

SARA MARIA DE CARVALHO E SUZANO

**CLASSIFICAÇÃO CITOLÓGICA E IMUNOCITOQUÍMICA DOS
LINFOMAS CANINOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

Botucatu-SP
2004

Aos meus pais, João Carlos Suzano, Rosa Maria de Carvalho e Suzano, aos meus irmãos Caio e Cláudia de Carvalho e Suzano (e ao Dimple). Muito obrigada, pelo apoio e amor incondicional, sem vocês tudo isso seria impossível.

DEDICO.

Ao meu namorado Rodrigo Mannarino, pelos momentos tranquilos e especiais, pela paciência interminável e pelo incentivo, sempre com muito carinho nas horas mais difíceis.

OFEREÇO.

Ao meu orientador, Professor Assistente Doutor Julio Lopes Sequeira, pela orientação, amizade e principalmente por toda confiança. Com você aprendi que devemos aceitar e respeitar alguns defeitos das pessoas, afinal não somos perfeitos. Mas aprendi acima de tudo, que caráter e ética são fundamentais.

AGRADEÇO.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos docentes do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP. À **Professora Assistente Doutora Renée Laufer Amorim**, muito obrigada pela paciência, carinho, incentivo e importantes ensinamentos nos momentos difíceis deste trabalho e da minha vida.

À **Professora Assistente Doutora Noeme Sousa Rocha**, pelos meus primeiros passos na Citologia, pela dedicação, muita cobrança, amizade e exemplo de competência e profissionalismo.

Aos funcionários do Serviço de Patologia Veterinária. Ao técnico de necropsia **Maury Raul**, pela inestimável ajuda na sala de necropsia e ao técnico do Laboratório de Histologia **Noel Melo**, pelos ensinamentos no processamento do material.

Aos Residentes do Serviço de Patologia Veterinária. **Camila**, **Leandro** e principalmente a **Marcela** pela ajuda na colheita e processamento do material e pela amizade.

Aos Pós-graduandos **Celmira, Fábio, Anne, Luis Fernando** e em especial, **Adriana Wanderley Pessoa**, pelo trabalho em conjunto.

Às companheiras **Louisiane de Carvalho Nunes e Mércia Rodrigues de Barros**, pelos momentos felizes que soubemos aproveitar e aqueles tristes que de um certo modo soubemos ultrapassar.

Às eternas amigas **Juliany Gomes Quitzan**, muito obrigada pelo imenso apoio, dedicação e amizade em todos os dias que precisei e **Flávia Quaresma Moutinho**, pelos momentos felizes e trabalhosos.

Aos amigos muito especiais, **Renée, Rogério e Sofia** pelos momentos “família” em que me acolheram com tanto carinho e compreensão. Muito obrigada, com certeza a vida ficou mais fácil e gostosa.

A todos os estagiários que em algum momento me ajudaram durante este período de pesquisa.

Aos Médicos Veterinários Residentes da Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pelo encaminhamento dos animais deste trabalho.

E finalmente agradeço, com muito respeito, aos animais que participaram involuntariamente desta pesquisa. Este trabalho foi idealizado e realizado, desejando sempre melhores condições e qualidade de vida aos nossos pacientes.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Estudo prospectivo dos casos de Linfomas	32
3.2. Classificação Anatômica dos linfomas e Estadiamento Clínico dos pacientes	32
3.3. Processamento Citológico	34
3.4. Avaliação imunocitoquímica	37
3.4.1 Padronização da técnica de imunocitoquímica	37
3.4.2 Anticorpos primários	37
3.4.3 Fixação dos esfregaços citológicos	38
3.4.4 Imunocitoquímica	38
4. RESULTADOS	42
4.1. Dados clínicos dos animais	42
4.2. Aplicação das classificações citológicas dos linfomas caninos: Kiel, Working Formulation e Fournel-Fleury <i>et al.</i> (1994)	48
4.3. Avaliação Imunocitoquímica	56
5. DISCUSSÃO	60
5.1. Dados Epidemiológicos	60
5.2. Classificação Citológica	63

5.3. Imunofenotipagem	68
5.4. Correlação entre a Classificação Citológica e o Imunofenótipo	73
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. ANEXOS	89

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Estadiamento Clínico dos Linfomas Caninos proposto pela OMS (Owen, 1980; Gray *et al*, 1984) 23
- Tabela 2 - Classificação Anatômica dos Linfomas Caninos segundo Jacobs *et al.*, 2002. 23
- Tabela 3 - Distribuição racial dos 59 animais portadores de linfoma canino diagnosticados pelo método da PAAF 44
- Tabela 4 - Distribuição por sexo dos animais em 59 casos de linfoma canino diagnosticados pelo método da PAAF 45
- Tabela 5 - Idade dos animais portadores de linfoma em 59 casos diagnosticados pelo método da PAAF 45
- Tabela 6 - Estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN 1980; GRAY *et al.*, 1984) nos 46 casos de linfoma canino diagnosticados pelo método da PAAF 46
- Tabela 7 - Classificação Anatômica (JACOBS *et al.*, 2002) dos linfomas caninos diagnosticados pelo método da PAAF 46
- Tabela 8 - Classificação Citológica de 59 casos de linfoma canino de acordo com as classificações de Kiel, Working Formulation e Fournel-Fleury *et al.*, 1994 49

Tabela 9 - Frequência da classificação imunofenotípica de 38 casos de linfoma caninos diagnosticados pelo método da PAAF 58

Tabela 10 - Relação entre o imunofenótipo e o tipo citológico de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) 58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Linfoma Multicêntrico- PAAF-Punção de nódulo cutâneo 35
- Figura 2 – Citoaspirador de Valeri com seringa e agulha acopladas 35
- Figura 3 - Preparação do esfregaço citológico pelo método do squash 36
- Figura 4 – Lâminas citológicas montadas e coradas pelo método de Giemsa 36
- Figura 5 – Baço. Linfoma multicêntrico. Acentuada esplenomegalia, palidez e hemorragias multifocais devido a infiltração neoplásica do órgão 47
- Figura 6 – Intestino delgado e mesentério. Linfoma multicêntrico. Aumento acentuado dos linfonodos mesentéricos. 47
- Figura 7 – PAAF. Linfoma Linfocítico (Kiel, Fournel-Fleury *et al.*, 1994 e WF). Neoplasia composta por células pequenas que possuem núcleos redondos, de contornos regulares e hipercromáticos. Giemsa (400X) 53

- Figura 8 – PAAF. Linfoma Centrocítico (Kiel e Fournel-Fleury *et al.*, 1994), equivalente ao Linfoma de Pequenas Células Clivadas (WF). As células mostram núcleos irregulares e clivados. Giemsa, (400X) 53
- Figura 9 - PAAF. Linfoma Centroblástico (Kiel e Fournel-Fleury *et al.*, 1994), equivalente ao Linfoma de Grandes Células não Clivadas (WF). As células mostram nucléolos múltiplos, proeminentes e periféricos. Giemsa, (400X) 54
- Figura 10 - PAAF. Linfoma Imunoblástico (Kiel e Fournel-Fleury *et al.*, 1994 e WF), As células mostram nucléolo único, proeminente e central. Giemsa, (400X) 54
- Figura 11 - PAAF. Linfoma Linfoblástico (Kiel e WF) equivalente a Linfoma de Pequenas Células Blásticas (Fournel-Fleury *et al.*, 1994) As células mostram núcleos pequenos com distribuição da cromatina uniforme Giemsa, (400X) 55
- Figura 12 - PAAF. Linfoma Anaplásico. Acentuado pleomorfismo celular, núcleos grandes e irregulares (Kiel, Fournel-Fleury *et al.*, 1994 e WF). Giemsa, (400X) 55
- Figura 13 - PAAF. Linfoma T- positividade para CD3, ABC, Hematoxilina, (400X) 59
- Figura 14 - PAAF. Linfoma B – positividade para CD79a, ABC, Hematoxilina, (400X) 59

Resumo

Os linfomas estão entre as neoplasias mais freqüentes na espécie canina. Do ponto de vista etiológico, epidemiológico, clínico, morfológico e imunofenotípico os linfomas caninos apresentam muitas semelhanças com os linfomas não-Hodgkin humanos. No presente trabalho utilizou-se a técnica de Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) como método de diagnóstico de 59 casos de linfoma canino, que foram submetidos às classificações de Kiel e Working Formulation, utilizadas nos Linfomas não-Hodgkin humanos, e a classificação citológica para linfomas caninos, proposta por Fournel-Fleury *et al.* em 1994. Além disso, foram utilizados métodos imunocitoquímicos para a determinação do imunofenótipo de 38 destas neoplasias utilizando um marcador de células T (CD3) e um marcador de células B (CD79a). De acordo com a Classificação de Kiel, 61,02% dos linfomas foram classificados como de grau alto de malignidade e 38,98% como de grau baixo. O tipo mais freqüente nesta classificação foi o Linfoma Centrobástico. Segundo a Classificação da Working Formulation, 11,86% dos animais eram portadores de linfomas de grau baixo de malignidade, 61,02% de grau intermediário e 27,12% de grau alto. O tipo mais freqüente nesta classificação foi o Linfoma de Grandes Células Não Clivadas. Utilizando a classificação proposta por Fournel-Fleury *et al.* (1994), 38,98% dos animais eram portadores de linfomas de grau baixo e 61,02% de grau intermediário ou alto. O tipo mais

freqüente nesta classificação foi o Linfoma Centroblástico. A classificação de Kiel foi aquela que melhor se adaptou ao material colhido pelo método da PAAF. No presente estudo, foram identificadas neoplasias que apresentavam imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) em 57,89% dos casos, imunofenótipo B (CD3-/CD79a+) em 34,21% dos casos e imunofenótipo T/B (CD3+/CD79+) em 7,90% dos casos. Entre os 22 casos de Linfomas T, o tipo citológico mais freqüente foi o Linfoma Linfoblástico (27,30%). Entre os 13 casos de Linfoma B predominaram os Linfomas Centroblásticos (38,46%), seguidos pelos Linfomas Imunoblásticos (30,77%). Os resultados obtidos mostram que o método da PAAF pode ser incorporado à rotina diagnóstica, pois permite a obtenção de dados que ajudam a estabelecer o comportamento biológico dos linfomas e protocolos de tratamento melhor direcionados.

Palavras Chave: linfoma; cão; citologia; imunocitoquímica

Abstract

Lymphoma is one of the most frequent canine neoplasia and share many similarities with human non-Hodgkin's lymphoma in respect of etiology, epidemiology, clinical, morphological and immunophenotypical aspects. The aim of this study was to apply Kiel, Working Formulation and Fournel-Fleury's *et al.* (1994) non-Hodgkin's classifications in a survey of 59 cases using Fine Needle Aspiration (FNA) and immunocytochemistry. According to Kiel scheme 61.02% were high-grade lymphomas and 38.98% low-grade. The Working Formulation, showed 11.86% of low-grade, 61.02% intermediate grade and 27.12% high-grade. In Fournel-Fleury's protocol revealed a predominance of medium or high-grade lymphoma, with 61.02% over 38.98% of low -grade. Among the T-cell lymphomas the most frequent was Lymphoblastic Lymphoma (27.30%) and for B-cell cases Centroblastic Lymphoma (38.46%) was predominant followed by Immunoblastic Lymphoma (30.77%). Immunophenotyping was performed with a panel of two antibodies CD3 (T-cell marker) and CD79a (B-cell marker). The immunocytochemical study revealed 57.89% of T-cell lymphomas, 34.21% of B-cell lymphomas and 7.90% were T/B lymphomas. In conclusion, FNA can be used as a diagnostic method and in canine lymphoma cytological and

immunocytological classification. Kiel's system showed the best results, once is based on cytological aspects.

Key words: lymphoma; dog; cytology; immunocytochemistry

1. Introdução

Linfoma é uma das neoplasias mais freqüentes na espécie canina e representa cerca de 7 a 24% de todas as neoplasias caninas e 83% dos tumores de origem hematopoiética. Anatomicamente, os linfomas caninos são classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário. Ainda pode-se classifica-los de acordo com o grau de malignidade em linfomas de baixo, médio e alto grau e quanto ao imunofenótipo em linfomas T, linfomas B ou de celularidade mista (T e B).

Como os linfomas caninos apresentam características semelhantes às dos linfomas não-Hodgkin humanos, as classificações morfológicas dos linfomas não-Hodgkin humanos têm sido adotadas por diversos autores no estudo deste tipo de neoplasias dos cães (GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997 e FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

No seres humanos a associação do tipo citológico com o imunofenótipo da neoplasia é obrigatória para a determinação do diagnóstico e do tratamento (SOARES & ARIAS, 1999). Nos cães a imunofenotipagem dos linfomas tem sido utilizada com os mesmos objetivos, sendo realizada tanto em material incluído em parafina quanto em material citológico (GREENLEE *et al.* 1990; TESKE, 1994; FISHER *et al.* 1995 CANIATTI *et al.*, 1996; MILNER *et al.*, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; DE MOURA,

2000 e FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002). O alto custo e a ausência de marcadores específicos para os cães faz com que esta técnica ainda seja pouco utilizada na classificação dos linfomas caninos.

Recentemente a Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) tem sido utilizada no diagnóstico de lesões neoplásica, inclusive dos linfomas não Hodgkin do homem. Esta técnica é um método de diagnóstico rápido, de baixo custo, eficaz, causa desconforto mínimo ao paciente e permite o diagnóstico primário dos linfomas e o estadiamento clínico. Auxilia também a classificação anatômica e a verificação da evolução da doença (VERNAU *et al.*, 2001).

A associação entre a classificação citológica e a técnica imunocitoquímica em material colhido pelo método da PAAF permite obter além da tipificação da neoplasia, o estabelecimento de protocolos clínicos de tratamento de maneira rápida e eficiente (CANIATTI *et al.*, 1996).

Diante do que foi exposto, este trabalho teve como principais objetivos:

- ✓ Investigar as características dos linfomas caninos utilizando métodos citomorfológicos em material colhido pelo método da Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF);
- ✓ Verificar a aplicabilidade das classificações de Kiel e Working Formulation — utilizadas para os linfomas não-Hodgkin no homem —

em exames citológicos de linfomas caninos, correlacionando-as com a classificação citológica proposta por Fournel-Fleury *et al.* (1994) para os linfomas do cão;

- ✓ Realizar a imunofenotipagem dos linfomas em esfregaços citológicos de linfomas caninos e estabelecer a origem T ou B das células neoplásicas;
- ✓ Correlacionar as características citológicas dos linfomas caninos com as características imunofenotípicas das neoplasias;
- ✓ Avaliar a eficácia da PAAF em associação com métodos de classificação citológica e de imunofenotipagem, no diagnóstico dos linfomas caninos;
- ✓ Acrescentar dados sobre as características dos linfomas caninos que permitam ampliar a sua comparação com os linfomas humanos, possibilitando assim, a utilização do linfoma canino como modelo da doença humana.

2. Revisão de Literatura

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

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

Apesar de não haver predileção por sexo, há evidências de predisposição racial envolvendo, principalmente, animais das raças Boxer, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier, Chow Chow, Pastor Alemão, Poodle, São Bernardo, Beagle, Golden Retriever e Bulldog. Raças como Dachshund e Cocker Spaniel são pouco acometidas (TESKE, 1994; VONDEHAAR & MORRISON, 1998).

A etiologia deste tipo de neoplasia é desconhecida. A presença de agentes virais não foi comprovada na espécie canina ao contrário do que

acontece nos seres humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas (SEQUEIRA & FRANCO, 1992; TESKE, 1994a e SEQUEIRA *et al.*, 1999). Fatores ambientais, como exposição crônica a substâncias químicas, são citados como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma nos cães (HAYES *et al.*, 1991; 1995). Recentemente, GAVAZZA *et al.* (2001), relacionam o aparecimento precoce da neoplasia em cães que habitam áreas industriais, com alta poluição ambiental, e com o uso de produtos químicos como tintas e solventes pelos proprietários.

Os sinais clínicos relacionados aos linfomas dos cães são, na maioria das vezes, inespecíficos e dependem do órgão ou órgãos envolvidos. Entretanto linfadenopatia indolor, perda de peso progressiva, caquexia, edema local ou generalizado, apatia e emese são os mais comumente encontrados. Anatomicamente, os linfomas caninos são classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário ou extranodal, sendo a forma multicêntrica a mais freqüente (SEQUEIRA & FRANCO, 1992; JACOBS *et al.*, 2002).

Alterações hematológicas são comuns, podendo ocorrer anemia, trombocitopenia, leucopenia ou leucocitose, e linfopenia ou linfocitose. Infiltração na medula óssea e leucemização raramente ocorrem. Hipercalcemia é uma síndrome paraneoplásica que pode ocorrer em cães com linfoma devido à produção, pelas células neoplásicas, de uma substância de ação semelhante ao paratormônio (TESKE 1994;

VONDEHAAR & MORRISON, 1998). Segundo FOURNEL-FLEURY *et al.*, (2002), há uma maior incidência de hipercalcemia nos linfomas de origem T.

O estadiamento clínico dos linfomas caninos é realizado durante o diagnóstico clínico e serve como guia para o prognóstico e tratamento da neoplasia (DOBSON *et al.*, 2001). Este estadiamento, estabelecido inicialmente para linfomas nos seres humanos, é também utilizado para a espécie canina (SEQUEIRA & FRANCO, 1992), e segue o protocolo proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN 1980; GRAY *et al.*, 1984). Grande parte dos casos de linfoma canino apresenta-se em estágio clínico avançado (IV ou V) no momento diagnóstico (DOBSON & GORMAN, 1993), o que indica uma pior resposta ao tratamento e menor sobrevida do animal (DOBSON *et al.*, 2001).

De acordo com a classificação anatômica, a forma multicêntrica, freqüentemente envolve linfonodos periféricos e profundos, além de órgãos como fígado, baço, rins, pulmão, coração, trato gastrintestinal e medula óssea. Na forma digestiva, as lesões envolvem órgãos do trato gastrintestinal e linfonodos regionais, podendo, entretanto, haver comprometimento de outros órgãos abdominais como o fígado, baço e rins. O linfoma tímico usualmente acomete o timo e linfonodos regionais. O linfoma cutâneo ocorre como massas solitárias ou múltiplas na pele, podendo ser uma lesão tardia de um envolvimento sistêmico como o que ocorre no linfoma multicêntrico. A

forma solitária é aquela que envolve apenas um órgão não linfóide (JACOBS *et al.*, 2002).

TABELA 1 - Estadiamento Clínico dos Linfomas Caninos proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY *et al.*, 1984)

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

Obs: Os estádios são ainda subdivididos em A (sem sinais sistêmicos) ou B (com sinais sistêmicos), segundo GREENLEE *et al.* (1990). Os sinais sistêmicos são inespecíficos, podendo ocorrer febre, letargia, anorexia, vômitos e diarreia.

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

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

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

No homem, uma vez estabelecido o diagnóstico de linfoma, procura-se determinar além da morfologia celular, a linhagem à qual pertencem as células neoplásicas, o que geralmente é de importância terapêutica e diagnóstica. Em termos práticos, nos seres humanos, os linfomas de células T são mais agressivos e de pior prognóstico que os linfomas de células B (WAKAMATSU *et al.*, 1995).

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

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

A Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) tem sido empregada, tanto no homem quanto nos animais, como método de diagnóstico de lesões das mais diversas origens, inclusive neoplásicas (OERTEL *et al.*, 1988; SNEIGE *et al.*, 1990). As vantagens deste método estão relacionadas à rapidez do diagnóstico, ao baixo custo e à sua eficácia (RASKIN & NIPPER, 1992; ROCHA *et al.*, 1998). Além disso, causa desconforto mínimo ao paciente, permitindo que se realizem múltiplas colheitas e amostragens em série, particularmente interessantes quando surgem resultados inconclusivos ou quando existe suspeita de recidiva da lesão (VERNAU *et al.*, 2001). No homem, este método tem sido utilizado com frequência no diagnóstico dos linfomas, porém no cão, são poucos os estudos que empregam a PAAF na

sua metodologia (ROBEY *et al.*, 1987; TESKE & VAN HEERDER, 1996). Nos casos de linfadenopatia, este exame permite a diferenciação rápida entre processos reacionais benignos e neoplásicos (FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1994). Quando há suspeita de lesão ou alteração em órgãos internos, como vísceras abdominais ou torácicas, a PAAF também pode ser realizada com auxílio da ultra-sonografia (CIVARDI *et al.*, 2001).

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

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

CARTAGENA *et al.* (1992), sugeriram como principais indicações da PAAF: punções em massas internas de pacientes com grandes riscos cirúrgicos, que não apresentem massas superficiais uma vez que esta técnica não necessita de qualquer tipo de sedação do paciente, nas avaliações de novas massas e no estadiamento da doença. A acurácia da

PAAF nos casos de linfomas não-Hodgkin chega a 85% e quando combinada a citomorfometria com outros exames como, por exemplo, imunocitoquímica, esta eficácia chega a 91%.

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

Os primeiros trabalhos de pesquisa que procuraram caracterizar as populações de linfócitos que constituíam os linfomas caninos esbarraram em algumas dificuldades relacionadas à metodologia utilizada. Nestes estudos pioneiros, as células que apresentavam capacidade de formar rosetas com hemácias humanas eram classificadas como T (HOLMBERG *et al.*, 1976; ONIONS, 1977). Esta metodologia mostrou-se inadequada, já que 40% a 60% das células com esta capacidade também eram SIg+, ou seja, possuía imunoglobulinas de superfície, característica associada às células B (ATKINSON *et al.*, 1980). Na realidade, ainda não havia anticorpos Anti-Ia que pudessem ser empregados nos linfomas caninos, ou mesmo nos linfomas humanos para os quais eram de importância capital (APPELBAUM *et al.*, 1984).

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

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

A utilização de um painel de anticorpos amplo e as técnicas de imunoperoxidase em cortes de congelação foi relatada por TESKE *et al.*, (1994). De acordo com estes autores os linfomas foram considerados como de células B quando apresentavam positividade para CD21, anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA e negatividade para os marcadores de células T. Os linfomas foram considerados como de células T quando apresentavam positividade para CD3, CD4, CD8, Thy-1, CD49 e negatividade para os marcadores de células B. A maioria dos linfomas (58%) foi caracterizado como de células B.

O emprego de técnicas imunológicas no estudo e classificação das desordens linfoproliferativas tem se mostrado particularmente importante no

estabelecimento de um diagnóstico preciso (CANIATTI *et al.*, 1996 e DOBSON *et al.*, 2001).

As determinações do imunofenótipo T ou B e do grau de maturação das células linfóides neoplásicas auxiliam no diagnóstico dos linfomas e no monitoramento da recidiva destes tumores na espécie humana. Atualmente a imunofenotipagem é indispensável para determinar o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin de acordo com as classificações mais atuais, Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), Real (HARRIS *et al.*, 1994) e WHO (JAFFE *et al.*, 2001).

Durante muito tempo a determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos foi dificultada pela falta de marcadores específicos. Entretanto, os métodos imunoistoquímicos têm sido aplicados com sucesso em cortes histológicos de tecido incluído em parafina, utilizando o anticorpo policlonal anti-CD3 para marcar linfomas de células T e o anticorpo monoclonal anti-mb1 (CD79a) para marcar linfomas de células B (MILNER *et al.*, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002). Em trabalho de pesquisa recente, tivemos a oportunidade de padronizar a marcação imunofenotípica de linfomas caninos utilizando material incluído em parafina e os mesmos anticorpos citados acima (DE MOURA *et al.*, 2000).

Nos cães, assim como no homem, o imunofenótipo T dos linfomas tem sido associado a um prognóstico ruim, com sobrevida menor e períodos de remissão mais curtos, quando comparado aos linfomas de células B (KIUPEL

et al., 1999; DOBSON *et al.*, 2001). No entanto, algumas diferenças ocorrem dentro de cada um destes grupos no que diz respeito à apresentação clínica, resposta ao tratamento e prognóstico (KIUPEL *et al.*, 1999).

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

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

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

De acordo com estudos já realizados, os linfomas caninos apresentam muitas semelhanças com os linfomas não Hodgkin humanos, do ponto de vista epidemiológico, morfológico e imunofenotípico. Portanto, aplicar as classificações citohistológicas e imunofenotípicas nos linfomas caninos, além de adicionar dados aos estudos dessa neoplasia canina — relacionando-as

com a clínica para melhor determinar o tratamento, prognóstico e tempo de vida dos animais (CARTER *et al.*, 1986; FISHER *et al.*, 1995; KIUPEL *et al.*, 1999) — permitirá que estes resultados possam ser incorporados ao modelo experimental da doença humana.

3. Material e Métodos

3.1. Estudo prospectivo dos casos de Linfomas

Foram utilizadas as amostras citológicas obtidas de 59 cães previamente diagnosticados como portadores de linfoma por meio do método da PAAF, pelo Serviço de Patologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Campus de Botucatu-SP, durante o período de maio de 2000 a julho de 2003.

Por ocasião da colheita do material os dados de identificação do animal, como sexo, idade e raça, evolução do processo e estadiamento clínico foram anotados em fichas individuais (Anexo A).

3.2. Estadiamento Clínico e Classificação Anatômica dos linfomas

O estadiamento das neoplasias foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OWEN 1980; GRAY *et al.*, 1984) e a classificação anatômica foi estabelecida de acordo com JACOBS *et al.* (2002), em 44 animais portadores de linfoma.

Além do exame físico, foram utilizadas técnicas de diagnóstico por imagem, como radiografias ou ultra-sonografias e a punção de medula óssea para a determinação do estadiamento clínico e da classificação anatômica da neoplasia.

Os protocolos do estadiamento clínico e da classificação anatômica estão apresentados nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

A punção da medula óssea foi realizada de acordo com a técnica padronizada pelo Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Campus de Botucatu-SP, utilizando a agulha para aspiração de medula óssea Bierman de aço inox, reutilizável, BD. O local da punção em todos os animais foi a região da crista ilíaca, devido a facilidade de acesso.

A técnica da punção de medula óssea foi a seguinte:

- ✓ Anti-sepsia com álcool iodado da região a ser puncionada;
- ✓ Após ultrapassar a pele a agulha foi fixada na parede óssea empregando-se movimentos rotatórios;
- ✓ Uma seringa descartável de 10ml foi acoplada à agulha Bierman de aço inox sendo realizada a aspiração do material;
- ✓ O material foi distendido em lâmina histológica, fixado em álcool metílico e corado pelo método de Giemsa.

Nos animais que vieram a óbito antes da realização de exames complementares a determinação do estadiamento clínico e da classificação anatômica da neoplasia foi realizada durante a necropsia.

3.3. Processamento Citológico

O material foi colhido de acordo com a técnica de Punção Aspirativa por Agulha Fina padronizada no Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Campus de Botucatu-SP. Na maioria dos animais, as punções foram realizadas nos linfonodos periféricos que apresentavam linfadenomegalia ou em lesões palpáveis extranodais (Figura 1). Também foi utilizado, embora com menos freqüência, material proveniente de lesões em órgãos internos obtidos com o auxílio da ultra-sonografia, bem como de efusão pleural.

As punções foram feitas empregando-se seringa descartável de plástico de 10ml e agulha 30 x 7mm acopladas ao citoaspirador de Valeri (Figura 2). Os locais a serem puncionados foram previamente submetidos à anti-sepsia com álcool iodado. O material colhido foi distendido em lâminas histológicas de vidro e posteriormente fixado em álcool metílico durante cinco minutos (Figura 3). Essas lâminas fixadas, em média de três por local puncionado, foram coradas pelo método de Giemsa e utilizadas tanto para o diagnóstico como para as classificações citológicas das neoplasias (Figura 4). Os tipos citológicos foram determinados de acordo com as classificações de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e Working Formulation (NCI, 1982), utilizadas para os linfomas não-Hodgkin humanos e com a classificação citológica proposta por Fournel-Fleury *et al.* (1994) para os linfomas caninos (Anexo B).



Figura 1 – Linfoma Multicêntrico- PAAF -Punção de nódulo cutâneo

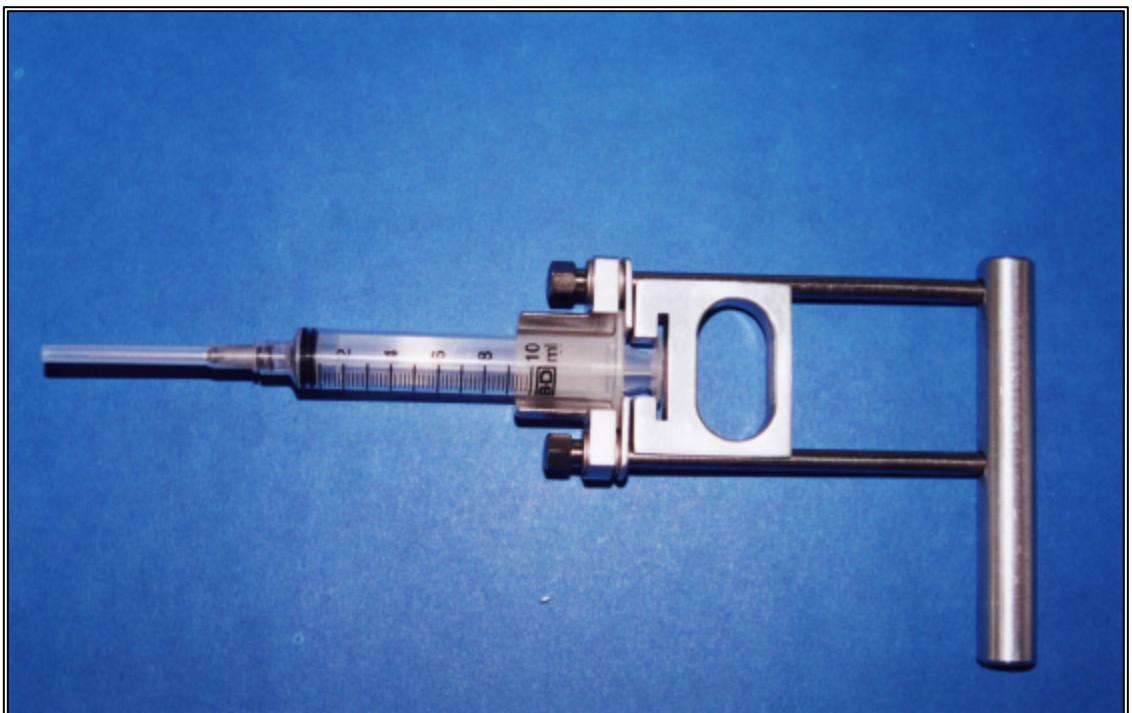


Figura 2 – Citoaspirador de Valeri com seringa e agulha acopladas

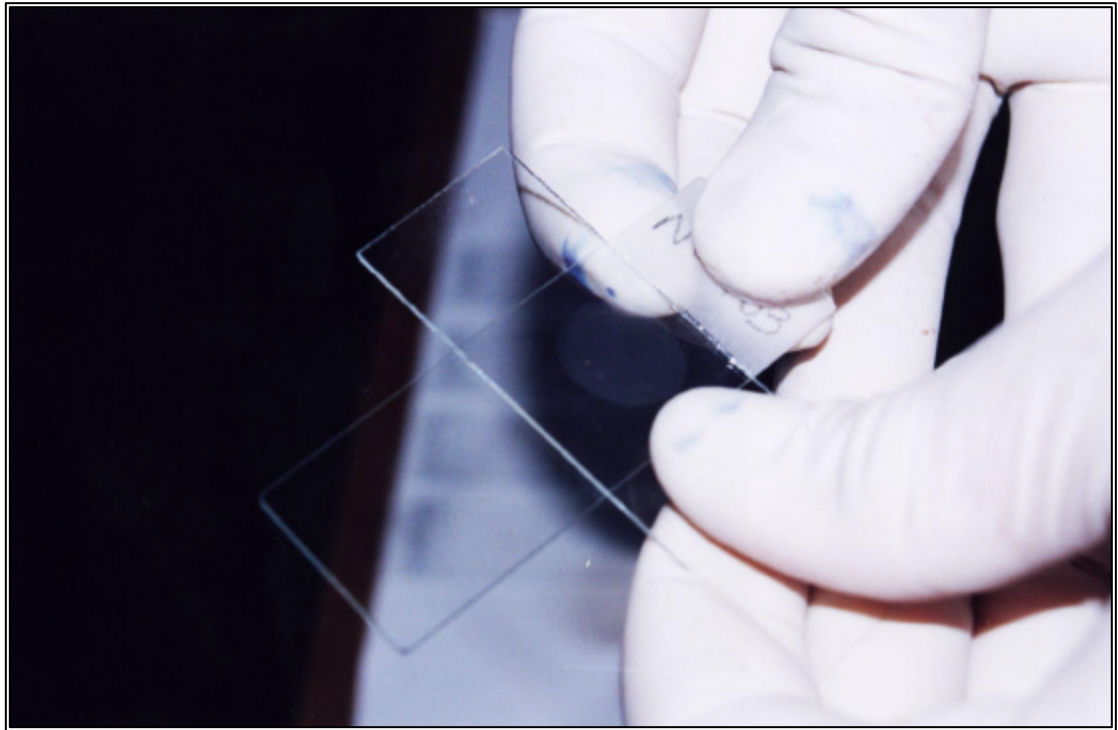


Figura 3 - Preparação do esfregaço citológico pelo método do squash

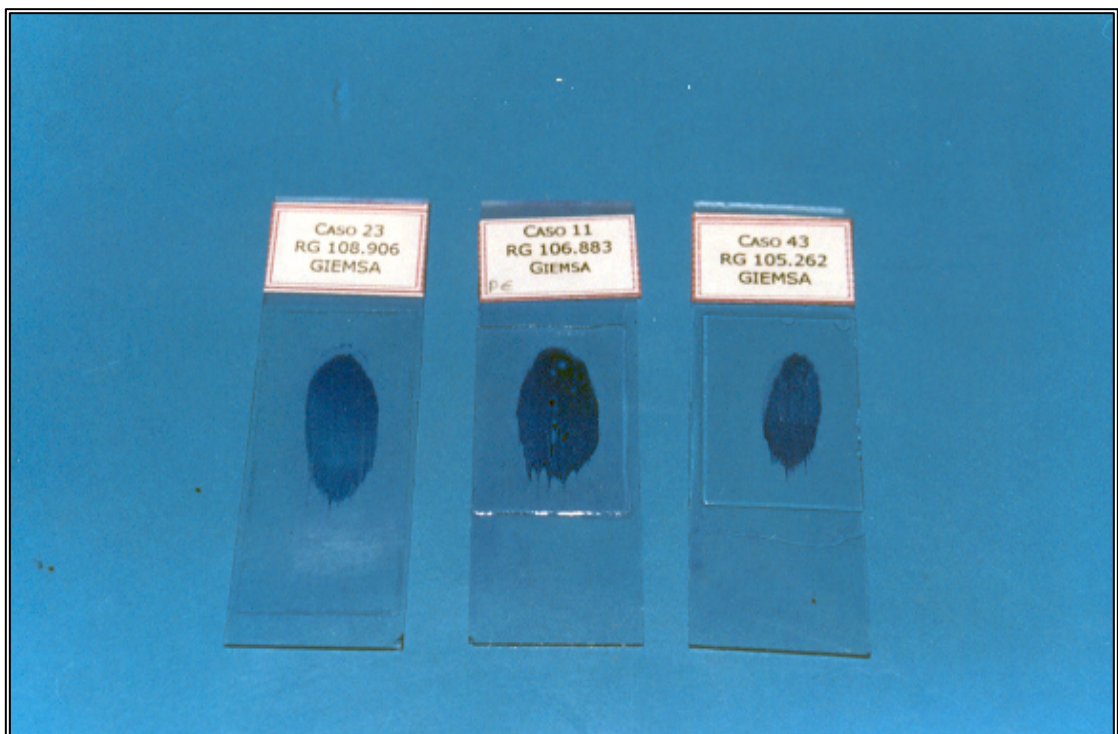


Figura 4 – Lâminas citológicas montadas e coradas pelo método de Giemsa

3.4. Avaliação imunocitoquímica

3.4.1 Padronização da técnica imunocitoquímica

A técnica imunocitoquímica utilizada no presente trabalho foi baseada na metodologia descrita por HSU *et al.* (1981). Sua padronização foi realizada no Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu - SP.

Para a padronização desta técnica foram utilizados esfregaços citológicos de linfonodos normais de cães, colhidos por meio da PAAF. Este material foi fixado e mantido em álcool 95° até o momento da realização da técnica imunocitoquímica.

3.4.2. Anticorpos primários

CD3 (DAKO A0452) – Anticorpo policlonal humano que reconhece uma molécula (antígeno C3) ligada ao receptor das células T

CD79a (DAKO M7051) – Anticorpo monoclonal humano que reconhece um polipeptídeo que faz parte do complexo receptor de antígeno dos linfócitos B.

Cada anticorpo foi diluído em solução de 1% de albumina bovina e solução tampão de TRIS (TRIZMA base, D5637 Sigma Chemical CO, St. Louis, E.U.A.).

As concentrações testadas foram:

CD3 – 1:100 e 1:50 – ficando estabelecida a concentração de 1:50 como padrão;

CD79a – 1:50 e 1:25 – ficando a concentração de 1:25 como padrão;

Para a determinação do imunofenótipo da neoplasia foram considerados os seguintes parâmetros:

Foram classificados como linfomas T aqueles que apresentaram células neoplásicas positivas para CD3 e negativas para CD79a. Os linfomas B foram aqueles que apresentaram as células neoplásicas positivas para CD79a e negativas para CD3. As neoplasias positivas tanto para CD3 como CD79a foram classificadas como linfoma de celularidade mista (T/B).

3.4.3. Fixação dos esfregaços citológicos para imunofenotipagem

O material colhido por meio da PAAF e distendido nas lâminas foi fixado imediatamente em álcool 95° a fim de evitar alterações celulares que pudessem prejudicar a reação imunocitoquímica. Os esfregaços armazenados em porta lâminas de plástico com álcool 95° foram mantidos a temperatura ambiente até o momento da realização da imunocitoquímica.

3.4.4. Imunocitoquímica

Recuperação antigênica

Após a retirada das lâminas do fixador, estas foram hidratadas antes do início da etapa de recuperação antigênica.

Foram testados dois tipos de recuperação antigênica sendo, o primeiro, a solução de EDTA 10 μ M, pH 8,0, previamente aquecida a 95°C, em cozimento por vapor (Steammer) por vinte minutos. Em seguida o material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente e depois submetido ao bloqueio da peroxidase endógena. O outro tipo de recuperação foi em solução tampão de citrato 10mM, pH 6,0, e colocadas em forno de microondas (potência máxima), por 15 minutos, completando-se a solução a cada três minutos. Em seguida o material foi resfriado à temperatura ambiente e também submetido ao bloqueio da peroxidase endógena.

Para os dois anticorpos utilizados neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos com a recuperação antigênica com solução de EDTA em Steammer.

Bloqueio da peroxidase endógena

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado de duas formas, em solução de partes iguais de água oxigenada 20 volumes e metanol, durante 20 minutos, sendo dois banhos de dez minutos cada e, em solução de partes iguais de água oxigenada 20 volumes e água destilada, durante trinta minutos, sendo dois banhos de 15 minutos cada.

Os melhores resultados foram obtidos com a utilização da solução de partes iguais de água oxigenada 20 volumes e água destilada para os dois anticorpos utilizados.

Reação com os anticorpos primários e secundários

Foram realizados dois tipos de reação com kits de anticorpos secundários diferentes. O primeiro método utilizou o kit LSAB (K0690 – DAKO). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em câmara úmida, por 18 horas a 4°C, lavadas em solução tampão de TRIS e incubadas com anticorpo biotilado e solução de estreptavidina-biotina-peroxidase do kit LSAB (K0690-DAKO), por 30 minutos cada reação, em câmara úmida, a temperatura ambiente.

O outro método empregou o kit ABC (K0492, DAKO) com a concentração de 1:200 . As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em câmara úmida, por 18 horas a 4°C, lavadas em solução de TRIS e incubadas com anticorpo biotilado e solução de estreptavidina-biotina-peroxidase do kit ABC (K0492, DAKO), por trinta minutos cada reação, em câmara úmida, a temperatura ambiente.

Melhores resultados foram obtidos com a utilização do kit ABC (K0942, DAKO) para os dois anticorpos utilizados.

Revelação

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (1mg/ml) em TRIS (D5637- Sigma Chemical CO) e 600µl de H₂O₂, de 20 volumes durante cinco minutos em câmara escura a temperatura ambiente. Os esfregaços foram contra-corados com Hematoxilina de Meyer, por dois minutos. Após este processamento, as lâminas foram desidratadas, montadas e lidas em microscópio óptico.

4. Resultados

4.1 Dados clínicos dos animais

Dos 59 animais puncionados nenhum foi submetido à sedação ou anestesia para a colheita do material. Em 54 animais, as lesões eram superficiais e a simples contenção física foi suficiente para que o exame fosse realizado.

Foi constatada linfadenopatia em 44 animais, geralmente com comprometimento de mais de um linfonodo superficial. Nestes casos, eram puncionados preferencialmente os linfonodos cervicais superficiais e poplíteos, devido à facilidade de acesso. Em dez animais foi feita PAAF em lesões cutâneas; em quatro animais o material foi colhido por meio de punção torácica, sendo três animais com efusão pleural e outro apresentando massa localizada na região antero-ventral do tórax. Neste último, assim como em um animal que apresentava massa esplênica, a punção foi guiada por ultra-som.

O estadiamento e a classificação anatômica das neoplasias foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY *et al.*, 1984).

Dos 59 animais utilizados no presente estudo, 21 eram sem raça definida (SRD), 12 animais da raça Boxer, seis animais da raça Pastor Alemão, quatro animais da raça Rottweiler, três animais da raça Fox

Paulistinha e três animais da raça Fila Brasileiro. Os outros dez animais pertenciam a outras raças (tabela 3). Em relação ao sexo entre os 59 animais portadores de linfomas 29 eram fêmeas e trinta eram machos (tabela 4). A idade dos pacientes variou de dois a 17 anos, sendo que 54,4% dos animais possuíam idade acima de seis anos, apresentando como média 7,2 anos (tabela 5).

O estadiamento clínico e a classificação anatômica foram realizados em 46 animais. Destes animais, 33 estavam no estágio IV, oito apresentaram comprometimento da medula óssea, portanto se apresentaram no estágio V e cinco pacientes possuíam apenas acometimento dos linfonodos e foram classificados como estágio III (tabela 6).

Em relação à classificação anatômica, 44 animais apresentaram a forma multicêntrica da neoplasia com acometimento de vários órgãos e dois casos foram classificados como tímicos, com comprometimento mediastinal (tabela 7).

Dentre os 44 animais portadores de linfoma multicêntrico, 37 apresentaram aumento de volume dos linfonodos periféricos, sendo os cervicais superficiais e submandibulares os mais acometidos, destes 37 apenas em cinco havia envolvimento somente dos linfonodos, 32 possuíam infiltração neoplásica nos órgãos internos. Três animais apresentaram lesões cutâneas e comprometimento de órgãos internos, e outros três animais possuíam envolvimento apenas dos órgãos internos como baço e fígado,

linfonodos ilíacos e mesentéricos os quais foram puncionados com auxílio da ultra-sonografia (Figuras 5 e 6).

Os dois casos classificados como linfomas tímicos apresentaram acometimento do timo, dos linfonodos mediastínicos e efusão pleural.

Tabela 3 – Distribuição racial dos 59 animais portadores de linfomas caninos diagnosticados pelo método da PAAF

RAÇAS	Nº DE CASOS	%
SRD	21	35,60
Boxer	12	20,34
Pastor Alemão	06	10,17
Rottweiler	04	6,78
Fox Paulistinha	03	5,08
Fila Brasileiro	03	5,08
Outras	10	16,65
TOTAL	59	100

Tabela 4 – Distribuição por sexo dos animais em 59 casos de linfomas caninos diagnosticados pelo método da PAAF

SEXO	Nº DE CASOS	%
Machos	30	51
Fêmeas	29	49
TOTAL	59	100

Tabela 5 - Idade dos animais portadores de linfoma em 59 casos diagnosticados pelo método da PAAF

IDADE	Nº DE CASOS	%
0 a 3 anos	5	8,47
4 a 6 anos	22	37,29
Acima de 6 anos	32	54,24
TOTAL	59	100

Tabela 6 - Estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980; GRAY *et al.*, 1984) nos 46 casos de linfomas caninos diagnosticados pelo método da PAAF

ESTADIAMENTO CLÍNICO	Nº DE CASOS	%
Estádio III	5	10,87
Estádio IV	33	71,74
Estádio V	8	17,39
TOTAL	46	100

Tabela 7 - Classificação Anatômica (JACOBS *et al.*, 2002) dos linfomas caninos diagnosticados pelo método da PAAF

CLASSIFICAÇÃO ANATÔMICA	Nº DE CASOS	%
Multicêntrica	44	95,65
Tímica	02	4,35
TOTAL	46	100



Figura 5 - Baço. Linfoma multicêntrico. Acentuada esplenomegalia, palidez e hemorragias multifocais devido à infiltração neoplásica do órgão.

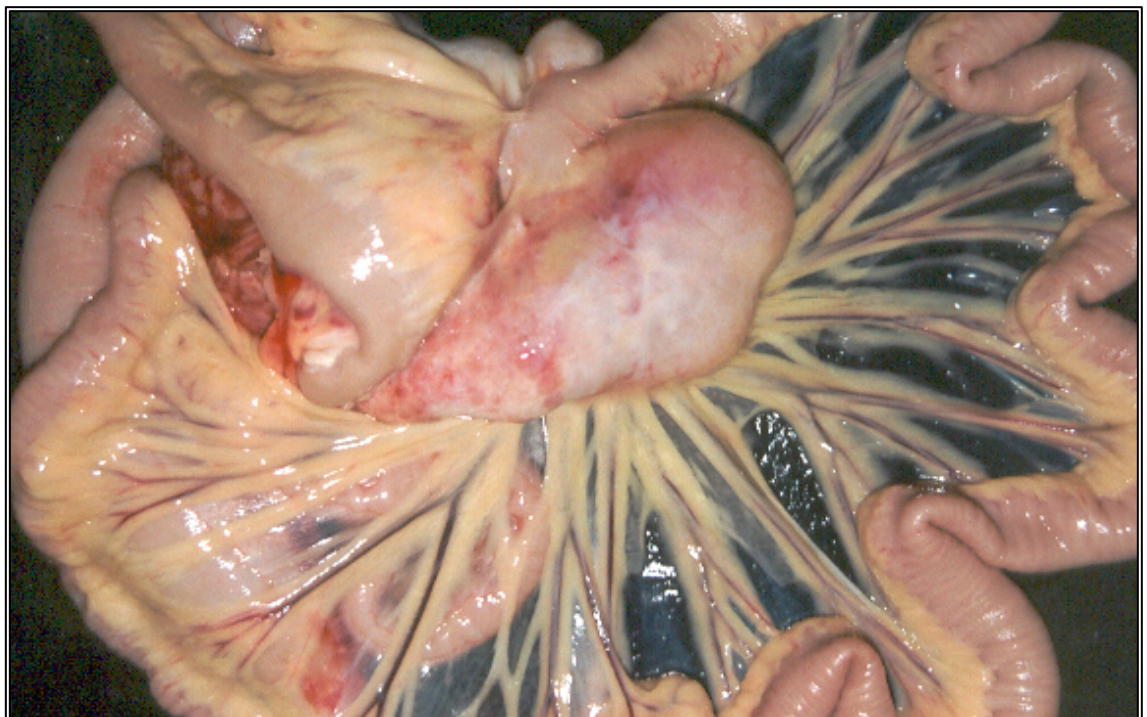


Figura 6 - Intestino delgado e mesentério. Linfoma multicêntrico. Aumento acentuado dos linfonodos mesentéricos.

4.2. Aplicação das classificações citológicas dos linfomas caninos: Kiel, Working Formulation e Fournel-Fleury *et al.* (1994)

Para cada caso de linfoma diagnosticado, o tipo citológico foi caracterizado segundo as classificações de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e Working Formulation (NCI, 1982) propostas para os linfomas não-Hodgkin humanos, e a Classificação Citológica para linfomas caninos, proposta por Fournel-Fleury *et al.*, (1994). Os achados citológicos foram descritos em fichas individuais para cada animal, nas quais se podia estabelecer a correlação entre as diferentes classificações utilizadas (Anexo B).

As amostras obtidas utilizando-se o método da PAAF foram de boa qualidade e com celularidade suficiente para permitir o diagnóstico e a classificação citológica do linfoma. A coloração dos esfregaços pelo método de Giemsa permitiu a identificação das características celulares, principalmente da morfologia nuclear, do padrão de distribuição da cromatina e dos nucléolos que são elementos importantes na determinação do tipo celular predominante.

Os resultados da classificação citológica de acordo com os critérios das classificações de Kiel, da Working Formulation e de Fournel-Fleury estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Classificação Citológica de 59 casos de linfomas caninos de acordo com as classificações de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) , Working Formulation (NCI, 1982) e Fournel-Fleury *et al.* (1994)

KIEL	WORKING FORMULATION	FOURNEL-FLEURY	NÚMERO DE CASOS
GRAU BAIXO	GRAU BAIXO	GRAU BAIXO	
Linfocítico	Linfocítico	Linfocítico	7
	GRAU INTERMEDIÁRIO		
Centrocítico	Células Pequenas Clivadas	Centrocítico	8
Centrocítico-Centroblastico	Misto de Células Pequenas e Grandes	Centrocítico-Centroblastico	8
GRAU ALTO		GRAU INTERMEDIÁRIO OU ALTO	
Centroblastico	Grandes Células não Clivadas	Centroblastico	20
	GRAU ALTO		
Imunoblastico	Imunoblastico	Imunoblastico	7
Linfoblastico	Linfoblastico	Pequenas Células Blásticas	8
Anaplásico	Anaplásico	Anaplásico	1
TOTAL			59

Quando se utilizou a classificação de Kiel predominaram os linfomas de grau alto de malignidade, resultado semelhante ao encontrado quando se empregou a classificação proposta por Fournel-Fleury. A classificação da Working Formulation quando aplicada a esta série de neoplasias mostrou predominância dos linfomas de grau intermediário.

Para os linfomas de grau baixo de acordo com a classificação de Kiel, foram identificados sete casos de Linfomas Linfocíticos, oito casos de Linfomas Centrocíticos e oito casos do tipo Centrocítico-Centroblástico.

Os Linfomas Linfocíticos se caracterizavam pela presença de células pequenas, de núcleos redondos e pequenos, cujo diâmetro era semelhante ao de uma hemácia. A cromatina mostrava padrão denso com pequenos agregados mais grosseiros, não sendo observados nucléolos. O citoplasma destas células era sempre escasso (Figura 7).

Nos Linfomas Centrocíticos o tipo celular predominante caracterizava-se pelo seu tamanho pequeno, com diâmetro equivalente a uma hemácia ou uma hemácia e meia e por possuir núcleo também pequeno e clivado, com aspecto irregular e cromatina densa. O citoplasma era sempre escasso. Este tipo de linfoma equivale ao Linfoma de Pequenas Células Clivadas na classificação da Working Formulation, sendo considerado nesta classificação como linfoma de grau intermediário (Figura 8).

Os Linfomas Centrocíticos-Centroblásticos eram constituídos por uma população celular bimórfica na qual estavam presentes células pequenas

com núcleo irregular ou clivado e células grandes com núcleos não clivados. As células pequenas tinham características semelhantes às do tipo centrocítico descrito anteriormente e as células grandes possuíam as características do tipo centroblástico que será descrito a seguir. Este tipo de linfoma equivale ao Linfoma Misto de Células Pequenas e Grandes na classificação da Working Formulation sendo considerado nesta classificação como linfoma de grau intermediário.

Nos linfomas de grau alto pela classificação de Kiel, foram identificados vinte casos de Linfomas Centroblásticos, sete Imunoblásticos, oito casos de Linfoma Linfoblástico e um Anaplásico.

Os Linfomas Centroblásticos se caracterizavam pela presença de células grandes, com núcleos de diâmetro equivalente a duas ou três hemácias, cromatina vesicular e nucléolos múltiplos e periféricos. As figuras de mitose eram freqüentes. O citoplasma destas células podia ser escasso ou abundante. Este tipo de linfoma equivale ao Linfoma de Grandes Células não-Clivadas na classificação da Working Formulation, sendo considerado nesta classificação como linfoma de grau intermediário (Figura 9).

Os Linfomas do tipo Imunoblástico eram constituídos por células de tamanho médio ou grande, núcleo com diâmetro variando entre uma e meia a duas hemácias, cromatina vesicular e nucléolo proeminente e central. As figuras de mitose eram freqüentes. O citoplasma era variável, anfófilo ou basofílico (Figura 10).

A composição celular dos Linfomas Linfoblásticos se caracterizava por células pequenas, cujo núcleo equivalente a uma e meia hemácia apresentava forma redonda ou oval. Nestas células a distribuição da cromatina era uniforme, não permitindo a observação dos nucléolos. As figuras de mitose eram freqüentes. Na maioria das células o citoplasma escasso e fracamente basofílico formava um anel ao redor do núcleo (Figura 11).

O Linfoma Anaplásico caracterizava-se por apresentar uma população de células grandes pleomórficas, que possuíam núcleo grande e irregular, com cromatina fina ou granular e citoplasma claro ou levemente basofílico. O número de mitoses era sempre muito alto (Figura 12).

De acordo com a Classificação de Kiel, 61,02% (36 casos) das neoplasias se enquadram como de grau alto de malignidade e 38,98% (23 casos) como de grau baixo de malignidade. Segundo a classificação da Working Formulation, 11,86% (sete casos) dos animais eram portadores de linfomas de grau baixo de malignidade, 61,02% (36 casos) de grau intermediário e 27,12% (16 casos) de grau alto. Utilizando a classificação proposta por Fournel-Fleury *et al.* (1994), 38,98% (23 casos) dos animais eram portadores de linfomas de grau baixo de malignidade e 61,02% (36 casos) de grau intermediário ou alto.

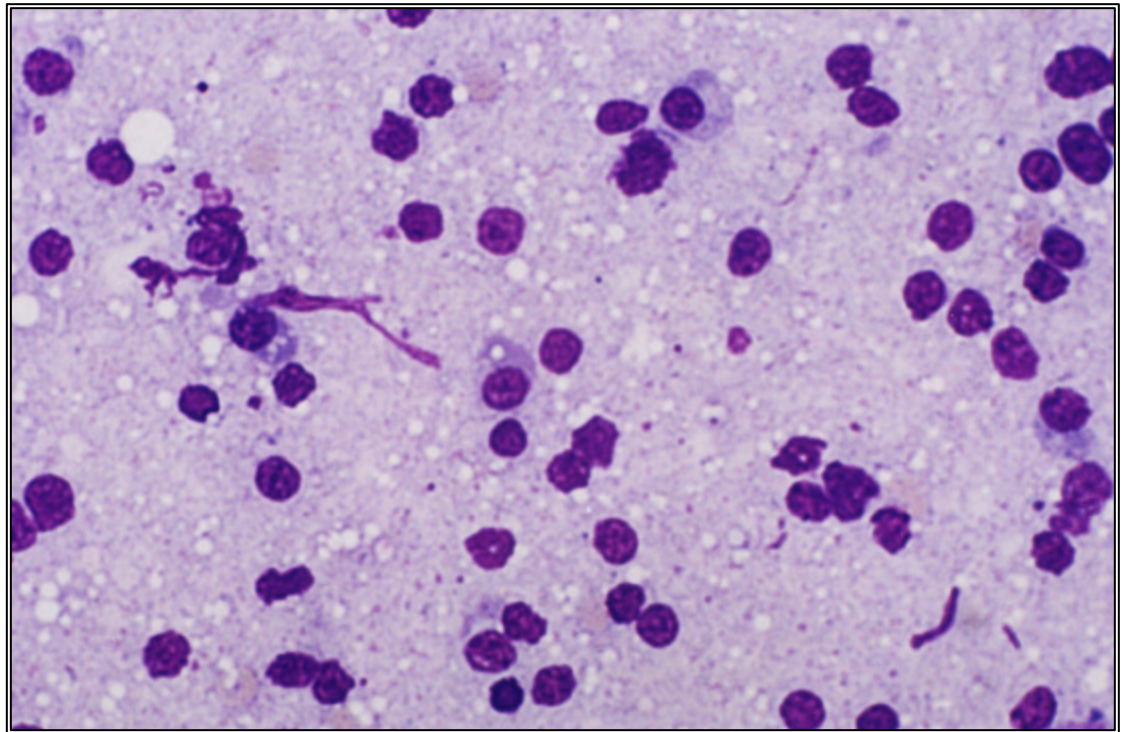


Figura 7 – PAAF. Linfoma Linfocítico (Kiel, Fournel-Fleury *et al.*, 1994 e WF). Neoplasia composta por células pequenas que possuem núcleos redondos, de contornos regulares e hiper cromáticos. Giemsa (400X)

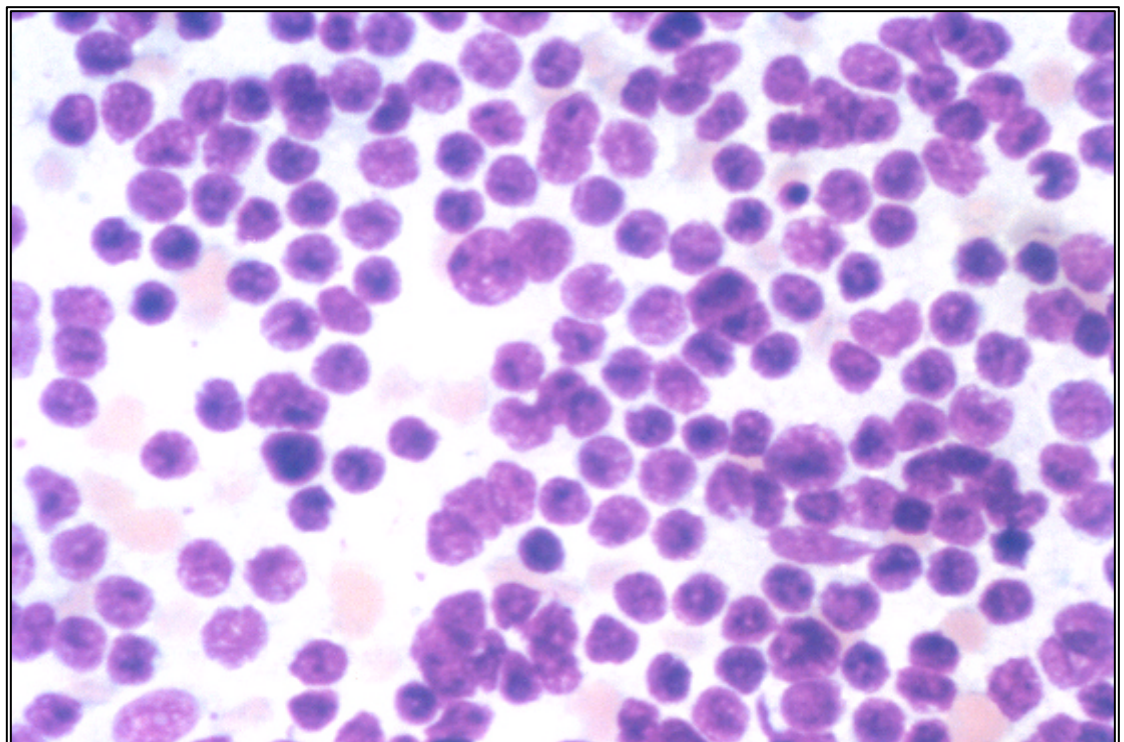


Figura 8 - PAAF. Linfoma Centrocítico (Kiel e Fournel-Fleury *et al.*, 1994), equivalente ao Linfoma de Pequenas Células Clivadas (WF). As células mostram núcleos irregulares e clivados. Giemsa, (400X)

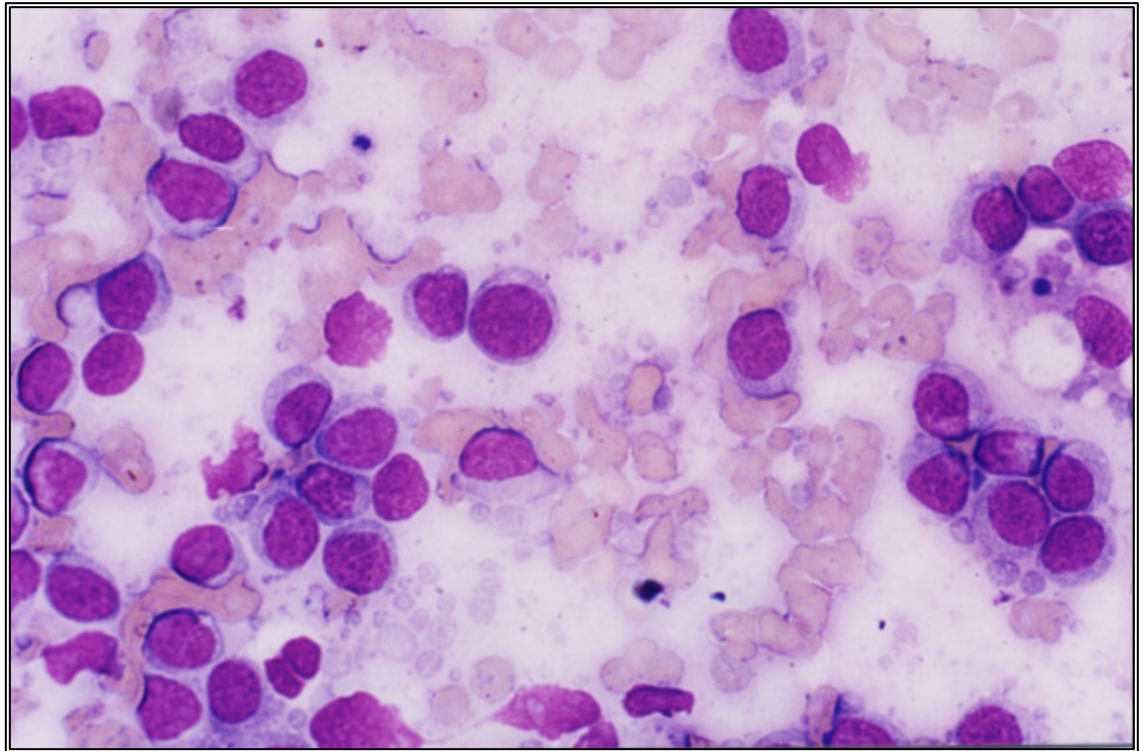


Figura 9 - PAAF. Linfoma Centroblástico (Kiel e Fournel-Fleury *et al.*, 1994), equivalente ao Linfoma de Grandes Células não Clivadas (WF). As células mostram nucléolos múltiplos, proeminentes e periféricos. Giemsa, (400X)

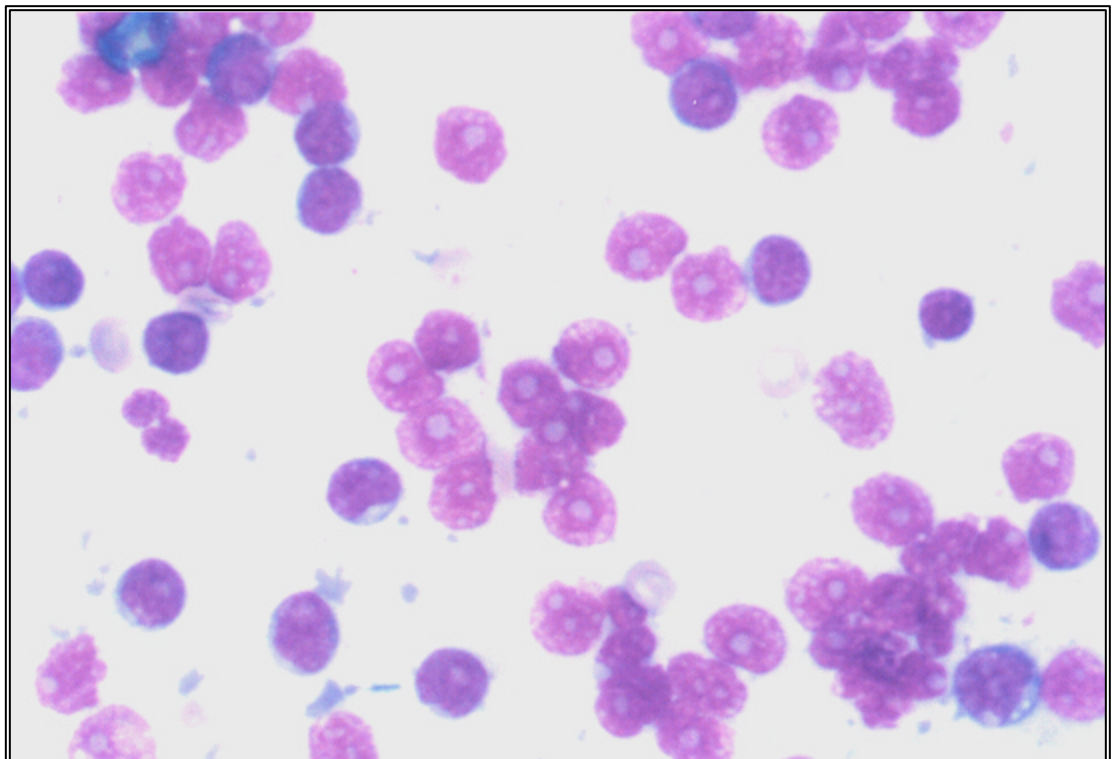


Figura 10 - PAAF. Linfoma Imunoblástico (Kiel, Fournel-Fleury *et al.*, 1994 e WF), As células mostram nucléolo único, proeminente e central. Giemsa, (400X)

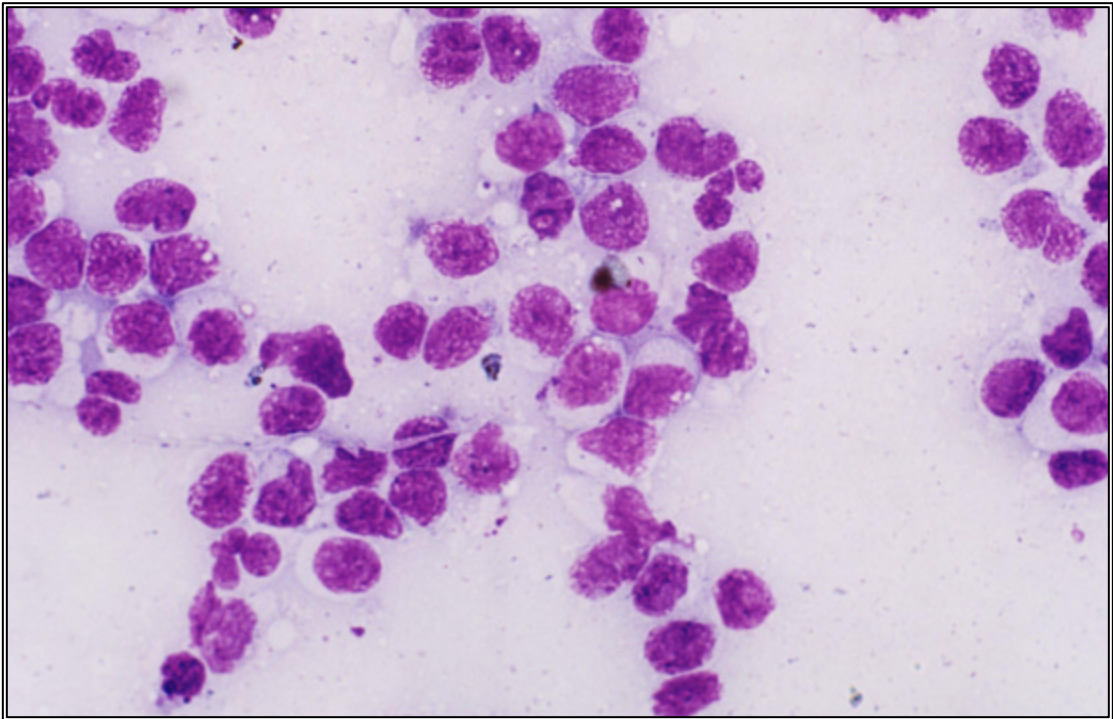


Figura 11 - PAAF. Linfoma Linfoblástico (Kiel e WF) equivalente a Linfoma de Pequenas Células Blásticas (Fournel-Fleury *et al.*, 1994). As células mostram núcleos pequenos com distribuição uniforme da cromatina. Giemsa, (400X)

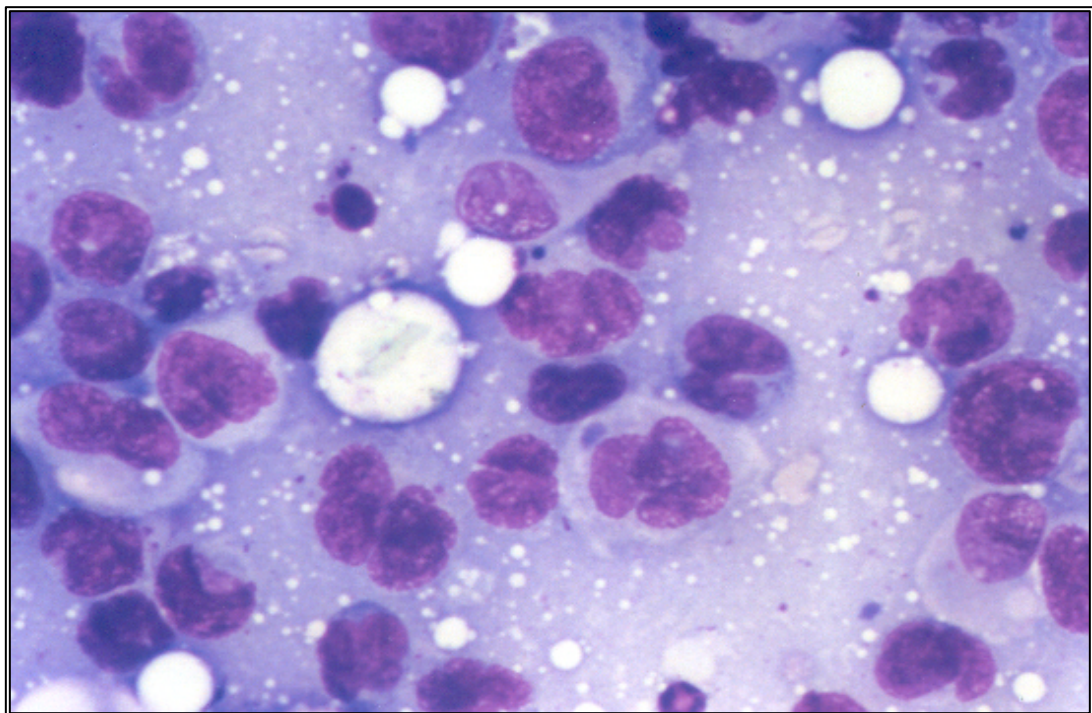


Figura 12 - PAAF. Linfoma Anaplásico. Acentuado pleomorfismo celular, núcleos grandes e irregulares (Kiel, Fournel-Fleury *et al.*, 1994 e WF). Giemsa, (400X)

4.3. Avaliação Imunocitoquímica

A imunofenotipagem foi realizada em 38 casos de linfomas caninos. Os linfomas T (Figura 13) foram os de maior frequência, ocorrendo em 22 casos (57,89%), seguidos pelos linfomas B (Figura 14), diagnosticados em 13 casos (34,21%) e pelos linfomas T/B em três casos (7,90%) (Tabela 9).

Os linfomas com imunofenótipo T mais frequentes são os Linfomas Linfoblásticos em seis casos, seguido pelos Linfomas Centroblasticos e Centrocíticos em quatro casos cada tipo. Dentre os linfomas B são mais frequentes os Linfomas Centroblasticos em cinco casos e Linfomas Imunoblásticos em quatro casos (Tabela 10).

Os 59 casos de linfomas foram submetidos à técnica de imunocitoquímica, porém, alguns casos foram inconclusivos. A desvantagem do material citológico é não permitir a avaliação prévia das lâminas como pode ser feito na histologia e em alguns esfregaços, as células neoplásicas não se apresentaram com qualidade ou quantidade suficiente para a avaliação imunofenotípica.

Nos casos de linfomas classificados nesta pesquisa, foi observada a marcação de linfócitos T normais, tanto nas neoplasias de origem T como nas neoplasias de origem B, o que indica resto de população normal dos órgãos linfóides ou um infiltrado reacional à neoplasia. Antes de avaliar a

imunocitoquímica deve-se determinar no esfregaço citológico corado pelo método do Giemsa, a classificação citológica da neoplasia e depois avaliar se as células neoplásicas apresentam reação positiva para os marcadores imunocitoquímicos.

Estas marcações devem ser avaliadas com muita cautela, pois o marcador de células T (anti-CD3) possui a marcação de membrana mais intensa, o que facilita a identificação dos linfócitos marcados, enquanto o marcador de linfócitos B (anti-CD79a) possui a marcação fraca dificultando a avaliação.

Tabela 9 - Frequência da classificação imunofenotípica de 38 casos de linfomas caninos diagnosticados pelo método da PAAF

IMUNOFENÓTIPO	Nº DE CASOS	%
Linfoma T	22	57,89
Linfoma B	13	34,21
Linfoma T/B	3	7,90
TOTAL	38	100

Tabela 10 - Relação entre o imunofenótipo e o tipo citológico de acordo com a classificação de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990)

TIPO CITOLÓGICO	LINFOMA T	LINFOMA B	LINFOMA T/B
Linfocítico	3	0	1
Centrocítico	4	2	0
Centrocítico-Centroblástico	2	1	1
Linfoblástico	6	1	1
Centroblástico	4	5	0
Imunoblástico	2	4	0
Anaplásico	1	0	0

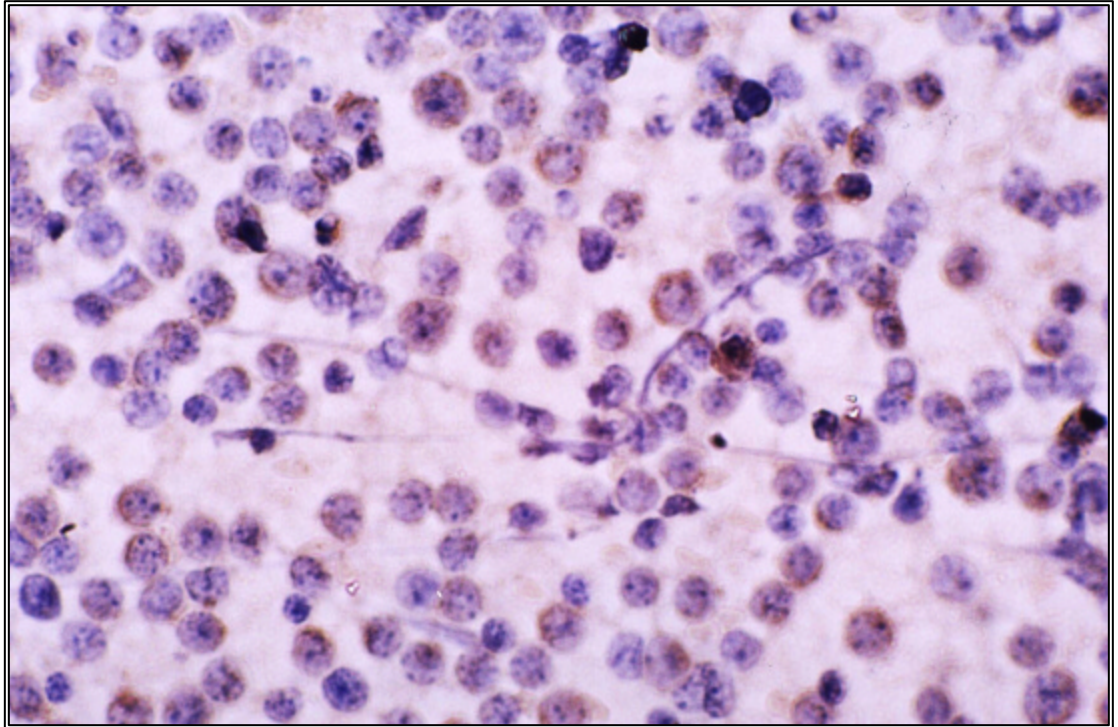


Figura 13 - Linfoma T – positividade para CD3, ABC, Hematoxilina, (400X)

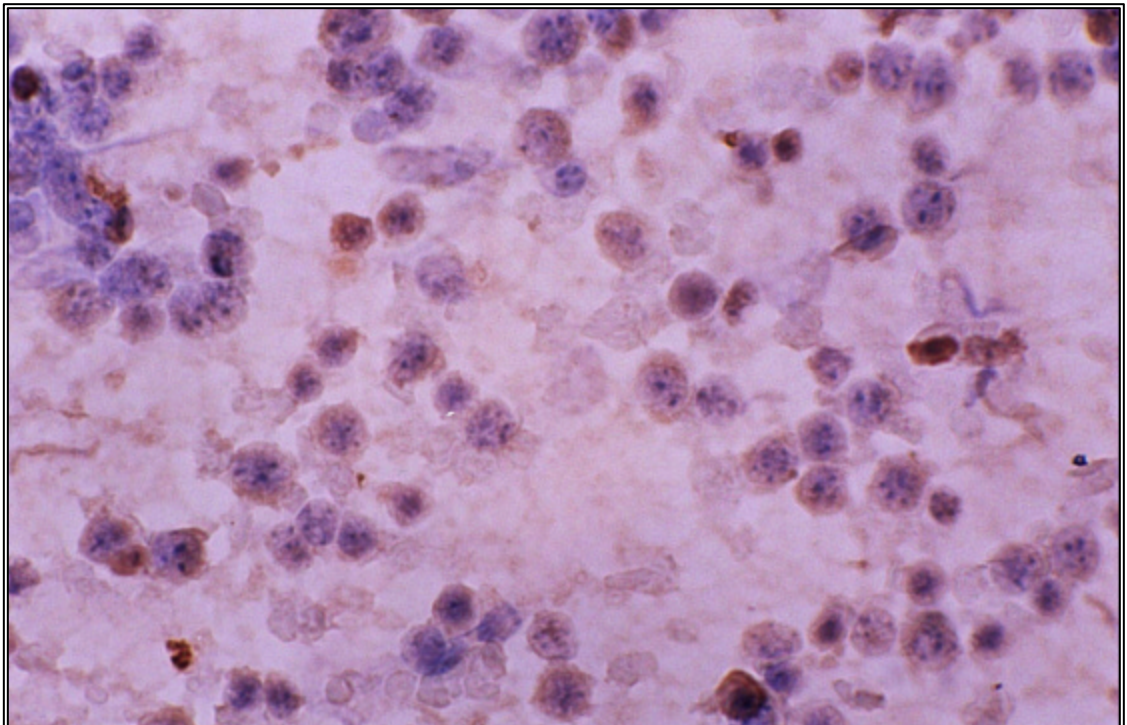


Figura 14 - Linfoma B – positividade para CD79a, ABC, Hematoxilina, (400X)

5. Discussão

5.1. Dados Epidemiológicos

Segundo a literatura, a predisposição racial neste tipo de neoplasia é um assunto controverso e já foi relatada por diversos autores para cães da raça Boxer, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier, Chow Chow, Pastor Alemão, Poodle, São Bernardo, Beagle, Golden Retriever e Bulldog (TESKE *et al.*, 1994b; VONDERHAAR & MORRISON, 1998 e JACOBS *et al.*, 2002).

Os animais portadores de linfomas no presente estudo eram predominantemente sem raça definida (SRD) em 21 casos, seguido dos animais da raça Boxer (12 casos), animais da raça Pastor Alemão (seis casos), animais da raça Rottweiler (quatro casos), animais da raça Fox Paulistinha (três casos) e Fila Brasileiro (três casos). Os outros dez animais pertenciam a outras raças.

De acordo com SEQUEIRA *et al.* (1999), não existem dados sobre a composição racial da população dos cães da região de Botucatu. Provavelmente, a frequência encontrada esteja mais relacionada à proporção de cada raça na população canina do que à predisposição racial para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia.

A maioria dos animais, com raça definida, acometida pela neoplasia neste estudo, pertencia ao grupo das raças de grande ou médio porte. Este

resultado concorda com o trabalho realizado por SEQUEIRA *et al.* (1999), que observaram 50%, dos 34 animais avaliados, pertencente às raças de grande ou médio porte.

Em relação à idade dos animais portadores de linfoma, este trabalho observou uma maior ocorrência da neoplasia (54,24%) em cães com idade superior a seis anos, seguido dos animais com idade entre quatro a seis anos (37,29%) e animais de até três anos (8,47%), apresentando como média 7,2 anos. Os dados observados neste trabalho estão de acordo com SEQUEIRA & FRANCO, (1992) que afirmam haver maior ocorrência desta neoplasia nos animais adultos entre quatro a 13 anos. SEQUEIRA *et al.* (1999), observaram que 80% dos animais apresentaram idade acima de quatro anos e nos trabalhos realizados por TESKE (1994) e TESKE *et al.* (1994) a idade média dos cães acometidos pela neoplasia foi de 6,4 e 7,7 anos respectivamente.

Entre os animais utilizados neste estudo encontravam-se trinta machos (51%) e 29 fêmeas (49%). Existe grande discordância na literatura sobre a influência do sexo no aparecimento dos linfomas caninos. TESKE *et al.* (1994b), obtiveram uma prevalência maior em fêmeas, porém RALLIS *et al.* (1992) e SEQUEIRA *et al.* (1999) observaram maior número de cães machos. Já JACOBS *et al.* (2002) afirmam que não existe influência do sexo do animal.

No presente estudo foi realizado o estadiamento clínico dos linfomas em 46 animais, destes, 33 estavam no estágio IV da doença, oito se apresentaram no estágio V e cinco foram classificados como estágio III. Estes dados concordam com SEQUEIRA *et al.* (1999), que verificaram que a maior parte dos portadores de linfoma (94%) encontrava-se nos estágios mais avançados da doença (III, IV e V), o que piora o prognóstico e dificulta a determinação de um protocolo para o tratamento da neoplasia.

Dos 46 animais avaliados, 44 foram classificados como Linfomas Multicêntricos e 2 casos como Linfomas Tímicos.

Estes dados estão de acordo com a literatura consultada. A forma multicêntrica é considerada como a mais freqüentemente observada, sendo seguida pelas formas digestiva, tímica, cutânea e solitária (TESKE, 1994; MILNER *et al.*, 1996 e VONDERHAAR & MORRISON, 1998 e JACOBS, *et al.*, 2002). SEQUEIRA *et al.* (1999), em sua casuística, observaram 91,2% de Linfomas Multicêntricos, 5,9% de Linfomas Tímicos e 2,9% de Linfomas Digestivos.

O estadiamento clínico e a classificação da forma anatômica da neoplasia foram realizados em 46 animais devido a não autorização dos proprietários para realização de exames complementares ou então devido ao fato de após o diagnóstico de neoplasia os animais não retornarem às consultas o que não permitia a avaliação do comprometimento tumoral.

DOBSON *et al.* (2001), observaram que a maioria dos pacientes estudados encontrava-se nos estádios III e IV da doença no momento do diagnóstico, embora em alguns destes animais não tenha sido avaliada a medula óssea. O comprometimento da medula óssea implica na mudança do estadiamento clínico para o estágio V. Esta é uma das dificuldades mais freqüentes para o estabelecimento do grau de comprometimento da neoplasia.

Os mesmos autores afirmam que embora o estadiamento clínico não interfira na resposta tumoral à quimioterapia, modifica o tempo de sobrevivência do animal. Os animais que se apresentam na fase adiantada da doença apresentam uma menor sobrevivência quando tratados em relação aos animais com a neoplasia em fase inicial.

Um inconveniente da avaliação clínica da doença é que o estadiamento é realizado com base no exame clínico e de alguns exames complementares, não havendo muitas vezes a confirmação histológica ou citológica do envolvimento dos órgãos. Disto podem resultar classificações equivocadas (DOBSON *et al.*, 2001).

5.2. Classificação Citológica

A Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) vem sendo utilizada na medicina veterinária por ser um método de diagnóstico eficaz, rápido e de

baixo custo. Além dessas vantagens, não há necessidade de sedar o animal e permite que se realizem múltiplas colheitas e amostragens em série, particularmente necessárias quando se observam resultados inconclusivos ou quando existe suspeita de recidiva da lesão (VERNAU *et al.*, 2001). Essa versatilidade da citologia aspirativa, somada à rapidez com que as colorações podem ser realizadas, proporcionam aos clínicos diagnóstico rápido, seguro e definitivo na grande maioria das situações (ROCHA, 1998).

A forma multicêntrica do linfoma é a mais comumente observada nos cães (SEQUEIRA *et al.*, 1999), e foi a mais freqüente entre os casos utilizados neste trabalho. Esta característica da neoplasia facilitou o emprego da técnica de PAAF, pois na maioria dos casos a punção de um ou mais linfonodos superficiais permitiu que se estabelecesse o diagnóstico. Mesmo quando as lesões encontravam-se em órgãos internos, o auxílio do ultra-som orientou a punção e a colheita do material foi realizada.

Um dos aspectos mais importantes do exame citopatológico é a fixação do esfregaço. Quando este procedimento não é realizado ocorre a distorção da morfologia celular (CARTER *et al.*, 1986; CANIATTI *et al.*, 1996; VERNAU *et al.*, 2001). Segundo CANIATTI *et al.* (1996) e VERNAU *et al.* (2001), o artefato mais comum presente nos esfregaços não fixados é a alteração dos núcleos. No presente estudo, a fixação imediata dos

esfregaços preservou a estrutura das células e permitiu a observação dos detalhes celulares mais importantes para cada classificação.

SNEIGE *et al.* (1990) citam ser necessária a centrifugação das amostras colhidas, antes do preparo dos esfregaços, para se obter material mais rico em células. No presente estudo, não houve necessidade deste tipo de procedimento, já que a celularidade do esfregaço foi sempre muito alta. A única exceção foi no processamento do material obtido a partir de efusão pleural, no qual o uso da citocentrífuga foi necessário.

Vários autores utilizam as classificações propostas para os linfomas não-Hodgkin do homem para diagnosticar os linfomas dos cães (APPELBAUM *et al.*, 1984; CARTER *et al.*, 1986; GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997). No entanto, na maioria dos estudos foi utilizado material incluído em parafina, sendo ainda escassos os trabalhos que empregam o exame citopatológico para este fim (CARTER *et al.*, 1986; TESKE & VAN HEERDER, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

As características citomorfológicas encontradas nas amostras analisadas permitiram incluí-las nas categorias descritas para as diferentes classificações de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990) e Working Formulation (NCI, 1982), embora nem todos os tipos descritos em cada uma delas tenham sido encontrados em nosso trabalho.

No presente estudo, quando foi utilizada a classificação de Kiel, predominaram os linfomas de grau alto (61,02%) em relação aos linfomas de grau baixo (38,98%). Este resultado é semelhante ao obtido por TESKE & VAN HEERDER (1996), que utilizaram esta mesma classificação em material colhido pelo método da PAAF. O predomínio dos linfomas de grau alto se verifica mesmo quando a classificação de Kiel é aplicada ao exame histológico da neoplasia (APPELBAUM *et al.*, 1984; PARODI *et al.*, 1988; GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997). A classificação de Kiel se baseia, principalmente, em critérios citomorfológicos bem definidos, não dando ênfase ao padrão arquitetural da neoplasia. Portanto, torna-se o tipo de classificação ideal para ser empregada nos exames citopatológicos. Os Linfomas Centroblasticos (33,9%) foram os mais freqüentes em nossa casuística, resultado também obtido por diversos autores que utilizaram essa mesma classificação (PARODI *et al.*, 1988; GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE 1994; TESKE & VAN HEERDE, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

A utilização da classificação da Working Formulation em nossa série de linfomas mostrou prevalência maior para os linfomas de grau intermediário (61,02%), seguidos dos linfomas de grau alto (27,12%) e dos linfomas de grau baixo (11,86%), a mesma proporção foi obtida por FOURNEL-FLEURY *et al.* (1997) O tipo citológico mais freqüente foi o

Linfoma de Grandes Células não-Clivadas (33,9%). A literatura consultada indica diferença significativa na frequência dos tipos citológicos entre os diferentes autores que utilizaram esta classificação, tanto em exames citológicos como nos histológicos. O Linfoma de Grandes Células não-Clivadas é apontado como o mais freqüente por GREENLEE *et al.* (1990), RALLIS *et al.* (1992) e FOURNEL-FLEURY *et al.* (1997), em 48,3%, 36,8% e 40,2% dos casos, respectivamente. No entanto, para APPELBAUM *et al.* (1984) e CARTER *et al.* (1986), a prevalência maior foi para os Linfomas Imunoblásticos com 37,5% e 24,9%, respectivamente. Em nosso trabalho este tipo de linfoma respondeu por 11,86% dos casos. Essas diferenças, provavelmente, são reflexos da maior complexidade desta classificação e da necessidade da familiarização dos patologistas com os diferentes tipos citológicos que a compõem. Deve-se ter em mente que os linfomas no homem podem apresentar características regionais e que isto pode ocorrer também com a espécie canina, podendo este fato ser, ao menos em parte, responsável pelas discrepâncias observadas (NCI, 1982; CARTER *et al.*, 1986).

A classificação dos linfomas caninos proposta por Fournel-Fleury *et al.* (1994), segundo os próprios autores, representa simplesmente uma adaptação, embora pequena, da classificação de Kiel para esta espécie. Esta adaptação se justificaria, ainda segundo os mesmos autores, porque

alguns linfomas seriam compostos por tipos celulares que não são observados nos linfomas humanos, como Linfoma Difuso de Células Médias Macronucleoladas. Nestes, as células são de tamanho médio, com núcleo pequeno ou médio, nucléolo proeminente, citoplasma moderadamente basofílico e baixo índice mitótico. Esta última característica associada ao tamanho pequeno das células incluiria este tipo entre os linfomas de grau intermediário (FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997). Na nossa casuística, nenhum dos linfomas mostrou células com estas características.

A classificação citológica dos linfomas caninos, bem como na medicina humana, tem grande importância na determinação do prognóstico, tempo de vida do paciente e principalmente na escolha do tratamento mais adequado a cada tipo de neoplasia. De acordo com a literatura os tumores de grau alto respondem melhor ao tratamento quimioterápico, porém aumentam os índices de recidiva (CARTER, *et al.*, 1986; FISHER, *et al.*, 1995 e DOBSON, *et al.*, 2001).

5.3. Imunofenotipagem

A associação entre as técnicas citopatológicas e a técnica imunocitoquímica tem sido aplicada com sucesso no diagnóstico das neoplasias humanas, inclusive dos linfomas não-Hodgkin, permitindo sua

classificação citológica e imunofenotípica (OERTEL *et al.*, 1988; CARTAGENA *et al.*, 1992; FISHER *et al.*, 1995; VERNAU *et al.*, 2001). No homem, uma vez feito o diagnóstico de Linfoma não-Hodgkin é obrigatório que seja realizada a imunofenotipagem, sendo raros os casos nos quais este procedimento pode ser dispensado (SOARES e ARIAS, 1999).

No que diz respeito à determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos o emprego dos anticorpos CD3 e CD79a, marcadores de células T e células B, respectivamente, tem permitido a utilização de material fixado em formol e incluído em parafina (MILNER *et al.*, 1996). A padronização deste tipo de procedimento já foi obtida em nosso laboratório (DE MOURA, 2000).

Estes mesmos anticorpos foram utilizados por CANIATTI *et al.* (1996) e FOURNEL-FLEURY *et al.* (1997) para a determinação do imunofenótipo de linfomas caninos em material citológico.

Um dos pontos fundamentais da técnica imunocitoquímica é a padronização dos procedimentos laboratoriais para que se obtenham resultados confiáveis. A principal dificuldade encontrada durante esta etapa deste experimento estava relacionada à fixação do material e seu armazenamento. Segundo alguns autores, os esfregaços devem ser fixados em acetona e estocados congelados a uma temperatura entre -20°C e -70°C , por no máximo 15 dias (RASKIN & NIPPER, 1992 e FISHER *et al.*, 1995). VERNAU *et al.* (2001) relataram que o aparecimento de artefatos de

técnica que alteravam os núcleos celulares eram prevenidos pela fixação rápida em álcool.

No presente estudo optou-se pela fixação imediata e estocagem dos esfregaços em álcool 95°. Este tipo de procedimento permite que o material fique armazenado durante vários meses, sem que ocorra a produção de artefatos de técnica indesejáveis. Este armazenamento prolongado permite que seja processado um número maior de esfregaços na mesma reação, o que leva a redução do consumo de reagentes.

Dos 59 casos de linfoma utilizados neste estudo, 38 tiveram seu imunofenótipo determinado. Isto se deve a variação no material obtido pela PAAF, mesmo quando este provém da mesma punção. A principal desvantagem do material obtido no exame citológico é não permitir uma avaliação prévia dos esfregaços produzidos, já que estes podem apresentar quantidade de material insuficiente ou baixa qualidade. No trabalho realizado anteriormente, no qual também foi determinado o imunofenótipo dos linfomas caninos, este tipo de dificuldade não foi enfrentada, porque foi utilizado material incluído em parafina, o que possibilitou a obtenção de vários cortes com o mesmo padrão (DE MOURA, 2000).

A determinação da origem T ou B dos Linfomas não-Hodgkin tem valor prognóstico e não pode ser definida pela morfologia celular (APPELBAUM *et al.*, 1984 e DOBSON *et al.*, 2001). Os cães portadores de Linfomas T respondem menos ao tratamento quimioterápico e têm tempo de

sobrevida menor do que os cães portadores de Linfomas B (DOBSON *et al.*, 2001). Portanto, a classificação imunocitoquímica dos linfomas torna-se um procedimento importante para a definição do comportamento clínico da neoplasia e sua resposta ao tratamento quimioterápico (TESKE *et al.*, 1994; TESKE *et al.*, 1994, FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1994; FISHER *et al.*, 1995; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; DOBSON *et al.*, 2001 e FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

Na determinação do imunofenótipo dos linfomas a avaliação da população celular que apresenta reação positiva deve ser cuidadosa. As neoplasias com imunofenótipo B podem mostrar células positivas para marcadores de células T, que representam células remanescentes da população original do órgão linfóide ou mesmo uma reação imunológica do organismo à neoplasia. Do mesmo modo, nos Linfomas T podem estar presentes células que apresentam marcação positiva para linfócitos B, que na verdade representam células normais não neoplásicas (CANIATTI *et al.*, 1996). No presente estudo, foram tomados todos os cuidados para que se evitassem erros na determinação do imunofenótipo da neoplasia. A principal medida para se realizar com segurança esta determinação é a classificação morfológica do linfoma e a identificação da positividade do tipo celular que compõe a neoplasia.

Deve-se ressaltar que a marcação de linfócitos normais em meio aos linfócitos neoplásicos, embora possa dificultar, em alguns casos, a

classificação imunofenotípica da neoplasia, pode também funcionar como um controle interno positivo da reação imunocitoquímica (CANIATTI *et al.*, 1996).

Na casuística utilizada neste trabalho foram identificadas neoplasias que apresentavam imunofenótipo T (CD3+/CD79a-) em 57,89% dos casos, imunofenótipo B (CD3-/CD79a+) em 34,21% dos casos e imunofenótipo T/B (CD3+/CD79+) em 7,90% dos casos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em trabalho realizado anteriormente em nosso laboratório com material incluído em parafina, que também detectou a predominância dos linfomas de imunofenótipo T (DE MOURA, 2000). MILNER *et al.* (1996), referem o mesmo tipo de achado, utilizando um painel mais amplo de anticorpos. A freqüência encontrada por estes autores foi de 60% de Linfomas T e 40% de Linfomas B.

No entanto, a maioria dos autores que trabalharam com imunofenotipagem dos linfomas caninos relata a predominância dos Linfomas B em suas casuísticas, embora também ocorra grande variação nas freqüências encontradas e na metodologia usada (TESKE *et al.*, 1994; TESKE *et al.*, 1994; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1994; CANIATTI *et al.*, 1996; TESKE & VAN HEERDE, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997 e FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002).

Quando a determinação do imunofenótipo foi realizada pelo método de Citometria de Fluxo a predominância foi dos Linfomas T+/B+, porém com

a predominância dos Linfomas B em relação aos Linfomas T (APPELBAUM *et al.*, 1984; GREENLEE *et al.*, 1990).

A freqüência de Linfomas B variou de 55,1% a 77,7% nas casuísticas dos autores que verificaram o predomínio deste imunofenótipo utilizando painéis de anticorpos amplos em material citológico ou incluído em parafina (CANIATTI *et al.*, 1996; TESKE & VAN HEERDE, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997). Deve-se ressaltar que mesmo com o predomínio do imunofenótipo B, a freqüência dos Linfomas T pode ser alta, chegando a 42% dos casos (TESKE & VAN HEERDE, 1996).

Nota-se pelos dados da literatura, que a freqüência do imunofenótipo dos linfomas caninos sofre a influência da metodologia e da amplitude do painel de anticorpos utilizados. Os autores que empregaram o mesmo painel de anticorpos utilizados nesta pesquisa obtiveram resultados semelhantes aos nossos (MILNER *et al.*, 1996; DE MOURA, 2000).

5.4. Correlação entre a Classificação Citológica e o Imunofenótipo

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que existe correlação entre a classificação morfológica e o imunofenótipo dos linfomas. Entre os 22 casos de Linfomas T o tipo mais freqüente foi o Linfoma Linfoblástico (seis casos). Este também foi o tipo citológico predominante nesta categoria imunofenotípica encontrado por outros autores (APPELBAUM *et al.*, 1984; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 2002). No presente trabalho, considerando-se a

classificação de Kiel, os Linfomas T mostraram-se, na maioria dos casos, como neoplasias de grau alto. Este resultado é corroborado por APPELBAUM *et al.* (1984).

Entre os 13 casos de Linfoma B da nossa casuística, predominaram os Linfomas Centroblasticos (cinco casos), seguidos pelos Linfomas Imunoblasticos (quatro casos). Estes resultados confirmam vários relatos presentes na literatura, que observaram a predominância destes tipos citológicos entre os linfomas de imunofenótipo B (APPELBAUM *et al.*, 1984; GREENLEE *et al.*, 1990; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

Segundo LENNERT & FELLER (1990), a morfologia das células que constituem as neoplasias linfóides pode indicar a sua origem T ou B. As bases da classificação de Kiel permitem a incorporação dos conhecimentos da imunologia experimental no estudo das neoplasias do sistema imune. Portanto, entre os Linfomas B deve-se esperar uma maior frequência de Linfomas Centroblasticos, por ser este tipo celular relacionado com o sistema B. Isto foi confirmado no presente estudo. No entanto, quando são utilizados marcadores imunológicos para se estabelecer o imunofenótipo dos linfomas verifica-se, eventualmente, que algumas neoplasias mostram-se morfológicamente como Linfomas Centroblasticos, porém apresentam antígenos de superfície específicos de células T (GREENLEE *et al.*, 1990). Na nossa casuística, foram verificados quatro casos classificados morfológicamente como Linfomas Centroblasticos com imunofenótipo T

(CD3+/CD79a-). Sugere-se, portanto, que só a classificação morfológica da neoplasia não é suficiente para que se determine o seu imunofenótipo e que este só pode ser estabelecido definitivamente por métodos imunológicos.

6. Conclusões

Os resultados desta pesquisa nos permitiram concluir que:

- ✓ O método citopatológico da PAAF pode ser utilizado no diagnóstico dos Linfomas devido à facilidade na colheita, a qualidade e quantidade do material obtido, permitindo inclusive a classificação citológica e imunofenotípica deste tipo de neoplasia;
- ✓ Nos exames citopatológicos de material colhido pela PAAF podem ser utilizadas as classificações morfológicas de Kiel, Working Formulation e Fournel-Fleury *et al.*, 1994;
- ✓ Os Linfomas de grau alto predominaram quando se utilizou a classificação de Kiel; os Linfomas de grau intermediário foram mais frequentes na classificação da Working Formulation e os Linfomas de grau intermediário a alto foram mais observados na classificação de Fournel-Fleury *et al.* (1994);
- ✓ A classificação de Kiel foi a que apresentou melhores resultados quando aplicada no material colhido pela PAAF;

- ✓ A classificação imunofenotípica dos Linfomas realizada no material colhido pelo método da PAAF revelou a predominância dos Linfomas T em relação aos Linfomas B e os Linfomas de celularidade mista;

- ✓ Entre os Linfomas T e os Linfomas B predominaram os tipos morfológicos correspondentes aos Linfomas de grau alto da classificação de Kiel.

7. Referências Bibliográficas *

APPELBAUM, F.R.; SALE, G.E.; STORB, R.; CHARRIER, K.; DEEG, H.J.; GRAHAM, T.; WULFF, J.C. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. **Hematol. Oncol.**, Chichester, v.2, p.151-168, 1984.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE MOURA, V.M.B.D. Classificação Cito-histológica e Imunofenotipagem dos Linfomas Caninos. Botucatu, 2000. 107p. Tese (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista.

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

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

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

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

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.;
CHARBANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P.A.; FELMAN, P.
Cytohistological and immunological classification of canine malignant
lymphomas: comparison with human non-Hodking's lymphomas. **J. Comp.
Pathol.**, Liverpool, v.117, n.1, p.35-59, 1997.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.;
BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOY-
THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell
Lymphoma: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new
cases. **Vet. Pathol.** Washington, v.32, p.92-109, 2002.

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

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

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

HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., STEIN H., BANKS, P.M., CHAN, J.K.C., CLEARY, M.L., DESLOL, G., WOLF-PEETERS, C., FALINI, B., GATTER, K.C., GROGAN, T.M., ISAACSON, P.G., KNOWLES, D.M., MASON, D.Y., MULLER-HERMELINK, H., PILERI, S.A., PIRIS M.A., RALFKIAER, E., WARNKE, R.A. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood.** v.84, n.5, p.1361-1392, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MILITO, C.B.; MORAIS, J.C.; NUCCI, M.; PULCHERI, W.; SPECTOR, N. Classificação dos linfomas não-Hodgkin: estudo morfológico e

imunoistoquímico de 145 casos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.38, n.4, p.315-324, 2002.

Nacional Cancer Institute (NCI). Sponsored study of classification of non-Hodking's lymphomas: summary and description of a Working Formulation for a clinical usage. **Cancer**, Philadelphia, v.48, p.2112-2135, 1982.

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

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

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

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

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

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

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

ROCHA, N.S. Citologia Aspirativa por Agulhas Finas (CAAF). **Cães e Gatos.** São Paulo, n.75, p.14-16, 1998

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

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

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

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

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: A review and comparison whit human non-Hodgkin's lymphoma. **Vet Q.** Dordrecht, v.16, n.,4, p.209-219, 1994.

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

TESKE, E.; Van HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine needle aspiration cytology in canine malignant lynfoma. **Vet. Q.**, Dordrecht, v.18, n.3, p.112-115, 1996.

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

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

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

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