *et al.*, 1983; RECHAVI *et al.*, 1991), sugerindo que o TVT possa ser usado como modelo experimental para o estudo desta neoplasia humana.

O tipo celular exato de origem do TVT não é conhecido. Ele tem sido definido histologicamente como um tumor indiferenciado de células redondas, provavelmente de origem reticuloendotelial (COHEN, 1985; MACEWEN, 1996). Estudos com técnicas de imunoistoquímica têm apontado para origem mesenquimal e histiocítica (TINUCCI-COSTA, 1999).

A infectividade do TVT sugere causa viral, mas a inoculação de filtrados livres de células não produz crescimento tumoral; os poucos autores que alegaram resultado positivo tiveram sua metodologia questionada (COHEN, 1985). Da mesma forma, nenhuma evidência reproduzível de oncogene viral foi demonstrada (ROGERS, 1997).

Estudos citogenéticos fortalecem a idéia de transmissão por transplante de células. O cariótipo canino normal é 78 cromossomos, dos quais 76 são acrocêntricos; TVTs de vários locais do mundo possuem número de cromossomos estável ao redor de 59 (varia de 57 a 64), sendo 16 metacêntricos

e 43 acrocêntricos (MACEWEN, 1996; HASLER & WEBER, 2000). Entretanto, o número de braços cromossômicos e a quantidade de DNA das células de TVT são iguais aos das células caninas normais (COHEN, 1978). As aberrações cromossômicas constantes e muito específicas, como o rearranjo da sequência LINE/*c-myc*, idêntico em todos os tumores (AMARIGLIO *et al.*, 1991), sugerem que os casos de TVT em diferentes locais geográficos provavelmente se desenvolveram a partir de uma origem comum e têm sido transmitidos continuamente como aloenxertos (ROGERS, 1997). Estudos com antígenos de histocompatibilidade demonstraram que o TVT não é composto por células do hospedeiro modificadas, e sim por um transplante celular (COHEN, 1985).

Além da transmissão natural, o TVT pode ser induzido em cães adultos e imunocompetentes pela inoculação subcutânea de células tumorais vivas (OTOMO *et al.*, 1981), mesmo para locais não genitais (COHEN, 1978). No transplante experimental, o curso clínico varia da regressão espontânea à disseminação metastática, dependendo da resposta imune montada contra o tumor (COHEN, 1985). Em cães filhotes, o crescimento é rápido, chegando a 5mm de diâmetro uma semana após a inoculação (YANG, 1987). A maioria dos tumores regride dentro de seis meses; nesses animais não é observada recorrência (COHEN, 1985). O transplante experimental de TVT para chacais e coiotes já foi relatado (COCKRILL & BEASLEY, 1979).

O TVT é antigênico para os cães; a regressão é seguida por imunidade. Resposta imune humoral contra o TVT foi descrita (YANG & PALKER, 1991). Anticorpos IgG anti-TVT podem ser detectados no soro na maioria dos animais com o tumor, seja qual for o estágio da doença (ROGERS, 1997). Estudos sugerem que os anticorpos anti-TVT são direcionados contra os antígenos de histocompatibilidade principal tipo II (MHC-II), já que as células do

TVT não apresentam β_2 -microglobulina de superfície, o que é necessário para expressão dos antígenos do MHC classe I (COHEN *et al.*, 1984).

A demonstração de que a transferência passiva de soro imune induz a regressão tumoral sugere que mecanismos dependentes de anticorpos estão envolvidos na regressão (COHEN, 1985). Entretanto, a recidiva de TVT em casos de ocorrência natural demonstra que a imunidade não é duradoura, já que BOSCOS *et al.* (1999) observaram casos de recorrência após dois anos do diagnóstico inicial.

2.1.3 SINAIS CLÍNICOS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

O TVT de ocorrência natural geralmente se desenvolve na genitália externa (OTOMO *et al.*, 1981). Em machos, os tumores são verificados no pênis ou no prepúcio e, nas fêmeas, a vagina, o vestíbulo e a junção vestibulovaginal são os locais primários de implantação (HASLER & WEBER, 2000). O tamanho dos TVT vaginais pode variar desde 0,5cm até massas com mais de 10cm de diâmetro, geralmente com aspecto de couve-flor, friáveis e de cor avermelhada (MACEWEN, 1996). Nos machos, secreção prepucial serossanguinolenta é a apresentação mais comum, sendo necessária a exposição do pênis para a visualização da massa. Conforme a localização, a massa tumoral pode levar à obliteração parcial da uretra e ser um fator predisponente para a infecção bacteriana do trato urinário (BATAMUZI & KRISTENSEN, 1996). O tumor pode ser sésil ou pedunculado e, por ser friável, sangra facilmente, o que em geral é a causa da consulta veterinária (WEIR *et al.*, 1978; BOOTH, 1994). A superfície do tumor ulcera e inflama com facilidade (SALINAS & CRUZ, 1995). O estado geral do paciente não costuma estar comprometido (RODRIGUES *et al.*, 2001).

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

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

Também foram reportadas a ocorrência de TVT na cavidade nasal, cavidade oral, pele e mucosa conjuntival, acompanhada ou não do envolvimento genital, provavelmente como conseqüência de comportamentos sociais (COHEN, 1985; AMBER & ADEYANJU, 1986; PÉREZ *et al.*, 1994; GINEL *et al.*, 1995). Não pode ser descartada a possibilidade de auto-infecção por lambedura do tumor genital (BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; FOWLER *et al.*, 1997). Os sinais clínicos associados ao TVT nasal são dispnéia, respiração estertorosa, espirros, epistaxe e deformação da face (WEIR *et al.*, 1978; AMBER & ADEYANJU, 1986; PÉREZ *et al.*, 1994).

A presença de metástases e implantes do TVT de ocorrência natural surge numa taxa estimada entre 1,5 a 6% (FERREIRA *et al.*, 2000). Os locais comuns são os linfonodos inguinais e ilíacos (NDIRITU *et al.*, 1977; YANG, 1987; ROGERS *et al.*, 1998), fígado, baço (HAMIR, 1985; KROGER *et al.*, 1991), pele (KROGER *et al.*, 1991; AYYAPPAN *et al.*, 1994; GUEDES *et al.*,

1996; BOSCOS *et al.*, 1999), língua (NDIRITU *et al.*, 1977), faringe (NDIRITU *et al.*, 1977), cérebro (KROGER *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 2000), adeno-hipófise (MANNING & MARTIN, 1970), olhos (MILLER *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2001), músculos (KROGER *et al.* 1991) e, ainda, mucosa anal e região perineal (BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991). Em muitos casos pode haver a extensão do tumor vaginal até cérvix e útero (YANG, 1987) ou do TVT nasal até seios maxilares e faringe (HAMIR, 1985).

A regressão espontânea é bem documentada em casos de TVT experimental, mas o mesmo não é visto como rotina nos atendimentos clínicos reportados (COHEN, 1985; BOOTH, 1994), nem nos pacientes do Hospital Veterinário da Unesp-Botucatu ou do Hospital de Clínica Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, RS (dados não publicados). Ainda que a regressão espontânea nos casos de ocorrência natural tenha sido reportada por HIGGINS (1966), numerosos estudos clínicos controlados não têm registrado a regressão espontânea do tumor (BOOTH, 1994). Além disso, a presença crônica de tumores por até quatro anos se opõe francamente à teoria da regressão espontânea (BOSCOS *et al.*, 1999).

2.1.4 TRATAMENTO

Como a regressão espontânea não é esperada em casos naturais, a terapia sempre deve ser recomendada. Independente do potencial maligno desta neoplasia, o TVT é singular por sua responsividade a uma variedade de tratamentos (ROGERS, 1997). A exérese cirúrgica dos tumores foi durante muito tempo o tratamento preconizado, mas a localização pouco acessível e a dificuldade em delimitar os bordos do tumor resultam em alta taxa de recorrência (DASS & SAHAY, 1989), que pode variar de 20 a 60%, dependendo da localização e extensão da doença (MACEWEN, 1996). O

sucesso no uso de crioterapia para o tratamento de um cão com TVT genital também foi reportado (RICKARDS, 1983), embora seja pouco prática em algumas localizações anatômicas. A terapia de radiação é extremamente efetiva em casos de tumores solitários ou resistentes à quimioterapia, mas implica na necessidade do equipamento especializado (ROGERS *et al.*, 1998).

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

2.1.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

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

descreveram três tipos de células neoplásicas de TVT no exame histológico: redondas, ovais ou poliédricas.

As características ultra-estruturais das células do TVT incluem núcleo redondo a oval, com membranas nucleares freqüentemente invaginadas por extensões citoplasmáticas, cromatina nuclear homogênea, nucléolo volumoso e proeminente (COCKRILL & BEASLEY, 1975). No citoplasma, os ribossomos se encontram livres ou como polissomos e com distribuição irregular; as mitocôndrias encontram-se agrupadas e são redondas a ovais e com raras cristas e o complexo de Golgi é pouco desenvolvido (OTOMO *et al.*, 1981). A superfície celular apresenta um arranjo característico de projeções citoplasmáticas (WEIR *et al.*, 1978; OTOMO *et al.*, 1981; AMBER *et al.*, 1985). AMBER *et al.* (1985) descreveram a presença de partículas icosaédricas, eletrodensas e de tamanho uniforme, confinadas ao citoplasma de células de TVT degeneradas ou necróticas, que eles supuseram ser partículas virais. Até o momento, nenhuma característica ultra-estrutural específica foi identificada, mas os achados são consistentes com um tumor linforreticular (ROGERS, 1997).

A avaliação citológica de lesões superficiais é ferramenta extremamente útil que pode ser realizada com rapidez e facilidade, de baixo custo e com risco mínimo (COWEL & TYLER, 1989). A eficácia da citologia aspirativa por agulha fina para o diagnóstico de neoplasias ou lesões inflamatórias é de 90% (ROCHA, 1998). Preparações citológicas obtidas por aspiração com agulha fina ou por impressão das massas são excelentes métodos para o diagnóstico do TVT (WRIGHT & PARRY, 1989; KROGER *et al.*, 1991). Este deve ser o método de escolha para o diagnóstico de suspeitas de TVT, pois é uma técnica simples, minimamente invasiva e indolor e, além disso, produz menos distorção da morfologia celular do que as amostras de biópsia fixadas por formaldeído (KROGER *et al.*, 1991; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000).

Observações semelhantes já haviam sido feitas por DALECK *et al.* (1987b), comparando diferentes métodos diagnósticos do TVT.

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

COWEL & TYLER (1989) afirmaram que a citologia pode auxiliar na estimativa do potencial maligno de uma neoplasia. Eles salientam que a presença de três ou mais critérios de malignidade, especialmente nucleares, em muitas células do tecido são consideradas altamente significativas de neoplasia maligna. Alguns dos critérios de malignidade mais comumente vistos são macrocariose, multinucleação, nucléolos grandes ou angulares, padrão de cromatina grosseiro, basofilia citoplasmática, vacuolização e presença de mitoses normais ou anormais. Muitas destas características são apresentadas pelas células do TVT, o que faz deste tumor uma neoplasia maligna, apesar da boa resposta observada à quimioterapia e radioterapia.

A citologia também pode ser um auxiliar durante o ato cirúrgico (ROCHA *et al.*, 2001). A citologia esfoliativa tem sido usada durante a cirurgia de exérese do TVT para confirmar a efetiva remoção das células tumorais, obtendo redução na recorrência local do tumor de 22% para apenas 8% (BATAMUZI & KESSY, 1993).

As amostras citológicas de TVT são geralmente muito celulares e contêm células redondas ou ovais, que variam entre 14 e 30 μ de diâmetro, e bordos citoplasmáticos bem delimitados. O núcleo, redondo ou oval, é frequentemente excêntrico, de tamanho variável, com cromatina grosseiramente

granular e com um ou dois nucléolos proeminentes (WELLMAN, 1989). A relação núcleo:citoplasma é relativamente alta (BOSCOS *et al.*, 1999). O citoplasma é discretamente basofílico e com vacúolos distintos (WELLMAN, 1989). Estes vacúolos são múltiplos, pequenos e claros (ROGERS, 1997) e geralmente acompanham o bordo celular (KROGER *et al.*, 1991; ERÜNALMARAL *et al.*, 2000). A presença de figuras mitóticas e células inflamatórias é outra característica celular desta neoplasia (ROGERS, 1997). Anisocitose e anisocariose são observadas (WRIGHT & PARRY, 1989), bem como eventual basofilia citoplasmática, hipercromasia nuclear e macrocariose (ERÜNALMARAL *et al.*, 2000). VARASCHIN *et al.* (2001) registraram que TVTs malignos apresentam citoplasma abundante.

Tem-se notado, entretanto, diferenças na morfologia celular em alguns casos de TVT. A principal diferença é a ausência dos vacúolos citoplasmáticos (ROGERS, 1997) e a presença de células maiores e ovóides em relação à morfologia típica das células de TVT (BOSCOS *et al.*, 1999); muitas vezes o aspecto das células pode variar entre o tumor primário e a metástase (ROGERS, 1997; BOSCOS *et al.*, 1999), ou ser atípico em casos de tumores antigos (BOSCOS *et al.*, 1999).

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

2.2 BINUCLEAÇÃO E MULTINUCLEAÇÃO

A binucleação e a multinucleação podem resultar da divisão celular sem a ocorrência subsequente da citocinese (MEINKOTH & COWELL, 2002), fusão de células mononucleares (KAMEL, 1990) e da divisão mitótica de uma célula binucleada pré-existente (MIRANDA, 1996). O fenômeno pode ocorrer, com frequência, nas neoplasias e nas infecções virais. Nas neoplasias a ocorrência de células multinucleadas pode ser devido à falha nos mecanismos de regulação da divisão celular ou pela falta de uma coordenação adequada entre a cariocinese e a citocinese (BHATTATHIRI, 2001). O significado do aparecimento dessa estrutura ainda não é bem compreendido, mas tem sido sugerido um possível mecanismo compensatório para manter o balanço genético em certa população ou é um estado transicional para a poliploidia. Ainda segundo RODILLA (1993), trabalhando com vários tipos celulares de mamíferos, a formação de células binucleadas seria o primeiro passo para altos níveis de ploidia e isso poderia ter um importante papel na transformação maligna. Para DENICOLA & REAGAN (1998), células com múltiplos núcleos de vários tamanhos, incluindo os micronúcleos, são evidências de divisão anormal com desigual distribuição de cromatina nuclear, portanto, características de malignidade celular.

As várias anormalidades nucleares induzidas por radiação podem estar relacionadas com o local e a causa do dano que levou à morte celular mitótica. O micronúcleo é devido a dano cromossômico que conduz à perda de material genético. A divisão celular é iniciada e controlada por centríolos e matriz pericentriolar. A multinucleação poderá ocorrer se houver dano ou interferência com o funcionamento dos centríolos, matriz pericentriolar ou membrana celular. Experimentos mostraram que irradiação do citoplasma resulta em dano do centríolo, conduzindo à multinucleação celular. O dano da

matriz pericentriolar determina uma mitose multipolar com conseqüente multinucleação. Se a lesão induzida pela radiação for severa, haverá um bloqueio da citocinese resultando na formação de célula binucleada, quando então, a divisão de um ou ambos núcleos poderá gerar uma multinucleação (BHATTATHIRI *et al.*, 1998).

2.3 MICRONUCLEAÇÃO E BROTAMENTO NUCLEAR

Micronúcleos (MN) são corpúsculos de cromatina envolvidos por uma membrana nuclear, localizados próximos ao núcleo principal e morfologicamente indistinguíveis deste, exceto pelo seu menor tamanho. São originados de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não foram incorporados ao núcleo das células-filhas durante a mitose (TOLBERT *et al.*, 1992), sendo, portanto, visualizados somente em células que sofreram danos no DNA e completaram pelo menos um ciclo de divisão. A frequência de MN é dependente da proporção de células em divisão e diminui após as células passarem por mais de uma divisão após a indução de lesão no DNA (FENECH & MORLEY, 1985a,b).

Os mecanismos que levam à formação de micronúcleos e de outras figuras interfásicas são: perda de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros, a inativação do cinetócoro, a formação de ponte cromossômica forte, como conseqüência de um entrelaçamento de cromossomos, ou ainda a apoptose com subseqüente fagocitose (HEDDLE *et al.*, 1991).

Os acúmulos de anormalidades estruturais e numéricas em células eucarióticas são coordenados pelos reparos nos *checkpoints* do ciclo celular. As mutações dos genes envolvidos nesta transação ocorrem comumente durante a progressão do câncer e podem elevar a frequência das alterações e

dos rearranjos cromossômicos em grande escala. Defeitos nos pontos de controle do ciclo celular, envolvendo o gene supressor p53 criam um ambiente favorável, no qual as células aneuplóides, as translocações cromossômicas e as amplificações gênicas surgem com frequência elevada em resposta ao estresse criado por antimetabólitos ou superexpressão oncogênica (DENKO *et al.* 1994).

A aneuploidia é definida como a ocorrência de alterações numéricas de cromossomos em células somáticas ou germinativas, que apresentam desvio do estado diplóide ou haplóide. Durante a divisão celular, a fidelidade da replicação cromossômica e a segregação dos cromossomos para as células-filhas são processos dependentes do funcionamento de uma variedade de organelas celulares e de atividades que incluem a síntese de proteínas do fuso nuclear e movimento dos cromossomos sobre o aparelho do fuso mitótico. O funcionamento incorreto destes mecanismos pode induzir a alterações do genoma, com perda ou ganho de cromossomos durante a segregação ou a formação de aberrações cromossômicas (HARTWELL & KASTAN, 1994). Nas células tumorais a aneuploidia ocorre também por deleção de material genômico, amplificação cromossômica de alguns oncogenes ou ainda por *double minutes* extracromossômicos, que são fragmentos de DNA acêntricos com seqüências gênicas amplificadas (NOWELL, 1994; FENECH & CROTT, 2002; BINDU *et al.*, 2003). Estruturas cromossomais aberrantes com braços muito longos tendem a gerar projeções nucleares chamadas de brotos (PEDEUTOUR *et al.*, 1994). Seqüências cromossômicas encerradas em tais projeções são freqüentemente encontradas no micronúcleo (PEDEUTOUR *et al.*, 1994), as quais podem ser perdidas do núcleo.

SHIMIZU *et al.* (1998) propuseram um novo mecanismo de micronucleação que envolve a formação de projeções nucleares (brotos nucleares) durante a fase S e se associam seletivamente com *double minutes*.

Os autores acreditam que o processo de formação de *double minutes* esteja associado à eliminação de oncogenes amplificados de células neoplásicas (FENECH, 2003). É sugerido que o núcleo tenha a capacidade de “sentir” o excesso de DNA dentro da matriz nuclear, encaminhando ativamente para a periferia o acúmulo de DNA amplificado. Este material amplificado, excluído para o citoplasma, originará o micronúcleo que, por sua vez, poderá ser eliminado com uma pequena quantidade de citoplasma, formando uma mini-célula (FENECH & CROTT, 2002).

A formação de MN em células eucarióticas é um parâmetro importante para a avaliação de danos cromossômicos ou erros de segregação (GEARD & CHEN, 1990).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que as células com MN desaparecem da população de células em divisão. Muito pouco se sabe sobre esse mecanismo, mas isso pode ocorrer devido à perda de material genético (micronúcleo), quando então as células deixam de possuir produtos gênicos essenciais (CARRANO & HEDDLE, 1973), ou pela toxicidade que reduz a viabilidade das células danificadas (DAHL *et al.*, 1976; BRADLAW & CHRISTIAN, 1985). As células com micronúcleos grandes ou múltiplos podem ser eliminadas mais rapidamente, devido à grande quantidade de danos no material genético (CHANNARAYAPPA *et al.*, 1992).

Para identificar a relação entre a radiosensibilidade do câncer oral e a indução de micronucleação, brotamento nuclear e multinucleação, BHATTATHIRI *et al.* (1998) avaliaram um seriado citológico durante sessões de radioterapia. O resultado da pesquisa mostrou que houve um aumento das anormalidades nucleares de acordo com a intensidade da radiação no tratamento. Este fato demonstrou que o seriado das anormalidades nucleares,

durante a radioterapia, foi potencialmente útil como preditivo da radiosensibilidade.

2.4 CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA

SCOTT (1960), baseado em estudos da composição das glicosaminoglicanas ácidas em matriz celular animal com azul de alcian, propôs o conceito de concentração eletrolítica crítica (CEC), objetivando a identificação de diferentes compostos aniônicos nessa matriz. Conforme o mesmo, a CEC é a concentração específica de cátions inorgânicos na qual a alcianofilia de determinado substrato é abolida. Quando corados com soluções contendo cátions inorgânicos, devido à matriz extracelular, passam a exibir uma diminuição de intensidade de coloração, decorrente da concentração dos íons inorgânicos na solução corante. Isto ocorre em consequência da competição entre moléculas do corante com os cátions inorgânicos nos sítios aniônicos disponíveis no substrato (SCOTT, 1973).

A técnica de CEC foi adaptada por VIDAL & MELLO (1989) e MELLO & VIDAL (1989) para estudos de mudanças na composição e estruturas de complexos nucleoprotéicos *in vitro* e *in situ*. Esses autores utilizaram como cátion inorgânico o Mg^{2+} e como corante catiônico o azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine em pH 4. Com este grau de acidez as moléculas deste corante se ligam eletrostaticamente a grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA (não ligados a proteínas) resultando em basofilia nuclear.

A basofilia nuclear é considerada metacromática para a coloração com azul de toluidina, quando as moléculas deste corante se unem a grupos aniônicos disponíveis em determinados substratos em grande número e muito próximos, ocorrendo a composição de dímeros, trímeros e tetrâmeros por

sobreposição das moléculas de azul de toluidina. Com a sobreposição das moléculas do corante, ocorre um deslocamento do pico no espectro de absorção de valores de 630 nm (nanômetros) para picos de comprimento de onda de 540 nm, que são mais curtos (VIDAL & MELLO, 1989; MELLO & VIDAL, 1989).

Desta maneira, a concentração de Mg^{2+} na qual é abolida a metacromasia do DNA ou do RNA num complexo nucleoprotéico é considerado como ponto de concentração eletrolítica crítica (VIDAL & MELLO, 1989). Considerando que no ponto da CEC de DNA em complexos DNA-proteínas a sua metacromasia é abolida, enquanto a metacromasia do RNA em complexos RNA-proteínas é mantida, MELLO *et al.* (1993) propuseram uma técnica variante de CEC para a visualização de nucléolos, a qual foi estendida para estudos de relocação de metacromasia de RNA durante a mitose (MELLO, 1995) e visualização de células apoptóticas (VIDAL *et al.*, 1996).

Em geral, células em proliferação ou metabolicamente ativas têm nucléolos mais proeminentes e em maior número (KAMEL *et al.*, 1989). O tamanho, forma e textura do núcleo de células tumorais também são registradas como características importantes no diagnóstico e classificação de determinadas neoplasias (BARBISAN *et al.*, 1998). Para TAJIMA (1991) a morfometria nucleolar também é importante para determinação do prognóstico e estagiamento do câncer de mama.

2.5 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O estudo de proliferação tem fornecido importantes informações em relação ao entendimento do crescimento dos diferentes tecidos e, especialmente, aos crescimentos neoplásicos, demonstrando valor diagnóstico e prognóstico em distintas neoplasias. A descoberta de proteínas e

co-fatores que modulam as transições G1/S e G2/M e a transcrição do material genético permitiu que as células durante o ciclo pudessem ser detectadas mesmo fora da fase de mitose (MADEWELL, 2001).

Os métodos de estudo da proliferação celular podem basear-se na quantificação da medida de DNA nuclear (citometria de fluxo). Esta técnica identifica células em G0/G1, S e G2/M; entretanto, não pode fazer a distinção das células em G0/G1 daquelas em G2/M. Além disso, a população celular, durante esta técnica, pode ser perdida, diminuída ou a distinção entre as células normais das neoplásicas estar dificultada. Outros métodos têm a grande vantagem de medir a atividade proliferativa, sem que haja perda de integridade celular, o que possibilita a análise citológica simultânea do material. Portanto, a contagem das figuras mitóticas permite, além do estudo proliferativo, a análise morfológica. O aumento da atividade mitótica é um achado freqüente em tumores agressivos, entretanto, não é um método padrão e apresenta baixa reprodutibilidade, mesmo que a variação entre observadores possa ser eliminada (QUIN & WRIGHT, 1990; ABADIE *et al.*, 1999).

Já o método de detecção de proliferação, baseado na incorporação de substâncias marcadas no DNA durante a fase S, como a timidina tritiada e a bromodeoxiuridina, requer a prévia exposição das células ao precursor marcado (QUIN & WRIGHT, 1990).

2.5.1 IMUNOCITOQUÍMICA

Atualmente, a detecção de antígenos relacionados com o ciclo celular, por meio de anticorpos monoclonais, tem-se mostrado uma valiosa ferramenta no auxílio ao diagnóstico, permitindo avaliações precisas do índice de proliferação. Trata-se de uma técnica relativamente simples, sem riscos para o paciente e compatível com outros métodos (GALAND & DEGRAEF, 1989). Entre

os anticorpos monoclonais que mais vêm se destacando em determinar a cinética celular estão os anticorpos anti-PCNA e Ki-67. De fato, são marcadores de proliferação celular que podem ser úteis na avaliação do comportamento biológico da neoplasia e, conseqüentemente, dar informações a respeito da sensibilidade a regimes quimioterápicos (QUINN & WRIGHT, 1990).

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal assim designado por ter sido produzido na universidade de Kiel (Alemanha) sendo que o clone produtor de anticorpo específico para este antígeno foi crescido na 67^a placa de cultura de tecido.

A natureza do antígeno reconhecido pelo anticorpo Ki-67 não está completamente estabelecida. Recentes estudos sugerem que este antígeno seja um componente da matriz nuclear e tem sido caracterizado como uma proteína não histona de peso molecular aproximado de 345 a 395 Kd (GERDES *et al.*, 1991; ABADIE *et al.*, 1999; PLATZ *et al.*, 1999). É expresso durante todo ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas sua expressão gênica aumenta na segunda metade da fase S, alcançando o máximo em G2 e M (SASAKI *et al.*, 1987; QUINN & WRIGHT *et al.*, 1990; LÖHR *et al.*, 1997; KIUPEL *et al.*, 1999; PLATZ *et al.*, 1999) e rapidamente diminui após a mitose, sendo, desta forma, um excelente indicador de proliferação, estando ausente apenas nas células em G1 precoce e G0 (QUINN & WRIGHT *et al.*, 1990; ABADIE *et al.*, 1999). As taxas de avaliação do índice de proliferação celular usando anticorpos monoclonais encontrados comercialmente contra o antígeno Ki-67, como marcador, são compatíveis com aquelas dos métodos tradicionais (RABENHORST *et al.*, 1994).

Recentemente, utilizando partes recombinantes do antígeno Ki-67, como imunógeno, foram produzidos novos anticorpos monoclonais, denominados MIB-1-2-3. Enquanto os MIB 1 e 3 detectam o mesmo epítopo que o anticorpo original Ki-67, o MIB-2 difere claramente desta especificidade (KEY *et*

al., 1993). Estudos que compararam resultados obtidos com diferentes marcadores de proliferação celular na imunoistoquímica mostraram que o MIB-1 ou Ki-67 são mais adequados que o PCNA para o uso na rotina (SCHMITT & FERREIRA *et al.*, 1995). Assim, o MIB-1 tem-se mostrado um marcador de proliferação celular útil e confiável nos diferentes tecidos.

LAPRIE *et al.* (1998) descreveram a detecção imunoistoquímica da proliferação do Ki-67 associado ao epítipo nuclear com uso do anticorpo monoclonal MIB-1 em cortes histológicos de nove cães. Foram considerados três parâmetros: a localização das células expressando o epítipo de Ki-67, a característica citológica da expressão do Ki-67 e a atividade proliferativa de alguns tecidos medidos pela média do índice de proliferação. Como resultado foi observado que o anticorpo MIB-1 reagiu com o núcleo de células proliferativas, como em humanos. Já o índice de proliferação não foi representativo. Este estudo serviu como base para a expressão de antígeno Ki-67 em compartimentos proliferativos de tecidos normais, permitindo a aplicação, como marcador de proliferação, na rotina da histopatologia veterinária.

Outro estudo sobre cinética celular de tumores foi o de ABADIE *et al.* (1999) que procuraram determinar se a detecção imunoistoquímica do antígeno nuclear de proliferação (PCNA) e o Ki-67 apresentaram correlação com o prognóstico em caninos com mastocitoma. A imunorreatividade do Ki-67 foi limitada ao núcleo, preenchendo o nucléolo e ao redor dele, mas com variável imunocoloração do nucleoplasma. A maioria dos tumores teve uma distribuição homogênea das células positivas do Ki-67. O resultado sugeriu que, para cães com mastocitoma cutâneo solitário, um determinado número de células positivas de Ki-67 foi útil para traçar o prognóstico.

De acordo com ZUCCARI *et al.* (2004), os tumores mamários em caninos são um desafio para os clínicos e patologistas, por causa da sua

classificação histológica complexa, baixa especificidade do diagnóstico citológico e comportamento biológico de prognóstico incerto. Estes pesquisadores, trabalhando com impressão de neoplasia mamária, observaram que o índice de proliferação avaliado com Ki-67 foi significativamente baixo nos tumores benignos em relação aos malignos. Um alto índice de Ki-67 foi positivamente correlacionado com metástases, morte pela neoplasia, baixa taxa de sobrevivência livre da doença e de sobrevida. Portanto, o valor prognóstico do índice do Ki-67 em tumores mamários, na citologia, foi semelhante ao previamente observado em espécimes histológicos. A detecção imunoistoquímica do Ki-67 melhorou a acurácia e o valor da citologia, promovendo uma rápida e segura informação sobre a malignidade da neoplasia.

Em um estudo retrospectivo, 33 pacientes com câncer de pulmão e metástases foram submetidos a investigações histoquímicas, imunoistoquímicas e citomorfométricas. Variáveis clínicas foram examinadas para diferenciar a frequência dos subtipos histológicos, volume nuclear, índice mitótico, área das AgNORs e Ki-67 nos subgrupos de pacientes com tumor primário e metástases. No que se refere a imunomarcagem do Ki-67, mesmo não havendo diferença estatística entre os tumores primários e as metástases, o índice de marcação do Ki-67 foi maior nas metástases que nos tumores primários (MATHEUS, 2004).

Estudando proliferação celular e apoptose em cortes histológicos de cães com histiocitoma e tumor venéreo transmissível, GUVENC *et al.* (2002), constataram que os valores do anticorpo Ki-67 tiveram um intervalo de marcação de 5 a 26% de células imunopositivas. O número médio de células imunorreativas foi de 17 ($\pm 2,1751$). Este estudo confirmou que a imunorreatividade do Ki-67, com o clone MIB-1, foi fácil de padronizar e que o MIB-1 é um útil marcador para rápida determinação de tumores proliferativos.

GONZÁLEZ *et al.* (2000), estudando índice de proliferação em espécimes citológicos e histológicos de TVT antes e durante a quimioterapia com sulfato de vincristina, observaram que a imunocoloração para o antígeno de proliferação Ki-67 revelou uma alta proporção de células imunorreativas nos tumores em progressão, contudo somente uma pequena proporção de células expressou Ki-67 durante a regressão pela quimioterapia.

2.5.2 AgNOR

Outro indicador de proliferação de células neoplásicas é a frequência das AgNORs. As regiões organizadoras nucleolares (NOR) são alças de DNA que ocorrem no nucléolo das células e possuem genes RNA ribossomais (DERENZINI *et al.*, 1994). Os genes RNA ribossomais têm um importante papel na síntese protéica, crescimento celular, diferenciação celular e transformação maligna (EGAN & CROCKER, 1988). O número de NORs reflete a atividade proliferativa da célula: quanto mais alta a frequência de NORs, maior a atividade proliferativa celular (DERENZINI *et al.*, 1994).

As NORs podem ser facilmente demonstradas pela sua íntima associação com proteínas que contêm grande número de ligações dissulfídicas, as quais se ligam a íons prata (HARMELIN *et al.*, 1995). A técnica de coloração pela prata permite a enumeração dos pontos nucleares, chamados AgNORs (VAIL *et al.*, 1996). Entretanto, embora apresente resultados com baixa probabilidade de erro (SANTOS *et al.*, 1998), a contagem visual das AgNORs é tediosa, com risco de variações causadas pelas condições de observação; neste contexto, a análise de imagens digitalizadas pode facilitar e padronizar a contagem das AgNORs (DESTEXHE *et al.*, 1995).

Para a avaliação das imagens AgNORs positivas digitalizadas é necessário o emprego de uma técnica de coloração adequada. Esta técnica é

altamente específica e pode ser utilizada em tecidos fixados em formol e embebidos na parafina, frescos ou de arquivo, em tecidos congelados, esfregaços citológicos e preparados citocentrifugados (CROCKER, 1989).

As técnicas de coloração das AgNORs compreendiam duas etapas: a primeira correspondia à impregnação com nitrato de prata; a segunda era caracterizada pela revelação com um agente revelador (amônia ou ácido fórmico). Durante a etapa de revelação os depósitos de prata agiam como núcleos para maior crescimento dos depósitos de íon prata, devido à presença do revelador na solução (DERENZINI & PLOTON, 1991).

HOWELL & BLACK (1980) modificaram o protocolo anterior, fazendo a coloração numa única etapa. Eles utilizaram o revelador acrescido de um protetor coloidal (gelatina), a qual evitava a redução intensa da prata. A coloração era realizada a 70°C durante 2 minutos.

Por sua vez, PLOTON *et al.* (1986), utilizando o protocolo de etapa única, aumentaram o tempo de coloração para um intervalo entre 14 e 20 minutos à temperatura ambiente. A simplicidade da técnica e a reprodutibilidade deste protocolo resultaram na técnica mais usada atualmente. Entretanto, existem fatores que influenciam a especificidade da coloração, tais como formação de precipitados inespecíficos, que é um problema freqüente, a fixação adequada do material, o tempo e a temperatura da coloração e, finalmente, o pH das soluções.

Estudos recentes têm proposto uma variante para o método de AgNORs, no qual um tratamento com Triton X-100 foi utilizado antes da coloração com a prata, evitando precipitado inespecífico do fundo e facilitando a visualização, mais claramente, das áreas das AgNORs positivas e facilitando a análise de imagens. O Triton X-100, na presença de glicerol, tem induzido a

solubilização de algumas proteínas citoplasmáticas (VIDAL *et al.*, 1994; VIDAL & MELLO, 1995).

Outra variante, adotada por CHU *et al.* (2001), foi a coloração de cortes histológicos na qual as lâminas eram colocadas em bandejas de coloração invertida, dispostas com a face do material voltada para baixo. Desta maneira, o corante era depositado em baixo das lâminas, evitando, pela ação da gravidade, o depósito inespecífico de prata.

Para avaliar quantitativamente as AgNORs, dois métodos são empregados: o método direto de contagem de pontos das AgNORs por núcleo, ao microscópio de luz com a objetiva de 100x e o método de contagem pelo sistema analisador automático de imagens.

A contagem direta é altamente subjetiva, gasta muito tempo e apresenta alta probabilidade de erro (AUBELE *et al.*, 1994; ÖFNER & SCHMID, 1996). Para facilitar a contagem, CROCKER *et al.* (1989) sugeriram o emprego de um filtro colorido (verde), para diminuir as alterações cromáticas e destacar os limites das AgNORs.

O método de contagem pelo analisador automático de imagens (morfometria) é caracterizado pela precisão, reprodutibilidade e capacidade para medir a área total das AgNORs por núcleo e por nucléolo (DERENZINI & TRERÈ, 1991a; AUBELE *et al.*, 1994; RÜSCHOFF *et al.*, 1994; VIDAL *et al.*, 1994). A avaliação das AgNORs através deste método foi proposta pelo comitê das AgNORs, por ser mais objetivo e superar as dificuldades do método direto (ÖFNER & SHMID, 1996).

O padrão de distribuição dos componentes ribonucleoprotéicos no núcleo varia e é influenciado pela própria distribuição espacial da cromatina ribossômica. Visto que a cromatina ribossômica estendida está distribuída

uniformemente nas NORs durante a interfase, foi possível concluir que os padrões nucleolares sejam determinados por diversas distribuições das AgNORs na interfase (DERENZINI & TRERÈ, 1991b).

De acordo com RÜSCHOFF *et al.* (1994) a morfometria computadorizada das AgNORs exige um equipamento caro, geralmente não disponível para diagnóstico de rotina. A contagem direta também varia significativamente entre os observadores. Desta maneira, os autores propõem a análise dos padrões de distribuição em vez da simples quantificação, para facilitar o estudo direto das NORs.

CROCKER *et al.* (1989) foram os primeiros a propor um padrão de distribuição das AgNORs como ferramenta para avaliar aspectos proliferativos de uma neoplasia. Os padrões criados seriam: tipo 1 (AgNORs agrupadas formando uma única estrutura [nucléolo]); tipo 2 (observadas no interior de diferentes nucléolos); tipo 3 (AgNORs pequenas e distribuídas por todo núcleo), geralmente em células malignas. Já SHIRO *et al.* (1993) utilizaram uma diferente classificação de distribuição das AgNORs na avaliação da correlação entre AgNORs e padrão histológico em carcinoma hepatocelular. No padrão tipo 1 as AgNORs apresentam-se como pontos escuros ou marrons, de tamanho diferente, com limites bem definidos e localizadas no interior dos nucléolos e, no padrão tipo 2, as AgNORs nucleolares são acompanhadas de pontos sem limites definidos e dispersos pelo núcleo (SHIRO *et al.*, 1993).

O nucléolo é a organela mais destacada no núcleo de uma célula interfásica, que pode ser considerado a expressão morfológica da transcrição e processamento do rRNA. O nucléolo representa a estrutura complexa, formada por frações de DNA, ocupada pelos genes RNA, as quais associam-se a proteínas para processamento, compactação e formação final de partículas pré-ribossômicas. Numa seqüência, o nucléolo é uma organela com

alças de DNA que emergem de vários cromossomos, cada um dos quais contém um agrupamento de genes rRNA; cada agrupamento representa uma NOR (PLOTON, 1994).

Em situações adversas, como uma grande privação de proteína na dieta, pode ocorrer a formação de um brotamento no nucléolo dos neurônios. Segundo MANOCHA & SHARMA, (1978), a privação de proteína induz a cromatólise citoplasmática e uma pronunciada mudança no nucléolo, tal como aumento de tamanho, atividade secretora e transferência de material nucleolar para o citoplasma. O broto apresenta um agregado de proteínas e ribossomos que estão passando para o citoplasma, os quais ajudam na síntese de proteínas específicas perdidas, como um processo catabólico iniciado pela deficiência de proteína.

Conforme GOESSENS (1984), numa micrografia eletrônica típica do nucléolo podem ser distinguidos pelo menos cinco componentes: o centro fibrilar, o fibrilar denso, o granuloso, o interstício nucleolar, a cromatina nucleolar. A região do centro fibrilar é composta de pequenas quantidades de DNA e de proteínas AgNORs. O componente fibrilar denso é composto de fibras associadas à região do centro fibrilar que contém moléculas de pré-RNA (AgNORs positivo), e pequenas quantidades de proteínas associadas às NORs (DERENZINI & TRERÈ, 1994).

A impregnação com os depósitos de prata permite a visualização dos componentes dos centros fibrilares na interfase, os quais representam a contrapartida das NORs na metáfase (DERENZINI & TRERÈ, 1994).

Para a demonstração das NORs, a técnica pressupõe a propriedade das proteínas argirofílicas associar-se aos sítios de cromatina ribossômica, onde é inicializada a produção dos grânulos ribossômicos

(PLOTON, 1994). O emprego de diversas técnicas tem permitido a identificação de diferentes proteínas AgNORs positivas. Entre elas destaca-se a RNA polimerase I que é uma enzima obrigatória para a transcrição gênica do rRNA em moléculas de rRNA e está localizada na região do centro fibrilar. A topoisomerase I é outra proteína importante, porém localizada na região fibrilar densa, que atua na redução da tensão da fita de DNA permitindo a leitura pela RNA polimerase (DERENZINI & PLOTON, 1991).

A proteína C₂₃ (nucleolina) é a fosfoproteína mais importante e de maior expressão na fase de máximo crescimento celular. Está associada ao processamento do pré-RNA. A proteína B₂₃ (numatrina) também participa da biossíntese ribossomal, e foi uma das primeiras fosfoproteínas identificadas como associadas às NORs (DERENZINI & PLOTON, 1991).

A técnica de coloração pela prata não cora genes ribossomais. Na realidade, somente proteínas relacionadas aos genes ribossomais, que estão localizadas nas NORs em atividade transcricional, são impregnadas pela prata (DERENZINI & PLOTON, 1991).

As NORs estão localizadas na região do centro fibrilar dos nucléolos durante a interfase e são a contrapartida das NORs na metáfase dos cromossomos acrocêntricos. Sendo assim, as AgNORs da interfase correspondem às AgNORs na metáfase. Na metáfase as NORs (rRNA) correspondem às constrições secundárias dos cromossomos. Em humanos, estão localizados nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22). Nos caninos as NORs metafásicas foram identificadas por Kopp *et al.* apud HARMELIN *et al.* (1995) nas regiões teloméricas dos cromossomos 7, 8, 27 e algumas vezes no 38.

O aumento de tamanho, com formas e coloração irregular são algumas alterações morfológicas no nucléolo de células neoplásicas, contudo

não são confiáveis para a diferenciação entre células benignas e malignas. A possibilidade de avaliar alterações morfológicas do nucléolo, medindo o tamanho, distribuição e quantidade das AgNORs revelou-se útil para diferenciar neoplasias benignas e malignas (AUBELE *et al.*, 1994). No entanto, a determinação das AgNORs nem sempre tem valor diagnóstico e prognóstico, pois em algumas neoplasias de mama, tireóide, endométrio e intraepiteliais do colo do útero, não se verificam diferenças significativas entre lesões benignas e malignas (DERENZINI & TRERÈ, 1994). Entretanto, a maior parte dos trabalhos mostrou que a determinação do número das AgNORs em células malignas foi superior ao número das AgNORs nas benignas ou normais.

Apesar da potencial aplicação do método AgNOR como ferramenta diagnóstica ser controverso, estudos têm mostrado sua utilidade na distinção entre certas lesões malignas e benignas (DESTEXHE *et al.*, 1995; HARMELIN *et al.*, 1995). KARADEMIR *et al.* (1998) reportaram que os índices das AgNORs são úteis para determinar a atividade proliferativa do TVT e HARMELIN *et al.* (1995) afirmaram que a medida das AgNORs pode ser útil na avaliação do comportamento biológico e prognóstico do TVT.

Durante o ciclo celular, ocorre um aumento progressivo da área nucleolar e do número de AgNORs durante a passagem da fase G1 para a fase S (interfase). Comparando a presença das AgNORs com outros marcadores de proliferação (Ki-67, PCNA, timidina e bromodeoxiuridina) encontrou-se uma correlação estreita entre a quantidade de AgNOR e a razão de duplicação celular. Da mesma forma, existe uma correlação positiva entre AgNORs e o tempo potencial de duplicação da população de células neoplásicas. Os resultados destas pesquisas constituem a base para assinalar a proliferação celular como causa diretamente relacionada com as variações dos parâmetros AgNORs (DERENZINI & TRERÈ, 1994; RÜSCHOFF *et al.*, 1994).

PREZIOSI *et al.* (1995), estudaram a atividade proliferativa de adenocarcinomas, adenomas e hiperplasia de glândula perianal em caninos, através de dois métodos de contagem das AgNORs: o direto e o automático (análise de imagens). Estes autores observaram que três índices (número de AgNORs/núcleo, área relativa e total das AgNORs) permitiram categorizar as lesões de acordo com sua atividade proliferativa. A área relativa das AgNORs permitiu claramente distinguir as lesões malignas das benignas.

CROCKER & NAR (1987), empregando a técnica de coloração com a prata (AgNORs) em cortes histológicos de pacientes com linfoma não Hodgkins, constataram que o linfoma de baixo grau apresentou um número médio de AgNORs/núcleo menor que o de alto grau.

Outro estudo, realizado por HAUPT *et al.* (1995) em seres humanos com sarcoma de Kaposi, também mostrou um significativo aumento do número médio de AgNORs nuclear em pacientes apresentando lesão em placa/nódulo (estágio avançado), comparado com os pacientes que tinham mancha cutânea (estágio inicial).

Estudando o significado do prognóstico em caninos com mastocitoma, SIMÕES *et al.* (1994) observaram haver diferença significativa entre mastocitomas recorrentes (mais pontos de AgNORs/núcleo) e não recorrentes. Este estudo estabeleceu a importância de reconhecer mastocitomas potencialmente malignos. Os resultados indicaram que mastocitomas recorrentes, não recorrentes e tempo de sobrevivência podem ser determinados pela contagem das AgNORs.

BRATULIC *et al.* (1996), trabalhando com contagem de AgNORs (núcleo e nucléolo) e número de nucléolos em cortes histológicos de tumores mamários benignos e malignos de caninos, afirmou ser possível determinar um aumento significativo nos tumores malignos em relação aos

benignos (ORREL *et al.*, 1991). O estudo também mostrou que as AgNORs não parecem ter valor prognóstico na determinação da possibilidade de tumores de glândula mamária malignos promoverem metástases à distância. DESTEXHE *et al.* (1995) também realizaram um trabalho semelhante, empregando as AgNORs em neoplasias mamárias malignas e benignas em caninos; contudo o resultado não mostrou diferença estatística entre os tumores malignos e benignos.

PREZIOSI *et al.* (1995), pesquisando hiperplasia e neoplasia em glândula perianal de cães, determinaram o número, área total e relativa das AgNORs por núcleo. Estes índices permitiram discriminar as lesões de acordo com suas atividades proliferativas. A área relativa das AgNORs distinguiu claramente lesões benignas de malignas.

HARMELIN *et al.* (1995) estudando casos clínicos de tumor venéreo transmissível primários e metastáticos, concluíram que os metastáticos apresentaram área de nucléolo e área das AgNORS maior que os tumores primários.

KARANDEMIR *et al.* (1998), trabalhando com material histológico de tumor venéreo transmissível, identificaram um número médio de AgNORs por grupo de 5,41. Por esta razão, a medida da proteína AgNOR tem sido correlacionada com o prognóstico neste tumor.

SANTOS *et al.* (1998) estudaram os AgNORs em TVTs genitais e extragenitais e concluíram que a contagem visual das AgNORs no núcleo, a área do nucléolo, a área do núcleo, a área total das AgNORs no nucléolo, a contagem na tela das AgNORs no núcleo e a área total das AgNORs no núcleo permitiram a diferenciação entre os dois grupos de TVT, sendo que os valores maiores foram obtidos sempre nos casos de TVT extragenital.

Empregando marcadores de proliferação como o PCNA, telomerase e AgNORs para estudar características do tumor venéreo transmissível, CHU *et al.* (2001) constataram que as células dos tumores em progressão apresentaram um maior número de AgNORs que os tumores em regressão, constituindo-se um bom indicador de prognóstico.

Contudo, mesmo que a maioria das pesquisas com AgNORs demonstrem resultados significativos, TOIKKANEN & JOENSUU (1993) comprovaram que a contagem das AgNORs em câncer de mama na mulher não teve significado prognóstico.

2.6 GLICOPROTEÍNA-P E RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

A resistência à quimioterapia é um grande obstáculo no tratamento de pacientes com câncer. Uma série de mecanismos pode contribuir para a resistência clínica à quimioterapia. Durante muitos anos, a maior parte dos estudos focalizou modificações no alvo celular da droga e na resistência resultante. No entanto, logo ficou claro que um grupo de indivíduos podia apresentar resistência cruzada a diversas drogas, as quais divergiam entre si quanto à estrutura, modo de ação e ao alvo celular. Este fenômeno de resistência a múltiplas drogas é multifatorial, podendo ser conferido por uma variedade de mecanismos celulares. Estes mecanismos estão relacionados com defeitos na regulação dos genes que controlam a apoptose, aumento dos mecanismos de detoxificação intracelular, alterações nos sistemas de reparo do DNA e pela ativação ou superexpressão de moléculas (glicoproteína-p) capazes de exportarem os quimioterápicos para fora da célula ou outros compartimentos celulares (MAIA & RUMJANEK, 2004).

A resistência multidroga (MDR) é o fenômeno pelo qual as células neoplásicas adquirem resistência a uma série de drogas utilizadas em medicina veterinária, como doxorubicina, vincristina, actinomicina D e mitoxantrona. Tais drogas são tipicamente substâncias hidrofóbicas (BERGMAN, 2000).

A resistência multidrogas pode ser uma propriedade intrínseca das células tumorais (MORAL *et al.*, 1995) ou ser adquirida por uma população de células tumorais, que foram inicialmente sensibilizadas pelo quimioterápico, tornando-se subsequenteiramente resistentes após a exposição ao agente citotóxico. A ação da glicoproteína-p é um dos mecanismos clássicos de resistência multidrogas, a qual foi atribuída à mutação ou amplificação de genes. As moléculas de glicoproteína-p têm sido identificadas e implicadas na resistência às drogas em diversos organismos como *Leishmania*, *Plasmodium*, hamsters, camundongos e em cultura de células de cães e seres humanos. No homem e roedores, a glicoproteína tem múltiplas isoformas codificadas pela família dos genes MDR (mdr1, mdr2, mdr3). Sabe-se que a isoforma que confere resistência multidrogas no homem é codificada pelo gene mdr1, entretanto não é conhecido se genes mdr2 e mdr3 também determinam a resistência às drogas (GINN, 1996).

Estudos preliminares do câncer em humanos indicam que um significativo número de pacientes que desenvolveram resistência à quimioterapia expressou glicoproteína-p. A partir da expressão dos padrões de glicoproteína-p foram criadas quatro categorias. A primeira é a dos tumores com expressão intrínseca da glicoproteína-p; estes tumores são derivados de células que expressam glicoproteína-p em estado não neoplásico e são tradicionalmente refratários às drogas que bloqueiam a ação da glicoproteína-p. A segunda categoria é a dos tumores que ocasionalmente expressam a pg-p, estando

incluídas neste grupo várias leucemias, linfoma não-Hodkin e algumas neoplasias mamárias. Estes são normalmente considerados suscetíveis à quimioterapia. A terceira categoria é a dos tumores que apresentam raramente a expressão de pg-p e conseqüentemente apresentam uma variável sensibilidade à quimioterapia; estão compreendidos neste grupo tumores de mama, melanomas, tumores de bexiga, tireóide, timo, ovário e próstata. A quarta categoria inclui os tumores que passam a expressar a pg-p após a quimioterapia; nesta categoria estão compreendidos os linfomas não-Hodgkin de grau intermediário, mieloma múltiplo, leucemia mielóide aguda, sarcoma de tecidos moles em crianças, neoplasias ovarianas e neuroblastomas (GINN, 1996).

A função normal da glicoproteína-p (gp-p) não é completamente compreendida, mas sabe-se que ela é expressa nas adrenais, rins, fígado, cólon, cérebro, pulmões, sangue periférico e medula óssea normais (ALEXANDROVA, 1998, THOMAS & COLEY, 2003). Ela faz parte da família de transportadores ABC, que funcionam como uma bomba de efluxo dependente da energia gerada pela hidrólise do ATP, capazes de translocar para o exterior da célula uma série de drogas, reduzindo a sua concentração a níveis pouco letais (THOMAS & COLEY, 2003; MAIA & RUMJANEK, 2004). Muitos tumores derivados destes tecidos expressam grandes quantidades de gp-p, o que pode explicar sua resistência intrínseca a quimioterápicos, comumente observada (BERGMAN, 2000).

Vários mecanismos de ação foram propostos para o funcionamento da glicoproteína-p. Mesmo o modelo clássico de uma bomba capaz de transportar o substrato do meio intracelular para o meio extracelular vem sendo questionado. Sugere-se que as drogas possam ser retiradas da membrana citoplasmática, antes de entrarem no citoplasma (MAIA & RUMJANEK, 2004).

Em oncologia humana, a importância clínica da MDR é demonstrada pela observação que níveis elevados de expressão de gp-p correlacionam-se positivamente com a falta de resposta ou de remissão após formas adequadas de quimioterapia (BERGMAN, 2000). MEALEY *et al.* (1998) observaram que a gp-p canina funciona da mesma maneira que a homóloga no homem.

Estudo realizado por BERGMAN *et al.* (1996) em cães com linfoma constatou níveis de expressão da gp-p maiores na recaída e na necropsia do que no momento do diagnóstico. O mesmo estudo encontrou correlação negativa entre a expressão de gp-p e remissão e tempo de sobrevivência. Com a detecção da gp-p por imunoistoquímica, LEE *et al.* (1996) concluíram que a expressão da gp-p antes do início do tratamento é um fator preditivo independente negativo de sobrevivência. Adicionalmente, estes autores observaram que a expressão da gp-p após a recidiva era maior que a expressão inicial.

GINN (1996) trabalhando com cortes de tecidos normais e neoplásicos de caninos, padronizou o uso de três anticorpos monoclonais de glicoproteína-p (C494, C219 e JSB-1). A avaliação dos tecidos normais e neoplásicos revelou imunorreatividade satisfatória, indicando que a gp-p pode ser detectada nos tecidos de caninos processados rotineiramente. O uso de diferentes anticorpos monoclonais para a mesma molécula é recomendado, pois nem todos os epítomos na mesma molécula têm os mesmos aminoácidos na constituição (MONTERO, 2003).

Osteossarcoma humano e canino são muito similares nos aspectos clínico, radiológico, histopatológico, índice e tipo de metástases e resposta à quimioterapia. Por esta razão, o osteossarcoma canino é um útil modelo intermediário para estudar a doença no homem. A expressão de

glicoproteína-p, produto do gene *mdr1*, é o mais importante indicador do curso clínico adverso em pacientes humanos com osteossarcoma. A exposição de células de osteossarcoma canino à doxorrubicina resultou em superexpressão de glicoproteína-p, gene *mdr* e mRNA. Além disso, estas células falharam em acumular doxorrubicina intracelular e foram menos sensíveis a vincristina, quando comparadas com as células parenterais (MEALEY *et al.* 1998).

BALDINI *et al.* (1995) estudando a marcação da glicoproteína-p em 92 pacientes com osteossarcoma, observaram um aumento dos níveis glicoproteína-p associado ao decréscimo do tempo livre da doença após a realização do diagnóstico.

Em um experimento, 54 caninos com mastocitoma foram avaliados pela imunistoquímica para a expressão de glicoproteína-p e proteína associada à resistência multidrogas. Todos os tumores examinados foram estagiados de acordo com o *rank* de malignidades histológicas. A expressão de glicoproteína-p foi confirmada em 15% (8/54) dos casos, dos quais 33% (5/15) eram do grau I, 10% (3/31) do grau II e 0% (0/8) do grau III. O resultado indicou que pelo menos 26% de caninos com mastocitoma expressaram glicoproteína-p e por esta razão, podem ser resistentes a várias drogas diferentes (MIYOSHI *et al.*, 2002).

O linfoma canino é uma doença de ocorrência espontânea, que pode ser um modelo para o linfoma não-Hodgkin no homem. A quimioterapia com antineoplásicos resulta em alta taxa de remissão; entretanto, a recidiva e a resistência clínica às drogas é freqüentemente observada dentro de 8 a 10 meses. A glicoproteína-p parece desempenhar um papel importante na resistência das células tumorais. Para avaliar a função dos produtos do gene *mdr* na resistência à droga do linfoma canino, preparações de membranas celulares de linfoma canino de graus intermediário e alto foram sujeitos a

Western blotting para a detecção da glicoproteína-p. Neste estudo, uma das 30 amostras coletadas antes da quimioterapia expressou glicoproteína-p. Também foi detectada em três amostras de biópsia de oito cães que foram resistentes à quimioterapia. Este padrão de expressão foi similar ao linfoma não-Hodgkin no homem. O estudo sugere que o linfoma canino é um proveitoso modelo para estudar resistência multidroga (MOORE *et al.*, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento deste projeto, aprovado pela Câmara de Ética em experimentação Animal (Anexo A), foram estudadas prospectivamente 138 massas neoplásicas de 102 cães, sem restrição de sexo, raça ou idade, com diagnóstico clínico de TVT atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, campus Botucatu, ou oriundos do Biotério central da UNESP (campus Botucatu), entre o período de março de 2002 a setembro de 2004.

Os animais com TVT, que tiveram seu diagnóstico feito em bases clínicas e confirmado com auxílio do citodiagnóstico, foram arranjados em três grupos de acordo com o tipo celular predominante, baseado em critérios pré-estabelecidos. Dos animais atendidos no Hospital Veterinário, cuja propedêutica inicial compreendia a anamnese e exame clínico, com a concordância dos proprietários (Anexo B), foram obtidas informações sobre a história pregressa e atual do animal, tempo de evolução da neoplasia, localização, terapia prévia, hábitos de criação e reprodução, seguidas pelo exame físico criterioso da região afetada, avaliação das dimensões tumorais e inspeção de linfonodos regionais. A partir do registro destas informações em fichas clínicas (Anexo C), cada massa tumoral foi classificada de acordo com sua localização, em genitais ou extragenitais. Quanto ao comportamento

biológico, os tumores foram definidos como *primários* ou *não primários* (*metastáticos* ou *recorrentes*).

Ainda antes da quimioterapia, era sempre realizado o hemograma e, quando necessário, outros exames complementares, tais como o bioquímico sérico (perfil hepático e renal), radiológico e ultrassonográfico. Destes animais, 48 foram avaliados ao final das sessões de quimioterapia com o objetivo de investigar a eficácia da resposta clínica, assim como a sua possível relação com a expressão de antígenos de membrana que pudessem induzir a quimiorresistência.

Compondo ainda uma proposta de observação, as neoplasias foram, alternativamente, rearranjadas em dois novos grupos, os quais reuniram as neoplasias primárias e não primárias (metástase ou recorrência), avaliados mediante as mesmas variáveis.

3.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

3.2.1 TÉCNICA DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS – CAAF

Confirmado o diagnóstico inicial, foram colhidas amostras das massas primárias e metastáticas. Para a técnica propriamente dita de citologia por aspiração com agulha fina (CAAF), foram utilizadas seringas descartáveis de 10ml, agulhas descartáveis 24 $\frac{3}{4}$ G (independentemente do tamanho do tumor a ser aspirado) e citoaspirador de Valeri. Após a anti-sepsia do local, eram realizadas punção da massa e a aplicação de pressão negativa, fazendo-se o reposicionamento da agulha sem que ela saísse da massa. A seguir, a pressão negativa era interrompida e a agulha retirada da massa; a agulha era então desacoplada da seringa, aspirando para dentro da mesma um pequeno volume de ar, suficiente para expulsar o conteúdo da agulha sobre lâminas de

microscopia ou para o interior de um tubo *ependorf* contendo 1,5ml de salina tamponada (PBS), conforme descrição a seguir.

3.2.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Uma das amostras foi suspensa em 1,5ml de solução de PBS, para posteriormente ser dividida em alíquotas de 50µl e citocentrifugada (500 rpm, durante três minutos), com o propósito de confeccionar dez preparados citológicos (“botão” de células), os quais foram fixados e armazenados em etanol 95% para realização das técnicas de imuno e citoquímica. O material de outra amostra foi depositado sobre três lâminas histológicas e, após a extensão do material (COWEL & TYLER, 1989), foram secas ao ar livre, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa para determinação do tipo citomorfológico e anormalidades nucleares. Em alguns casos, foram processados fragmentos de tecido neoplásico que se desprenderam da massa, realizando-se a confecção dos esfregaços mediante a técnica de impressão. Em outros, onde a visualização ou o acesso à massa era difícil, utilizou-se o método de colheita com escova ginecológica.

3.3 AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA

3.3.1 SELEÇÃO DO TIPO CITOMORFOLÓGICO

As preparações citológicas das massas tumorais coradas pelo Giemsa foram submetidas à avaliação morfológica em microscopia óptica¹, com objetiva de 40x, identificando-se cem células neoplásicas em contador mecânico, para inclusão em um dos grupos experimentais, de acordo com as características do tipo celular predominante, da seguinte forma:

¹ Carl Zeiss Jenamed 2, Alemanha.

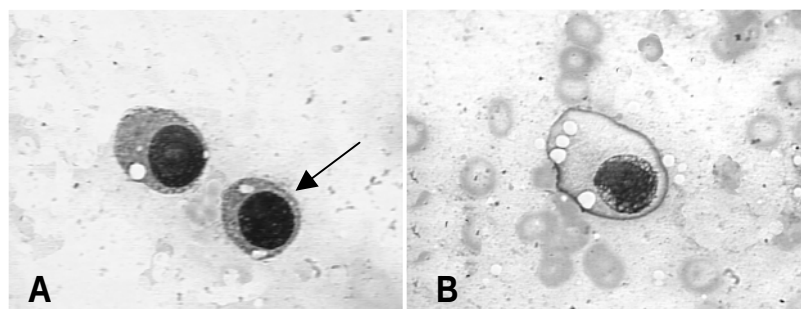


FIGURA 1 – Tumor venéreo transmissível canino de morfologia linfocitóide (**1A** - seta) e plasmocitóide (**1B**).

Grupo Linfocitóide: predomínio de 60% ou mais de células de TVT típicas, ou seja, com morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, com presença de vacúolos que acompanham a periferia da célula, núcleo redondo e central com cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos salientes (TVT "linfocitóide"). Ver Figura 1A.

Grupo Plasmocitóide: predomínio de 60% ou mais de células de TVT com morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor relação núcleo:citoplasma), com núcleo localizado excentricamente (TVT "plasmocitóide"). Ver Figura 1B.

Grupo Misto: celularidade mista entre os tipos celulares linfocitóide e plasmocitóide, sem que nenhum ultrapassasse 59% do total.

Os esfregaços corados pelo Giemsa foram avaliados inicialmente com objetiva de 10x para verificação do controle de qualidade, coloração e distribuição das células. A seguir, procedeu-se à observação em aumentos progressivos de 250x e 400x para o detalhamento das características

celulares, contagem de células e verificação das anormalidades nucleares (ver próximo item). Após a varredura inicial, as áreas com melhor padrão de distribuição celular e coloração eram analisadas em 400x, sendo registrados em cada lâmina no mínimo dez campos ao acaso, não sobrepostos, para a obtenção da classificação do tipo celular predominante.

3.4 ANORMALIDADES NUCLEARES

Para a determinação destes índices foram analisadas 79 amostras de massas neoplásicas. Para cada massa foram contadas, no mínimo, 1000 células por tipo citomorfológico em campos microscópicos semi-sucessivos com 0,25 mm² (grade de integração 100/25) de maneira a percorrer toda a lâmina. Os campos microscópicos de grande confluência de células, devido a difícil individualização, foram ignorados. Cada uma das avaliações foi feita da seguinte maneira:

3.4.1 CÉLULAS BINUCLEADAS, MULTINUCLEADAS E MICRONUCLEAÇÃO

Foram contadas todas as células binucleadas e multinucleadas, em relação às mononucleadas (Figuras 2A e 2B).

A identificação e a análise de células micronucleadas seguiram os critérios propostos por TOLBERT *et al.* (1992) e FENECH *et al.* (1993), conforme descrição a seguir. Os micronúcleos foram definidos como corpúsculos de cromatina individualizados, separados do núcleo principal via ponte nucleocitoplasmática, idênticos ao núcleo principal com relação à afinidade tintorial, textura e plano focal, entretanto menores e com um diâmetro de até $\frac{1}{3}$ do núcleo principal (Figura 2C).

3.4.2 BROTAMENTO E LOBULAÇÃO NUCLEAR

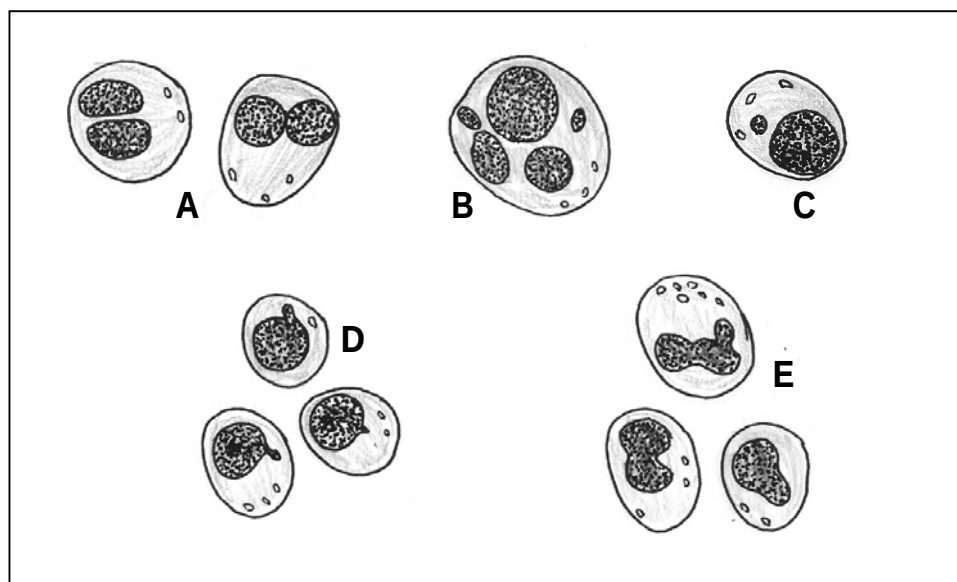


FIGURA 2 – Tumor venéreo transmissível – critérios morfológicos: **A:** binucleação; **B:** multinucleação; **C:** micronucleação; **D:** brotamentos nucleares; **E:** lobulações nucleares (criado por Amaral, 2004).

Os brotos nucleares (Figura 2D) foram definidos como pequenas evaginações da membrana nuclear contendo eucromatina (MANELLI-OLIVEIRA, 2000). Na avaliação dos brotos nucleares foram consideradas somente células com núcleo íntegro em interfase. As células com núcleo picnótico, irregular, deformado ou com espículas características de degeneração foram excluídos da avaliação.

Lobulação nuclear foi definido como uma grande evaginação nuclear, cerca dez vezes maior que o broto. Em algumas células o núcleo pode apresentar uma ou mais lobulações (Figura 2E). Da mesma forma que as outras anormalidades nucleares, as células foram criteriosamente selecionadas, descartando-se as degeneradas.

3.5 CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA (CEC) – DISCRIMINAÇÃO DE NUCLÉOLOS INTERFÁSICOS

Para o estabelecimento da concentração eletrolítica crítica foram utilizadas 69 amostras de massas neoplásicas. As preparações citológicas fixadas em etanol eram coradas com uma solução de azul de toluidina² 0,025% em tampão McIlvaine³ com pH 4, durante 15 minutos. Imediatamente à coloração, foram tratadas com solução aquosa de cloreto de magnésio⁴ 0,05M durante 15 minutos, lavadas rapidamente em água destilada, diafanizadas em xilol durante 15 minutos e montadas em resina.

Esta técnica, descrita por MELLO *et al.* (1993), baseia-se na propriedade do azul de toluidina em conferir coloração metacromática ao DNA e RNA, enquanto o cloreto de magnésio faz a subtração da metacromasia do DNA nuclear, permitindo que os nucléolos, ricos em RNA, fiquem evidenciados e possam ser contados e medidos.

² Amresco. Solon, Ohio, USA.

³ 38,5ml de ácido cítrico anidro 0,2M; 61,5ml de fosfato de sódio bibásico dodecaidratado 0,1M. Ajustar pH em 4, se necessário.

⁴ Dinâmica.

3.5.1 MORFOMETRIA NUCLEAR E NUCLEOLAR

Foram analisadas trinta células tumorais por caso, selecionadas aleatoriamente, baseado na técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios, a fim de determinar o número mínimo de células necessárias para a aferição proposta. Desta maneira, foi selecionado um espécime cujas células tinham mais critérios de malignidade (tipo plasmocitóide), o qual apresentava-se com mais evidência as variações do tumor estudado. Do caso selecionado foram medidas as áreas nuclear e nucleolar de cem células. Após, dividiu-se a amostra dos cem dados obtidos em dez grupos de dez células cada, sorteadas ao acaso. A seguir, determinaram-se valores médios de cada grupo e logo o valor médio para os dez valores médios e desvio padrão desta média final. Este procedimento foi repetido, obtendo-se os valores médios e os desvios padrões de maneira acumulativa, modificando o número de células para vinte, trinta, quarenta, cinquenta, sessenta, setenta, oitenta, noventa e cem. Os desvios padrões obtidos foram plotados e analisados num gráfico. Verificado a estabilização do desvio padrão em torno de trinta células, adotou-se este valor como o número mínimo de células necessárias para estimar os parâmetros (área nuclear, nucleolar e número de nucléolos) estabelecidos, desabonando maiores amostragens.

Foram medidas semi-automaticamente através do analisador de imagens número de nucléolos por núcleo, diâmetro do nucléolo, área dos nucléolos e índice de circunferência, área do núcleo, diâmetro do núcleo, índice de circunferência e relação nucléolo:núcleo. Estes dados foram analisados em microscópio óptico⁵ adaptado ao analisador de imagens KS300⁶, sob objetiva de 100x.

⁵ Leica DMS. Leica, Alemanha.

3.6 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA

A padronização da técnica de imunocitoquímica dos casos de tumor venéreo transmissível foi realizada com os preparados citológicos citocentrifugados fixados em etanol 95%, baseado em CANIATTI *et al.* (1996), segundo o qual constitui-se num método econômico e preciso para a imunofenotipagem em caninos. Os anticorpos submetidos à padronização estão relacionados a seguir:

- Ki-67 (clone MIB-1)⁷
- antiglicoproteína-p (clone C494)⁸
- antiglicoproteína-p (clone 5B12)⁹

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

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

⁶ Analisador de imagem KS300. Zeiss, Alemanha.

⁷ Anti-Ki-67 humano produzido em camundongo, clone MIB-1, monoclonal cód. M 7240. DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca.

⁸ Anti-glicoproteína-P humana de camundongo, clone C494, monoclonal, código 8720-01. Signet Laboratories, Inc. Dedham, MA, USA.

⁹ Anti-p170/p-glycoprotein/MDR Ab-4 humana de camundongo, clone 5B12, monoclonal, código MS-1787-S0. LabVision, Fremont, CA, USA.

uso do tampão EDTA, pH 8, em banho-maria por trinta minutos e, por último, se necessário, tampão EDTA pH 9, em banho-maria, por trinta minutos.

Para o bloqueio de peroxidase endógena utilizou-se tanto água oxigenada 20 volumes, diluída a 1:1 com água destilada na hora do uso como água oxigenada 10 volumes, obtendo-se os mesmos resultados. Também foram testados bloqueios de marcação inespecífica (BSA 2%, por 1 hora em temperatura ambiente), bloqueios de proteína (*kit* CSA¹⁰) e de avidina e biotina¹¹.

Foram também experimentadas concentrações diferentes do anticorpo primário, com objetivo de obter uma boa marcação usando volumes menores de anticorpo. As diferentes diluições são apresentadas na Tabela abaixo.

TABELA 1 – Anticorpos anti-Ki-67 e antiglicoproteína-*p* utilizados para a técnica de imunocitoquímica no tumor venéreo transmissível canino.

Anticorpo primário	Anti-Ki-67	Anti-p 170/p-Glicoprotein/MDR	Glicoproteína- <i>p</i>
Clone	MIB-1	5B12	C494
Diluições testadas			1:20
	1:50	1:2	1:50
	1:75	1:10	1:100
	1:150	1:20	1:150
			1:200
Diluição final	1:75	—	1:100

Padronização dos anticorpos

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

¹¹DAKO Biotin Blocking System, código X0590, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

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

As preparações citológicas mantidas em álcool etílico 95% foram hidratadas com um banho em álcool 85% por 5 minutos, seguido por banho em água corrente durante 10 minutos e duas passagens em água destilada. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes, novo banho de 10 minutos em água corrente, seguido de outros dois banhos de água destilada.

O passo seguinte era a recuperação antigênica, realizada em microondas na potência máxima, mantendo-se as lâminas em tampão citrato¹² pH 6,0 em cubas horizontais, não cruzadas e em recipiente com tampa apropriado para o uso em microondas, ou em banho-maria a 96°C, com tampão EDTA¹³ pH 8 ou 9, conforme as exigências de cada anticorpo.

Após a recuperação antigênica, as lâminas permaneciam em repouso mergulhadas no tampão, durante 20-30 minutos, para diminuição da temperatura e, após esfriarem, submetidas a 10 banhos com água destilada e um banho em tampão tris¹⁴.

As lâminas foram então secas, a área com o material delimitada com caneta¹⁵ e transferidas para uma bandeja com tampa, tendo-se o cuidado de manter sempre as células umedecidas com tampão tris.

¹² 2,1g ácido cítrico monoidratado; 1l de água destilada.

¹³ 0,3722g ácido etilenodiaminotetraacético; 1l de água destilada.

¹⁴ 8,5g NaCl; 6g trizma base; 1l de água destilada, ajustando pH em 7,4.

¹⁵ Dako DakoCytomation Pen. DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca.

Quando utilizado o anticorpo anti-glicoproteína-p (clone C494) não foi necessário o uso de recuperação antigênica pelo calor, mas para a diminuição de marcações inespecíficas e redução de fundo, antes da incubação com o anticorpo primário os preparados citológicos foram incubados com BSA 2% por uma hora em temperatura ambiente. Para o controle positivo da glicoproteína-p foram usados cortes histológicos e impressão de fígado de cão e, como controle negativo, amostras citológicas de TVT incubadas somente com o diluente do anticorpo primário.

Os anticorpos diluídos em BSA 1% eram aplicados sobre as lâminas e incubados em câmara úmida pelo tempo e temperatura padronizados. Seguiram-se duas lavagens em tris e incubação com anticorpo secundário por 30 minutos em temperatura ambiente. Após duas lavagens com tris foi aplicado o complexo streptavidina-biotina, incubado por 30 minutos em temperatura ambiente e novamente lavados com dois banhos de tris. Com o anticorpo antiglicoproteína-p foi utilizado, no lugar do complexo streptavidina-biotina, um sistema de anticorpo secundário e polímero associado a peroxidase¹⁶, com incubação em temperatura ambiente durante uma hora.

Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno 3'-3' diaminobenzidina¹⁷ líquido, na diluição recomendada pelo fabricante, durante 5 minutos, ao abrigo da luz, seguindo-se a lavagem das lâminas durante 10 minutos em água corrente.

As lâminas foram contra-coradas com verde de metila por 5 minutos, lavadas com álcool isopropílico por 2 minutos (dois banhos),

¹⁶ DakoCytomation EnVision + Dual Link System, Peroxidase. DakoCytomation. Carpinteria, CA, USA.

¹⁷ DAB Líquido Dako. DakoCytomation. Carpinteria, CA, USA.

desidratadas em álcool absoluto (1 minuto), diafanizadas em xilol e montadas com resina sintética.

3.7 TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL

3.7.1 ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67

Uma vez padronizada a técnica para antígeno nuclear Ki-67 (clone MIB-1) na diluição de 1:75, foram estudadas 96 amostras de massas neoplásicas. Nos casos positivos as células estavam imunomarcadas com núcleos marrons, independentes da intensidade da marcação. As lâminas foram observadas em microscópio óptico sob objetiva de 40x e os resultados expressos como percentual de células positivas em 10 campos aleatórios, nunca se contando menos de 100 células por amostra. Com os dados obtidos, foi determinado o índice proliferativo, de acordo com a equação: $IP = n^{\circ} \text{ de células marcadas} \div n^{\circ} \text{ de células analisadas} \times 100$.

3.7.2 REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (AgNORs) **INTERFÁSICAS**

3.7.2.1 Avaliação Qualitativa das AgNORs

Para a avaliação das AgNORs foram utilizadas 70 amostras de massas neoplásicas, cujo material estava contido em lâminas histológicas do citocentrifugado armazenadas em etanol 95%. Este material foi submetido à hidratação progressiva por imersão em etanol 70% durante 15 minutos, seguido por imersão em água deionizada por 10 minutos.

Para a solubilização das proteínas citoplasmáticas e melhoria da qualidade da coloração, as lâminas eram imersas em uma solução de Triton X-100¹⁸ a 0,5% em PBS durante 15 minutos em temperatura ambiente e após, lavadas durante 10 minutos em água corrente, conforme adaptação modificada de VIDAL E MELLO (1995). Este procedimento foi acrescentado ao protocolo de coloração como uma medida para facilitar a análise morfométrica, uma vez que a solubilização de algumas proteínas citoplasmáticas produz um fundo mais claro e com maior contraste e definição das proteínas NOR, além de tornar os núcleos das células mais limpos e permeáveis à prata (VIDAL, 1995).

Foi avaliada a distribuição dos AgNORs no núcleo e nucléolo em 70 amostras de massas neoplásicas, segundo o padrão proposto por SHIRO et al (1993), pela análise de imagens digitalizadas¹⁹.

As lâminas foram coradas pelo método da prata coloidal descrito por PLOTON *et al.* (1986). Esta técnica consiste da mistura de 2 partes de uma solução aquosa de prata²⁰ a 50% com uma parte de uma solução aquosa de gelatina²¹ a 2% em água deionizada com ácido fórmico a 1%. Para a diminuição dos precipitados inespecíficos de prata sobre o material, adotou-se a coloração com lâminas invertidas. Um mililitro da solução de prata coloidal era depositado sobre uma bandeja de coloração de polipropileno e as lâminas, com a face do material voltada para baixo, eram depositadas sobre o corante. A bandeja era mantida em estufa a 37°C por 12 a 15 minutos e depois as lâminas eram lavadas, deixadas secar e montadas com lamínula e resina sintética²².

¹⁸ SIGMA-Aldrich. St. Louis, MO, USA.

¹⁹ Media Cybernetics. Silver Spring, MD, USA.

²⁰ Nitrato de Prata. Merck, Alemanha.

²¹ Gelatina Vetec Química Fina Ltda. Duque de Caxias, RJ.

²² Permunt. Fisher Scientific, Fair Lawn, NS, USA.

3.7.2.2 Avaliação Quantitativa das AgNORs

A análise morfométrica das AgNORs foi realizada através do programa Image-Pro Plus, versão 4.1²³. Para tal, as lâminas foram observadas em microscópio óptico Leica DMR sob objetiva de imersão (100x). O microscópio acoplado à câmera Sony CCD -IRIS / RGB enviava as imagens para o programa computacional. A análise morfométrica foi semi-automatizada combinada com observação direta: o limiar de resolução para os pontos foi selecionado individualmente por campo, após estabelecer contraste para que cada ponto NOR (preto ou marrom) visualizado ao microscópio pudesse ser facilmente identificado na tela do monitor. Eram avaliadas as células localizadas na parte mais central do monitor (RÜSCHOFF, 1994). Os pontos de AgNORs nucleolares ou dispersos no núcleo foram contados e a sua área medida, sendo determinado o número de AgNORs por núcleo e a área de AgNOR nucleolar e nuclear em cada uma das células.

Para a determinação do número mínimo de células necessárias para a avaliação das AgNORs foi utilizada a técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação aos valores do tamanho da amostra de origem. Como descrito anteriormente para a CEC, foi selecionado um espécime cujas células tinham mais critérios de malignidade (tipo plasmocitóide), o qual apresentava com mais evidência as variações do tumor estudado. Do caso selecionado foram medidas as AgNORs contidas em cem células. Verificada a estabilização do desvio padrão, que foi também em torno de trinta células, adotou-se este valor como o número mínimo de células necessárias para estimar os parâmetros de AgNORs estabelecidos.

²³ Media Cybernetics. Silver Spring, MD, USA.

Conforme a proposição de ORREL *et al.* (1991) foram medidas semi-automaticamente com o analisador de imagens as áreas das AgNORs nucleares e nucleolares de trinta células em cada espécime. As mensurações finais para cada caso foram calculadas pelas fórmulas apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 – Indicadores avaliados nas AgNORS.

MEDIDA	RÓTULO	FÓRMULA
Área média por ponto de AgNOR / nucléolo	APNu	$\frac{\sum \text{áreaAgNORnucleolar}}{\sum \text{pontosAgNORnucleolar}}$
Área média por ponto de AgNORS / núcleo	APN	$\frac{\sum \text{áreaAgNORnuclear}}{\sum \text{pontosAgNORnuclear}}$
Área média por ponto de AgNORS / célula	APC	$\frac{\sum \text{áreaAgNORcélula}}{\sum \text{pontosAgNOR}}$
Área média de AgNORS / núcleo	AgNu	$\frac{\sum \text{áreaAgNORNuclear}}{\text{númeroNúcleos}}$
Área média de AgNOR / nucléolo	AgN	$\frac{\sum \text{áreaAgNORnucleolar}}{\text{númeroNucléolos}}$
Área média de AgNOR / célula	AgC	$\frac{\sum \text{áreaAgNORtotal}}{\text{númeroCélulas}}$
Número médio de pontos de AgNOR / nucléolo	nPNu	$\frac{\sum \text{ptosAgNORnucleolar}}{\text{númeroNucléolos}}$
Número médio de pontos de AgNOR / núcleo	nPN	$\frac{\sum \text{ptosAgNORnúcleo}}{\text{númeroNúcleos}}$
Número médio de pontos de AgNOR / célula	nPC	$\frac{\sum \text{númeroPtosAgNOR}}{\text{númeroCélulas}}$

3.8 AVALIAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA-P

A glicoproteína-p é uma fosfoglicoproteína transmembrana citoplasmática e de algumas organelas citoplasmáticas que está relacionada com a resistência multidrogas. A expressão de glicoproteína-p nas células tumorais foi avaliada por imunocitoquímica, utilizando anticorpo antiglicoproteína-p (clone C494) com diluição 1:100 em 101 amostras de massas neoplásicas. Foram consideradas positivas as células com membrana citoplasmática e citoplasma marrom, independente da intensidade da marcação (GINN, 1996;

MIYOSHI *et al.*, 2002). As lâminas foram observadas em microscópio óptico sob objetiva de 40x e os resultados expressos como percentual de células positivas em 10 campos aleatórios, contando-se no mínimo 100 células por amostra. Foram considerados positivos para a expressão de glicoproteína-p tumores com mais de 10% das células marcadas.

3.9 RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA

Para a avaliação desta variável foram acompanhados 48 casos clínicos e seus respectivos tratamentos. Durante este período de observação todos os cães receberam protocolo terapêutico idêntico. Este protocolo constava de infusão semanal de sulfato de vincristina intravenosa na dose de 0,75mg/m² de superfície corporal. A duração do tratamento variou de 4 a 8 semanas, conforme avaliação clínica semanal (resposta clínica). O volume tumoral era medido imediatamente antes da quimioterapia e os pacientes reavaliados semanalmente. De acordo com a resposta clínica foram estabelecidas as seguintes categorias: resposta completa (RC), quando a duração do tratamento necessário para a regressão total da massa tumoral não ultrapassou quatro semanas; resposta parcial (RP), foi definida como regressão do tamanho do tumor em 50% ou menos e presença de células de TVT no exame citológico. Considerando a resposta clínica, investigou-se a relação com o tipo citomorfológico (linfocitóide, misto e plasmocitóide) e a expressão da glicoproteína-p. Também foi estudada a relação entre imunomarcação da glicoproteína-p com a resposta clínica à quimioterapia em 42 massas neoplásicas.

3.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

Para a comparação dos parâmetros calculados pela porcentagem de sua ocorrência entre os diferentes tipos citomorfológicos (linfocitóide, misto e plasmocitóide), tais como a porcentagem de anormalidades nucleares (índice de binucleação, multinucleação), foi utilizado o teste estatístico para contrastes entre proporções multinomiais (GOODMAN, 1964), adotando-se 5% como nível de significância. Para outras anormalidades nucleares, tais como brotos, lobulação e micronucleação os grupos foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para as variáveis quantitativas como AgNORs e concentração eletrolítica crítica (CEC) os grupos de morfologia celular foram comparados em média pela utilização de análise de variância com a aplicação do teste de Tukey com nível de significância de 5% (ZAR, 1996).

Para a determinação do padrão de distribuição das AgNORs nos diferentes tipos citomorfológicos foi utilizado o teste qui-quadrado (ZAR, 1996).

Para a determinação do percentual de marcação do anticorpo Ki-67 (clone MBI-1), devido à variabilidade da amostra, foi empregado o teste não-paramétrico de comparação por *ranks* Kruskal-Wallis, nível de significância de 5%.

Os diferentes percentuais de marcação imunocitoquímica do anticorpo antiglicoproteína-p entre os grupos foram analisadas pelo teste de Goodman ($\alpha=0,05$).

Foram realizados testes de associação entre os tipos citomorfológicos (grupos) com a resposta clínica à quimioterapia; dos grupos com glicoproteína e da resposta clínica com glicoproteína-p. Todas associações foram analisadas pelo teste Goodman com nível de significância ($\alpha = 0,05$).

Os dados foram recombinaados formando outros dois grupos, o de massas tumorais primárias e não-primárias. A partir desta nova formação as variáveis foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância ($\alpha = 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO CELULAR E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO

Dos 102 animais incluídos no experimento, 52 eram fêmeas e 50, machos (Figura 3); deles foram colhidas amostras de 138 massas para as análises citológicas. Com a coloração de rotina (Giemsa) foi confirmado o diagnóstico em todos os casos, permitindo classificar o tumor venéreo transmissível em linfocitóide, plasmocitóide e misto segundo os critérios estabelecidos. A classificação está apresentada na Tabela 3 e Figura 4.

TABELA 3 – Número de amostras e respectivo percentual dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível estudados.

TIPO CITOMORFOLÓGICO	NÚMERO DE AMOSTRAS	%
Linfocitóide	27	19,56
Misto	40	28,98
Plasmocitóide	71	51,46
Total	138	100



FIGURA 3 – Aspecto macroscópico do tumor venéreo transmissível genital observado em fêmeas (A) e em machos (B).

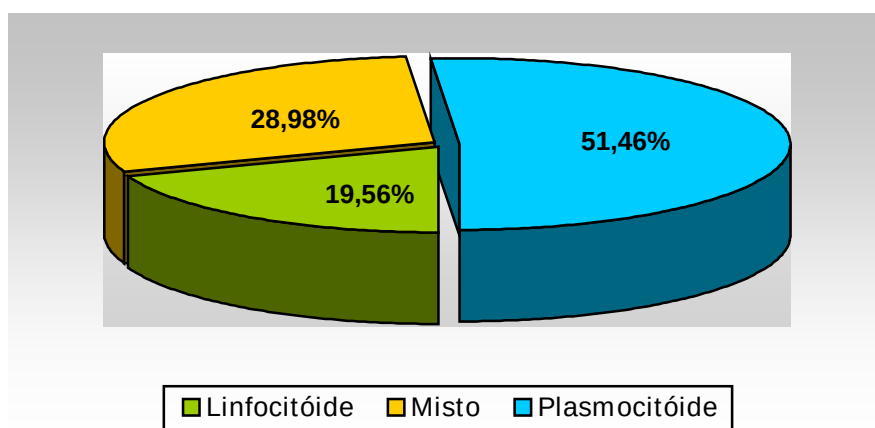


FIGURA 4 – Tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, expressos em percentual.

O TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL DO TIPO LINFOCITÓIDE foi o que apresentou menor frequência entre os três tipos (Tabela 3). Este se caracteriza microscopicamente pela presença de células de TVT típicas, ou seja, com morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, com presença de vacúolos que acompanham a periferia da célula, núcleo redondo com cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos salientes (Figura 5A).

O TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL DO TIPO PLASMOCITÓIDE foi o que apresentou maior frequência entre os três tipos. Este padrão caracteriza-se pelo predomínio de células de TVT com morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor relação núcleo:citoplasma), com núcleo localizado excentricamente (Figura 5B).

O TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL DO TIPO MISTO teve uma frequência superior ao tipo linfocitóide e inferior ao plasmocitóide. A celularidade que caracteriza este tipo é mista, ou seja, o percentual dos tipos celulares linfocitóide e plasmocitóide é semelhante (Figura 5C).

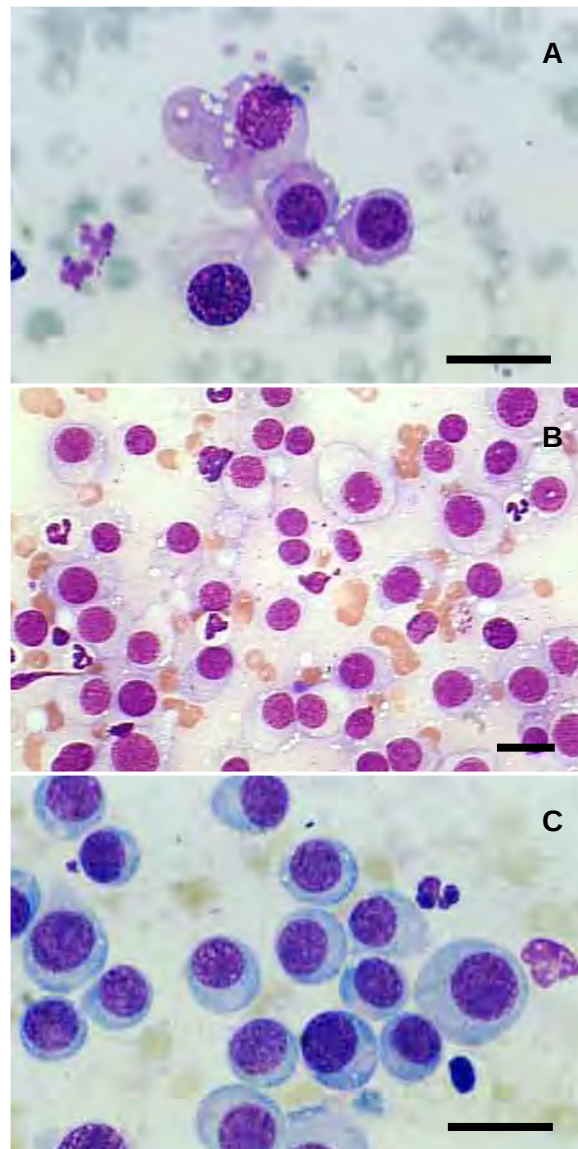


FIGURA 5 – Características citomorfológicas do tumor venéreo transmissível: **A**: padrão linfocitóide; **B**: padrão plasmocitóide; **C**: padrão misto. Barra: 20µm.

As massas tumorais foram recombinaadas, segundo o comportamento biológico, em primárias e não primárias e analisadas de acordo com perfil das variáveis previamente propostas. Os dados gerais desta classificação estão ilustrados na Figura 6.

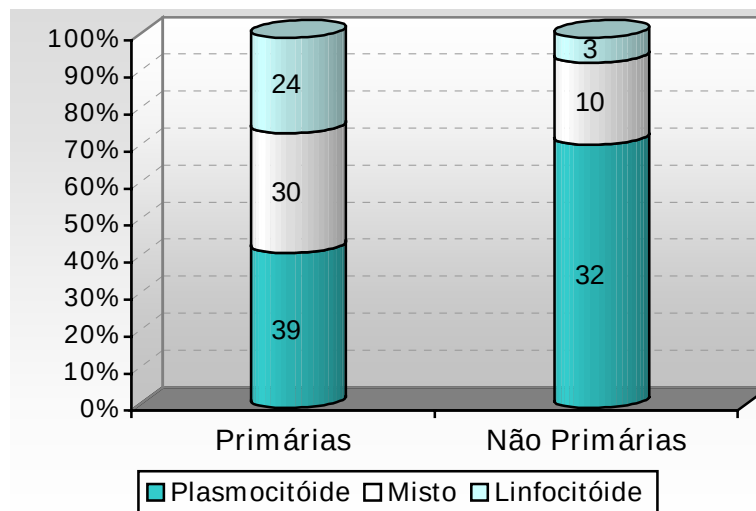


FIGURA 6 – Tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, de acordo com o comportamento biológico.

4.2 ANORMALIDADES NUCLEARES

4.2.1 BINUCLEAÇÃO E MULTINUCLEAÇÃO

Apesar destes critérios terem sido quantificados individualmente, para fins de análise estatística estas anormalidades foram agrupadas. A percentagem de casos com células como mais de um núcleo (Figura 7) não mostrou diferença estatística entre os diferentes grupos citomorfológicos ($p=0,67$), conforme pode ser observado na Tabela 4. Entretanto, o percentual de casos com mais de um núcleo foi grande nos três grupos.

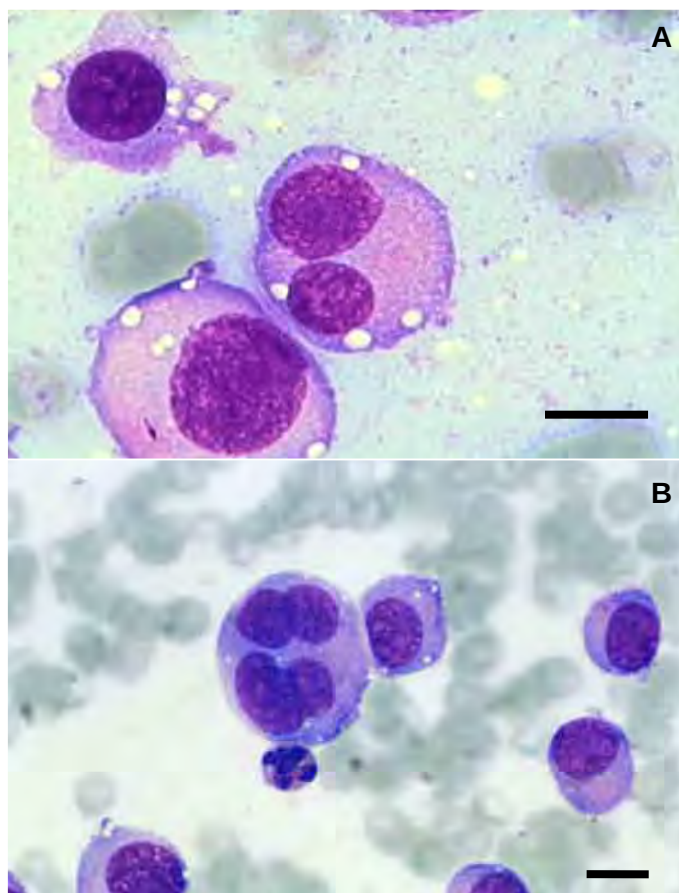


FIGURA 7 – Tumor venéreo transmissível: **A**: célula binucleada no centro do campo; **B**: célula multinucleada com moldamento entre os núcleos. Giemsa, barra: 10µm.

TABELA 4 – Número (n) e percentagem (%) de células que apresentaram um núcleo ou mais de um núcleo em amostras citológicas do tumor venéreo transmissível nos diferentes grupos morfológicos.

GRUPO	UM NÚCLEO		MAIS DE UM NÚCLEO*		TOTAL
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Linfocitóide	5	26,31	14	78,69	19
Misto	10	40,00	15	60,00	25
Plasmocitóide	12	34,28	23	65,72	35

*Células binucleadas e multinucleadas.
 $p = 0,67$ pelo teste χ^2 .

4.2.2 MICRONUCLEAÇÃO

Com relação ao número de casos que apresentaram células com micronúcleos (Figuras 8 e 9), foi observada uma maior frequência no grupo plasmocitóide (34%) em relação ao grupo linfocitóide (21%), embora não tenha havido diferenças significativas pelo teste de qui-quadrado ($p=0,59$). Os resultados mostraram também que a frequência de células com micronúcleo, nas amostras de tumor venéreo transmissível, sem considerar o grupo, variou de 0,1% a 0,3% (Tabela 5, Figura 10). Ainda foi observado que as células micronucleadas apresentavam geralmente um micronúcleo por célula.

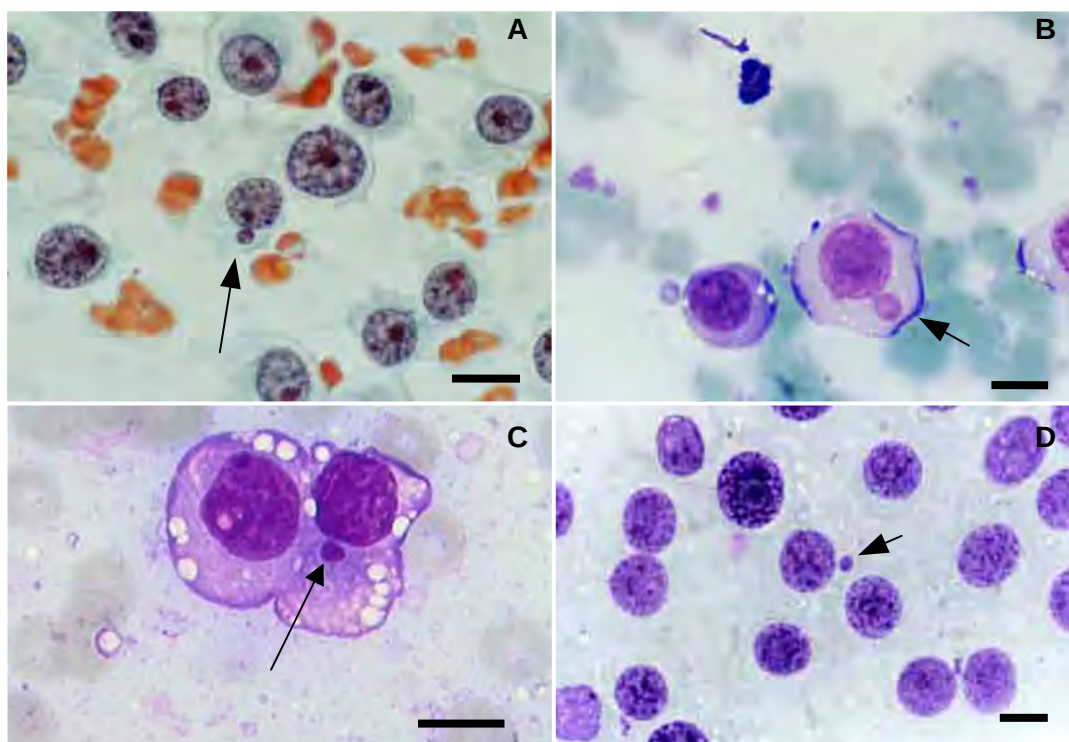


FIGURA 8 – Células de tumor venéreo transmissível apresentando micronucleação (setas). **A:** Shorr; **B, C, D:** Giemsa. Barra: 10 μ m.

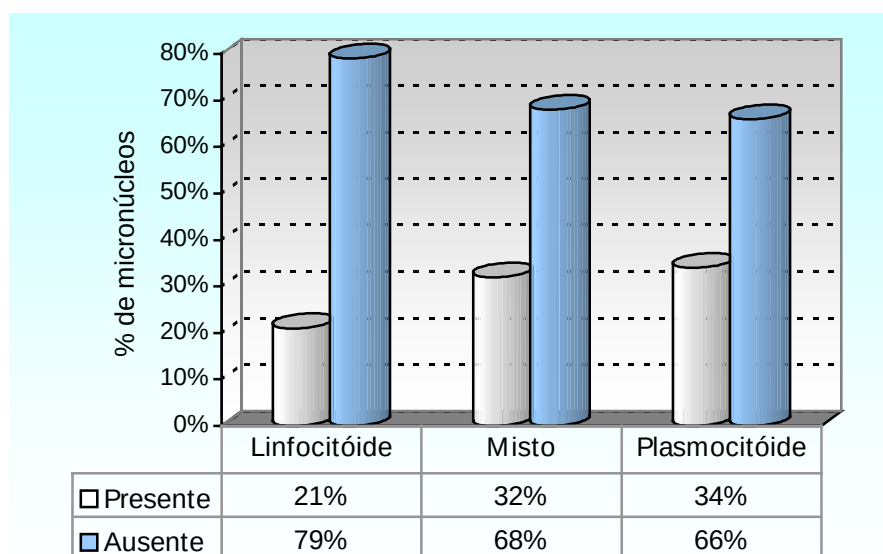


FIGURA 9 – Frequência (%) de micronucleação em amostras dos diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

TABELA 5 – Número de casos, mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência de células com micronucleação em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos três grupos citomorfológicos.

GRUPO	<i>n</i> (casos)	MEDIANA	P_{25}	P_{75}
Linfocitóide	4	0,10	0,1	0,15
Misto	8	0,15	0,1	0,20
Plasmocitóide	12	0,10	0,1	0,15

$p = 0,49$ pelo teste Kruskal-Wallis.

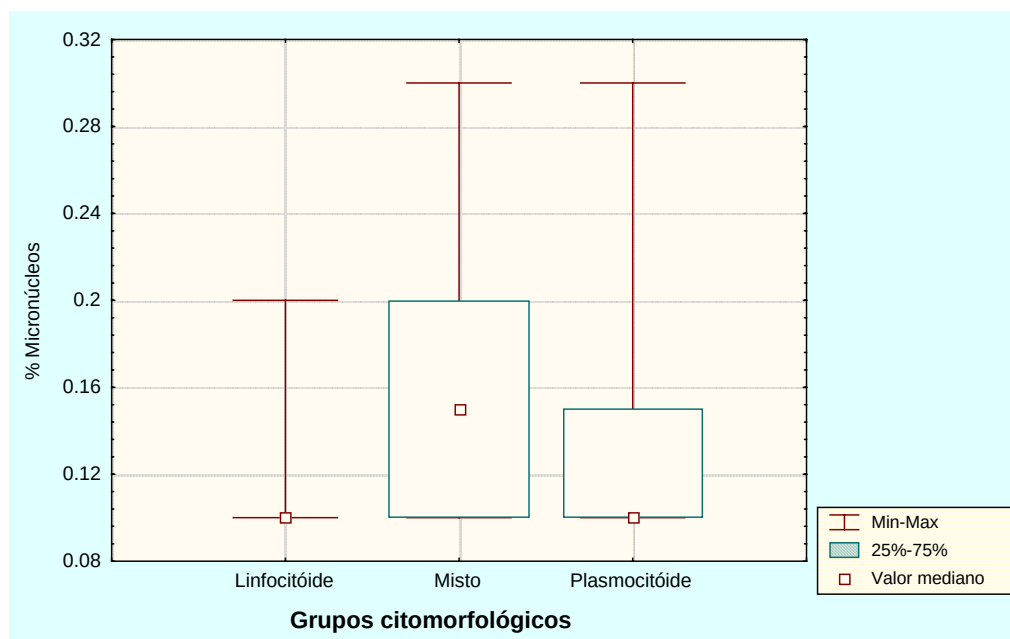


FIGURA 10 – Percentual de células com micronucleação em amostras dos três grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

4.2.3 BROTAMENTO E LOBULAÇÃO NUCLEAR

A frequência de brotamentos nucleares (Figura 11) também não apresentou diferenças significativas entre os três grupos ($p=0,56$ pelo teste de Kruskal-Wallis), ainda que a estatística descritiva tenha evidenciado a mediana do grupo misto superior a dos outros dois (Tabela 6).

TABELA 6 – Número de células (n), mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência dos brotamentos nucleares em amostras dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide do tumor venéreo transmissível.

GRUPO	n	MEDIANA	P_{25}	P_{75}
Linfocitóide	19	28	16,00	74,25
Misto	25	60	24,25	91,75
Plasmocitóide	35	40	26,00	70,75

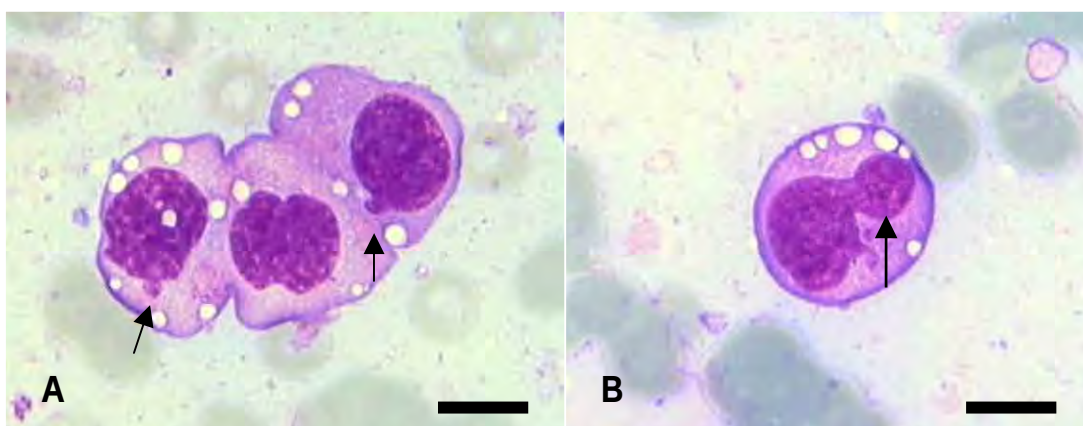


FIGURA 11 – Anormalidades nucleares do tumor venéreo transmissível: **A.** brotamento nuclear (setas); **B.** lobulação nuclear. Giemsa, barra: 10µm.

Com relação às lobulações nucleares, foi constatado que o grupo plasmocitóide apresentou um percentual maior (8%) destas anormalidades em relação ao grupo linfocitóide (2%) pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5% (Tabela 7, Figuras 11B e 12).

TABELA 7 – Número de células (n), mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência de lobulações nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide.

GRUPO	n	MEDIANA (%)	P_{25}	P_{75}
Linfocitóide	19	2 ^a	1,00	8,75
Misto	25	5 ^{ab}	3,00	10,00
Plasmocitóide	35	8 ^b	2,25	14,00

^{a,b} Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$.

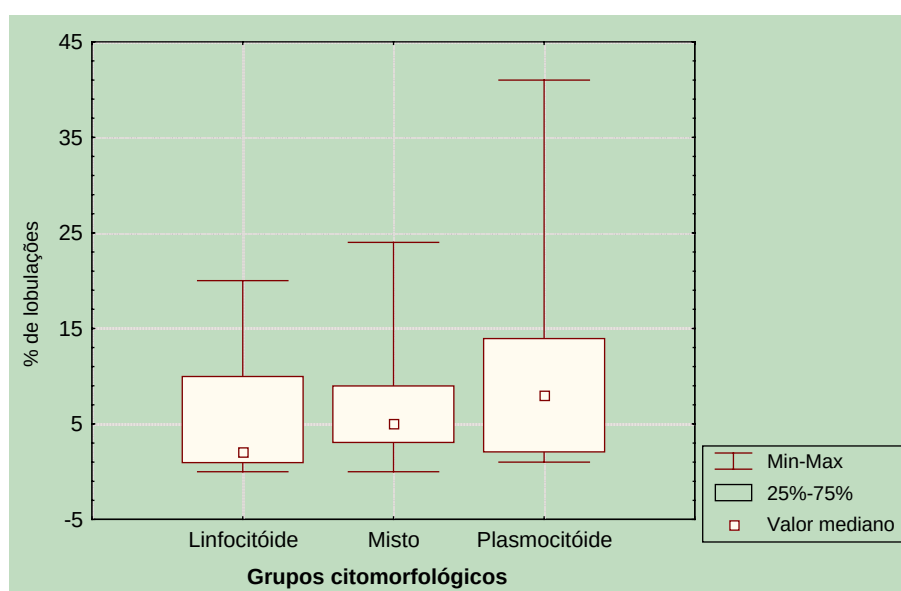


FIGURA 12 – Lobulações nucleares nos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide do tumor venéreo transmissível.

Quando as massas primárias e não primárias foram comparadas considerando a variável anormalidades nucleares, notou-se que o brotamento e a lobulação apresentaram mediana maior no grupo das massas não primárias em relação ao grupo das massas primárias (Tabela 8, Figura 13), mesmo sem haver diferença significativa.

TABELA 8 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da frequência de anormalidades nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

Anormalidades nucleares	Primário			Não primário		
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%
Brotamento[§]	33,00	19,75	75,50	55,00	36,00	101,00
Lobulação[‡]	5,00	2,00	10,00	6,50	3,00	13,00

[§] p= 0,07 pelo teste de Mann-Whitney

[‡] p= 0,25 pelo teste de Mann-Whitney

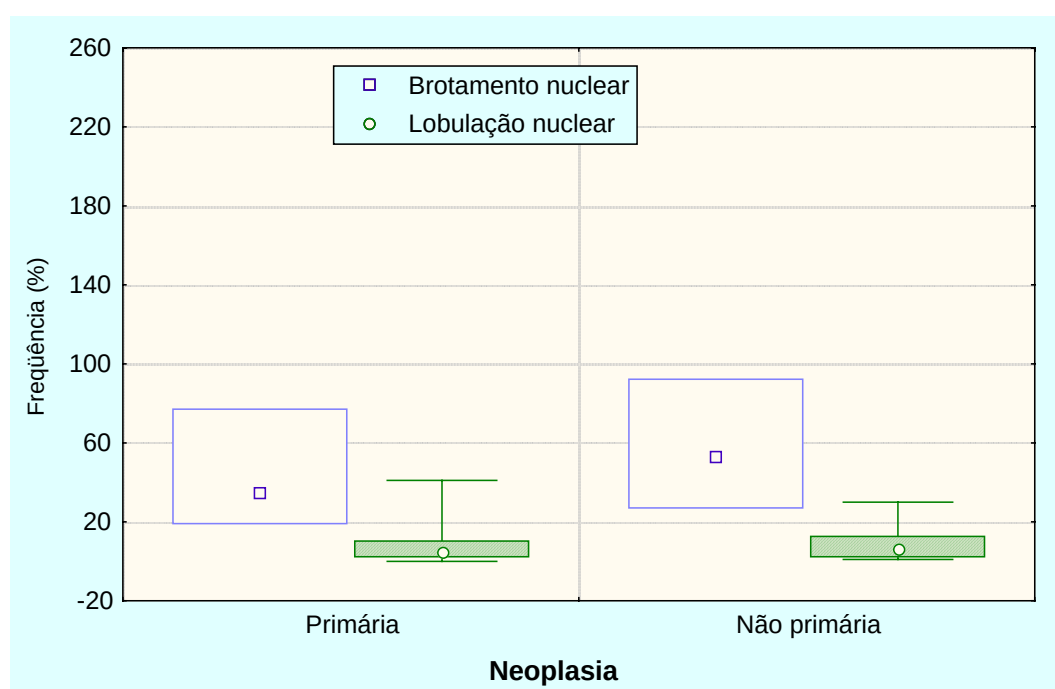


FIGURA 13 – Frequência de anormalidades nucleares em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

4.3 MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA

A coloração do núcleo e nucléolo com o azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine com pH 4, durante 15 minutos, mostrou-se adequada para as células de TVT devido à forte afinidade das moléculas do corante com os ácidos ribonucléicos (RNA e DNA); sendo assim, determinou

uma distinção entre o nucléolo (RNA) e a cromatina nuclear (DNA) restante (Figura 14).

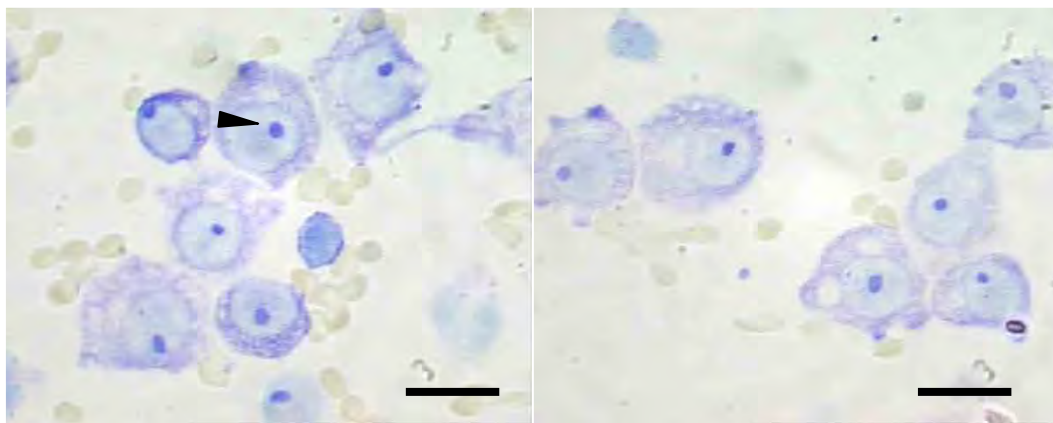


FIGURA 14 – Preparado citológico corado pela técnica de concentração eletrolítica crítica evidenciando intensa marcação do nucléolo (cabeça de seta). Barra: 20 μ m.

4.3.1 MORFOMETRIA NUCLEAR E NUCLEOLAR

De uma forma geral, a análise exploratória dos dados morfométricos nucleares e nucleolares utilizando os testes estatísticos paramétrico (ANOVA) e não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA em *ranks*) tiveram resultados semelhantes. Embora alguns indicadores estudados não apresentassem distribuição normal, todos tiveram homogeneidade de variâncias entre os grupos. Assumindo que se trabalha com pressuposições de homogeneidade de variâncias e considerando a robustez do teste, a decisão estatística foi descrever o teste paramétrico de ANOVA.

As Tabelas 9 e 10 apresentam os valores médios e desvio padrão de cada variável citomorfométrica avaliadas neste experimento.

A análise dos dados citomorfométricos de cada indicador demonstrou não haver diferença significativa, entretanto avaliando-se a área

nucleolar, relação do nucléolo/núcleo e número de nucléolos, foi notado que o grupo plasmocitóide apresentou valores médios maiores que os dos grupos misto e linfocitóide (Tabela 9).

TABELA 9 – Médias e desvios padrões das áreas nuclear e nucleolar, da relação nucléolo/núcleo e número de nucléolos pelo método de CEC em amostras dos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

GRUPO	ÁREA NUCLEAR § (μm^2)		ÁREA NUCLEOLAR $\square$ (μm^2)		NUCLÉOLO/ NÚCLEO ‡		NÚMERO DE NUCLÉOLOS †	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfocitóide	65,60	18,89	3,90	1,10	0,05	0,01	1,08	0,12
Misto	73,35	16,21	4,20	1,91	0,06	0,01	1,05	0,10
Plasmocitóide	71,97	16,71	4,36	1,80	0,06	0,01	1,10	0,21

§ p=0,28 pela ANOVA

$\square$ p=0,62 pela ANOVA

‡ p= 0,25 pela ANOVA

† p=0,54 pela ANOVA

Ainda estudando indicadores citomorfométricos, foi identificado um maior valor médio do diâmetro nuclear e nucleolar no grupo plasmocitóide em relação aos grupos misto e linfocitóide, embora não tivessem diferença estatística significativa (Tabela 10).

TABELA 10 – Médias e desvios padrões dos índices de circunferência nuclear e diâmetro nucleares e nucleolares pelo método de CEC em amostras nos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

GRUPO	ÍNDICE CIRCUNF. NUCLEAR §		ÍNDICE CIRCUNF NUCLEOLAR $\square$		DIÂMETRO NUCLEAR (μm) ‡		DIÂMETRO NUCLEOLAR (μm) †	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfocitóide	0,97	0,008	0,91	0,01	9,13	0,81	2,15	0,28
Misto	0,97	0,007	0,92	0,01	9,41	0,90	2,16	0,41

Plasmocitóide	0,97	0,006	0,92	0,01	9,50	1,10	2,37	0,57
§ p=0,82 pela ANOVA				‡ p= 0,44 pela ANOVA				
▫ p=0,22 pela ANOVA				† p=0,18 pela ANOVA				

Analisando a morfometria do núcleo e nucléolo nas neoplasias primárias e não primárias (Tabela 11, Figura 15), identificou-se uma mediana da área nucleolar maior nas neoplasias primárias ($3,93\mu\text{m}^2$) em relação às não primárias ($3,3\mu\text{m}^2$), estatisticamente significativa ($p<0,05$ pelo teste de Mann-Whitney). Também notou-se que na relação nucléolo/núcleo (Figura 16), o grupo das neoplasias primárias teve uma maior mediana (0,06) com significância estatística ($p<0,05$) quando comparada com o grupo das não primárias (0,05).

TABELA 11 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) das medidas nucleares e nucleolares em amostras das neoplasias primárias e não primárias do tumor venéreo transmissível.

Grupos	Primário			Não primário		
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%
Área nuclear (μm^2)	69,59	60,44	80,18	63,93	59,90	73,88
Área nucleolar (μm^2)	3,93 ^a	3,28	4,86	3,34 ^b	2,90	3,74
Nucléolo/núcleo	0,06 ^a	0,05	0,06	0,05 ^b	0,04	0,05
Número de nucléolos	1,00	1,00	1,14	1,00	1,00	1,01
Índice circunf. Nuclear (μm^2)	0,97	0,97	0,98	0,98	0,97	0,98
Índice circunf. Nucleolar (μm^2)	0,92	0,01	0,00	0,93	0,01	0,00
Diâmetro nuclear (μm)	9,22	8,67	10,00	8,98	8,70	9,65
Diâmetro nucleolar (μm)	2,19	2,02	2,41	2,05	1,91	2,32

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas para $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney)

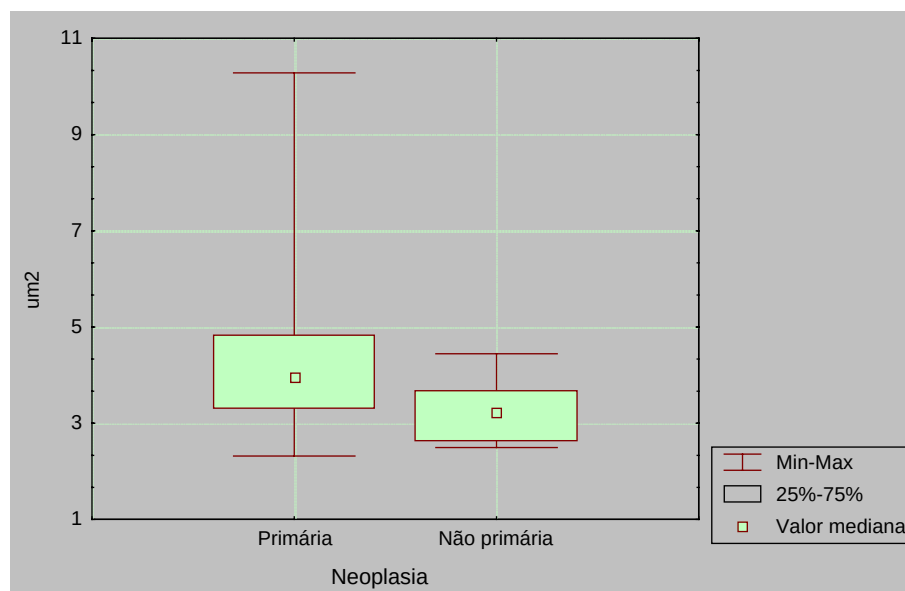


FIGURA 15 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) das áreas nucleolares nas amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

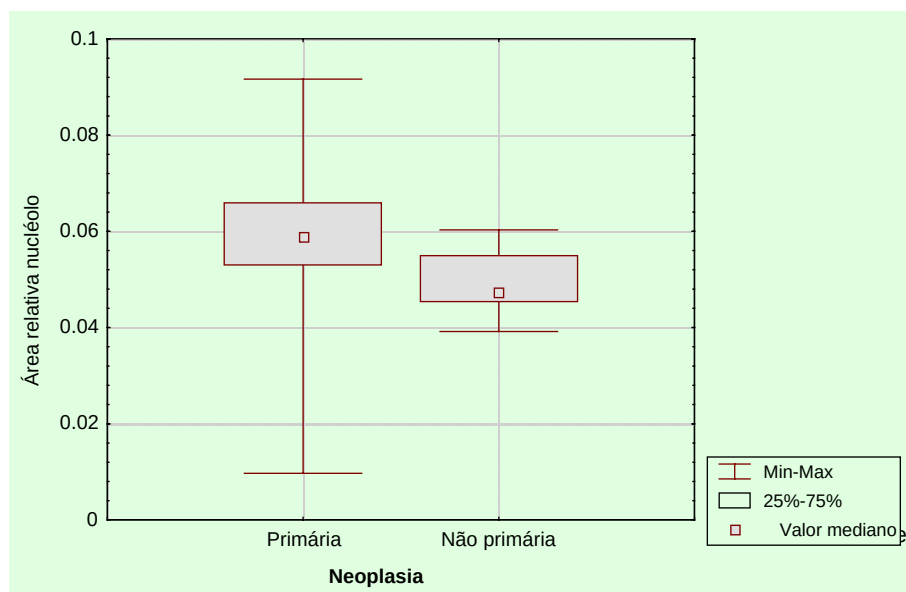


FIGURA 16 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da relação nucléolo/núcleo em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

4.4 AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL

4.4.1 MARCAÇÃO DO ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO Ki-67

A imunorreatividade do Ki-67 (clone MIB-1) nas células do tumor venéreo transmissível foi limitada exclusivamente ao núcleo, sendo vista predominantemente ao redor ou dentro do nucléolo, mas com variável coloração do nucleoplasma. As células que tiveram marcação forte ou fraca do nucleoplasma ou marcação apenas do nucléolo foram consideradas imunorreativas (Figura 17). A maioria das células marcadas nos três grupos teve distribuição homogênea nos campos microscópicos percorridos.

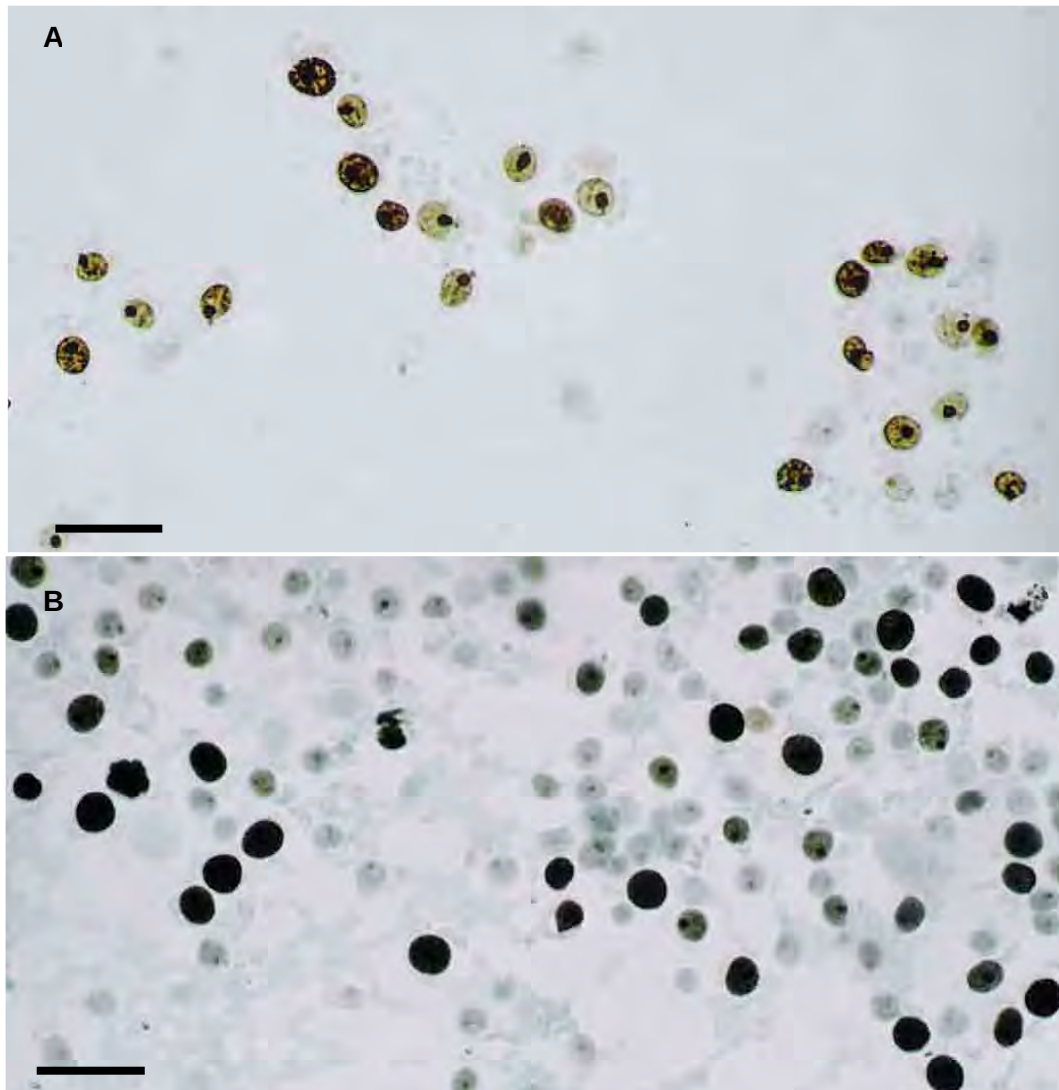


FIGURA 17 – Amostras imunomarcadas pelo antígeno Ki-67 em amostras do tumor venéreo transmissível: **A.** marcação nuclear fraca; **B:** marcação nuclear forte (contra-coloração com verde de metila; barra: 20 μ m).

De acordo com o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o paramétrico de ANOVA, foi constatado que o grupo plasmocitóide apresentou imunorreatividade do Ki-67 significativamente superior ($p < 0,05$) ao grupo linfocitóide. A Tabela 12 ilustra esta diferença demonstrada pelas medianas e percentis, assim como pelas as médias e desvios padrões dos três diferentes

grupos. Nota-se ainda que não houve diferença significativa entre os grupos misto e linfocitóide (Figura 18).

TABELA 12 – Número de células (n), medianas e percentis (P_{25} : P_{75}), médias e desvios padrões da marcação do Ki-67 (MIB-1) em amostras de tumor venéreo transmissível dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide.

GRUPO	n	MEDIANA (%)	P_{25}	P_{75}	MÉDIA (%)	DP
Linfocitóide	22	37 ^a	21	61	41,86 ^a	22,02
Misto	30	53 ^{ab}	48	62	52,63 ^{ab}	12,33
Plasmocitóide	46	58 ^b	46	75	57,41 ^b	20,30

^{a,b} Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$.

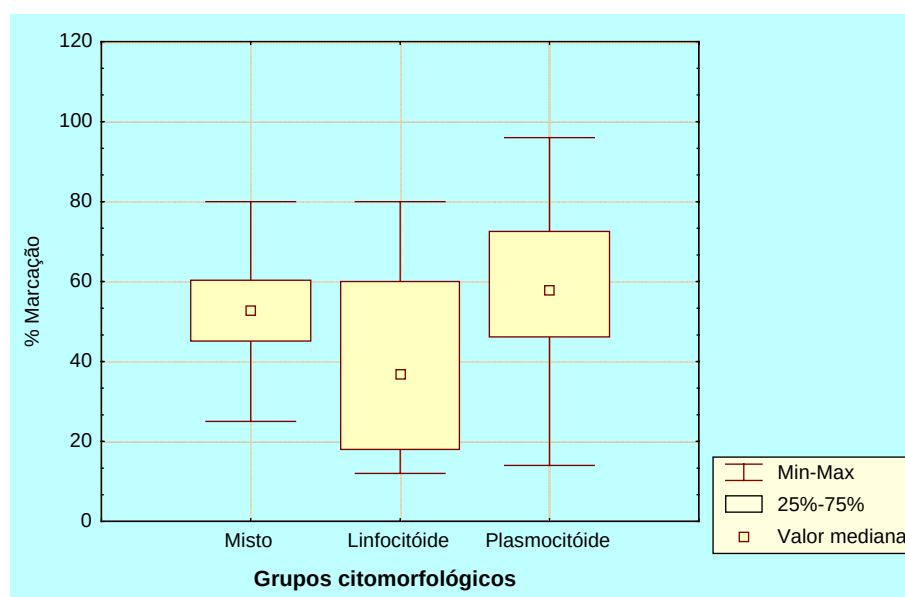


FIGURA 18 – Marcação do Ki-67 (MIB-1) em amostras de tumor venéreo transmissível dos tipos linfocitóide, misto e plasmocitóide.

Analisando taxa de proliferação das neoplasias primárias e não primárias, demonstrada no *box-whiskers* (Figura 19), constatou-se que houve um percentual de marcação do Ki-67 (MIB-1) maior no grupo das neoplasias não primárias (58%) comparado com as primárias (51%), embora sem apresentar diferença estatística (Tabela 12).

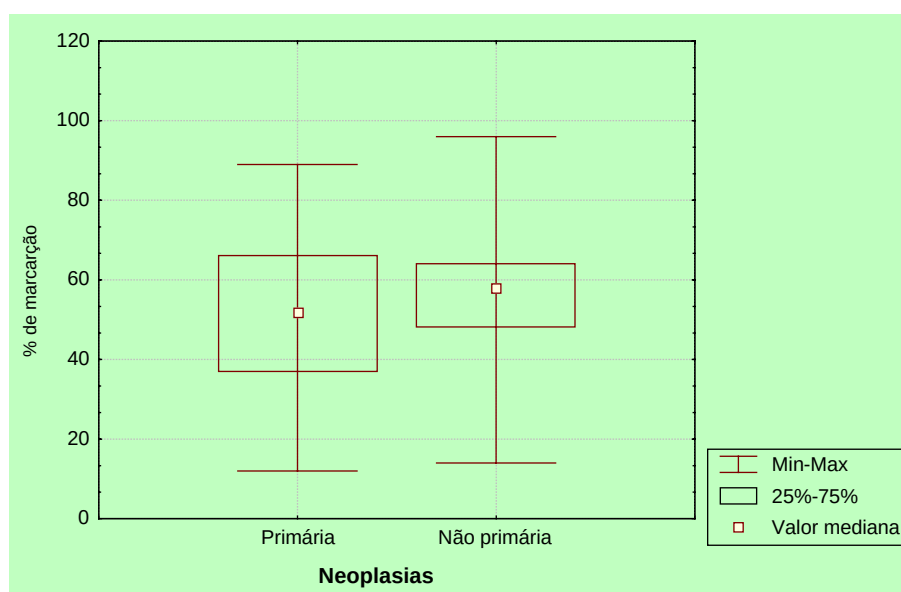


FIGURA 19 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da marcação do Ki-67 nas amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

4.4.2 MARCAÇÃO DA REGIÃO ORGANIZADORA DO NUCLEOLO INTERFÁSICO

4.4.2.1 Resposta à coloração

As regiões organizadoras nucleolares coradas pela técnica de PLOTON *et al.* (1986), tratadas previamente com com Triton-X a 0,5% em PBS, durante 15 minutos em temperatura ambiente (VIDAL E MELLO, 1995) foram observadas nitidamente em todos os espécimes corados.

As AgNORs das células de TVT foram melhor visualizadas ao microscópio óptico após o tempo de 12 a 15 minutos de coloração. Quando as lâminas eram retiradas antes deste tempo as AgNORs não se definiam claramente, já em tempos maiores os pontos coalesciam, formando áreas escuras nos núcleos.

A proposta variante do tratamento prévio com o Triton-X 100 resultou numa melhor definição das AgNORs, com menos coloração indevida de fundo, facilitando bastante a definição das áreas AgNORs positivas para o procedimento na análise de imagens. A Figura 20 mostra aspectos da coloração das AgNORs sem tratamento prévio com Triton-X100.

A técnica de coloração com as lâminas invertidas em bandeja de polipropileno reduziu o precipitado inespecífico, mostrando-se eficiente e bastante econômica.

Em todos os casos corados as AgNORs apresentavam-se em

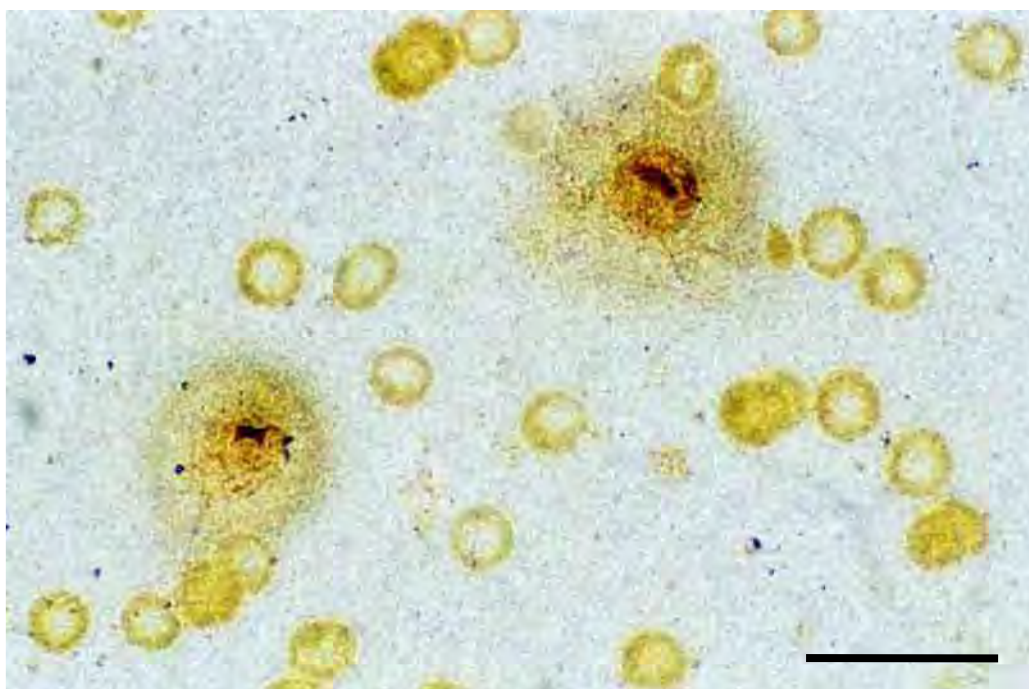


FIGURA 20 – Amostra citológica de tumor venéreo transmissível corado pela técnica da prata coloidal sem tratamento prévio com Triton X-100. Observar pobre delimitação das AgNORs; barra: 20µm.

pontos ou agregados de coloração marrom escuro, de tamanho e forma regular (Figura 21). Os pontos das AgNORs apresentavam limites bem definidos e regulares, enquanto os agregados das AgNORs mostraram limites irregulares. Cabe salientar que, durante avaliação das AgNORs nucleolares, verificou-se células de alguns espécimes apresentando um brotamento nucleolar. Estes brotamentos estavam destacados pelos sais de prata, facilitando, desta forma, a sua visualização (Figura 21C).

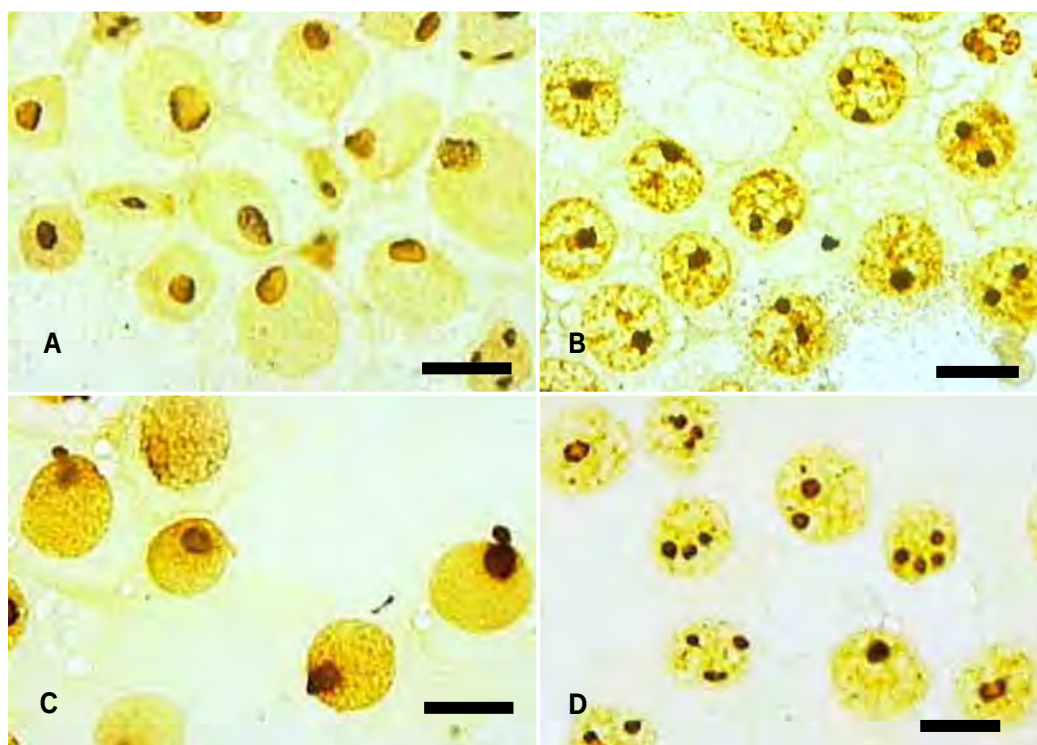


FIGURA 21 – Amostras citológicas de tumor venéreo transmissível corados pela técnica da prata coloidal: **A**: marcação nucleolar; **B**: marcação nucleolar e nuclear; **C**: marcação de brotamentos nucleolares; **D**: marcação com múltiplos nucléolos. Barra: 10 μ m.

4.4.2.2 Parâmetros qualitativos das AgNORs

Em todos os espécimes estudados pelo analisador de imagens, foi avaliada a distribuição das AgNORs segundo o padrão proposto por SHIRO

et al. (1993). A distribuição segundo tipo citomorfológico do TVT é apresentada na Tabela 13.

TABELA 13 – Padrão de distribuição das AgNORs nos diferentes tipos citomorfológicos de amostras do tumor venéreo transmissível, segundo SHIRO *et al.* (1993).

Grupo	Número de casos	Total de células	Tipo 1		Tipo 2	
			Número de células	%	Número de células	%
Linfocitóide	20	741	165	22,27	576	77,73
Misto	22	733	145	19,79	588	80,21
Plasmocitóide	28	914	223	24,40	691	75,60

p= 0,54 pelo teste χ^2 .

No padrão tipo 1 (Figura 22) as AgNORs apresentam-se como pontos escuros ou marrons, de tamanho diferente, com limites bem definidos e localizadas no interior dos nucléolos. No padrão tipo 2 (Figura 22), as AgNORs localizam-se nos nucléolos como no padrão anterior acompanhados de pontos sem limites definidos e dispersos pelo núcleo (SHIRO *et al.*, 1993).

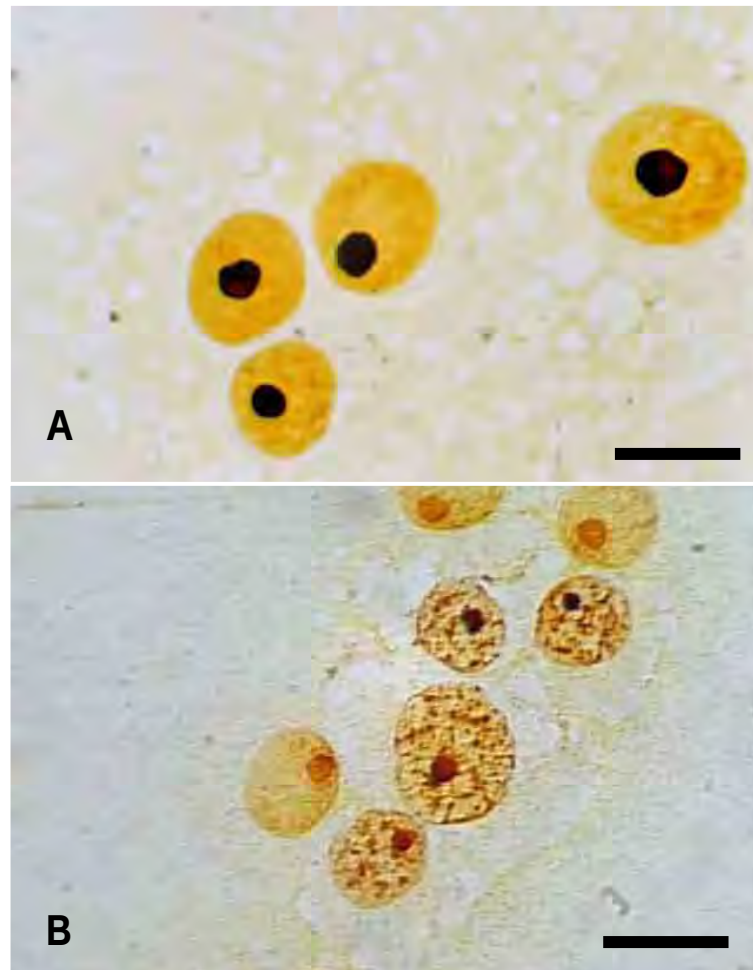


FIGURA 22 – Padrão de distribuição das AgNORs (SHIRO *et al.* 1993): A. tipo 1 (AgNORs nucleolares); B. tipo 2 (AgNORs nucleolares e nucleares). Barra: 10 μ m.

4.4.2.3 Parâmetros quantitativos das AgNORs

Para análise exploratória do número de pontos e área das AgNORs empregou-se os testes estatísticos paramétrico de ANOVA e não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA em *ranks*), os quais tiveram resultados semelhantes. Embora alguns indicadores estudados não apresentassem distribuição normal, todos apresentaram homogeneidade de variâncias entre os grupos. Aceitando que se trabalhou com pressuposições de homogeneidade de

variâncias, foi decidido descrever a ANOVA, considerando a eficiência deste teste estatístico.

A área média de cada ponto das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula foram calculadas para cada grupo de acordo com o tipo citomorfológico (Tabela 14). Estes valores tiveram uma variação de 0,19 a $1,66\mu\text{m}^2$. Subseqüentemente, estes valores médios foram analisados comparativamente e, mesmo não havendo diferenças significativas, a média do ponto no nucléolo do tipo plasmocitóide foi maior que nos outros dois grupos.

TABELA 14 – Comparação das médias e desvios padrões das áreas de pontos de AgNORs por nucléolo, núcleo e total por célula em amostras dos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

Grupo	Área pontos AgNOR/núcléolo (μm^2) §		Área pontos AgNOR/núcleo (μm^2) ‡		Área pontos AgNOR/célula (μm^2) †	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfocitóide	1,19	0,81	0,23	0,10	0,54	0,22
Misto	1,41	1,05	0,19	0,06	0,55	0,15
Plasmocitóide	1,66	0,97	0,23	0,12	0,66	0,43

§p= 0,24, ‡p= 0,43 e †p= 0,29 pelo teste de ANOVA

Também foram mensuradas as áreas médias das AgNORs nuclear, nucleolar e da célula (Tabela 15), com objetivo de comparação de médias segundo o tipo citomorfológico. Embora a área das AgNORs no nucléolo tenha apresentado valor médio superior no grupo plasmocitóide em relação aos outros dois grupos, não houve diferença estatística significativa. Já o grupo linfocitóide apresentou uma maior área média das AgNOR no núcleo em relação

aos outros dois. Entretanto, quando a área das AgNORs por célula (total) foi comparada entre estes dois grupos, não houve diferença.

TABELA 15 – Comparação das médias e desvios padrões das áreas das AgNORs por nucléolo, núcleo e área total por célula de amostras nos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

Grupo	Área AgNOR/núcléolo (μm^2) [§]		Área AgNOR/núcleo (μm^2) [‡]		Área AgNOR/célula (μm^2) [†]	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfocitóide	1,83	0,81	1,39	1,11	3,40	1,79
Misto	1,88	1,05	0,85	0,74	2,91	1,60
Plasmocitóide	2,20	0,97	0,97	0,78	3,38	1,79

[§]p= 0,45, [‡]p= 0,13 e [†]p= 0,57 pelo teste de ANOVA

Comparando o número de pontos por nucléolo, núcleo e total por célula nos diferentes grupos citomorfológicos, foi notado que o nucléolo apresentou um número médio de pontos superior no grupo linfocitóide (1,76%) em relação ao grupo plasmocitóide (1,43%) com significância estatística ($p < 0,05$) pelo teste paramétrico da ANOVA (Tabela 16, Figura 23).

TABELA 16 – Comparação das médias e desvios padrões do número de pontos de AgNORs por nucléolo, núcleo e total por célula, em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos diferentes tipos citomorfológicos.

Grupo	Número pontos AgNOR/núcléolo (μm^2)		Número pontos AgNOR/núcleo (μm^2)		Número pontos AgNOR/célula (μm^2)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfocitóide	1,76 ^a	0,64	5,05	3,85	6,96	3,74
Misto	1,52 ^{ab}	0,39	4,06	3,43	5,80	3,35
Plasmocitóide	1,43 ^b	0,24	4,33	2,78	5,87	2,69

^{a,b} Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$ (teste de Tukey para comparação entre as médias).

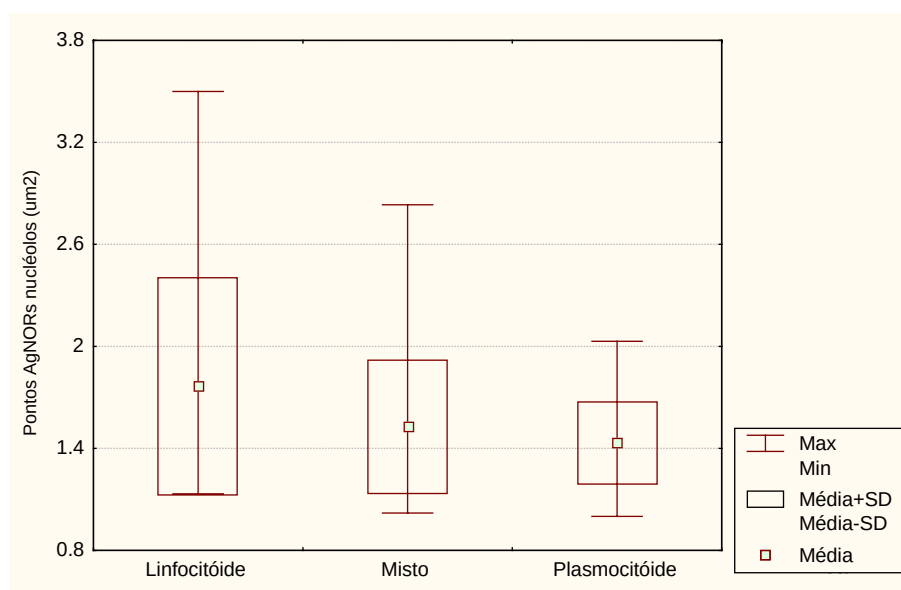


FIGURA 23 – Médias e desvio padrões dos pontos de AgNORs por nucléolo em amostras de tumor venéreo transmissível de diferentes tipos citomorfológicos.

Considerando a área dos pontos das AgNORs no nucléolo das neoplasias primárias e não primárias, mesmo não tendo diferença estatística, chama a atenção que a mediana das não primárias foi maior (1,45) que a mediana das primárias (1,14). A área mediana dos pontos das AgNORs nas células de neoplasias primárias e não primárias variou de 0,19 a 1,45 μm^2 (Tabela 17, Figura 24).

TABELA 17 – Medianas e percentis da área dos pontos das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

Grupos	Primário			Não primário			p*
	Mediana	P25%	P75%	Mediana	P25%	P75%	
Área pontos AgNOR/núcléo o	1,14	0,67	1,60	1,45	0,80	2,51	0,08
Área pontos AgNOR/núcleo	0,21	0,19	0,28	0,19	0,17	0,23	0,06
Área pontos AgNOR/célula	0,52	0,44	0,65	0,50	0,45	0,63	0,73

* teste de Mann-Whitney

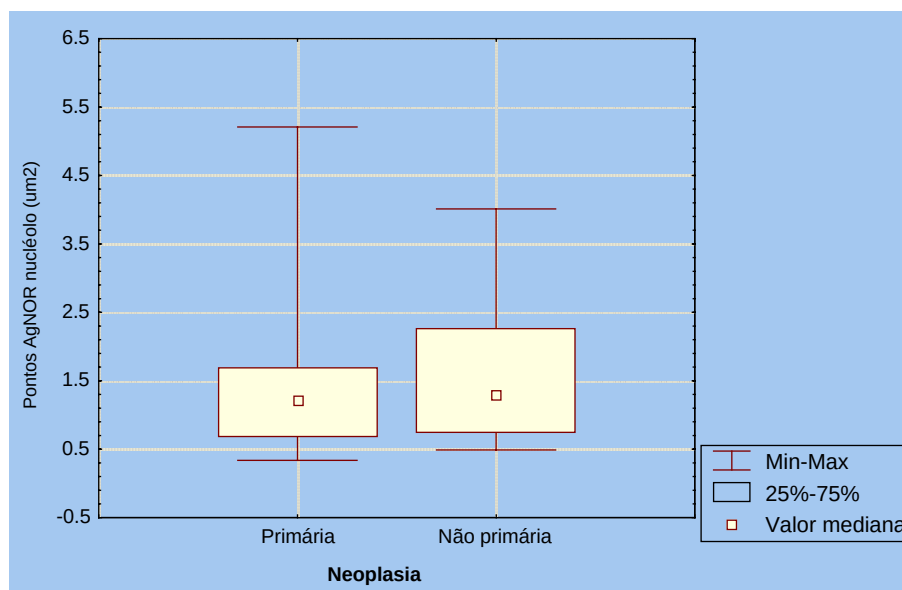


FIGURA 24 – Mediana e percentis (P_{25} : P_{75}) da área dos pontos das AgNORs nucleolares em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

Analisando o valor das áreas das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula como um todo, percebeu-se que a mediana e percentis foram maiores no grupo das neoplasias não primárias em comparação com as primárias, sem que houvesse diferença estatística (Tabela 18, Figura 25).

TABELA 18 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) das áreas das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

Grupos	Primário			Não primário			P^*
	Mediana	P25%	P75%	Mediana	P25%	P75%	
Área AgNOR/núcléolo	1,61	1,18	2,07	1,84	1,23	3,16	0,27
Área AgNOR/núcleo	0,87	0,27	1,48	1,07	0,38	1,56	0,72
Área AgNOR/célula	2,84	1,89	4,03	3,55	1,89	4,73	0,53

* teste Mann-Whitney

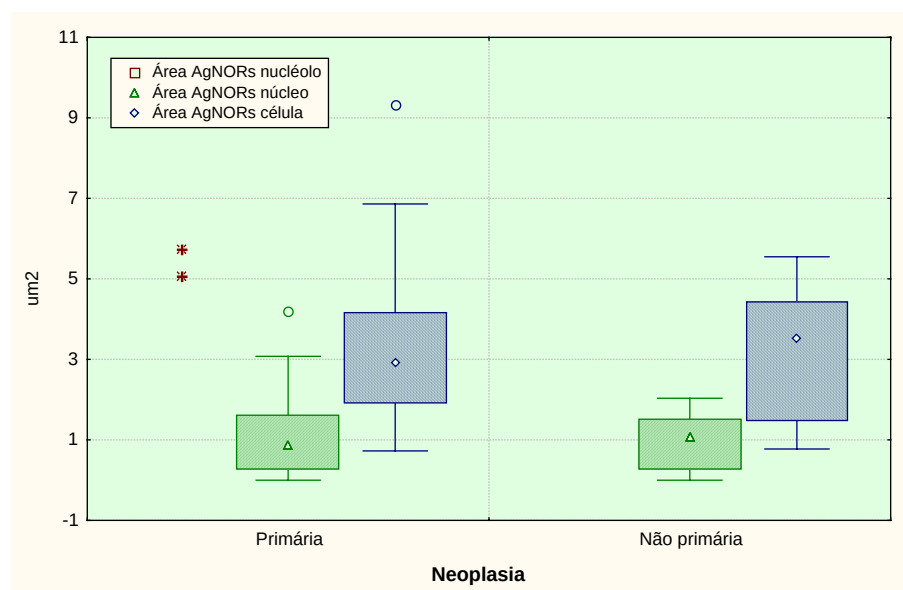


FIGURA 25 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) da área das AgNORs nucleolares, nucleares e da célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

Conforme descrito na Tabela 19, as neoplasias não primárias, em relação às primárias, apresentaram um número mediano de pontos das AgNORs maior no núcleo, assim como na célula. A Figura 26 ilustra esta observação.

TABELA 19 – Valores medianos e percentis (P_{25} : P_{75}) do número de pontos das AgNORs no nucléolo, núcleo e na célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

Grupos	Primário			Não primário			P^*
	Mediana	P25%	P75%	Mediana	P25%	P75%	
Número pontos AgNOR/núcléo o	1,47	1,23	1,76	1,43	1,22	1,55	0,23
Número pontos AgNOR/núcleo	3,45	1,36	6,13	5,09	2,10	7,13	0,35
Número pontos AgNOR/célula	5,40	3,26	9,03	6,68	3,66	8,46	0,69

* teste Mann-Whitney

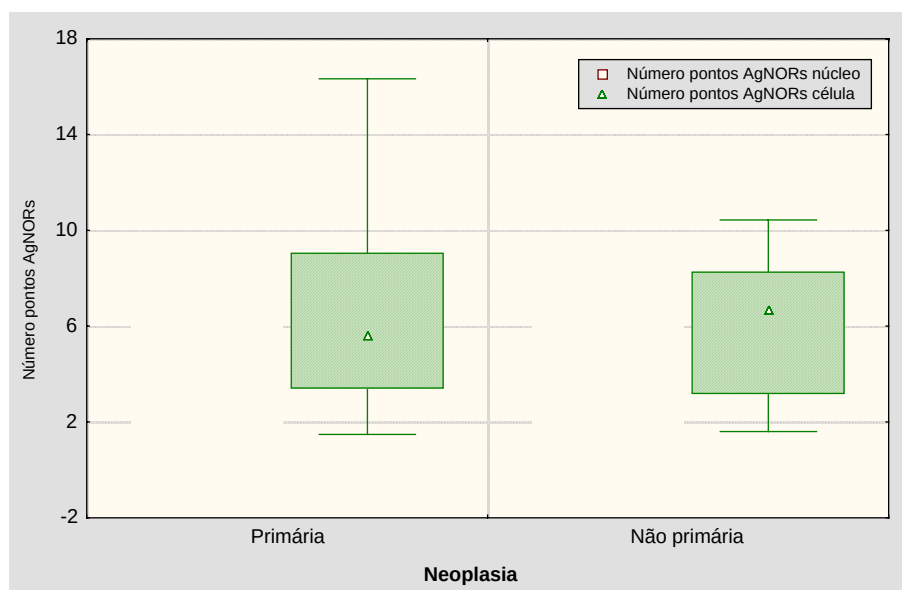


FIGURA 26 – Medianas e percentis (P_{25} : P_{75}) do número de pontos das AgNORs no núcleo e na célula em amostras de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

4.5 MARCAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA-P

O anticorpo antiglicoproteína-p clone 5B12, testado, não apresentou marcação positiva nos tecidos que fisiologicamente expressam glicoproteína-p, tais como fígado e rim hígidos. Da mesma forma, também não demonstrou expressão antigênica nas células de TVT, mesmo seguindo as recomendações da literatura e do fabricante. Como mesmo após as tentativas de recuperação antigênica por calor com EDTA e citrato e uso de sistemas secundários e de amplificação diferentes sem sucesso, o mesmo não foi incorporado ao painel.

Quando utilizado o anticorpo antiglicoproteína-p do clone C494, obteve-se uma marcação positiva usando uma diluição de 1:100 do anticorpo primário, tanto dos controles positivos, como das células de TVT. No processamento inicial não foi necessário o uso de recuperação antigênica pelo calor, mas para a diminuição de marcações inespecíficas e redução de fundo,

antes da incubação com o anticorpo primário os preparados citológicos foram incubados com BSA 2% por uma hora em temperatura ambiente. Para o controle positivo da glicoproteína-p foram usados cortes histológicos ou impressão de fígado canino normais (Figura 27) e como controle negativo, amostras citológicas de TVT incubadas somente com o diluente do anticorpo primário.

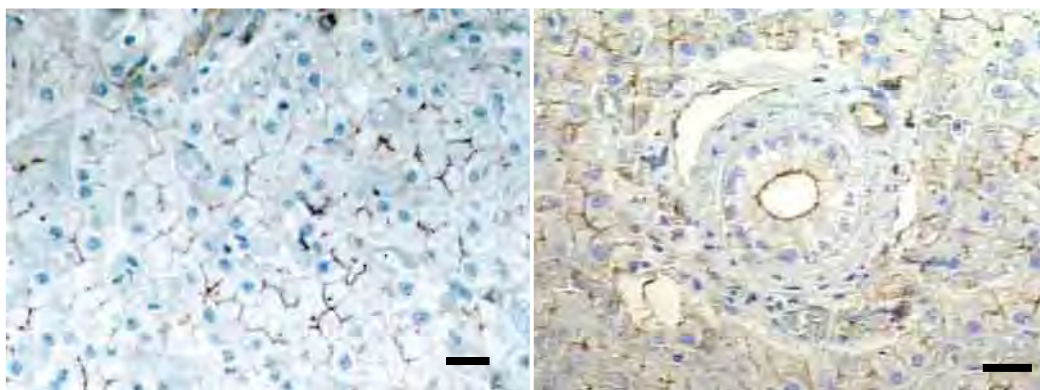
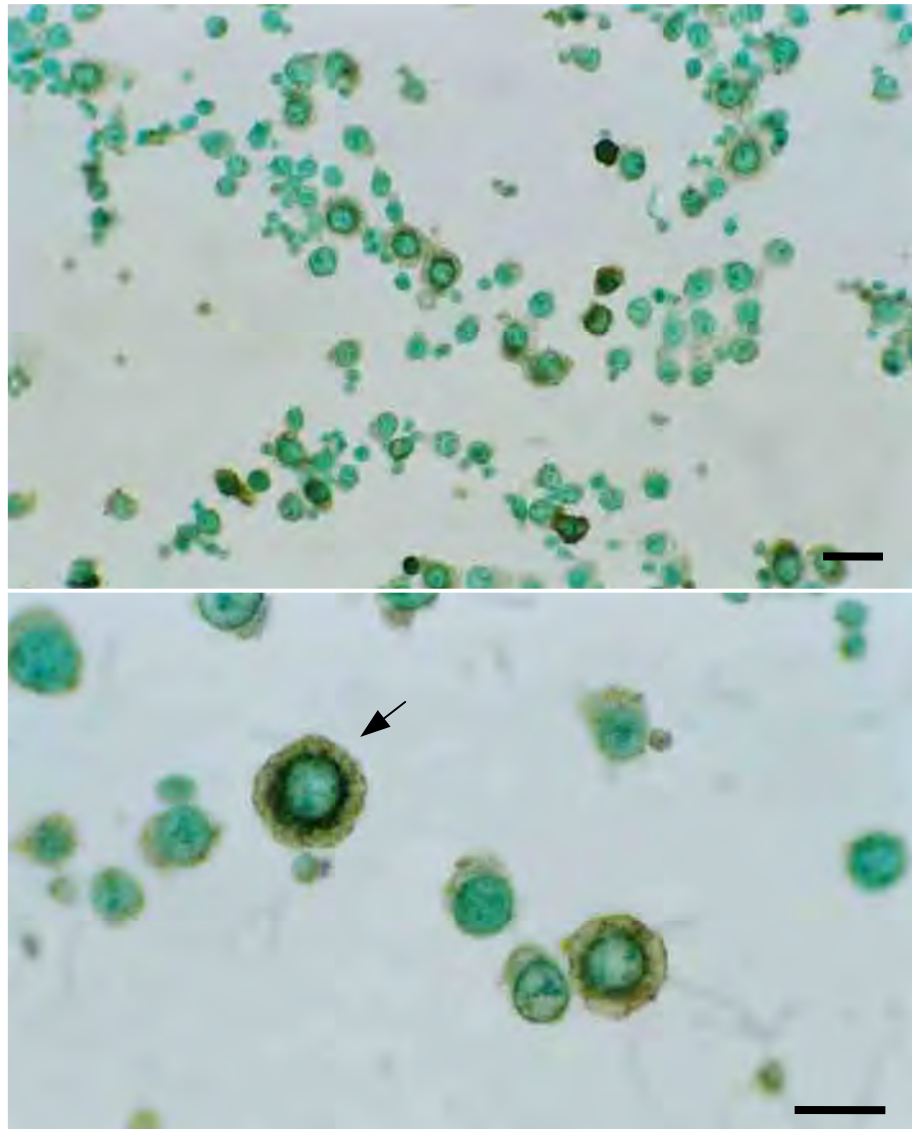


FIGURA 27 – Cortes histológicos de fígado canino imunocorados com anticorpo anti-glicoproteína-p (controle positivo). Barra: 20 μ m.

A substituição do complexo streptavidina-biotina por um sistema de anticorpo secundário e polímero associado a peroxidase, com incubação em temperatura ambiente durante uma hora, resultou na redução das marcações inespecíficas (fundo).

Todos os espécimes citológicos foram analisados em microscopia de luz em aumento 400x para determinar a presença e a localização da imunocoloração positiva. As células de TVT tiveram marcação da membrana citoplasmática variando de discreta a intensamente corada,



geralmente acompanhada de difusa marcação citoplasmática (Figura 28).

FIGURA 28 – Amostras citológicas imunocoradas com anticorpo anti-glicoproteína-p mostrando a marcação de citoplasma e membrana (barra: 10µm).

De acordo com o teste χ^2 seguido pelo teste de Goodman foi constatado que o grupo plasmocitóide apresentou uma maior imunorreatividade para o anticorpo antiglicoproteína-p estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo linfocitóide (Tabela 20). Na representação gráfica da marcação da glicoproteína (Figura 29), observa-se mais claramente esta manifestação.

TABELA 20 – Número de casos (n) e percentagem (%) de marcação da glicoproteína-p em amostras dos diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

GRUPO	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL
	n (casos)	%	n (casos)	%	
Linfocitóide	3 ^a	15,79	16	84,21	19
Misto	14 ^{ab}	43,75	18	56,25	32
Plasmocitóide	29 ^b	55,76	22	44,24	51

^{a,b} Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$ (Teste de Goodman para contraste entre proporções multinomiais)

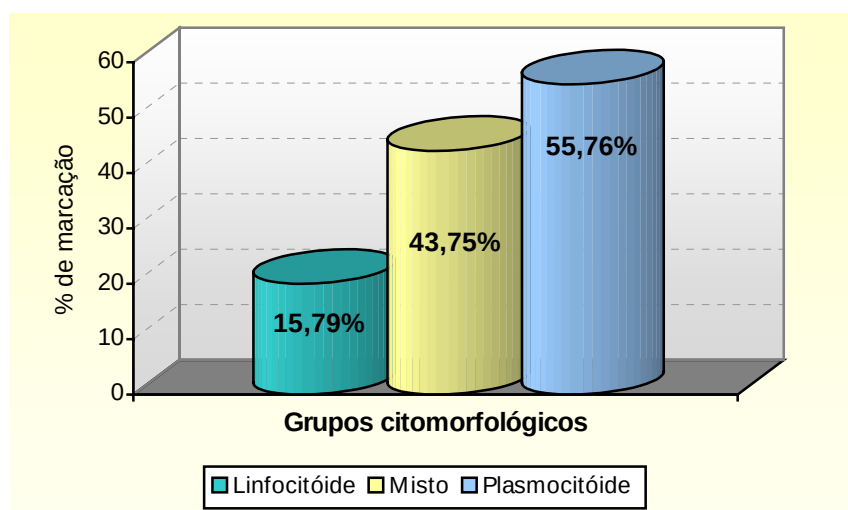


FIGURA 29 – Percentual de casos imunomarcados pela glicoproteína-p em amostras dos três diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

Com relação à marcação da glicoproteína-p, observou-se que ela produziu imunorreatividade superior (58,80%) no grupo de massas não primárias, comparado com a do grupo primário (38,58%) sem que houvesse diferença significativa (Tabela 21). A Figura 30 ilustra a imunorreatividade da glicoproteína-p nas neoplasias.

TABELA 21 – Percentagem de marcação da glicoproteína-p em amostras de neoplasias primárias e não primárias no tumor venéreo transmissível.

Glicoproteína-p	Primário		Não primário	
	n	%	n	%
Marcação positiva	27	38,58	20	58,80
Marcação negativa	43	61,42	14	41,20
Total	70	100	34	100

p= 0,11 pelo teste χ^2 .

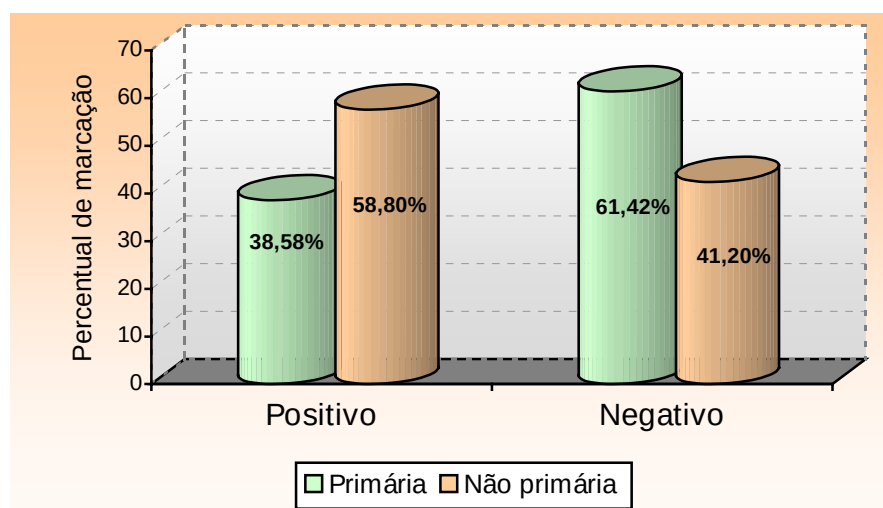


FIGURA 30 – Marcação da glicoproteína-p em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível primário e não primário.

4.6 RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA

Todos os casos acompanhados durante o tratamento foram submetidos ao mesmo protocolo terapêutico (droga, via de administração, intervalo e número de aplicações). Analisando as respostas clínicas à quimioterapia entre os grupos, observou-se que o grupo plasmocitóide foi menos sensível à quimioterapia em relação aos grupos misto e linfocitóide (Tabela 22), mostrando diferença estatisticamente significativa (5%). De outra forma, notou-se que o percentual de casos que tiveram resposta clínica parcial à quimioterapia no grupo linfocitóide (41,67%) foi menor em relação ao grupo plasmocitóide (77,28%). Para melhor entendimento, os resultados desta variável estão demonstrados na Figura 31.

TABELA 22 – Resposta clínica à quimioterapia entre os diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

GRUPO	RESPOSTA COMPLETA	RESPOSTA PARCIAL	TOTAL

	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Linfocitóide	7 ^a	58,33	5	41,67	12
Misto	8 ^a	66,66	4	33,34	12
Plasmocitóide	5 ^b	22,72	17	77,28	22

^{a,b} Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$ (Teste de Goodman para contraste entre proporções multinominais).

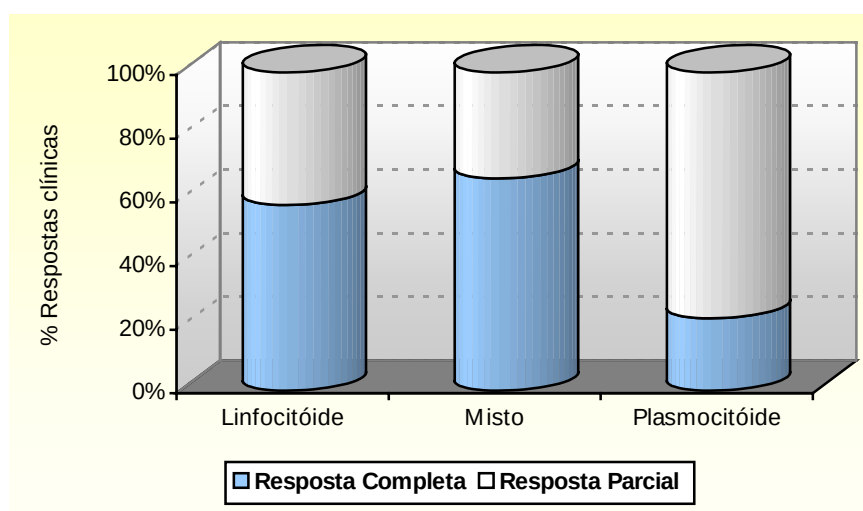


FIGURA 31 – Resposta clínica de acordo com tipo citomorfológico do tumor venéreo transmissível.

Este experimento teve a proposição de reagrupar as amostras para analisar possíveis relações entre as variáveis estudadas. Neste caso procurou-se relacionar a resposta clínica à quimioterapia com a expressão de glicoproteína-p, devido a resistência tumoral a alguns quimioterápicos. O resultado expressado na Tabela 23 mostrou que o grupo com resposta parcial apresentou um percentual de marcação maior da glicoproteína-p (68,43%). Alternativamente, observando a Figura 32, o grupo com resposta completa teve um percentual de marcação menor da glicoproteína-p (31,57%). Embora não tenha havido diferença estatística, o efeito biológico foi aparente.

TABELA 23 – Distribuição do percentual de marcação da glicoproteína em relação à resposta clínica à quimioterapia nos animais com tumor venéreo transmissível.

GRUPO	POSITIVO		NEGATIVO	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Resposta completa	6	31,57	13	56,52
Resposta parcial	13	68,43	10	43,48

$p=0,19$ pelo teste χ^2 .

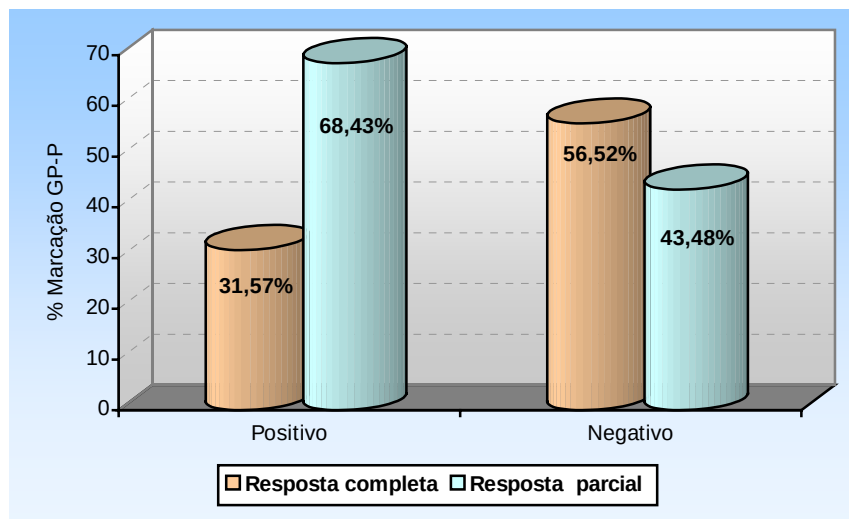


FIGURA 32 – Percentual de casos de tumor venéreo transmissível positivos para glicoproteína-p relacionado com resposta clínica à quimioterapia.

5 DISCUSSÃO

Analisando a frequência dos tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, pôde-se observar que houve uma predominância dos tipos plasmocitóide e misto em relação ao linfocitóide. Os achados citológicos do tipo linfocitóide lembram muito o perfil celular do tumor venéreo transmissível, já que são células pequenas, de contorno regular, com núcleos arredondados e geralmente concêntricos (COHEN, 1985; MACEWEN, 1996). O tipo plasmocitóide constituiu-se geralmente de células volumosas, de contorno irregular, com núcleo excêntrico e citoplasma abundante (BOSCOS *et al.*, 1999).

5.1 BINUCLEAÇÃO E MULTINUCLEAÇÃO

A percentagem dos casos apresentando células com mais de um núcleo não foi estatisticamente diferente entre os grupos citomorfológicos, conforme pôde ser observado. Entretanto, o percentual de casos com mais de um núcleo foi grande nos três grupos. Como ocorreu neste experimento, a binucleação e a multinucleação podem resultar da divisão celular sem a ocorrência subsequente da citocinese (MEINKOTH & COWELL, 2002), fusão de células mononucleadas (KAMEL, 1990) e da divisão mitótica de uma célula binucleada pré-existente (MIRANDA, 1996). O dano da matriz pericentriolar determina uma mitose multipolar com consequente multinucleação. De acordo com BHATTATHIRI *et al.* (1998) estudando lesões severas induzidas pela

radiação, descreveram que o bloqueio da citocinese resulta na formação de célula binucleada e a divisão de um ou ambos núcleos poderia gerar a multinucleação. Células com múltiplos núcleos de vários tamanhos, incluindo os micronúcleos, são evidências de divisão anormal com desigual distribuição de cromatina nuclear, portanto, características de malignidade celular (DENICOLA & REAGAN, 1998).

Para RODILLA (1993) e BHATTATHIRI (2001) a ocorrência de células multinucleadas nas neoplasias pode ser devido a uma falha nos mecanismos de regulação da divisão celular ou pela falta de uma coordenação adequada entre as divisões nuclear e citoplasmática.

5.2 BROTAMENTO E LOBULAÇÃO NUCLEAR

Embora a frequência de brotamentos nucleares tenha sido alta para os três grupos, não houve diferenças significativas. Uma frequência elevada de brotamentos também foi observada nas massas não primárias. Com relação às lobulações nucleares, foi constatado que o grupo plasmocitóide apresentou um percentual maior destas anormalidades em relação ao grupo linfocitóide. Mesmo sem o aval positivo do método estatístico utilizado, não se pode desvalorizar o fenômeno biológico, visto que estas estruturas também estão presentes em tumor venéreo transmissível de localização não primária.

De forma inédita, os brotamentos e lobulações foram observados no tumor venéreo transmissível a exemplo de outras neoplasias. A ocorrência destas anormalidades nucleares possivelmente tem uma gênese semelhante. A frequência aumentada dos brotos pode estar relacionada com a instabilidade genética da célula, a qual é característica dos tumores. Esta proposição baseia-se na citação de NOWELL (1994), onde ele menciona que

nas células tumorais a aneuploidia ocorre também por deleção de material genômico, amplificação cromossômica de alguns oncogenes ou ainda por *double minutes* extracromossômicos, que são fragmentos de DNA acêntricos com seqüências gênicas amplificadas. Os autores acreditam que o processo de formação de *double minutes* esteja associado à formação de oncogenes amplificados em células neoplásicas (FENECH & CROTT, 2002; BINDU *et al.*, 2003). Estas estruturas cromossomais aberrantes com braços muito longos tendem a gerar projeções nucleares chamadas de brotos (PEDEUTOUR *et al.*, 1994). Estas observações, mesmo que preliminares, apontam o tumor venéreo transmissível do tipo plasmocitóide como um tipo celular com perfil citogenético mais instável que os outros dois tipos. Do ponto de vista da carcinogênese comparada, essas informações são de extrema importância, pois o desenvolvimento neoplásico é um processo dinâmico que se caracteriza por modificações progressivas do perfil biológico.

5.3 MICRONUCLEAÇÃO

Considerando que a micronucleação pode ser um indicativo de genotoxicidade, e que também pode ocorrer nas neoplasias, buscou-se, de forma inédita, a presença de células micronucleadas nos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível. Analisando os casos que apresentaram células com micronúcleos, foi observado um maior percentual no grupo plasmocitóide em relação ao grupo misto e linfocitóide, embora não tivesse demonstrado diferenças significativas.

A formação dos micronúcleos provavelmente decorre da inativação do gene p53. Este gene tem um importante papel na regulação transcricional de efetores negativos que regulam os diferentes *checkpoints*, em

especial o G1. Desta forma, a inativação do p53 e, conseqüentemente, a perda do papel do *checkpoint* G1, aumentaria a probabilidade de aparecimento de células em divisão com quebras no DNA (DENKO *et al.*, 1994; HARTWELL & KASTAN, 1994). Estas quebras cromossômicas (clastogênese) poderiam dar origem a fragmentos cromossômicos que iriam se constituir, posteriormente, em micronúcleos nas células filhas (PEDEUTOUR *et al.*, 1994). Deve-se considerar, também, que interferências com o fuso mitótico (aneuploidogênese) poderiam constituir-se em outro mecanismo importante de formação de micronúcleos (TOLBERT *et al.*, 1992).

SHIMIZU *et al.* (1998) propuseram um novo mecanismo de micronucleação que envolve a formação de projeções nucleares durante a fase S (brotos nucleares), associado à eliminação de oncogenes amplificados de células neoplásicas. De acordo com estes autores, o excesso de DNA dentro da matriz nuclear é encaminhado ativamente para a periferia do núcleo. Este material amplificado, excluído para o citoplasma, originará o micronúcleo que, por sua vez, poderá ser eliminado com uma pequena quantidade de citoplasma, formando uma mini-célula (FENECH & CROTT, 2002). Esses achados para as células de tumor venéreo transmissível, no que diz respeito à biologia molecular, corroboram a seqüência de alterações genéticas, envolvendo a ativação de genes, juntamente com a perda de suas funções, necessárias para a aquisição do perfil biológico do tumor.

5.4 MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA

Os núcleos dos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, quando corados com o azul de toluidina, em presença de concentrações adequadas de íons Mg^{2+} , exibiram abolição de metacromasia do

DNA devida as concentrações iônicas de Mg^{2+} inferiores àsquelas observadas para o RNA. Isto aconteceu porque o ponto de CEC (concentração crítica de eletrólitos) do DNA é menor do que o do RNA. A molaridade de Mg^{2+} mais adequada para a visualização do nucléolo nas células de tumor venéreo transmissível no material estudado foi de 0,05M. Esta técnica razoavelmente simples não somente permitiu a identificação do nucléolo, mas também foi útil para avaliá-la devido à qualidade do contraste nuclear. Estes achados estão de acordo com MELLO *et al.* (1993) que propuseram uma técnica variante de CEC para a visualização de nucléolos, a qual foi estendida para estudos de relocação de metacromasia de RNA durante a mitose (MELLO, 1995) e a visualização de células apoptóticas (VIDAL *et al.*, 1996). Embora a técnica variante de CEC seja de fácil execução, viável economicamente e de extrema eficiência para os propósitos a que se destina, foram encontrados muito poucos trabalhos publicados empregando esta técnica para a citomorfometria tumoral.

Avaliando a morfometria do tumor venéreo transmissível notou-se que, mesmo sem diferença significativa, o tipo plasmocitóide apresentou valores médios da área nuclear, do diâmetro nucleolar e do número de nucléolos superiores aos dos outros dois tipos. Estas manifestações geralmente estão presentes nas células em proliferação ou metabolicamente ativas, as quais têm nucléolos mais proeminentes e em maior número (KAMEL *et al.*, 1990). O nucléolo tem um papel importante na célula com respeito ao processo de síntese protéica, pois é o local de síntese e processamento de RNA ribossomal e está envolvido ativamente na síntese e distribuição de RNA nuclear e citoplasmático (KAMEL *et al.*, 1990). O nucléolo sempre foi reconhecido como uma organela celular que se torna proeminente nas lesões proliferativas, especialmente as neoplasias malignas. Desta forma, a avaliação do número, forma e tamanho do nucléolo podem ser utilizados como parâmetro de avaliação proliferativa e de

progressão neoplásica (BARBISAN *et al.*, 1998). Em geral, células em proliferação ou ativas metabolicamente têm nucléolos mais proeminentes e em maior número (KAMEL *et al.*, 1990). Por meio de técnicas citoquímicas usuais, como a da concentração crítica de eletrólitos (CEC), pode-se obter imagens nucleolares nítidas, possibilitando sua análise morfológica e morfométrica (MELLO *et al.*, 1993).

Para alguns patologistas, a simples presença do nucléolo já é indicativa de malignidade naqueles tecidos onde as proliferações benignas têm nucléolos inconspícuos. O aumento do número e tamanho é comumente observado e relacionado ao diagnóstico, prognóstico e estadiamento do câncer de mama (TAJIMA, 1991).

Conforme observado neste experimento, SANTOS *et al.* (1998) trabalhando com tumor venéreo transmissível genital e extragenital, também constataram que a área média nucleolar foi maior nos tumores mais proliferativos (extragenitais). HARMELIN *et al.* (1998) igualmente comprovaram os resultados do presente estudo, quando identificaram um aumento da área do nucléolo e das AgNORs no tumor venéreo transmissível metastático comparado com o primário.

Analisando ainda a morfometria do núcleo e nucléolo das neoplasias primárias e não primárias registrou-se, com diferença estatística, que a mediana da área nucleolar foi maior nas neoplasias primárias, comparadas às não primárias. Também notou-se que na relação nucléolo/núcleo o grupo das neoplasias primárias aparentou uma maior mediana, quando comparada com o grupo das não primárias. Os resultados acima descritos sugerem que o tumor venéreo transmissível primário possivelmente apresente uma atividade transcricional maior do que o não primário. Tendo em vista que a área e o

diâmetro dos núcleos, nas neoplasias não primárias, estão relativamente menores, pode-se inferir que esta diminuição se deva, provavelmente, à perda de DNA e/ou compactação cromatínica à semelhança do que foi verificado por VIDAL (1992). As densidades nucleares podem ser indicativas de aneuploidia e de distribuição heterogênea de cromatina mais condensada nos núcleos das células tumorais.

5.5 TAXA DE CRESCIMENTO TUMORAL

5.5.1 ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO Ki-67 (CLONE MIB-1)

Analisando os resultados entre os três tipos tumorais, foi constatado que o tipo plasmocitóide apresentou uma imunorreatividade do Ki-67 (MBI-1) estatisticamente superior em relação ao tipo linfocitóide. Estes resultados sugerem que o tumor tipo plasmocitóide apresenta uma maior atividade proliferativa.

Não foram encontrados trabalhos publicados sobre o aspecto proliferativo do tumor venéreo transmissível utilizando a citologia aspirativa com agulha fina para a imunomarcação com o clone MBI-1.

GONZÁLEZ *et al.* (2000) fizeram avaliação histológica de 11 caninos com tumor venéreo transmissível, tratados com sulfato de vincristina. Os espécimes histológicos foram colhidos dos tumores durante a fase de crescimento tumoral, antes da quimioterapia, e novamente durante a regressão induzida pela quimioterapia. Os resultados mostraram que a imunocoloração para o antígeno de proliferação Ki-67 (clone MBI-1) revelou uma alta proporção de imunorreatividade no núcleo das células do tumor em progressão, entretanto uma pequena proporção de células expressou o antígeno durante a regressão induzida pelo quimioterápico. Os resultados do presente trabalho estão de

acordo no que se refere a alta imunorreatividade do núcleo das células do tumor venéreo transmissível em progressão.

Contudo, GUVENC *et al.* (2002) trabalhando também com proliferação celular (Ki-67/MBI-1) em tumor venéreo transmissível encontrou marcação positiva, entretanto com baixa imunorreatividade (17%) nos núcleos das células tumorais. Outra conclusão deste estudo foi com relação a fácil padronização do clone MBI-1. A constatação destes pesquisadores concorda com o resultado observado neste estudo.

Outro estudo imunoistoquímico sobre cinética celular de tumores, agora utilizando KI-67, foi realizado por ABADIE *et al.* (1999) procurando correlacionar antígeno nuclear de proliferação (PCNA) e o Ki-67 com o prognóstico em caninos com mastocitoma. A maioria dos tumores teve uma distribuição homogênea das células positivas do Ki-67. O resultado sugeriu que para cães com mastocitoma cutâneo solitário, um determinado número de células positivas de Ki-67 foi útil para traçar o prognóstico.

De acordo com ZUCCARI *et al.* (2004), trabalhando com impressão de neoplasia mamária, o índice de proliferação Ki-67 foi significativamente baixo nos tumores benignos em relação aos malignos. Um alto índice de Ki-67 foi positivamente correlacionado com metástases, morte pela neoplasia, baixa taxa de sobrevivência livre da doença e de sobrevida.

Estudando proliferação celular e apoptose em cortes histológicos de caninos com histiocitoma e tumor venéreo transmissível, GUVENC *et al.* (2002) constataram uma expressiva marcação de células imunopositivas pelo anticorpo Ki-67. Este estudo confirmou que a imunorreatividade do Ki-67 com o clone MBI-1 foi fácil de padronizar e que o MBI-1 é um útil marcador para rápida determinação de tumores proliferativos.

Analizando taxa de proliferação das neoplasias primárias e não primárias apresentadas neste trabalho, constatou-se que houve um percentual de marcação do Ki-67 (MIB-1) maior no grupo das neoplasias não primárias, comparado com as primárias, embora sem diferença estatística. Este resultado assemelha-se ao trabalho de MATHEUS *et al.* (2004), que pesquisaram vários marcadores de proliferação, dentre eles o Ki-67, em carcinoma pulmonar primário e metastático. A conclusão do referido trabalho mostrou que a percentagem imunomarcação do Ki-67 foi destacadamente mais alta nas metástases do que no tumor primário correspondente.

Resultados semelhantes ao do presente trabalho foram obtidos por PLATZ *et al.* (1999), que estudaram plasmocitomas extramedulares em caninos. Nesta pesquisa, os plasmocitomas foram divididos em cinco categorias com base em critérios histológicos. Todas as categorias tiveram marcação do Ki-67 (MIB-1), entretanto o tipo blástico-polimórfico foi o que apresentou a maior percentagem de marcação. Este achado foi semelhante ao que ocorreu com tipo plasmocitóide pesquisado neste experimento.

5.5.2 COLORAÇÃO DAS AgNORS

A técnica de coloração das AgNORS utilizada neste trabalho permitiu a caracterização das regiões organizadoras nucleolares no tumor venéreo transmissível para correlacioná-las com o grau de diferenciação celular e atividade proliferativa.

Para SIMÕES *et al.* (1994) a técnica de expressão das AgNORS nas células tumorais, correlacionada com o comportamento clínico, demonstrou ter valor prognóstico. A técnica também foi aplicada por EGAN & CROCKER (1988) para a distinção entre tumores benignos e malignos, assim

como para a diferenciação de tumores de baixo e alto grau de diferenciação (CROCKER & NAR, 1987).

Estudo realizado por CHU *et al.* (2001) em cães com tumor venéreo transmissível demonstrou existir uma correlação significativa entre a expressão das AgNORs e marcadores de proliferação (PCNA). Outros trabalhos utilizando a técnica das AgNORs estão concentrados em pesquisar tumores mamários (DESTEXHE *et al.*, 1995) e de pele (PRESIOZI *et al.*, 1995).

Mesmo que a maioria das pesquisas com AgNORs demonstrem resultados significativos, TOIKKANEN & JOENSUU (1993) comprovaram que a contagem das AgNORs em câncer de mama na mulher não teve significado prognóstico.

Com relação ao tempo de coloração situado entre 12 e 15 minutos, pode-se inferir que foi ideal para uma a visualização dos pontos. Este achado foi confirmado por AUBELE (1994), segundo o qual 15 minutos seriam suficientes para corar as AgNORs. DERENZINI & PLOTON (1991) consideraram 30 minutos o tempo básico de coloração. Mesmo existindo divergências entre autores, o protocolo de coloração permanece original, conforme proposto por PLOTON *et al.* (1986); no entanto, a técnica deverá ser adequada para cada experimento de acordo o espécime, tipo de material e preferências do pesquisador.

A proposta variante do tratamento prévio com o Triton-X 100 resultou numa melhor definição das AgNORs, com menos coloração indevida de fundo, facilitando bastante a visualização das áreas AgNORs positivas. O sucesso desta técnica esta de acordo com a citação de VIDAL *et al.* (1994) e VIDAL & MELLO (1995), os quais descreveram que a melhoria da definição das

AgNORs seria devido a solubilização de algumas proteínas plasmáticas facilitando a análise de imagens.

A técnica de coloração com as lâminas invertidas em bandeja de polipropileno reduziu o precipitado inespecífico, mostrando-se eficiente e bastante econômica. A eficácia desta técnica foi corroborada por CHU *et al.* (2001) que, trabalhando com características proliferativas no tumor venéreo transmissível, também constatou que esta técnica melhorou bastante a qualidade das imagens.

Para este experimento foi considerada suficiente a avaliação de trinta células de cada caso. A literatura disponível aponta que o número de células a serem contadas para a avaliação das AgNORs varia entre vinte e duzentas células, entretanto grande parte dos autores trabalharam com cem células. Um experimento realizado por SIMÕES *et al.* (1994), estudando a recorrência de mastocitoma em caninos, concluiu ser necessário a contagem de duzentas células. No entanto, ORREL *et al.* (1991) e SANTOS *et al.* (1998) consideraram que contagens superiores a trinta células não alteram o número mínimo de células, conforme foi verificado neste experimento.

O padrão de distribuição das AgNORs apresentado nos diferentes tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível foi de dispersão pelo núcleo e concentração no nucléolo das células neoplásicas. Essa distribuição é semelhante ao padrão do tipo 2 mencionado por SHIRO *et al.* (1993). De acordo com estes autores, nos carcinomas hepatocelulares pouco diferenciados o padrão de distribuição prevalente é do tipo dois, sugerindo que a distribuição das AgNORs seja um importante indicador da progressão da doença. Baseado nesta informação, considerando a distribuição das AgNORs,

não foi possível traçar uma diferença entre os grupos citomorfológicos que permitisse antecipar um perfil de evolução clínica e prognóstico.

Com relação aos brotamentos nucleolares nas células de TVT, pode-se supor que o seu aparecimento esteja relacionado com aumento da síntese de proteínas. Este fato justifica-se pelo caráter proliferativo dos tumores.

5.5.3 ÁREA MÉDIA DE PONTOS DAS AGNORS

Cabe salientar que a área média de cada ponto das AgNORs, com valores extremos entre 0,19 e 1,66 μm^2 para todos os três tipos celulares coincidiu com os valores achados por RÜSCHOFF *et al.* (1990), os quais encontraram valores de 0,1 a 2,0 μm^2 . Entretanto, DERENZINI & TRERÈ (1991a) sugeriram que a área média das AgNORs variam entre 0,1 e 0,4 μm^2 , quando a coloração estiver satisfatória. Com base nessa informação, analisando especialmente as áreas médias dos pontos das AgNORs nos núcleos dos três tipos celulares, pode-se inferir que o tempo e temperatura utilizados nesta pesquisa foi o mais apropriado. Contudo, observando as médias das áreas dos pontos no nucléolo, verificou-se que nos três tipos estas áreas extrapolaram o valor estabelecido por DERENZINI & TRERÈ (1991a). Este fato deve-se, provavelmente, a aglutinação das AgNORs no nucléolo, tornando a sua área média maior.

5.5.4 ÁREAS MÉDIAS DAS AGNORS NUCLEARES E NUCLEOLARES

A área total de AgNORs por núcleo é considerada atualmente como indicador quantitativo básico na avaliação de AgNORs, segundo o “Committee on AgNORs Quantification of European Society of Pathology” (AUBELE, 1994; ÖFNER *et al.*, 1995; ÖFNER & SHMID, 1996).

Embora não tenha havido diferença significativa das áreas médias das AgNORs nucleares e nucleolares entre os grupos, percebeu-se que a área média das AgNORs no nucléolo foi maior no grupo plasmocitóide. Contudo, a área média de AgNORs no núcleo foi maior no grupo linfocitóide. Nota-se também que esta diferença aparente se desfaz, quando a área média de AgNORs por célula (total) foi comparada. Este fato foi confirmado por DERENZINI & TRERÈ (1994), os quais também observaram diferenças de área de AgNORs comparando neoplasias benignas e malignas (BRATULIC *et al.*, 1996). Já TRERÈ (1993), assim como HAUPT *et al.* (1995), registraram um aumento da área das AgNORs nas neoplasias malignas (ORREL *et al.*, 1991).

Trabalhos têm mostrado que o número de AgNORs nos núcleos das células malignas é maior do que nas células benignas, hiperplásicas ou normais (CROCKER & NAR, 1987; SIMÕES *et al.*, 1994). Além do fato de que o número de AgNORs seja maior nas células neoplásicas, as pesquisas têm provado que este número está associado estritamente com a taxa de proliferação. Neste trabalho, onde foi estudado tipos citomorfológicos da mesma neoplasia, cuja origem é desconhecida, os resultados demonstraram que o tumor venéreo transmissível tipo linfocitóide, contrariando o esperado, apresentou um número maior das AgNORs que os outros dois tipos.

Estes valores superiores das AgNORs, mesmo que discretos, estão relacionados com a proliferação celular e podem ser explicados pela síntese de proteínas AgNORs na fase G1. As proteínas sintetizadas acumulam-se no nucléolo e, pela associação com genes ribossomais localizados no espaço extranucleolar, originam novas NORs para produção de uma quantidade maior de ribossomos para demanda protéica, o que caracteriza um célula tumoral em proliferação (DERENZINI & TRERÈ, 1991b).

Outro resultado observado empregando a coloração com a prata foi a média significativamente maior do número de pontos das AgNORs no nucléolo do tipo linfocitóide em relação aos outros dois tipos. Considerando que a área média dos pontos das AgNORs no nucléolo foi menor neste tipo citomorfológico, constatou-se que esta área embora menor, estava mais pulverizada, com um número maior de pontos AgNORs positivos. De outra maneira, o tipo plasmocitóide apresentou um número médio de pontos menor no nucléolo, entretanto apresentando uma área média de pontos maior.

Quando os animais do experimento foram reagrupados em grupos primário e não primário, foi observado, mesmo sem diferença significativa, um valor médio mais elevado das áreas das AgNORs no núcleo, no nucléolo e especialmente na área de AgNORs da célula (total) nos tumores não primários. Estes achados são semelhantes aos descritos por SANTOS *et al.* (1998) que trabalharam com a quantificação das AgNORs em tumor venéreo transmissível genital e extragenital. HARMELIN *et al.* (1995) estudando AgNORs e morfometria do núcleo e nucléolo relacionadas com o prognóstico, apresentaram resultados que corroboram os encontrados neste experimento.

BRATULIC *et al.* (1996), avaliando AgNORs (núcleo e nucléolo) e número de nucléolos em tumores mamários benignos e malignos de caninos,

detectaram um valor maior significativo dos tumores malignos em relação aos benignos.

5.6 GLICOPROTEÍNA-P E RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA

O anticorpo antiglicoproteína-p clone 5B12 não apresentou marcação positiva nos tecidos que fisiologicamente expressam glicoproteína-p. Da mesma forma, também não demonstrou expressão antigênica nas células de tumor venéreo transmissível. Embora, a exemplo de outros anticorpos, como o clone C494, a reação cruzada exista, neste caso não foi observada. O uso de diferentes anticorpos monoclonais para a mesma molécula pode ser recomendado, visto que nem todos os epítomos da molécula tem a mesma constituição de aminoácido (MONTERO, 2003). Provavelmente, a constituição dos aminoácidos do epítopo da célula de tumor venéreo transmissível não seja compatível com o clone 5B12, não havendo imunomarcação.

Quando utilizado o anticorpo antiglicoproteína-p (clone C494) obteve-se uma marcação positiva satisfatória usando uma diluição de 1:100 do anticorpo primário, tanto dos controles positivos como das células de TVT, como descrito por GINN (1996). A padronização deste anticorpo em preparados citológicos e histológicos constitui-se num parâmetro inovador para traçar prognóstico na oncologia de caninos e provavelmente pioneiro em Medicina Veterinária.

Analisando os resultados da marcação com o anticorpo antiglicoproteína-p foi verificado que o grupo plasmocitóide apresentou uma imunorreatividade significativamente maior em relação ao grupo linfocitóide.

Portanto, comparando os três tipos, de forma preliminar, podemos considerar que o tipo plasmocitóide apresenta um potencial para expressar resistência à droga.

Quando os preparados citológicos foram reagrupados em massas primárias em não primárias observou-se que a glicoproteína-p apresentou imunorreatividade maior no grupo de massas não primárias, comparado com o grupo das massas primárias, sem que houvesse diferença significativa. Este resultado sugeriu que as neoplasias não primárias podem apresentar um potencial para expressar resistência à quimioterapia.

Estes achados estão de acordo com MIYOSHI *et al.* (2002) que, trabalhando com expressão de glicoproteína-p em caninos com mastocitoma, observou que pelo menos 26% de caninos com mastocitoma expressaram glicoproteína-p e por esta razão, poderiam ser resistentes a várias drogas diferentes.

Como ocorreu neste experimento LEE *et al.* (1996) concluíram que a expressão da gp-p antes do início do tratamento é um fator preditivo independente negativo de sobrevivência. Adicionalmente, estes autores observaram que a expressão da gp-p após a recidiva era maior que a expressão inicial. Outro estudo mostrou que trinta amostras colhidas antes da quimioterapia expressaram glicoproteína-p. Esta também foi detectada em três amostras de biópsia de oito cães que foram resistentes à quimioterapia. Este padrão de expressão foi similar ao linfoma não-Hodgkin no homem. O estudo sugere que o linfoma canino é um proveitoso modelo para estudar resistência multidroga (MOORE *et al.*, 1995).

Estudo semelhante realizado por BERGMAN *et al.* (1996) em cães com linfoma constatou níveis de expressão da gp-p maiores na recidiva e

na necropsia do que no momento do diagnóstico. O mesmo estudo encontrou correlação negativa entre a expressão de gp-p e remissão e tempo de sobrevivência.

BALDINI *et al.* (1995) estudaram a marcação da glicoproteína-p em 92 pacientes com osteossarcoma. Os autores observaram um aumento dos níveis glicoproteína-p naqueles pacientes com prognóstico desfavorável.

De acordo com a citação de GINN (1996), a partir da expressão dos padrões de glicoproteína-p foram criadas quatro categorias. Na primeira categoria estão aqueles tumores que expressam sempre a glicoproteína-p. Na segunda categoria estão os tumores que expressam às vezes a glicoproteína-p. Na terceira categoria, os tumores apresentam raramente a expressão de pg-p. A quarta categoria inclui os tumores que passam a expressar a pg-p após a quimioterapia. Em consideração a esta classificação, pode-se supor que o tumor venéreo transmissível esteja, imprecisamente, dentro da primeira ou segunda categorias.

Analisando as respostas clínicas à quimioterapia entre os grupos, observou-se que o grupo plasmocitóide foi menos sensível à quimioterapia em relação aos grupos misto e linfocitóide, mostrando diferença significativa. Quando esta resposta foi comparada com a expressão de glicoproteína-p, observou-se uma relação direta da resposta parcial a quimioterapia com uma forte expressão de glicoproteína-p no grupo plasmocitóide. A partir deste resultado, pode-se inferir que casos clínicos de TVT do tipo plasmocitóide tendem a apresentar resposta clínica parcial à quimioterapia, possivelmente pela forte expressão de glicoproteína-p. Da mesma forma, pode se estabelecer que pelos resultados obtidos, os tumores do tipo

linfocitóide têm resposta completa à quimioterapia, provavelmente pela baixa expressão de glicoproteína-p.

Os achados acima descritos estão de acordo com LEE *et al.* (1996), que trabalharam com marcação com glicoproteína-p em linfoma canino. Os resultados mostraram que as formas mais malignas tiveram uma forte marcação de glicoproteína-p. Contudo, nos casos de recidiva a expressão foi ainda mais forte. Esta constatação foi reforçada por MORAL *et al.* (1995), os quais mencionaram a estreita relação da glicoproteína-p com a resistência multidroga em células tumorais.

De forma análoga, estudos em oncologia humana têm demonstrado a importância clínica da resistência multidrogas (MDR). Estes estudos mostraram que níveis elevados de expressão de gp-p correlacionam-se positivamente com a falta de resposta ou de remissão após formas adequadas de quimioterapia (BERGMAN, 2000).

De acordo com MEALEY *et al.* (1998) a expressão de glicoproteína-p é o mais importante indicador de evolução clínica adversa em pacientes humanos com osteossarcoma. A exposição de células de osteossarcoma canino à doxorrubicina resultou em superexpressão de glicoproteína-p, gene MDR e mRNA. Além disso, estas células falharam em acumular doxorrubicina intracelular e foram menos sensíveis à vincristina quando comparadas com as células parenterais.

MIYOSHI *et al.* (2002), trabalhando com mastocitoma em caninos, mencionou que devido à superexpressão da glicoproteína-p certas linhagens de células tumorais adquirem resistência a uma variedade de drogas comumente empregadas em Medicina Veterinária, entre elas, a doxorrubicina, vincristina, actinomicina D e mitoxantrona.

PERSPECTIVAS FUTURAS:

Os presentes resultados sugerem as seguintes linhas de pesquisa para trabalhos futuros: identificar oncogenes e anti-oncogenes expressos nos grupos citomorfológicos (plasmocitóide e linfocitóide), com o objetivo de avaliar se a seqüência temporal de mutações realmente determina a malignidade do tumor venéreo transmissível.

6 CONCLUSÕES

Com base nos estudos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível, correlacionados com os danos citogenéticos, índices de proliferação e resposta clínica à quimioterapia, pode-se concluir que:

- Todos os tipos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível apresentam as anormalidades nucleares binucleação, brotamento, lobulação e micronucleação.
- A frequência maior de lobulações nucleares no tipo citomorfológico plasmocitóide aponta para a instabilidade genética deste grupo.
- Os parâmetros morfométricos nuclear e nucleolar, pelo método variante da CEC, não indicam um tipo mais proliferativo entre as massas primárias e não primárias e entre os três tipos citomorfológicos do TVT.
- As AgNORs são um indicador de proliferação para o tumor venéreo transmissível, entretanto não mostram diferenças entre os três tipos citomorfológicos.
- O anticorpo Ki-67 (MIB-1) é um marcador de proliferação melhor que as AgNORs para diferenciar os tipos celulares do tumor venéreo transmissível.
- O anticorpo anti-Ki-67 (clone MBI-1) apresenta um percentual de marcação maior no tipo plasmocitóide.

- O tipo plasmocitóide do tumor venéreo transmissível expressa um percentual maior de marcação do anticorpo antiglicoproteína-p.
- O tumor venéreo transmissível do tipo plasmocitóide apresenta uma frequência maior de resposta clínica parcial do que os tipos linfocitóide e misto, possivelmente pelo maior percentual de expressão do anticorpo antiglicoproteína-p.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, J.J., AMARDEILH, M.A., DELVERDIER, M.E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.215, n.11, p.1629-1634, 1999.

ALEXANDROVA, R. Multidrug resistance and p-glycoprotein. **Exp. Pathol. Parasitol.**, v.1, p.62-66, 1998.

AMARIGLIO, E.N. *et al.* Identity of rearranged line/c-myc junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **J. Cell. Biochem.**, Suppl, 16 (part B), p.220, 1991.

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

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

AUBELE, M. *et al.* Guidelines of AgNORs quantitation. **Zentralbl. Pathol.** v.140, p.107-108, 1994.

BALDINI, N. *et al.* Expression of p-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. **New Engl. J. Med.** v.333, p.1380-1384, 1995.

BARBISAN, L.F., RUSSO, J., MELLO, M.L.S. Nuclear and nucleolar image analysis of human breast epithelial cells transformed with the C-Ha-ras oncogene. **Anal. Cell. Pathology**, v.16, p.193-196, 1998.

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

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

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

BERGMAN, P.J. Multidrug resistance. In: BONAGURA, J.D. (Ed.). **Kirk's current veterinary therapy XIII: small animal practice**. Philadelphia : Saunders, 2000. Sec.6, p.479-482.

- BERGMAN, P.J., OGILVIE, G.K., POWERS, B.E. Monoclonal antibody C219 immunochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 10, p. 354-359, 1996.
- BHATTATHIRI, N. M. *et al.* Prediction of radiosensitivity of oral cancers by serial cytology assay of nuclear changes. **Radiot. Oncol.**, v.49, p.61-65, 1998.
- BINDU, L. *et al.* Radiation-induced in oral carcinoma cells-a multiparametric evaluation. **Cytopathology**, v.14, p.287-293, 2003.
- BOOTH, M.J. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch. **J. Small Anim. Pract.**, v.35, n.1, p.39-42, 1994.
- BOSCOS, C.M., TONTIS, D.K., SAMARTZI, F.C. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. **Canine Pract.**, v.24, n.4, p.6-11, 1999.
- BRADLAW, J.A., CHRISTIAN, R.T. Methods for measurement of the cytotoxic response: a short review. **J. Tissue Cult. Methods**, v.9, p.1, 1985.
- BRATULIC, M. *et al.* Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus—prognostic value in canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, v.33, p.527-532, 1996.
- CALVERT, C.A., LEIFER, C.E., MacEWEN, E.G. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.181, p.163-164, 1982.
- CAMACHO, A.A., LAUS, J.L. Estudo sobre a eficiência da vincristina no tratamento de cães com tumor venéreo transmissível. **Ars Vet.**, v.3, n.1, p.37-42, 1987.
- CANIATTI, M. *et al.* Canine lymphoma: immunocytochemical a analysis of fine-needle aspiration biopsy **Vet. Pathol.**, v.33, p.204-212, 1996.
- CARRANO, A.V., HEDDLE, J.A. The fate of chromosome aberrations. **J. Theor. Biol.**, v.38, p.289-304, 1973.
- CATTANEO, G., MADEWELL, B.R. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **J. Comp. Pathol.**, v.122, p.241-248, 2000.
- CHANNARAYAPPA, O.T., NATH, J. Cytogenetic effects of vincristine sulphate and ethylene dibromide in human peripheral lymphocytes: micronucleus analysis. **Environ. Molec. Mutagen.**, v.20, p.117-126, 1992.
- CHU, R. M. *et al.* Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. **Anticancer Res.**, v.21, p.4017-4024, 2001.
- COCKRILL, J.M., BEASLEY, J.N. Transmission of transmissible venereal tumor of the dog to the coyote. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, n.3, p.409-410, 1979.
- COCKRILL, J.M., BEASLEY, J.N. Ultrastructural characteristics of canine transmissible venereal tumor at various stages of growth and regression. **Am. J. Vet. Res.**, v.36, p.677-681, 1975.
- COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. **Adv. Cancer Res.**, v.43, p.75-112, 1985.

- COHEN, D. The transmissible venereal tumor of the dog – a naturally occurring allograft? : a review. **Isr. J. Med. Sci.**, v.14, n.1, p.14-19, 1978.
- COHEN, D., SHALEV, A., KRUP, M. Lack of β_2 -microglobulin on the surface of canine transmissible venereal tumor cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.72, n.2, p.395-401, 1984.
- COWEL, R.L., TYLER, R.D. Cytology of cutaneous lesions. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.19, p.769-794, 1989.
- CROCKER, J., BOLDY, D.A., EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standarzed approach. **J. Pathol.**, v.158, p.185-188, 1989.
- CROCKER, J., MACARTNEY, J. C., SMITH, P.J. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. **Pathology**, v.154, p.151-156, 1988.
- CROCKER, J., NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. **J. Pathol.**, v.151, p.111-118, 1987.
- CRUZ, G.G. *et al.* Neoplasias en aparato reprodutor em perras: estudio retrospectivo de 6 años. **Veterinaria Méx.**, v.28, n.1, p.31-34, 1997.
- DAHL, W.N., OFTEBRO, R., BRUSTAD, T. Inhibitory and cytotoxic effects of oncovin (vincristine sulphate) on cells of human line NHIK3025. **Cancer Res.**, v.36, p.3101-3105, 1976.
- DALECK, C.L.M. *et al.* Novos estudos sobre o tratamento do tumor venéreo transmissível canino (TVT). **Ars Vet.**, v.3, n.2, p.203-209, 1987a.
- DALECK, C.L.M. *et al.* Avaliação de diferentes métodos diagnósticos do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães. **Ars Vet.**, v.3, n.2, p.187-194, 1987b.
- DASS, L.L., SAHAY, P.N. Surgical treatment of canine transmissible venereal tumour : a retrospective study. **Indian Vet. J.**, v.66, p.255-258, 1989.
- DENICOLA, D., REAGAN, W. J. Using cytology in the diagnosis of cancer. In: MORRISON, W.B. **Cancer in the dogs and cats: medical and surgical management**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1998. Cap.9, p.79-94.
- DENKO, N.C. *et al.* The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.5124-5128, 1994.
- DERENZINI, M., PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **Rev. Internatl. Exp. Pathol.** v.32, p.149-192, 1991.
- DERENZINI, M., SIRRI, V., TRERÈ, D. Nucleolar organizer regions in tumor cells. **Cancer J.**, v.7, p.71-74, 1994.
- DERENZINI, M., TRERÈ, D. AgNORs proteins as a parameter of the of the cell proliferation. **Zentralbl. Pathol.**, v.140, p.7-10, 1994.
- DERENZINI, M., TRERÈ, D. Standadization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. **J. Pathol.**, v.165, p.337-342, 1991a.

- DERENZINI, M., TRERÈ, D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchows Arch. B. Cell Incl. Molec. Pathol.**, v.61, p.1-8, 1991b.
- DESTEXHE, E., VANMANSHOVEN, P., COIGNOUL, F. Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. **Am. J. Vet. Res.**, v.56, n.2, p.185-187, 1995.
- DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W. Cytology of canine cutaneous round cell tumors : mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. **Vet. Pathol.**, v.16, n.6, p.673-679, 1979.
- EGAN, M., CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. **J. Clin. Pathol.**, v.154, p.247-253, 1988.
- ERÜNAL-MARAL, N., FINDIK, M., ASLAN, S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.**, v.107, n.5, p.175-180, 2000.
- FENECH, F. *et al.* Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v.534, p.65-75, 2003.
- FENECH, M., MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, v.147, p.29-36, 1985a.
- FENECH, M., MORLEY, A.A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. **Mutat. Res.**, v. 148, p. 99-105, 1985b.
- FENECH, M., CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic deficient human lymphocytes—evidence for breakage-fusion-bridges cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v.504, p.131-136, 2002.
- FERREIRA, A.J.A. *et al.* Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, v.41, n.4, p.165-168, 2000.
- FOWLER, K.A. *et al.* Diagnostic exercise: neoplastic mass of the vagina and vulva in a dog. **Lab. Anim. Sci.**, v.47, n.5, p.534-536, 1997.
- GALAND, P., DEGRAEF, C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labeling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. **Cell Tissue Kinet.**, v.22, p.383-392, 1989.
- GANDOTRA, V.K., CHAUHAN, F.S., SHARMA, R.D. Occurrence of canine transmissible venereal tumor and evaluation of two treatments. **Indian Vet. J.**, v.70, p.854-857, 1993.
- GEARD, C.R., CHEN, C.Y. Micronuclei and clonogenicity following low and high doses rate γ irradiation of normal human fibroblasts. **Radiat. Res.**, v.124, p.s56-s61, 1990.
- GERDES, J. *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Pathol.**, v.138, p.867-873, 1991.
- GINEL, P.J. *et al.* Primary transmissible venereal tumour in the nasal cavity of a dog. **Vet. Rec.**, v.136, n.9, p.222-223, 1995.

- GINN, P.E. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Vet. Pathol.**, v.33, p.533-541, 1996.
- GOESSENS, G. Nuclear structure. **Interntl. Rev. Cytol.**, v.87, p.107-158, 1984.
- GONZALEZ, C.M., GRIFFEY, S.M., NAYDAN, D.K. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **J. Comp. Pathol.**, v.122, p.241-248, 2000.
- GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinominal proportion **Techometrics**, v.7, p.247-254, 1965.
- GUEDES, R.M.C. *et al.* Tumor venéreo transmissível (TVT) extragenital em um cão : relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, n.3, p.369-374, 1996.
- GUVENT, T. *et al.* Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. **Acta Vet. Hungarica**, v.50, n.3, p.15-321, 2002.
- HAMIR, A.N. Neoplasms of dogs in Papua New Guinea. **Aust. Vet. J.**, v.63, n.10, p.342-343, 1986.
- HAMIR, A.N. Primary penile and nasal transmissible venereal tumours in a dog. **Aust. Vet. J.**, v.62, n.12, p.430-432, 1985.
- HARMELIN, A., ZUCKERMAN, A., NYSKA, A. Correlation of Ag-NOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumour. **J. Comp. Pathol.**, v.112, p.429-433, 1995.
- HARTWELL, J.H., KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v.16, p.1821-1828, 1994.
- HASLER, A.H., WEBER, W.T. Theriogenology question of the month. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v.216, n.10, p.1557-1559, 2000.
- HAUPT, H.M. *et al.* Argyrophilic nucleolar organizer regions and proliferating cell nuclear antigen/cyclin in Kaposi's sarcoma. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.119, p.538-541, 1995.
- HAYES, H.M. *et al.* Canine transmissible venereal tumor: a model for Kaposi's sarcoma? **Am. J. Epidemiol.**, v.117, n.1, p.108-109, 1983.
- HEDDLE, J.A. *et al.* Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environ. Molec. Mutagen.**, v.18, p.277-291, 1991.
- HIGGINS, D.A. Observations on canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas. **Vet. Rec.**, v.79, p.67-71, 1966.
- HOQUE, M., PAWDE, A.M., SINGH, G.R. Combination chemotherapy in canine transmissible venereal tumor. **Indian Vet. J.**, v.72, p.973-975, 1995.
- HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.
- KAMEL, H.M.H., KIRK, J., TONER, P.G. Ultrastructural pathology of the nucleus. In: UNDERWOOD, J.C.E. (Ed.) **Current opinion pathology : pathology of the nucleus**. Berlin : Springer-Verlag, 1990. Chap.32, p.16-65.

- KARADEMIR, N., GÜVEMÇ, T., ORMAN, M.N. Differentiation of transmissible venereal tumor and canine cutaneous histiocytoma with argyrophil nucleolar organizer regions (AgNORs) staining. **Isr J. Vet. Med.**, v.53, n.2, p.73-75, 1998.
- KEY, G. *et al.* New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MBI-1) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. **Lab. Invest.**, v.68, p.629-636, 1993.
- KIUPEL, M., TESKE, E., BOSTOCK, D., Prognostic factors for treat canine malignant lymphoma. **Vet. Pathol.**, v.36, p.292-300, 1999.
- KROGER, D., GREY, R.M., BOYD, J.W. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. **Canine Pract.**, v.16, n.6, p.17-21, 1991.
- LAPRIE, C. *et al.* Detection of the Ki-67 proliferation associated nuclear epitope in normal canine tissues using the monoclonal antibody MIB-1. **Anat. Histol. Embryol.**, v.27, p.251-256, 1998.
- LEE, J.J. *et al.* P-glycoprotein expression in canine lymphoma. **Cancer**, v.77, p.1892-1898, 1996.
- LÖHR, C.V. *et al.* Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with post fixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Vet. Pathol.**, v.34, p.212-221, 1997.
- MACEWEN, E.G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 2.ed. Philadelphia : Saunders, 1996. Cap.29C, p.533-538.
- MADEWELL, B. R. Celular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **J. Vet. Intern. Med.**, v.15, p.334-340, 2001.
- MAIA, R.C., RUMJANEK, V.M. Mecanismos moleculares de resistência a múltiplas drogas In: FERREIRA, C.G., ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. 469p. Cap. 11, p.113-122.
- MANNING, P.J., MARTIN, P.D. Metastasis of canine transmissible venereal tumor to the adenohypophysis. **Pathol. Vet.**, v.7, n.2, p.148-152, 1970.
- MANOCHA, S.L., SHARMA, S.P. Nucleolar changes in response to dietary protein malnutrition in the neurons of the motor cerebral cortex and cerebellum of squirrel monkey saimiri sciureus. **Cellule**, v.72, p.243-255, 1978.
- MEALEY, K.L. *et al.* Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. **Cancer Lett.**, v.126, n.2, p.187-192, 1998.
- MEINKOTH, J.H., COWELL, R.L. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. **Vet. Clin. Small Anim. Pract.**, v.32, p.1209-1235, 2002.
- MELLO, M.L.S. Relocation of RNA metacromasy at mitosis. **Acta Histochem. Cytochem.**, v.28, p.149-154, 1995.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. Critical eletrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, v.59, p.87-93, 1989.

- MELLO, M.L.S. *et al.* Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method **Acta Histochem. Cytochem.**, v.26, p.1-3, 1993.
- MIKAELIAN, I., GIRARD, C., IVASCU, I. Transmissible venereal tumor: a consequence of sex tourism in a dog. **Can. Vet. J.**, v.39, p.591, 1998.
- MILLER, W.W., ALBERT, R.A., BOOSINGER, T.R. Ocular metastasis of a transmissible venereal tumor. **Canine Pract.**, v.15, n.3, p.19-21, 1990.
- MIRANDA, E.I. *et al.* Induce mitotic death of Hela cells by abnormal expression of c-H-ras. **Mutat. Res.**, v.349, p.173-182, 1996.
- MIYOSHI, N. *et al.* Immunohistochemical detection of p-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. **J. Vet. Med. Sci.**, v.64, p.531-533, 2002.
- MOORE, A.S. *et al.* The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. **Cancer Invest.**, v.13, n.5, p.475-479, 1995.
- DEL MORAL, R.G. *et al.* Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. **Am. J. Pathol.**, v.146, n.2, p.398-408, 1995.
- NDIRITU, C.G., MBOGWA, S.W., SAYER, P.D. Extragenitally located transmissible venereal tumor in dogs. **Mod. Vet. Pract.**, v. 98, p.940-946, 1977.
- NOWELL P.C. Cytogenetic approaches to human cancer genes. **FASEB J.**, v.8, p.408-413, 1994.
- ÖFNER, D., SCHMID, K.W. Standardized AgNORs analysis: its usefulness in surgical oncology. **Histochem. Cell Biol.**, v.106, p.193-196, 1996.
- ORREL, J.M., EVANS, A.T., GRANT, A. A critical evaluation of AgNORs counting in benign naevi and malignant melanoma. **Pathology**, v.163, p.239-244, 1991.
- OTOMO, K. *et al.* Histological and ultrastructural findings of regressing canine venereal tumor after repeated transplantation. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.43, p.823-832, 1981.
- PEDEUTOUR, F., SUIJKERBUIJK, R.F., FORUS, Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well differentiated liposarcoma. **Gen. Chromosom. Cancer**, v.10, p.85-94, 1994.
- PÉREZ, J., *et al.* Primary extragenital occurrence of transmissible venereal tumors: three case reports. **Canine Pract.**, v.19, n.1, p.7-10, 1994.
- PLATZ, S. J. *et al.* Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. **Vet. Pathol.**, v.36, p.23-27, 1999.
- PLOTON, D. Structure and molecular organization of nucleolus. **Zentralbl. Pathol.**, v.140, p.3-6, 1994.
- PLOTON, D. *et al.* Improvement in the staining and in the visualization of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem. J.**, v.18, p.5-14, 1986.
- PREZIOSI, R. *et al.* Quantification of nucleolar organizer regions in canine perianal gland tumours. **Res. Vet. Sci.**, v.58, p.277-281, 1995.

QUINN, C.M., WRIGHT, N.A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and application as a prognostic variables. **J. Pathol.**, v.160, p.93-102, 1990.

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

RECHAVI, G., KATZIR, N., RAMOT, B. Kaposi's sarcoma among AIDS patients: transmissible venereal tumour by cell engraftment? **Med. Hypotheses**, v.34, n.4, p.380-341, 1991.

RICKARDS, D.A. Cryotherapy on a transmissible venereal tumor in a male dog. **Canine Pract.**, v.10, n.6, p.37-39, 1983.

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

ROCHA, N.S. *et al.* Citologia aspirativa por agulha fina como método de auxílio durante a cirurgia. **Cães e Gatos**, n.98, p.22-23, 2001.

RODILLA, V. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. **Mutat. Res.**, v.300, p.281-291, 1993.

RODRIGUES, G.N., ALESSI, A.C., LAUS, J.L. Intraocular transmissible venereal tumor in a dog. **Ciência Rural**, v.31, p.141-143, 2001.

ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumour. **Compend. Contin. Educ.**, v.19, n.9, p.1036-1045, 1997.

ROGERS, K.S., WALKER, M.A., DILLON, H.B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.**, v.34, n.6, p.463-470, 1998.

RÜSCHOFF, J. *et al.* AgNOR quantification with special reference to staining patterns. **Zentralbl. Pathol.**, v.140, p.23-30, 1994.

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

SANTOS, F.G.A. *et al.* Caracterização e quantificação de regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs) em tumor venéreo transmissível canino, genital e extragenital. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.50, n.6, p.665-6724, 1998.

SASAKI, K. *et al.* The cell cycle associated change of the Ki-67 reative nuclear antigen expression. **J. Cell Physiol.**, v.133, p.579-584, 1987.

SCHMITT, F.C., FERREIRA, M.P. MIB-1 is a suitable marker of proliferative activity in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of breast cancer. **Intl. J. Surg. Pathol.**, v.2, p.287-294, 1995.

SCOTT, J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of polysaccharides from tissues. **Meth. Biochem. Analysis**, v.8, p.145-197, 1960.

SCOTT, J.E. Affinity, competition and specific interactions in the biochemistry and histochemistry of polyelectrolytes. **Biochem. Soc. Transact.**, v.1, p.787-806, 1973.

SEM, T.B., MITRA, M., GUHA, C. Treatment of canine transmissible venereal tumour with cyclophosphamide : a case report. **Indian Vet. J.**, v.71, p.1120-1122, 1994.

SHIMIZU, N. *et al.* Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.**, v.140, p.1307-1320, 1998.

SHIRO, T. *et al.* A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions stages of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, 71, p 44-49, 1993.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica** : para as ciências do comportamento. São Paulo : McGraw-Hill, 1975.

SIMOES, J.P.C., SCHONING, P., BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Vet. Pathol.**, v.31, p.637-647, 1994.

SINGH, J. *et al.* Effect of geriforte supplementation on blood chemistry in transmissible venereal tumor affected dogs treated with vincristine sulphate. **Indian Vet. J.**, v.74, p.420-421, 1997.

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

TAJIMA, Y., ISHIGE, H., KONDO, Y. Morphometric studies for objectives diagnosis of intraductal carcinoma of the breast. **Acta Pathol. Jpn.**, v.41, p.604-609, 1991.

THOMAS, H., COLEY, H. Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. **Cancer Control**, v.10, p.159-165, 2003.

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

TOIKKANEN, S., JOENSUU, H. AgNORs counts have no prognostic value in breast cancer **J. Pathol.**, v.169, p.251-254, 1993.

TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears methods development. **Mutat. Res.**, v.271, p.69-77, 1992.

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

VAIL, D.M. *et al.* Assessment of potential doubling time (T_{pot}), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. **Exp. Hematol.**, v.24, n.7, p.807-815, 1996.

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

VIDAL, B.C. *et al.* Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. **Apoptosis**, v.1, p.218-221, 1996.

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

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

VIDAL, B.C. *et al.* Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells high-resolution image cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, v.7, p.27-41, 1994.

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

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

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

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

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

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

ZUCCARI, D.A. *et al.* Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. **Vet. Clin. Pathol.**, v.33, p.23-28, 2004.

ANEXO A

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO

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

Nome do animal: _____ Sexo: _____

Raça: _____ Idade: _____

Botucatu, / __ / ____ Assinatura: _____

ANEXO C - PROTOCOLO SEMIOLÓGICO

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

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

DESCRIÇÃO DE MASSAS ADICIONAIS		Caso nº						
Localização da massa								
			☐ G ☐ E					
Ordem de aparecimento		Comportamento biológico	☐ P ☐ M ☐ R					
Tamanho estimado			☐ P ☐ M ☐ G					
Massa hemorrágica?		☐ não	☐ sim					
Massa friável?		☐ ã obs	☐ não ☐ sim					
Crescimento atual		☐ rápido	☐ lento ☐ estável					
Tempo de crescimento		☐ até 3 semanas	☐ 3 a 8 semanas ☐ + de 8 semanas					
		☐ R ☐ E ☐ A						
CAAF	Agulha	☐ 13x4,5	☐ 20x5	☐ 25x6	☐ 25x7	Citocentrífuga	☐ não	☐ sim
						Biópsia	☐ não	☐ sim
☐ imunocitoquímica ☐ cometa ☐ micr. eletrônica						Microscopia eletrônica	☐ não	☐ sim
Tratamento utilizado						Dose		
☐ redução total			☐ redução parcial			☐ inalterado		
						☐ aumentado		
						☐ S ☐ PS ☐ R		

ANEXO D – FICHA DE AVALIAÇÃO CITOLÓGICA

CASO		LÂMINA	
Células Linfocitóides		Células Plasmocitóides	
Binucleação			
Multinucleação			
Micronucleação			
Brotamentos nucleares			
Lobulações nucleares			
Vacúolos nucleares			
Indentações nucleares			
OBSERVAÇÕES			

ANEXO E – DADOS DOS PACIENTES ESTUDADOS

ID MASSA	DADOS DO PACIENTE			DADOS DAS MASSAS			ANÁLISES					
	RG	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	COMP. BIOL.	CITOMORFOLOG	1	2	3	4	5	6
1	109112	macho	10	genital	primário	linfocitóide	x	x	x	x	x	x
2	111433	macho	6	genital	primário	misto			x	x	x	
2a	111433	macho	6	linfonodo	não primário	plasmocitóide			x		x	
2b	111433	macho	6	linfonodo	não primário	plasmocitóide			x		x	
3	111479	fêmea	2	genital	primário	misto			x	x		
7	biotério	fêmea	11	genital	primário	linfocitóide	x	x	x			x
8	111028	macho	adulto	genital	primário	plasmocitóide			x	x		
8c	111028	macho	adulto	subcutânea	não primário	plasmocitóide			x			
8d	111028	macho	adulto	subcutânea	não primário	plasmocitóide			x			
9	94325	macho	8	genital	primário	misto			x	x		
12	59094	macho	10	genital	primário	plasmocitóide				x		
13	111991	macho	8	genital	primário	plasmocitóide				x		
15	112337	fêmea	1	genital	primário	plasmocitóide			x	x		
16	94577	fêmea	3	genital	primário	linfocitóide				x		
18	112440	fêmea	2	genital	primário	linfocitóide	x	x	x	x	x	x
20	112596	macho	5	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x			x
21	111118	macho	1	nasal	primário	linfocitóide	x	x	x		x	x
23a	112726	fêmea	4	mamária	não primário	plasmocitóide	x	x	x			x
25	112790	fêmea	8	genital	primário	plasmocitóide			x			
25r	112790	fêmea	8	genital	não primário	plasmocitóide	x					
26	112793	macho	6	genital	primário	linfocitóide	x	x		x	x	x
27	97255	macho	2	genital	primário	misto			x	x	x	
28	112826	fêmea	10	genital	primário	misto			x	x	x	
29	98181	macho	3	genital	primário	plasmocitóide			x	x		
30	112936	fêmea	3	genital	primário	misto	x	x	x			x
30a	112936	fêmea	3	mamária	não primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
31	112998	macho	2	genital	primário	linfocitóide	x	x	x		x	x
32	113036	macho	5	genital	primário	plasmocitóide			x			
32a	113036	macho	5	linfonodo	não primário	plasmocitóide	x	x	x			x
33a	113036	macho	5	linfonodo	não primário	misto	x	x	x			x
34	100243	fêmea	3	genital	primário	linfocitóide					x	
35a	111367	fêmea	6	subcutânea	primário	misto			x			
35b	111367	fêmea	6	subcutânea	não primário	plasmocitóide	x	x	x			x
35c	111367	fêmea	6	subcutânea	não primário	plasmocitóide	x	x	x			x
37	113252	fêmea	8	genital	primário	plasmocitóide			x	x		
39	113314	fêmea	9	genital	primário	misto	x	x	x	x		x
41	67423	fêmea	9	genital	primário	misto			x	x		
42	113445	fêmea	1	genital	primário	plasmocitóide			x			
42b	113445	fêmea	1	mamária	não primário	plasmocitóide	x	x	x			x
43	113456	fêmea	7	genital	primário	linfocitóide			x			
45	113677	fêmea	6	genital	primário	linfocitóide	x	x	x	x	x	x
47	104605	macho	2	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	X
49	108214	macho	4	genital	primário	plasmocitóide	x	x		x		x

1= ANORMALIDADES NUCLEARES; 2= AGNOR; 3= GLICOPROTEÍNA-P; 4= RESPOSTA CLÍNICA; 5= MIB-1; 6= CEC.

ID MASSA	DADOS DO PACIENTE			DADOS DAS MASSAS			ANÁLISES					
	RG	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	COMP. BIOL.	CITOMORFOLOG	1	2	3	4	5	6
50	114026	fêmea	6	genital	primário	misto	x	x	x			x
51	113746	fêmea	2	genital	primário	misto	x	x	x	x		x
53	114377	macho	7	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x	x		x
54	102676	macho	2	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x			x
55	114438	macho	5	ocular	primário	misto	x	x			x	x
56	114559	macho	10	genital	primário	linfocitóide	x	x	x	x	x	x
57	114549	macho	10	genital	não primário	linfocitóide	x	x	x		x	x
60	114683	fêmea	6	genital	primário	linfocitóide				x		
62	114675	fêmea	4	genital	primário	linfocitóide	x	x	x		x	x
64	113131	macho	4	nasal	primário	linfocitóide	x	x		x	x	x
65	115087	macho	adulto	genital	primário	linfocitóide	x	x			x	x
66	115127	fêmea	adulta	genital	primário	misto					x	
68	112088	macho	2	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
70	115304	fêmea	11	genital	primário	linfocitóide			x	x		
74	107331	fêmea	4	genital	não primário	plasmocitóide					x	
75	93220	fêmea	7	genital	primário	misto	x		x		x	x
76	117048	fêmea	2	genital	primário	misto					x	
77 ^a	115750	macho	6	subcutânea	não primário	plasmocitóide					x	
77b	115750	macho	6	subcutânea	não primário	plasmocitóide					x	
78	117085	macho	4	genital	primário	plasmocitóide			x	x		
78 ^a	117085	macho	4	oral	primário	plasmocitóide					x	
78b	117085	macho	4	nasal	primário	plasmocitóide					x	
79	116797	fêmea	7	genital	primário	plasmocitóide			x	x		
80	116952	fêmea	4	genital	primário	plasmocitóide			x	x	x	
80 ^a	116952	fêmea	4	esplênica	não primário	misto	x	x	x		x	x
82	117165	macho	adulto	genital	primário	linfocitóide	x	x	x	x	x	
83	117158	fêmea	6	genital	primário	linfocitóide	x	x	x		x	
84	117231	macho	9	genital	primário	misto	x	x	x	x	x	
85	117206	fêmea	10	genital	primário	misto	x		x		x	
86	117311	fêmea	13	genital	primário	linfocitóide			x	x		
87	117438	macho	6	genital	primário	plasmocitóide	x			x		
87cr	117438	macho	6	peritoneal	não primário	plasmocitóide			x	x		
87dr	117438	macho	6	peritoneal	não primário	plasmocitóide			x	x	x	
88	117566	fêmea	3	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
88 ^a	117566	fêmea	3	mamária	não primário	plasmocitóide					x	
89	117681	macho	1	genital	primário	misto			x	x	x	
91	117838	fêmea	3	genital	primário	plasmocitóide	x		x		x	
92	118135	macho	11	genital	primário	plasmocitóide	x	x			x	x
93	118211	macho	idoso	genital	primário	misto	x	x	x		x	x
93 ^a	118211	macho	idoso	linfonodo	não primário	plasmocitóide			x		x	
93b	118211	macho	idoso	linfonodo	não primário	plasmocitóide					x	
93c	118211	macho	idoso	muscular	não primário	misto	x	x	x		x	x
94	118548	fêmea	adulta	genital	primário	linfocitóide	x	x	x	x	x	x
94 ^a	118548	fêmea	adulta	subcutânea	não primário	plasmocitóide			x		x	
94b	118548	fêmea	adulta	subcutânea	não primário	plasmocitóide					x	
94c	118548	fêmea	adulta	subcutânea	não primário	plasmocitóide			x			
95a	118500	macho	2	esplênica	não primário	misto	x	x	x	x	x	x
96	118543	fêmea	4	genital	primário	misto			x		x	

1= ANORMALIDADES NUCLEARES; 2= AGNOR; 3= GLICOPROTEÍNA-P; 4= RESPOSTA CLÍNICA; 5= MIB-1; 6= CEC.

ID MASSA	DADOS DO PACIENTE			DADOS DAS MASSAS			ANÁLISES					
	RG	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	COMP. BIOL.	CITOMORFOLOG	1	2	3	4	5	6
96a	118543	fêmea	4	mamária	não primário	linfocitóide	x	x	x		x	x
96b	118543	fêmea	4	mamária	não primário	linfocitóide	x	x	x		x	x
97	80986	macho	7	genital	primário	plasmocitóide				x	x	
98	119363	macho	1	genital	primário	misto	x	x		x	x	
99	121038	macho	4	nasal	não primário	plasmocitóide	x		x	x	x	
100	121025	macho	3	genital	primário	misto	x	x	x		x	
101	121162	macho	adulto	genital	primário	plasmocitóide	x		x	x	x	
103	125007	macho	4	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
104	125036	macho	4	genital	primário	plasmocitóide					x	x
104a	125036	macho	4	subcutânea	não primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
104b	125036	macho	4	subcutânea	não primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
104c	125036	macho	4	subcutânea	não primário	plasmocitóide		x			x	x
105	115720	fêmea	2	genital	primário	misto	x	x	x		x	x
105a	115720	fêmea	2	linfonodo	não primário	misto	x	x	x		x	x
105b	115720	fêmea	2	subcutânea	não primário	misto	x	x	x		x	x
106	125287	fêmea	4	genital	não primário	plasmocitóide	x	x	x	x	x	x
106r	125287	fêmea	4	genital	não primário	plasmocitóide	x	x	x	x	x	x
107	biotério	fêmea	adulta	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
108	biotério	fêmea	3	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
109	biotério	fêmea	adulta	genital	primário	linfocitóide	x	x	x		x	x
109a	biotério	fêmea	adulta	mamária	não primário	misto	x	x	x		x	
109b	biotério	fêmea	adulta	subcutânea	não primário	misto	x	x	x		x	x
110	125759	fêmea	1	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x	x	x	x
110a	125759	fêmea	1	esplênica	não primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
111	126099	macho	7	genital	primário	plasmocitóide			x		x	
112	biotério	fêmea	adulta	genital	primário	misto	x	x	x		x	x
113	biotério	macho	adulto	genital	primário	misto	x	x	x		x	x
114	126265	macho	adulto	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
115b	126534	macho	3	subcutânea	não primário	plasmocitóide			x	x	x	
116	126546	fêmea	9	genital	primário	linfocitóide					x	
117a	126453	macho	6	linfonodo	não primário	plasmocitóide	x	x	x	x	x	x
117b	126453	macho	6	linfonodo	não primário	misto			x	x	x	
118	126641	fêmea	3	genital	primário	misto			x		x	
119	biotério	fêmea	adulta	genital	primário	plasmocitóide	x	x	x		x	x
120	126678	fêmea	8	genital	primário	misto			x		x	
121	107311	macho	4	genital	primário	plasmocitóide			x		x	
122	126805	fêmea	4	genital	primário	plasmocitóide			x	x	x	
S01	81401	macho	6	genital	primário	plasmocitóide	x				x	x
S02	116303	macho	4	genital	primário	misto					x	
S04	116556	macho	5	genital	primário	plasmocitóide	x					x
S05	116716	fêmea	10	genital	primário	plasmocitóide					x	
S16	117574	fêmea	2	genital	primário	linfocitóide	x	x		x	x	x
S22	120309	macho	2	genital	primário	misto	x				x	x
S27	121314	fêmea	2	genital	primário	misto	x	x			x	x
S28	121212	fêmea	6	genital	primário	linfocitóide	x	x	x	x	x	x
S29	129748	macho	5	genital	não primário	plasmocitóide	x	x				x
S30	biotério	fêmea	adulta	genital	não primário	misto	x	x				x

1= anormalidades nucleares; 2= AgNOR; 3= glicoproteína-p; 4= resposta clínica; 5= MIB-1; 6= CEC.

Autorizo a reprodução deste trabalho, mediante referência ao autor.

Botucatu, janeiro de 2005.

Luiz Fernando Jantzen Gaspar

Este trabalho foi redigido de acordo com as Normas para Publicações da UNESP, Teses e Dissertações, volume 4, 1998.