



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KLEBER MORENO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
TERAPÊUTICOS DO LINFOMA CUTÂNEO E ÍNDICES DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA E Ki-67) NO LINFOMA
MULTICÊNTRICO EM CÃES.**

Londrina
2008

KLEBER MORENO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
TERAPÊUTICOS DO LINFOMA CUTÂNEO E ÍNDICES DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA E Ki-67) NO LINFOMA
MULTICÊNTRICO EM CÃES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina – como requisito parvial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Londrina
2008

KLEBER MORENO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
TERAPÊUTICOS DO LINFOMA CUTÂNEO E ÍNDICES DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA E Ki-67) NO LINFOMA
MULTICÊNTRICO EM CÃES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina – como requisito parvial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro
Bracarense

Profª. Dra. Giovana Wingeter di Santis

Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto

Prof. Dr. Pedro Luiz de Camargo

Profª. Dra. Roberta Lemos Freire

Londrina, 17 de dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Célia Rodrigues Moreno e Álvaro Moreno**, que mesmo diante de inúmeros desafios, nunca encontraram empecilhos para dar a maior manifestação de carinho, hombridade, maturidade e dignidade a seus filhos. Permitindo que cada um demonstrasse o mínimo de caráter necessário para enfrentar a vida sem buscar “muletas” ou artimanhas para se dar bem. Sem vocês com certeza não haveria um porquê na realização deste trabalho.

Agradeço as oportunidades e o privilégio de ser um de seus filhos.

AGRADECIMENTOS

A uma imensa força espiritual chamada **Deus**, que mantém viva a força interior em cada um de nós e que serve como leme para guiar meus passos.

Aos meus irmãos (**Vanessa e Leandro**) e sobrinhos (**Bruno, Otávio, João e Olívia**), por constituírem a base do que me sustenta, a família. Algo do qual tenho muito orgulho.

A professora **Ana Paula F. R. L. Bracarense**, por ter aceitado me orientar no aprendizado da oncologia, mesmo não sendo esta sua principal linha de pesquisa. Durante estes seis anos de orientação tive a oportunidade de aprender muito além do que inicialmente foi proposto, em grande parte por ter o incentivo desta que com certeza foi a maior responsável pelo que hoje eu sei na área de oncologia.

A professora **Eliane Palaoro Pereira** por não ser apenas mais uma professora, mas sim uma grande mãe que tenho o privilégio de ter na minha formação profissional e pessoal. Alguém que sempre manteve a porta de sua sala aberta e por este motivo possibilitou que eu batesse na porta certa em busca das primeiras orientações profissionais.

A professora **Maria de Lourdes (Dudi)**, pela amizade e por ser a responsável pelos primeiros passos na oncologia veterinária. Mesmo quando outros docentes tentavam boicotar minha participação no projeto de oncologia, lá estava ela com uma lâmina de citologia pronta para ensinar.

Ao professor **Pedro Luiz de Camargo**, não apenas por ter aceitado ser membro desta banca de defesa, mas por ter sido um orientador de grande importância na minha formação. Alguém do qual, mesmo nas adversidades das primeiras endoscopias em um canil quente e sem ventilação, sempre manteve disposição para ensinar.

Às professoras **Suely Beloni, Janis Gonzáles e Roberta Lemos** pela amizade, ensinamentos e contribuições na realização deste projeto.

Ao professor **Antônio Carlos** pela amizade e por ter me aceitado de braços abertos no laboratório de Anatomia Patológica. Por todos os ensinamentos transmitidos e pela grande confiança que deposita em mim como profissional.

A professora **Mara Stipp** por ter permitido a utilização do espaço físico e estrutura do laboratório de Patologia Clínica, pela amizade e aceite em participar deste trabalho.

Ao professor **Marcelo de Souza Zanutto** que apesar do pouco tempo que o conheço, sempre foi receptivo e prestativo no esclarecimento das mais diversas dúvidas e por estar contribuindo com a melhora de minha formação.

A professora e grande amiga **Giovana** (professora). Sua iniciativa, caráter, profissionalismo e transparência fazem com que eu seja um dos muitos privilegiados em ter você como amiga. Obrigado pelos primeiros passos na imuno-histoquímica, nas inúmeras conversas onde em muitas ocasiões apenas eu falei e você apenas ouviu. Com certeza cada um destes momentos ajudou não apenas a me valorizar, mas perceber de forma mais clara o quanto e como consegui vencer vários obstáculos que a vida sempre coloca em nossa trajetória.

A professora e amiga de longa data **Karina Flaiban**. Sempre disposta a ajudar, a compartilhar conhecimento. Alguém que participa de forma ativa em inúmeros trabalhos e em todos com um brilhantismo único. Sorriso fácil e uma capacidade de fazer mais de uma coisa ao mesmo tempo de forma inigualável.

Aos demais professores da Universidade Estadual de Londrina que contribuíram com minha formação profissional.

Aos técnicos e auxiliares de enfermagem (**João, José Carlos, Ademir, Maria, Sergio, Cris, Lucimara, Vilma, Nélio, Rose, Juvenal (Juju), Dna. Lourdes**) por sempre demonstrarem disposição em colaborar com a execução de inúmeras etapas deste projeto.

Por fim, os que com certeza representam o concreto na construção da vida de qualquer pessoa, os amigos.

Cláudia Boselli, uma pessoa admirável, prestativa, amiga pra todas as horas, amiga que com apenas um olhar já sabe o que está acontecendo ou que irá acontecer. Gênio forte é verdade, mas de um coração que não é dela. Quem a não ser ela iria suportar uma pessoa de humor instável como o meu? Muitos foram os sorrisos, raras foram às lágrimas. Obrigado por ser minha amiga.

Yuri, uma pessoa com um humor sarcástico, peculiar. Alguém do qual admiro como pessoa e profissional, que sempre está disposta a ir para um boteco no fim de tarde, pau pra toda obra.

Juliana Dias (Ju Dias), minha segunda irmã. Ao lado do **Fábio Galli**, forma uma dupla do qual tenho uma admiração e gratidão imensurável.

E aos demais amigos (**Letícia Yamasaki, Raquelita, Tiziane (T12), Juliana Miyasaki, Claudia Hatti, Vanessa (Japa), Kledir, Alexandre Amude, Andréia, Dani Moreira, Dani Tranqueira, Flávia (minhoca), Lu Takemura, Márcio, Claudio Kassahara, Joelma, Rita, Elisângela, Reginaldo, Alisson e Joe**), que tornaram a realização deste trabalho mais prazerosa.

MORENO, Kleber. **Aspectos epidemiológicos, morfológicos e terapêuticos do linfoma cutâneo e índices de proliferação celular (pcna e ki-67) no linfoma multicêntrico em cães.** 2008. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Linfoma é o termo utilizado para designar um grupo heterogêneo de tumores malignos de origem linfóide. Diversos sistemas de classificação foram estabelecidos para facilitar a compreensão do comportamento biológico destas doenças na medicina humana e adaptados para medicina veterinária. A classificação anatômica desenvolvida pela Organização Mundial de Saúde é a forma mais simples de classificá-los segundo o local primário de aparecimento. A determinação do grau de malignidade, da imunofenotipagem e dos índices de proliferação celular constitui a melhor forma de compreender o seu comportamento biológico, contribuindo na determinação de fatores prognósticos e na escolha de protocolos antineoplásicos. Neste estudo foram avaliados os aspectos epidemiológicos, morfológicos e terapêuticos de 49 cães com linfoma cutâneo e a associação do grau de malignidade e imunofenotipagem com os índices de proliferação celular (PCNA e Ki-67) em 55 cães com a apresentação multicêntrica, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008. Dentre os cães com linfoma cutâneo, 35 eram fêmeas e 14 machos, com distribuição racial heterogênea, porém com maior ocorrência em cães de raça definida e idade variando entre 2 a 14 anos. O tumor foi mais freqüente em cães de pequeno e médio porte, com lesões distribuídas principalmente no abdome, dorso e tronco. Em 21 cães foi realizada a classificação morfológica verificando-se doze com linfoma não epiteliotrópico e nove com a forma epiteliotrópica. Na maioria dos cães tratados com múltiplos fármacos, a remissão clínica foi completa ou parcial. Ao utilizar protocolos com monoterapia a doença permaneceu estável ou progrediu, com exceção dos dois pacientes tratados com lomustina. A sobrevida foi maior em pacientes tratados com múltiplos antineoplásicos. Dos 55 cães com linfoma multicêntrico 30 eram machos e 25 fêmeas, dos quais 39 de raça definida e 16 sem definição racial, com idade média de 5,4 anos. Morfológicamente 70,1% dos casos eram de alto grau de malignidade e 29,9% de baixo grau, sendo 32 de células T e 23 de células B. A média de células marcadas pelo anticorpo PCNA foi de $90,0 \pm 3,96$ em linfomas de alto grau e de $82,0 \pm 2,60$ entre os de baixo grau. Ao considerarmos todas as células marcadas não houve diferença significativa, porém ao estabelecer como positivas apenas as células fortemente marcadas, obtivemos diferença significativa entre os linfomas de alto grau ($84,72 \pm 3,79$) e os de baixo grau de malignidade ($64,19 \pm 3,50$). Associação significativa entre a proliferação celular mensurada com o anticorpo Ki-67 e o grau de malignidade ($64,0 \pm 9,03$ para os de alto grau e $9,50 \pm 2,49$ para os de baixo grau) também foi constatada. Não houve associação entre o índice de proliferação celular de nenhum dos anticorpos com o imunofenótipo.

Palavras chave: Linfoma canino. Epidemiologia. Morfologia. Imunofenotipagem. Proliferação celular. Terapia.

MORENO, Kleber. **Epidemiological, morphological and therapeutic aspects of cutaneous lymphoma and cell proliferation index (PCNA and Ki-67) in multicentric lymphoma in dogs.** 2008. 68 f. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Lymphomas are a diverse group of malignant neoplasms that originate in lymphoid tissues. Several classification systems were established to enhance the understanding of the biological behavior of this disease in both human and veterinary medicine. The anatomical classification developed by World Health Organization (WHO) is the most simple and it is based in the primary site of appearance. The pattern of growth, immunophenotypic features and mitotic rates consist the main basis to understand the tumor behavior, determining prognosis, and influencing treatment selection. In this study the epidemiologic, morphologic and therapeutic aspects of 49 dogs with cutaneous lymphoma were evaluated. The association between the malignant grade, immunophenotyping, and cellular proliferation (PCNA and Ki-67) were also evaluated in 55 dogs with the multicentric form. Within cutaneous lymphoma, 35 dogs were females and 14 were males, many different breeds were represented but more frequently in pure breeds and age from 2 to 14 years. This tumor was more frequent in small and medium breeds, with lesions in abdomen, dorsum and trunk. The morphologic classification was made in 21 dogs, with twelve non epiteliotrophic and nine epiteliotrophic form. In the majority of the cases the multiple-drug therapy was established, and the remission was complete. The single-drug therapy result in stable or progressive disease, except for patients treated with lomustine. The survival was longer in patients treated with multiple-drugs therapy. In 55 multicentric form dogs were 30 males and 25 females, 39 pure breed and 16 mixed breeds. The mean age was 5.4 years. High malignant grade were 70.1% of cases and low malignant grade represented 29.9%, 32 T cell lymphoma and 23 B cell lymphoma. The mean mitotic cell rate by PCNA antibody were $90,0 \pm 3,96$ in high malignant grade lymphomas and $82,0 \pm 2,60$ in low malignant grade concerning all marked cells was no significant difference ($p < 0,05$).

When only highly marked cells were counted, mean index was $84,72 \pm 3,79$ in high grade lymphomas and $64,19 \pm 3,50$ in low grade lymphomas ($p < 0,05$). The Ki-67 cellular proliferation index was $64,0 \pm 9,03$ within high malignant grade and $9,50 \pm 2,49$ within low grade ($p = 0,0045$). There was no association with cellular proliferation of both antibodies and the phenotype.

Keywords: Canine lymphoma. Epidemiological. Morphological. Immunophenotypic. Cellular proliferation. Therapy.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Distribuição das raças dos cães com linfoma cutâneo, atendidos no HV-UEL entre janeiro de 1990 e agosto de 200829
- Tabela 2** – Distribuição das lesões neoplásicas do linfoma cutâneo de acordo com a localização corpórea, de cães atendidos no HV-UEL entre janeiro de 1990 a agosto de 200830
- Tabela 3** – Protocolos utilizados no tratamento de linfoma cutâneo de cães atendidos no HV-UEL no período de janeiro de 1990 a agosto de 200830
- Tabela 4** – Resposta terapêutica de cães com linfoma cutâneo tratados com diversos protocolos, associado a classificação morfológica31
- Tabela 5** – Sobrevida dos cães com linfoma com ou sem instituição de protocolo antineoplásico, associado a classificação morfológica31

ARTIGO B

- Tabela 1** – Distribuição do gênero e das raças de acordo com a média, mediana e intervalo das idades49
- Tabela 2** – Distribuição dos subtipos morfológicos de alto e baixo grau de malignidade, de acordo com o sistema Kiel e seus respectivos fenótipos50
- Tabela 3** – Distribuição das médias de marcação celular para o anticorpo PCNA, de acordo com o grau de malignidade, fenótipo e os respectivos valores de p50
- Tabela 4** – Distribuição dos valores das medianas de marcação celular para o anticorpo Ki-67, de acordo com o grau de malignidade e fenótipo51

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Classificação Anatômica do linfoma canino proposto pela OMS, (OWEN, 1980) 21
- Figura 2** – Estadiamento clínico do linfoma canino proposto pela OMS, (OWEN, 1980) 22

ARTIGO A

- Figura 1** – Ocorrência das apresentações anatômicas do linfoma em cães atendidos no HV-UEL de janeiro de 1990 a agosto de 2008 28
- Figura 2** – Linfoma cutâneo: presença de nódulos pequenos (0,5 cm diâmetro), eritematosos, alguns com ulceração, em prepúcio de um teckel macho de 7 anos de idade. 32
- Figura 3** – Linfoma cutâneo: lesão ulcerativa interdigital com evolução de três semanas em um cão macho, SRD de 4 anos de idade. 32
- Figura 4** – Linfoma cutâneo: presença de nódulo interdigital com evolução de dois meses em um chow-chow macho de 5 anos de idade 33
- Figura 5** – Linfoma cutâneo: Despigmentação nasal e labial, com ulceração em narina (seta branca) e mucosa oral (seta preta). Pontos de sutura (setas vermelhas) no local da biopsia incisional 33
- Figura 6** – Fotomicrografia de pele com linfoma não epiteliotrópico. Observar na derme a presença de células tumorais redondas, com nucléolo proeminente em posição central (setas brancas) e figuras de mitose (setas pretas) 34
- Figura 7** – Fotomicrografia de pele com linfoma epiteliotrópico. Observar a presença de células linfóides infiltradas na epiderme (setas) 34

ARTIGO B

- Figura 1** – Classificação anatômica para linfoma em cães (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002) 46
- Figura 2** – Estadiamento clínico do linfoma canino proposto pela OMS, (OWEN, 1980) 46

Figura 3 –	Classificação histológica do linfoma não Hodgkin pelos critérios do sistema <i>Kiel</i> (LENNERT; FELLER, 1990)	47
Figura 4 –	Fotomicrografia de linfonodo canino. Observar o padrão difuso de células neoplásicas redondas com nucléolo único e central. Linfoma imunoblástico (alto grau de malignidade), sistema <i>Kiel</i> . HE 40X	51
Figura 5 –	Fotomicrografia de linfonodo canino. Observar o padrão difuso de células neoplásicas redondas com reentrância nuclear (setas brancas) e com nucléolos evidentes (algumas com nucléolos na periferia – centroblastos – setas vermelhas). Linfoma centrocítico com componente centroblastico (baixo grau de malignidade) – sistema <i>Kiel</i> . HE 40X	52
Figura 6 –	Fotomicrografia de linfoma canino de células T. Positividade para anticorpo primário anti-CD3 (setas). Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris. 40X	52
Figura 7 –	Fotomicrografia de linfoma canino de células B. Positividade para anticorpo primário anti-CD79a (setas). Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris. 40X	53
Figura 8 –	Linfoma de alto grau de malignidade (sistema <i>Kiel</i>). Positividade para anticorpo anti-PCNA. Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris. Setas pretas visualizam células fracamente marcadas e setas brancas células fortemente marcadas pelo anticorpo. 40X	53
Figura 9 –	Linfoma canino de baixo grau de malignidade (sistema <i>Kiel</i>). Positividade para anticorpo anti-Ki67 (setas). Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com hematoxilina de Harris. 40X	54

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1	INTRODUÇÃO	14
1.2	CLASSIFICAÇÃO	15
1.2.1	Classificação Anatômica	15
1.2.2	Classificação Histológica	16
1.2.3	Classificação Fenotípica.....	18
1.3	PROLIFERAÇÃO CELULAR	18
1.4	TRATAMENTO	19
1.5	PROGNÓSTICO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	ARTIGO A – LINFOMA CUTÂNEO EM CÃES: EPIDEMIOLOGIA, MORFOLOGIA, RESPOSTA TERAPÊUTICA E SOBREVIDA.	24
3.1	RESUMO.....	24
3.2	ABSTRACT.....	24
3.3	INTRODUÇÃO	25
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.5	RESULTADOS.....	28
3.6	DISCUSSÃO	35
3.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
3.8	REFERÊNCIAS.....	39
4	ARTIGO B – ASSOCIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA E KI-67) EM LINFOMA MULTICÊNTRICO CANINO COM O GRAU DE MALIGNIDADE E IMUNOFENOTIPAGEM	43
4.1	RESUMO.....	43
4.2	ABSTRACT.....	43
4.3	INTRODUÇÃO	44
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	45

4.4.1	Amostras.....	45
4.4.2	Exame Histopatológico e Classificação Morfológica	46
4.4.3	Exame Imuno-Histoquímico	47
4.4.4	Análise Estatística	48
4.5	RESULTADOS.....	48
4.6	DISCUSSÃO	54
4.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
4.8	REFERÊNCIAS.....	58
5	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

O linfoma é uma neoplasia que se origina do tecido linfóide, sendo o principal tumor hematopoiético no cão (MILNER et al., 1996). Nesta espécie, possui características similares ao linfoma do tipo não-Hodgkin humano. Estudos epidemiológicos realizados em outros países estimam incidência anual de aproximadamente 33 casos para cada 100.000 cães (TESKE, 1994a; FOURNEL-FLEURY et al, 2002). O linfoma afeta cães de todas as idades, predominantemente os de meia idade (6,3 a 7,7 anos), não havendo predileção relacionada ao sexo (MILNER et al., 1996; TESKE 1994a). O risco relativo para o aparecimento do linfoma é maior nas raças: scottish terrier; basset hound; airedale terrier; bulldog; boxer; golden retriever e pastor alemão (RALLIS et al. 1992; FAN; KITCHELL, 2002; MELLANBY; HERRTAGE; DOBSON, 2002). Predisposição genética foi relatada em bull mastiff, em um grupo de otterhounds e em uma família de rottweilers (VAIL; YOUNG, 2007).

O linfoma tem aparecimento espontâneo, representando 8,5 a 9% de todos os tumores caninos (DOBSON et al., 2001), e tem menor ocorrência apenas do que as neoplasias mamárias e cutâneas (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a). Caracteriza-se por elevada agressividade e, ao contrário do que ocorre em gatos, a relação com agentes virais não foi definitivamente demonstrada, apesar de ter sido relatada a presença de retrovírus nas células tumorais (TESKE 1994a; FOURNEL-FLEURY et al., 1997b).

Fatores ambientais têm sido investigados na tentativa de determinar fatores predisponentes do linfoma, principalmente quando da exposição ao herbicida 2,4 ácido fenoxiacético, que em pessoas e animais aumenta as chances de aparecimento da doença (FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

1.2 CLASSIFICAÇÃO

1.2.1 Classificação Anatômica

A classificação anatômica proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1980) (Figura 1), ainda é aceita e muito utilizada (MILNER et al., 1996; MELLANBY; HERRTAGE; DOBSON, 2002). Esta classificação também contempla o estadiamento clínico do linfoma, considerando a infiltração do tumor em outros órgãos e a presença ou ausência de sinais clínicos (Figura 2). A maioria dos animais apresenta-se com grau III ou IV da doença quando da avaliação clínica. Isto ocorre devido à demora no encaminhamento do animal para atendimento por clínico veterinário, o que favorece a progressão da doença (CROW, 1982; TESKE et al., 1994; MILNER et al., 1996, DE MOURA et al., 2003).

A forma clínica mais comum é a multicêntrica, que representa até 84% dos casos (RALLIS et al., 1992; FAN; KITCHELL, 2002, MORENO; BRACARENSE, 2007a, SUZANO, 2007). Caracteriza-se pelo aumento generalizado dos linfonodos superficiais, que se apresentam indolores e de consistência firme, podendo haver infiltração das células neoplásicas no fígado, baço, medula óssea e tonsilas (FAN; KITCHELL, 2002). A maioria dos animais é assintomática no momento da apresentação clínica, porém quando sintomáticos haverá histórico de perda de peso, letargia, anorexia e episódios de febre (CROW, 1982; FAN; KITCHELL, 2002; VAIL; YOUNG, 2007). Em estágios avançados da doença pode-se observar hepatoesplenomegalia, e em 27 a 34% dos casos infiltração pulmonar (VAIL; YOUNG, 2007).

O linfoma alimentar representa 5 a 7% dos casos, localizando-se principalmente no estômago e intestino delgado (FRENCH; SEITZ; VALLI, 1996; FAN; KITCHELL, 2002; VAIL; YOUNG, 2007). Similarmente ao que ocorre em seres humanos, esta apresentação é mais observada em cães machos (VAIL e YOUNG, 2007). Cães com linfoma alimentar podem apresentar sinais gastroentéricos como anorexia, vômito, diarreia, melena e perda de peso secundária à síndrome da má-absorção/má-digestão (FAN; KITCHELL, 2002; VAIL; YOUNG, 2007). A ocorrência de enterite linfoplasmocitária é um fator de predisposição para o linfoma alimentar em cães da raça basenji (FRENCH; SEITZ; VALLI, 1996; VAIL; YOUNG, 2007).

A forma mediastínica ocorre em aproximadamente 5% dos casos, sendo caracterizada pelo aumento dos linfonodos mediastínicos e/ou timo (FAN; KITCHELL, 2002; VAIL; YOUNG, 2007). Como o timo é o órgão linfóide responsável pela maturação dos linfócitos T, os linfomas mediastínicos são compostos em sua maioria por células T (FAN; KITCHELL, 2002). Cães com esta apresentação podem manifestar sinais respiratórios, efusão pleural, compressão de lobos pulmonares ou síndrome da veia cava cranial (FAN; KITCHELL, 2002). A hipercalcemia pode estar presente em até 40% dos cães com linfoma mediastínico (FAN; KITCHELL, 2002; VAIL; YOUNG, 2007).

O linfoma cutâneo pode ter apresentação localizada ou generalizada, sendo classificado como epiteliotrópico (*Mycosis fungoides*) e não epiteliotrópico (DeBOER; TURREL; MOORE, 1990; DAY, 1995; VAIL; YOUNG, 2007). Pode envolver também a mucosa oral e em casos mais avançados infiltrar linfonodos, fígado, baço e medula óssea (VAIL; YOUNG, 2007). A forma epiteliotrópica é a mais comum, tendo origem em células T, similarmente ao que ocorre em seres humanos (DeBOER; TURREL; MOORE, 1990; VAIL; YOUNG, 2007). Uma variante da *mycosis fungoides*, caracterizada por envolvimento generalizado da pele com evidências de circulação de linfócitos T malignos no sangue periférico, é referida em humanos como síndrome de Sézary, a qual já foi relatada também em cães e gatos (THRALL et al., 1984; TESKE; VAN HEERDE, 1996; VAIL; YOUNG, 2007).

Outras apresentações anatômicas do linfoma classificadas como extranodais são as oculares, renal, cardíaca, neurológica, óssea e articular, cuja ocorrência é menor que as anteriormente mencionadas (VAIL; YOUNG, 2007).

1.2.2 Classificação Histológica

Em humanos, os linfomas não Hodgkin's representam um grupo heterogêneo de tumores que foram classificados morfológicamente pela primeira vez em 1966 por Rappaport. Posteriormente, outras classificações foram elaboradas como a de Lukes e Colins (1974), e os sistemas *KIEL* (LENNERT, 1978) e Working Formulation, este último proposto pelo *National Cancer Institute* (ROBB-SMITH, 1982). Em 1990, Lennert e Feller introduziram uma modificação na classificação do sistema *Kiel*, levando em consideração o imunofenótipo, em linfoma de células B ou de células T. Harris et al. (1994) propuseram uma revisão da classificação das neoplasias linfóides na Europa e América, estabelecendo

subgrupos e uma subdivisão dos linfomas de baixo e de alto grau de malignidade, com valor prognóstico. Este sistema de classificação recebeu a denominação de REAL.

A classificação histológica da OMS abrange os seguintes subtipos: pouco diferenciado; linfoblástico; linfocítico e prolinfocítico; e histiocítico, histioblástico e histiolinfocítico (RALLIS et al., 1992).

Estes sistemas de classificação rapidamente foram adaptados para a Medicina Veterinária, sendo a classificação de *Kiel* e o sistema *Working Formulation* os mais facilmente adaptados (TESKE et al., 1994; MILNER et al. 1996; KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999).

A *Working Formulation* classifica o tumor com base no padrão tecidual (difuso ou folicular) e no tipo celular (pequena e clivada; grande; e imunoblástica). Já o sistema *Kiel* avalia a morfologia celular (centroblástico, centrocítico e imunoblástico) e a imunofenotipagem (células B ou T). Ambos os sistemas classificam o tumor como sendo de baixa ou alta malignidade, e a *Working Formulation* acrescenta um grau intermediário de malignidade (VAIL; YOUNG, 2007).

Os sistemas de classificação auxiliam na determinação do prognóstico dos linfomas. A classificação da *Working Formulation* tem maior correlação com o tempo de sobrevivência do animal (KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999). O padrão de arquitetura folicular em cães não está correlacionado com prognóstico, sendo encontrado em poucos casos. Em seres humanos, ao contrário, aproximadamente 30% dos linfomas não-Hodgkins são foliculares determinando um prognóstico favorável (TESKE, 1994b). Os linfomas de alto grau de malignidade apresentam com maior frequência, remissão completa em resposta à quimioterapia, quando comparados aos de baixa malignidade. No entanto, cães com linfoma de baixo grau de malignidade têm maior tempo de vida sem quimioterapia agressiva (VAIL; YOUNG, 2007).

O sistema *Kiel* modificado auxilia na determinação do tempo de reincidência nos animais tratados, acreditando-se que também tenha utilidade na estimativa da sobrevivência (KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999).

1.2.3 Classificação Fenotípica

A imunofenotipagem passou a ter importância prognóstica, quando se verificou que cães com linfoma de células T tinham prognóstico pior para o tempo de vida e o intervalo livre da doença que aqueles com linfoma de células B (GREENLEE et al. 1990; KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999).

A grande dificuldade para a padronização da imuno-histoquímica foi a disponibilidade de marcadores para células linfóides de cães (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; RASSNICK et al. 2002). Nos últimos anos foi demonstrado que marcadores de células B e T de humanos são eficazes também na marcação de células B e T de alguns animais, incluindo o cão (MILNER et al., 1996; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a). O anticorpo monoclonal anti-CD79a como um marcador pan-B, e o anticorpo policlonal humano anti-CD3 tem sido considerado eficientes como marcadores de células T, em seções de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (MILNER et al., 1996; FOURNEL-FLEURY et al., 1997b).

Em cães, observou-se maior incidência de linfomas com imunofenótipo B (FOURNEL-FLEURY et al., 1997b; SUEIRO, 2004). No entanto, De Moura (2000) e Moreno e Bracarense (2007b) observaram um predomínio de linfomas de células T (60,2 e 53,5%) respectivamente nas regiões de Botucatu –SP e Londrina - PR.

1.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Estudos sobre a cinética celular, seus mecanismos reguladores e sua interação com fatores de crescimento, oncogenes e anti-oncogenes estão em evidência nos últimos anos. Às informações pertinentes ao comportamento biológico dos tumores contribuem na escolha da terapia e em subsídios prognósticos para as mais variadas neoplasias (PHILLIPS et al., 2000; ZACCHETTI et al., 2003).

A aplicação de marcadores de proliferação celular, destacando-se o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e o Ki-67 (antígeno nuclear associado ao ciclo celular), assegura uma medida acurada da quantidade de células em proliferação (ALVES; BACCHI; VASSALO, 1999).

O PCNA é uma proteína nuclear ácida de 36kDa, que funciona como auxiliar da DNA-polimerase-delta e atua na replicação e no reparo de moléculas de DNA lesadas através da excisão de nucleotídeos, formando um complexo quaternário com a proteína P21, a ciclina D e a CDK (quinina dependente de ciclina). Nas fases G1, G2 e M do ciclo celular, a expressão imuno-histoquímica do PCNA é reduzida, contudo aumenta em até sete vezes na fase S. A expressão de PCNA pode estar desregulada próximo a tumores, em decorrência de fatores de crescimento autócrinos, que regulam a estabilidade e a expressão do RNAm da proteína (GRIFFEY; KRAEGEL; MADEWELL, 1999).

O PCNA é considerado um marcador de proliferação celular bom, pois os níveis desta proteína podem manter-se elevados quando induzidos por fatores de crescimento, como resultado de danos ao DNA. Outros fatores que podem influenciar em sua expressão é o tipo de fixador, tempo de fixação, meia vida longa, indicando que o núcleo celular pode permanecer PCNA positivo mesmo após o estímulo para a proliferação ter cessado ou mesmo nas células em G0. Todos estes aspectos devem ser levados em consideração quando da utilização da marcação com PCNA evitando falhas ou erros na interpretação de resultados (RABENHORST; BURINI; SCHIMITT, 1993; KELLEY; MAHAFFEY, 1998; KIUPEL; TESKE; BOSTOK, 1999).

O antígeno Ki-67 é uma não-histona nuclear que faz parte da estrutura protéica conhecida como suporte cromossômico. Sua expressão é determinada pelo gene situado no *locus* 10q 25 e ocorre no final da fase G1, em S, G2 e M. Tem relação direta com a fração de crescimento de uma população celular e é considerado um excelente marcador imuno-histoquímico para proliferação celular. Sua meia vida é curta, não havendo marcação de células em G0 ou para células que estão tendo reparo do DNA, ao contrário do que ocorre com o PCNA. Porém, assim como o PCNA não informa o tempo do ciclo celular, mas sim quais células estão em divisão (ESPOSITO et al. 2000; BAUER, ZERVOS; MORTIZ, 2007).

1.4 TRATAMENTO

Todos os fármacos antineoplásicos possuem potencial de desencadear efeitos adversos, usualmente menos intensos em animais de companhia do que em seres humanos. Portanto, é de fundamental importância que o clínico saiba reconhecê-los e contorná-los orientando os proprietários na identificação precoce (VAIL; YOUNG, 2007).

Vários protocolos quimioterápicos são indicados na terapia do linfoma canino. Tais protocolos podem ser formulados com a utilização de um fármaco ou uma combinação deles. Protocolos com combinações de fármacos geram melhores resultados na obtenção de remissão completa da doença, associada a um maior tempo de vida livre da doença e uma melhor qualidade de vida. Quanto maior o número de fármacos utilizados, maior será o custo, porém, melhor será a eficácia no tratamento, ainda que com maiores possibilidades de efeitos adversos, o que não deve ser um desestímulo para a utilização do melhor protocolo (VAIL; YOUNG, 2007).

A maioria dos protocolos utiliza diferentes combinações com os seguintes fármacos: sulfato de vincristina, ciclofosfamida, cloridrato de doxorubicina, prednisona e L-asparaginase. O uso de outros fármacos, como o clorambucil, actinomicina D, citarabina, metotrexato, mitoxantrona e lomustina também é proposto em alguns protocolos quimioterápicos para o linfoma canino. (FAN; KITCHELL, 2002).

A cirurgia como parte da terapia em cães com linfoma é controversa. No caso de massa tumoral única, a cirurgia pode auxiliar o tratamento com fármacos antineoplásicos, porém não poderá ser a única forma de tratamento, recomendando-se a associação das técnicas terapêuticas. O procedimento cirúrgico somente será obrigatório, quando houver obliteração da luz do trato digestivo na apresentação do linfoma alimentar (VAI; YOUNG, 2007).

A radioterapia tem pouca aplicação na terapia do linfoma canino, sendo indicada nos casos de linfoma nasal e com envolvimento do sistema nervoso central (VAIL; YOUNG, 2007).

1.5 PROGNÓSTICO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O prognóstico para o linfoma canino está relacionado a diversos fatores como: apresentação anatômica, estágio clínico, classificação histológica e imunofenótipo. A cura da doença é obtida em poucos casos (< 10%). No entanto, é possível prover boa qualidade de vida, por períodos longos, para a maioria dos cães acometidos (VAIL ; YOUNG, 2007).

O sítio anatômico será indicativo de pior prognóstico quando estiver relacionado ao linfoma cutâneo primário, alimentar difuso, envolvimento primário do sistema

nervoso central, infiltração da medula óssea ou circulação de linfoblastos malignos no sangue periférico (FAN; KITCHELL, 2002; VAIL; YOUNG, 2007).

Cães nos estágios III, IV ou V e com sinais clínicos da doença têm pior prognóstico quando comparados aos animais nos estágios I ou II e assintomáticos. O imunofenótipo T determina pior prognóstico quando comparado com o imunofenótipo B (FAN; KITCHELL, 2002; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

A síndrome paraneoplásica de hipercalcemia normalmente está associada ao imunofenótipo T, contribuindo para um pior prognóstico. Animais com neoplasmas de alto grau de malignidade, segundo as classificações histológicas do Sistema Kiel e da Working Formulation, respondem melhor ao tratamento quimioterápico, porém menor tempo de sobrevida (TESKE et al., 1994; KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

Ressalta-se desta forma, a importância do estadiamento clínico, da classificação histológica e imunofenotipagem para a determinação do prognóstico e auxílio na escolha do protocolo quimioterápico. Os índices de proliferação celular, também têm contribuído na melhor compreensão do comportamento biológico e em um prognóstico mais acurado (BAUER; ZERVOS; MORTIZ, 2007).

APRESENTAÇÃO ANATÔMICA
Multicêntrico
Alimentar
Mediastínico
Cutâneo
Extra Nodal (renal, neurológica, ocular, óssea, articular, etc.).

Figura 1 – Quadro da classificação anatômica do linfoma canino proposta pela OMS (OWEN, 1980).

ESTÁGIO CLÍNICO	
I	Envolvimento de apenas um linfonodo.
II	Envolvimento de vários linfonodos superficiais, com ou sem envolvimento de tonsilas.
III	Linfoadenomegalia generalizada.
IV	Envolvimento de fígado e/ou baço, com ou sem linfoadenomegalia generalizada.
V	Envolvimento de sangue, medula óssea e/ou outros órgãos.
SUBESTÁGIO CLÍNICO	
a	Sem sinais clínicos da doença.
b	Com sinais clínicos da doença.

Figura 2 – Quadro do estadiamento clínico do linfoma canino proposto pela OMS (OWEN, 1980).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os aspectos epidemiológicos, morfológicos, terapêuticos do linfoma cutâneo e determinar os índices de proliferação celular (PCNA e Ki-67) do linfoma multicêntrico em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os dados de ocorrência do linfoma cutâneo e multicêntrico em cães atendidos no HV-UEL, no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008.
- Investigar os aspectos epidemiológicos relacionados ao gênero, idade, raça, porte físico e distribuição das lesões do linfoma cutâneo e multicêntrico em cães.
- Classificar histologicamente os linfomas cutâneos, baseado em critérios descritos por Gross (2005).
- Descrever os protocolos utilizados no tratamento de cães com linfoma cutâneo atendidos no HV-UEL no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008, a resposta terapêutica e a sobrevida alcançada.
- Classificar histologicamente os linfomas multicêntricos em cães, seguindo critérios estabelecidos pelo sistema Kiel (LENNERT; FELLER, 1990)
- Investigar a fenotipagem dos linfomas multicêntricos através da técnica de imunoperoxidase.
- Estabelecer os índices de proliferação celular no linfoma multicêntrico para os anticorpos PCNA e Ki-67.
- Analisar a significância estatística entre o grau de malignidade dos linfomas multicêntricos e os índices de proliferação celular do PCNA e Ki-67.
- Analisar a significância estatística entre os índices de proliferação celular do PCNA e Ki-67 e a imunofenotipagem dos linfomas multicêntricos.

3 LINFOMA CUTÂNEO EM CÃES: EPIDEMIOLOGIA, MORFOLOGIA, RESPOSTA TERAPÊUTICA E SOBREVIDA.

MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.

3.1 RESUMO

A apresentação cutânea é uma dentre várias possíveis no linfoma canino. Tumor de origem linfóide e de aparecimento espontâneo nos cães é subdividido em epiteliotrópico ou não epiteliotrópico e pode se manifestar por meio de nódulos epidérmicos, subcutâneos, máculas e infiltrar outros órgãos em sua evolução. Neste estudo investigamos os aspectos epidemiológicos, morfológicos e terapêuticos do linfoma cutâneo em 49 cães. Destes cães, 35 eram fêmeas e 14 machos, com idade variando entre 2 a 14 anos. Trinta e sete animais apresentavam raça definida. Em relação ao porte 47% eram de pequeno porte, 31% de grande porte e 22% de porte médio. Em 21 cães foi realizada a classificação morfológica e estabeleceu-se o diagnóstico de linfoma não epiteliotrópico em doze animais e da forma epiteliotrópica em nove. As lesões ocorreram predominantemente no abdômen, dorso (caudal) e tronco. Na maioria dos cães tratados com múltiplos fármacos, a remissão clínica foi completa ou parcial. Ao utilizar protocolos monoterápicos a doença permaneceu estável ou progrediu, com exceção de pacientes tratados com lomustina. A sobrevida foi maior em pacientes tratados com protocolos com múltiplos antineoplásicos.

Palavras chave: Linfoma cutâneo. Epidemiologia. Morfologia. Terapia. Cães.

3.2 ABSTRACT

Cutaneous form is one of the clinical presentations of lymphoma. This lymphoid tumor has a spontaneous appearance in dogs, and is classified as epitheliotropic and non epitheliotropic. Multiple clinical presentations are described: epidermic, subcutaneous nodes, maculas, mucocutaneous junctions and organs infiltrations. In this study, epidemiologic, morphologic and therapeutic aspects of 49 dogs with cutaneous lymphoma were analyzed. From these dogs, 35 were females and 14 males, and the age range from 2 to 14 years. Thirty-seven were pure breed dogs. The tumor was more frequent in small (47%) and large (31%) breed dogs. The lesions occurred mainly in abdomen, dorsum (back) and trunk. In 21 dogs the morphologic classification of the tumor was performed and a diagnosis of twelve non epitheliotropic and nine epitheliotropic lymphoma was established. In the majority of multiple-drugs treated dogs the remission was complete or parcial. In single-drug therapy the disease still stable ou progressive, except in patients treated with lomustina. The survival was longer in multiple-drugs therapy.

Key words: Cutaneous lymphoma. Epidemiology. Morphology. Therapy. Dogs.

3.3 INTRODUÇÃO

Linfoma é o termo utilizado para designar um grupo heterogêneo de tumores malignos que se originam no sistema hemolinfático. É o principal neoplasma deste sistema e o terceiro em ocorrência dentre todos os tumores malignos dos cães (FAN; KITCHELL, 2002; PONCE et al. 2004; LURIE et al. 2008).

Estes tumores não possuem um agente etiológico conhecido na patogenia da doença entre os cães (TESKE, 1994; MILNER et al. 1996). Apesar de especulações como alteração genética causada por pesticidas ou ambientes com alta tensão elétrica, e a presença de partículas de retrovírus no tecido tumoral, nada foi comprovado quanto a real participação destes agentes na etiologia dos linfomas caninos, sendo a doença considerada de aparecimento espontâneo (VAIL; YOUNG, 2007). Sabe-se que bull mastiff, ottherhounds e uma família de rottweilers apresentaram maior predisposição ao linfoma em decorrência de falhas genéticas (VAIL; YOUNG, 2007). Outras raças como boxer, scottish terrier, golden retriever e pastor alemão tem uma maior ocorrência, mas sem causa específica (RALLIS et al. 1992; DOBSON et al., 2001; FAN; KITCHELL, 2002; MELLANBY, HERRTAGE; DOBSON, 2002).

Em humanos, a associação entre linfoma e a exposição ocupacional a alguns produtos químicos, como o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D), ou infecções por retrovírus foi relatada (TESKE, 1994). No entanto, assim como em cães, o aparecimento do linfoma é considerado espontâneo. O envolvimento de vírus como o HTLV-1 (vírus linfotrópico humano T, tipo 1) e possivelmente o HTLV-2 (vírus linfotrópico humano T, tipo 2) foi sugerido na etiologia do linfoma de células T em humanos (TESKE, 1994).

O linfoma possui diversas apresentações clínicas que estão diretamente relacionadas ao local de aparecimento da doença, grau de malignidade, fenótipo e índice de proliferação celular, entre outros. Em decorrência desta diversidade clínica, esta doença foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com o local de origem em linfoma multicêntrico, alimentar, mediastínico, cutâneo ou extra-nodal (OWEN, 1980; JACOBS, MESSICK; VALLI, 2002).

A forma cutânea possui uma baixa ocorrência clínica em comparação com a multicêntrica, correspondendo de 3 a 12 % de todas as apresentações clínicas. O cão com linfoma cutâneo pode apresentar nódulo isolado ou múltiplo, com ou sem ulceração, geralmente alopecico, eritematoso e com os bordos elevados. Ocasionalmente, as lesões podem adquirir aparência bizarra, arciforme e serpigínosa, ou aspecto eritematoso difuso com

descamação (BEALE; BOLON, 1993; BOUCHARD, 2000; MORRISSON, 2002; BHANG et al. 2006; MORENO; BRACARENSE, 2007).

Morfológicamente os linfomas cutâneos são subdivididos em não epiteliotrópico e epiteliotrópico (DHALIWAL; KITCHELL; MESSICK, 2003). A forma não epiteliotrópica caracteriza-se por uma infiltração difusa da derme e do subcutâneo por linfócitos anaplásicos. Estas células geralmente são grandes, similares aos histiócitos, com núcleos ovóides ou edentados e com citoplasma abundante. Arranjam-se como agregados nodulares com disposição perivascular, possibilitando a invasão vascular e subsequente formação de êmbolos, similar a granulomatose linfomatóide em humanos (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1995; UENO et al. 2004).

A forma epiteliotrópica é caracterizada pela infiltração de células linfóides anaplásicas na epiderme, epitélio de mucosas ou estruturas anexas. Os linfócitos neoplásicos intra-epidérmicos podem estar difusamente distribuídos ou formando pequenos agregados denominados microabscessos ou microagregados de Pautrier. O tropismo por estruturas anexas pode ser mais proeminente do que a infiltração da epiderme. Em humanos quatro padrões morfológicos foram descritos. A *mycosis fungoides* é o mais freqüente, caracterizado pela infiltração de células neoplásicas na epiderme, estruturas anexas e derme superficial, sendo freqüente a obliteração da junção dermoepidérmica. A síndrome de Sézary consiste na presença de células tumorais na epiderme e linfocitose neoplásica concomitante. Estes dois padrões morfológicos já foram descritos no cão (GROSS, 2005). A doença de Paget ou reticulose pagetóide é caracterizada por infiltração difusa restrita à epiderme e à parede de folículos pilosos e glândulas sudoríparas, e a doença de Woringer-Kolopp, na qual se observa um padrão focal da reticulose pagetóide foram descritas apenas no homem (SCOTT, MILLER; GRIFFIN, 1995; FOSTER et al. 1997; BOUCHARD, 2000; GROSS, 2005; BHANG et al. 2006).

Os linfomas cutâneos são constituídos predominantemente por células T tanto no cão como no homem, no entanto, em humanos a freqüência de linfoma cutâneo de células B é maior do que em cães (MOORE; OLIVRY; NAYDAN, 1994; WILLEMZE; BELJAARDS; MEIJER, 2007). O linfoma multicêntrico de células B pode causar metástase ou infiltração na pele, e não deve ser confundido com o linfoma cutâneo primário, pois esta apresentação também pode determinar linfadenomegalia (TESKE, 1994).

O objetivo deste trabalho é descrever os aspectos epidemiológicos, morfológicos e terapêuticos do linfoma cutâneo em cães.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 265 prontuários de cães com diagnóstico citológico ou histopatológico de linfoma, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL) no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008. Estabelecido o diagnóstico, estes cães foram classificados de acordo com a apresentação anatômica da doença, seguindo os critérios propostos por Jacobs (2002).

Dos animais com apresentação cutânea foram obtidos dados de resenha, localização da lesão, número de nódulos, porte do animal e quadro clínico da doença. Para os animais sem raça definida (SRD), o porte foi estabelecido pelo peso corpóreo sendo considerados de pequeno porte cães com peso \leq a 10 kg, porte médio > 10 e ≤ 20 kg, grande porte > 20 e ≤ 40 kg e cães gigantes com peso > 40 kg (MORENO; BRACARENSE, 2007).

Para a classificação morfológica foram utilizados os fragmentos de tecido emblocados em parafina provenientes do laboratório de Anatomia Patológica Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. Dos cães com diagnóstico histopatológico, foram separados os blocos de parafina com os fragmentos correspondentes, para novo corte e coloração pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE). Os tumores foram classificados em não epiteliotrópico e epiteliotrópico de acordo com os padrões histológicos descritos por Gross (2005).

Nos cães com linfoma cutâneo, o protocolo utilizado no tratamento, a resposta terapêutica e o tempo de sobrevivência dos animais também foram avaliados. Para análise da resposta terapêutica foram definidos os seguintes critérios: *i.* remissão completa da doença quando não era detectada a presença de nódulos ou qualquer outra alteração clínica do linfoma cutâneo; *ii.* remissão parcial quando havia redução de até 75% no tamanho e quantidade de nódulos do tumor; *iii.* doença estável quando reduzido à metade o tamanho das lesões cutâneas sem aparecimento de outros nódulos; *iiii.* doença progressiva quando havia no máximo 25% de redução das lesões cutâneas e nítido aparecimento de outros nódulos ou infiltração em outros órgãos (VAIL; YOUNG, 2007).

Para análise da sobrevivência foi considerado o número de semanas que o animal permaneceu vivo após o diagnóstico de linfoma em relação ao tratamento ou até a morte natural. Cães que foram submetidos à eutanásia logo após o diagnóstico não foram considerados para determinação da sobrevivência.

3.5 RESULTADOS

Dos 265 cães com linfoma, 49 (18,5%) apresentavam a forma cutânea da doença (Figura 1). Destes, 35/49 (71%) eram fêmeas e 14/49 (29%) machos. A distribuição racial foi heterogênea, porém com maior ocorrência em cães de raça definida (Tabela 1). Estes animais apresentavam idade variando entre 2 e 14 anos, sendo a média de 7,6 anos.

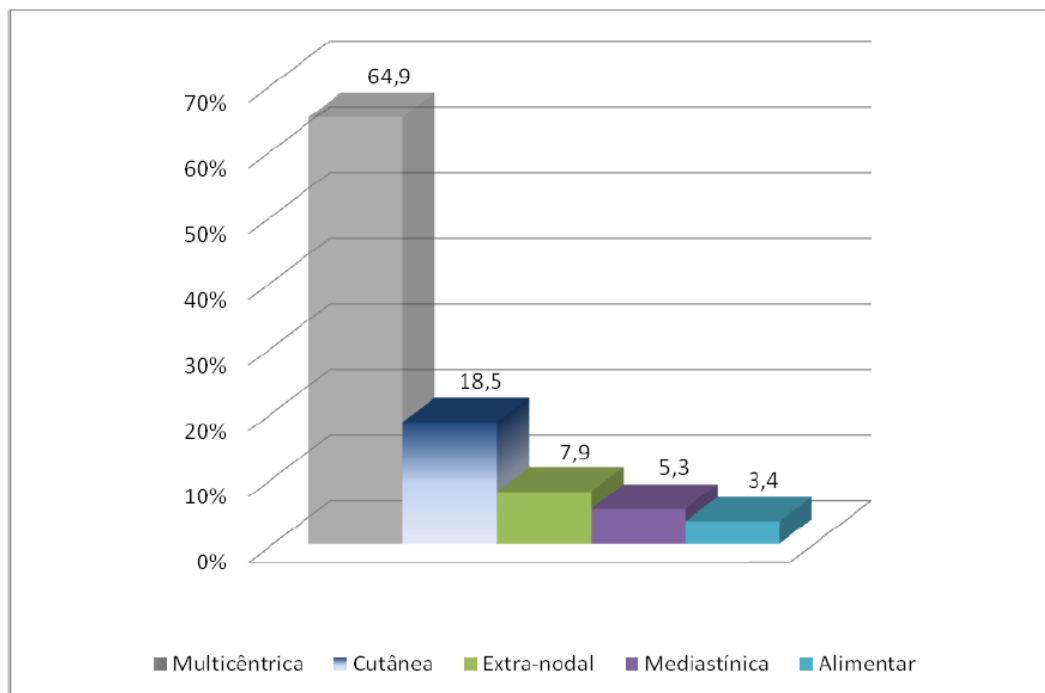


Figura 1 – Ocorrência das apresentações anatômicas de 265 cães com diagnóstico de linfoma, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008, Londrina – PR, 2008.

Tabela 1 – Distribuição da frequência das raças dos cães com linfoma cutâneo, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008, Londrina – PR, 2008.

Distribuição das raças	Total de animais (%)
Cocker Spaniel Inglês	7 (15%)
Teckel	5 (10%)
Boxer	5 (10%)
Rottweiler	4 (8%)
Pinscher	4 (8%)
Poodle	4 (8%)
Pastor Alemão	3 (6%)
Akita	1 (2%)
Chow-chow	1 (2%)
Collie	1 (2%)
Lhasa-apso	1 (2%)
Weimaraner	1 (2%)
Sem raça definida (SRD)	12 (25%)
TOTAL	49 (100%)

Quanto ao porte físico, nenhum cão SRD possuía peso corpóreo superior a 20 kilos, três apresentavam porte médio e nove eram de pequeno porte. Desta forma, considerando também o porte dos cães com raça definida, observamos a ocorrência do linfoma cutâneo de acordo com o porte físico da seguinte forma: 47% em cães de pequeno porte, 31% grande porte e 22% em cães de porte médio.

Ao avaliarmos a distribuição das lesões, verificamos que 23 cães apresentavam múltiplos nódulos pelo corpo, 18 possuíam de dois a quatro nódulos, sete com lesões únicas e um com ulcerações em mucosa nasal, oral e despigmentação (Figuras. 3, 4, 5 e 6). A distribuição dos tumores, considerando a localização corpórea, está descrita na tabela 2.

Sinais sistêmicos inespecíficos como apatia, vômito, anorexia e diarreia foram observados em nove (18%) cães.

Tabela 2 – Distribuição das lesões neoplásicas do linfoma cutâneo de acordo com a localização corpórea, de 49 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008, Londrina – PR, 2008.

Localização	Total*
Abdome	27
Dorso	23
Tronco	15
Cabeça	11
Cervical	09
Dígitos	07
Membros torácicos	06
Perianal	05
Membros pélvicos	04
Não informado	12**

* Nos animais com nódulos múltiplos foram pontuadas todas as localizações apresentadas.

** A localização das lesões não foi informada.

A classificação morfológica foi realizada a partir de cortes histológicos em 21 cães com diagnóstico prévio de linfoma. Os demais cães tiveram apenas o diagnóstico citológico e os proprietários não autorizaram a colheita de fragmento de pele para avaliação histopatológica. A forma epiteliotrópica foi diagnosticada em nove cães e a não epiteliotrópica em 12 (Figuras 7 e 8).

Dos 49 cães com diagnóstico de linfoma cutâneo, 37 foram submetidos a tratamento quimioterápico. Os principais protocolos utilizados estão listados na tabela 3.

Tabela 3 – Protocolos utilizados no tratamento de linfoma cutâneo de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008, Londrina – PR, 2008.

Protocolos com monoterapia antineoplásica		Protocolos com múltiplos fármacos antineoplásicos	
Protocolo	Cães tratados	Protocolo	Cães tratados
Prednisona	11	COP	9
Lomustina	8	VELCAP-L	5
Dexametasona	1	COAP	3
Total	20	Total	17

COP = ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona; VELCAP-L = sulfato de vincristina, L-asparaginase, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona; COAP = ciclofosfamida, sulfato de vincristina, citarabina e prednisona.

Os cães tratados apresentaram uma grande diversidade de respostas, independente do protocolo utilizado. Ao associarmos a resposta terapêutica com a classificação morfológica, observamos que os cães com linfoma epiteliotrópico tratados apenas com lomustina ou VELCAP-L apresentaram resposta terapêutica superior aos tratados com qualquer outro protocolo. No entanto, entre os cães com linfoma não epiteliotrópico a remissão completa ou parcial também foi obtida utilizando outros protocolos (Tabela 4).

A sobrevida destes animais variou de acordo com o protocolo utilizado e a classificação morfológica. Doze cães não foram tratados com nenhum fármaco ou submetidos à eutanásia logo após o diagnóstico por opção de seus responsáveis (Tabela 5).

Tabela 4 – Resposta terapêutica de cães com linfoma cutâneo tratados com diversos protocolos, associada à classificação morfológica.

PROTOCOLO	CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA												TOTAL
	EPI TELIOTRÓPICO				NÃO EPI TELIOTRÓPICO				SEM CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA				
	RC	RP	DE	DP	RC	RP	DE	DP	RC	RP	DE	DP	
Prednisona	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	4	2	11
COP	0	1	1	0	1	2	0	0	0	4	0	0	9
Lomustina	2	0	0	0	1	3	0	0	0	1	1	0	8
VELCAP-L	1	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	5
COAP	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	3
Dexametasona	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
TOTAL	3	2	2	1	3	7	1	0	0	11	5	2	37

COP = ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona; VELCAP-L = sulfato de vincristina, L-asparaginase, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona; COAP = ciclofosfamida, sulfato de vincristina, citarabina e prednisona; RC = remissão completa; RP = remissão parcial; DE = doença estável; DP = doença progressiva.

Tabela 5 – Sobrevida dos cães com linfoma cutâneo com ou sem instituição de protocolo antineoplásico, associada à classificação morfológica em número de semanas.

Protocolo	EPI TELIOTRÓPICO			NÃO EPI TELIOTRÓPICO			SEM CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA		
	Nº de Cães	Média de sobrevida*	Intervalo	Nº de Cães	Média de sobrevida*	Intervalo	Nº de Cães	Média de sobrevida*	Intervalo
Tratados	8	39,9	5 – 96	11	49,2	12 – 65	18	31,8	3 – 64
Prednisona	1	5,0	-	2	17,5	12 – 23	8	16,0	3 – 35
COP	2	26,0	13 – 52	3	51,3	44 – 62	4	44,5	37 – 54
Lomustina	2	43,0	32 – 54	4	55,0	43 – 65	2	49,0	43 – 55
Velcap-L	2	67,0	38 – 96	1	78,0	-	2	55,5	47 – 64
COAP	1	29,0	-	1	49,0	-	1	38,0	-
Dexametasona	0	0	0	0	0	0	1	19	-
Não tratados	1	4,0	-	1	0	-	10	6,8	2 – 14
Eutanásia	0	0	0	1	0	0	4	0	0

* Média de sobrevida em semanas. (-) Não há intervalo, pois foi avaliado apenas um animal.



Figura 2 – Fotografia de nódulos pequenos (0,5 cm diâmetro), eritematosos, alguns com ulceração, no prepúcio de um cão da raça teckel, macho, de 7 anos de idade. Diagnóstico: linfoma cutâneo.



Figura 3 – Fotografia de lesão ulcerativa interdigital com evolução de três semanas em um cão macho, SRD, de 4 anos de idade. Diagnóstico: linfoma cutâneo.



Figura 4 – Fotografia de nódulo interdigital, alopécico, não ulcerado, com evolução de dois meses em um cão da raça chow-chow, macho, 5 anos de idade. Diagnóstico: linfoma cutâneo.



Figura 5 – Fotografia de despigmentação nasal e labial (seta branca), com ulceração em narina e mucosa oral (seta preta) em cão da raça cocker spaniel, 08 anos, com evolução 02 meses. Pontos de sutura (setas vermelhas) no local da biopsia incisional. Diagnóstico: linfoma cutâneo.

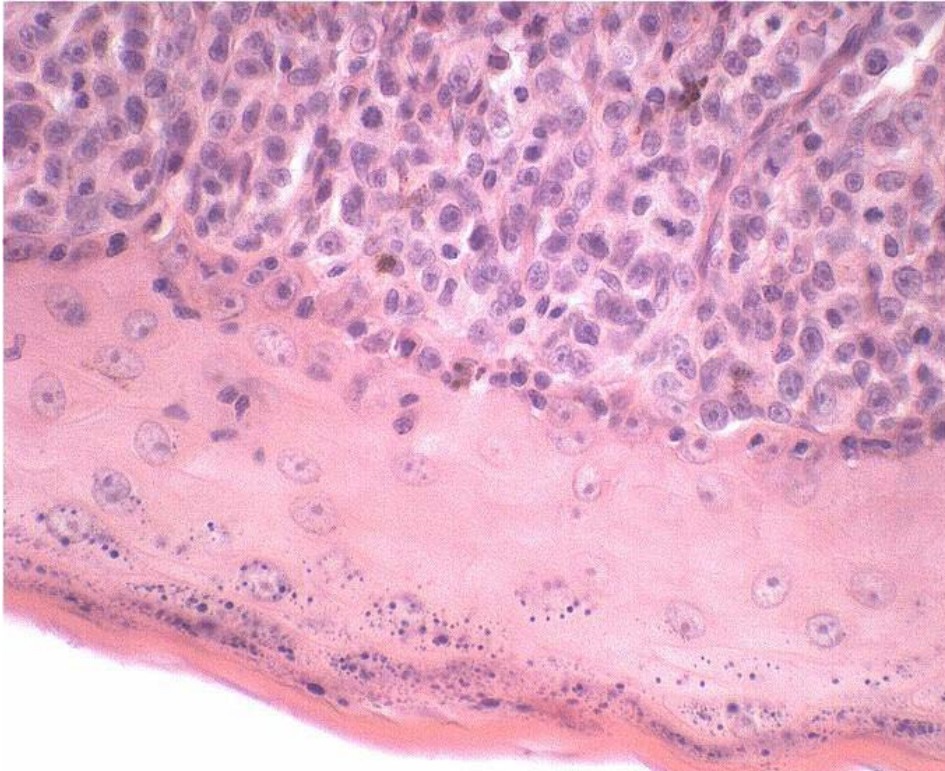


Figura 6 – Fotomicrografia de pele com linfoma não epiteliotrópico. Observar na derme a presença de células tumorais redondas, com nucléolo proeminente em posição central (setas brancas) e figuras de mitose (setas pretas). HE. Objetiva 40x.

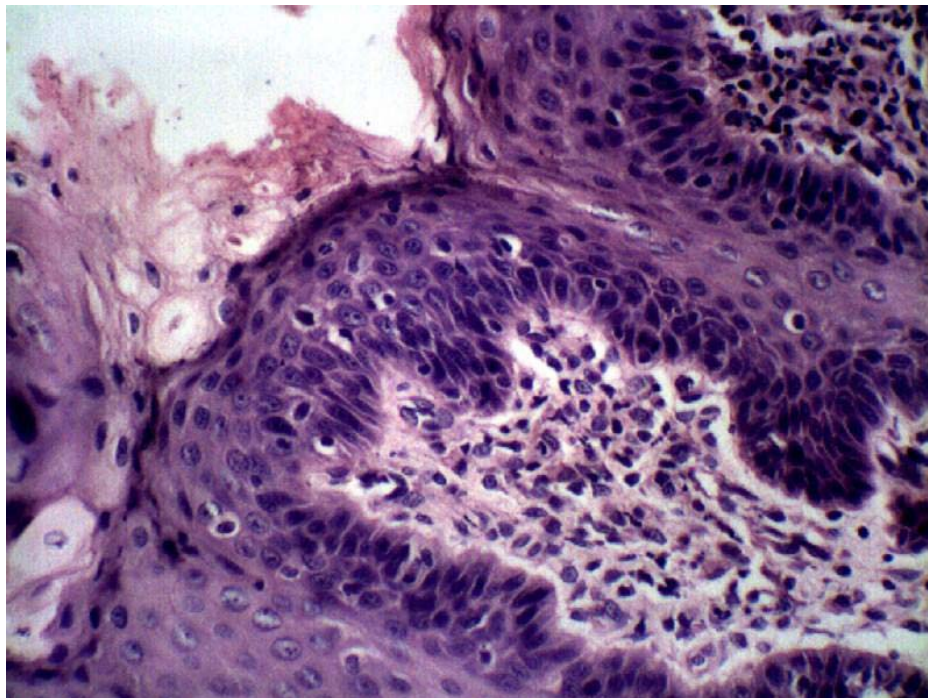


Figura 7 – Fotomicrografia de pele com linfoma epiteliotrópico. Observar a presença de células linfóides infiltradas na epiderme (setas). HE. Objetiva 40x.

3.6 DISCUSSÃO

Dentre as apresentações clínicas do linfoma em cães, a forma cutânea tem ocorrência relatada de 3 – 8% (BHANG et al. 2006; VAIL; YOUNG, 2007). No entanto, neste estudo constatamos uma ocorrência de 18,5%, superior inclusive a estudo anterior que abrangeu a mesma localização geográfica (MORENO; BRACARENSE 2007). Este fato pode estar relacionado a maior intensificação na pesquisa da doença nos cães atendidos no HV-UEL nos últimos quatro anos. Em humanos o HTLV-1 tem papel importante na indução do linfoma de células T, incluindo a apresentação cutânea (TESKE, 1994; MACY, 2007). Outros fatores ambientais como exposição a pesticidas e a permanência em áreas industriais podem favorecer as mutações genéticas, o que contribuiria para uma maior ocorrência da doença (HENRY, 2007; VAIL; YOUNG, 2007). Desta forma, é possível que a frequência mais elevada de linfoma cutâneo em nossa região seja modulada por fatores ambientais, tornando necessários estudos epidemiológicos que investiguem esta relação (HENRY, 2007).

A influência do gênero na ocorrência do linfoma em cães é controversa. Vários trabalhos relatam uma frequência maior em machos (RALLIS et al. 1992; SEQUEIRA et al. 1999; MORENO; BRACARENSE, 2007). No entanto, nestes trabalhos consideraram-se todas as apresentações anatômicas do linfoma canino. Apenas Teske (1994) descreve uma maior ocorrência em fêmeas. O maior número de fêmeas com linfoma cutâneo em nosso estudo sugere que hormônios sexuais possam modular o desenvolvimento destes tumores, hipótese também considerada por Valli (1993) que observou uma menor ocorrência de linfoma em cães castrados. Henson et al. (1998) descrevem um caso de involução de linfoma cutâneo em égua após remoção de tumor ovariano. Os autores relataram a expressão positiva para receptores de progesterona e negativa para receptores de estrógeno nas células tumorais. Em mulheres, fatores reprodutivos e a utilização de contraceptivos hormonais conferem algum risco no desenvolvimento de determinados subtipos de linfoma (LEE; BRACCI; HOLLY, 2008).

Determinadas raças como o boxer, basset hound, golden retriever, pastor alemão, scottish terrier e bulldog inglês apresentam maior risco de desenvolver linfoma (RALLIS et al., 1992; DOBSON, et al. 2001; MELLANBY; HERRTAGE; DOBSON, 2002), enquanto a predisposição genética foi descrita em bull mastiff, rottweiler e otterhound (VAIL; YOUNG, 2007). No grupo de cães avaliados, verificamos um maior número de cocker spaniel inglês, teckel e pinscher. Estas três raças não são consideradas com qualquer predisposição para o desenvolvimento do linfoma (VAIL; YOUNG, 2007). No entanto, são raças muito

freqüentes em nosso meio e possivelmente o grande número de casos diagnosticados esteja relacionado diretamente à população destas em nossa região. Outra hipótese é que a forma cutânea apresente predisposição racial diferente. Os artigos que avaliaram a predisposição racial ao linfoma consideraram todas as apresentações anatômicas, sendo que a forma multicêntrica nestes estudos é sempre a de maior ocorrência. Contudo, como há no Brasil uma grande quantidade de cães mestiços ou sem definição racial, sempre ao trabalhar com estudos epidemiológicos, os cães SRD apresentam-se com grande participação dentro da população estudada. Nesta amostragem, aproximadamente 25% dos cães acometidos não possuíam definição de raça.

Raças de grande porte ou gigantes são consideradas de maior risco para o desenvolvimento do linfoma (TESKE, 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 1997). Contudo, ao avaliarmos os cães com raça definida, constatamos que 59,5% destes cães eram de pequeno ou médio porte. Quando incluímos os cães SRD esta ocorrência sobe para 69,4%. Desta forma, cães de pequeno porte apresentam uma maior freqüência de linfoma cutâneo. No entanto, considerando que em nosso meio há uma grande quantidade de raças de pequeno ou médio porte, aliado ao fato dos cães SRD serem geralmente pequenos, esta maior freqüência em cães de pequeno porte pode não refletir a realidade.

O linfoma canino é observado freqüentemente em animais adultos e idosos, com idade média de 6,3 a 7,7 anos (RALLIS et al. 1992; TESKE, 1994). Moulton e Harvey (1990) descrevem uma freqüência de 80% dos casos em animais entre 5 e 11 anos. Resultados similares foram obtidos no Brasil por Sequeira e Franco (1992) que relataram uma freqüência de 80% dos casos em cães com idade entre 4 e 13 anos e por Moreno e Bracarense (2007) que descreveram a idade média dos animais acometidos em 5,9 anos. Neste estudo observamos que a idade média dos cães com linfoma cutâneo (7,6 anos) não difere daqueles com outras apresentações clínicas do linfoma.

A distribuição das lesões não segue um padrão clínico. O fato de o animal apresentar apenas um ou poucos nódulos está relacionado com o tempo de aparecimento da doença e não com a sua gravidade. Lesões na cabeça e períneo normalmente envolvem áreas de mucosas, principalmente a mucosa oral e a junção anorectal (MOORE; OLIVRY; NAYDAN, 1994). A presença de nódulos em maior quantidade no abdome, tronco e região dorsal consiste apenas em maior área corpórea para o desenvolvimento do tumor, não caracterizando maior ou menor gravidade.

Ao contrário da distribuição das lesões pela área corpórea, a presença de sinal clínico inespecífico sistêmico indica maior evolução da doença e invariavelmente pior prognóstico em decorrência da menor resposta terapêutica (VAIL; YOUNG, 2007).

Em seres humanos predomina o linfoma epiteliotrópico, sendo a *mycosis fungoides* a mais freqüente (MOORE; OLIVRY; NAYDAN, 1994; BHANG et al., 2006). No cão, a apresentação não epiteliotrópica aparenta ser mais freqüente, porém faltam estudos que possam sustentar esta afirmação (GROSS, 2005; VAIL; YOUNG, 2007). Em nosso trabalho, 43% (21/49) dos cães com linfoma cutâneo foram avaliados morfológicamente. Nos demais cães houve desinteresse do proprietário ou falta de condições financeiras para autorizar a biopsia e o exame histopatológico, e em alguns casos por falta de indicação do médico veterinário. Dentre os cães em que os tumores foram submetidos à classificação morfológica, 57% foram diagnosticados como linfoma não epiteliotrópico. Essa ocorrência é semelhante à descrita na literatura (GROSS, 2005; VAIL; YOUNG, 2007).

Vários protocolos antineoplásicos são descritos para o tratamento de pacientes com linfoma (VAIL; YOUNG, 2007). Invariavelmente os protocolos com múltiplos fármacos proporcionam uma melhor resposta terapêutica eliminando células tumorais por diversos mecanismos. Estes protocolos contribuem para uma maior sobrevida com qualidade de vida, permitindo uma remissão completa ou parcial da doença com intervalo maior. Outra importante vantagem ao escolher estes protocolos consiste na menor probabilidade de desencadear resistência das células tumorais a estes ou outros fármacos. A proteína P, existente na membrana celular como um mecanismo de defesa que impede a entrada de toxinas deletérias, está superexpressa nas células tumorais afetando a entrada adequada dos agentes antineoplásicos (CHUN; GARRET; VAIL, 2007). Quando é realizado o tratamento com apenas um fármaco, principalmente na monoterapia com prednisona, há uma maior indução de resistência inespecífica, dificultando inclusive o uso de outras medicações no tratamento. Por estes motivos, protocolos como o VELCAP-L, COP e COAP apresentam melhores resultados do que a monoterapia (CHUN; GARRET; VAIL, 2007).

O linfoma cutâneo tende a responder menos aos protocolos terapêuticos em comparação a outras apresentações anatômicas, por ocorrer diferença na concentração tissular dos quimioterápicos na pele em comparação a outros órgãos (CHUN; GARRET; VAIL, 2008; VAIL; YOUNG, 2007). Portanto, em alguns pacientes mesmo utilizando protocolos com múltiplos medicamentos, não é possível obter uma remissão satisfatória. Ao mesmo tempo, pacientes tratados apenas com lomustina podem apresentar remissão igual ou superior aos protocolos combinados (VAIL; YOUNG, 2007).

Neste estudo observamos que, apesar do número de animais tratados com cada protocolo ser pequeno, em pacientes tratados com lomustina, a remissão clínica foi similar a dos pacientes tratados com VELCAP-L. Ao mesmo tempo, é nítida a baixa qualidade na resposta terapêutica dos pacientes tratados apenas com prednisona, em decorrência do rápido desenvolvimento de resistência e recidiva da doença com posterior falha na reindução da remissão e óbito subsequente.

Pacientes com a linfoma epiteliotrópico responderam bem ao tratamento com lomustina ou VELCAP-L, sendo o COP um protocolo com indicações limitadas para estes pacientes. O comportamento biológico da forma epiteliotrópica tende a ser mais agressivo em comparação com o linfoma não epiteliotrópico (MOORE; OLIVRY; NAYDAN, 1994; BHANG et al. 2006). Com isto, o uso de protocolos mais complexos ou da lomustina pode permitir uma melhor remissão, períodos sem quimioterapia agressiva e conseqüente maior sobrevida.

Nos cães com linfoma não epiteliotrópico foi possível obter remissão completa ou parcial inclusive com o COP. Desta forma, para pacientes com esta forma de linfoma cutâneo, há pelo menos outras duas boas opções de tratamento com o COP e COAP.

Apesar de o protocolo monoterápico com a lomustina parecer ser melhor que o VELCAP-L ou COP, por ser medicação única com administração a cada 21 dias e proporcionando uma remissão semelhante a de protocolos mais complexos, este agente tem a grande desvantagem de ser hepatotóxico e extremamente mielossupressor, o que favorece quadros de sepse, hepatite e subsequente morte. Portanto, o uso da lomustina é limitado e indicado principalmente para pacientes refratários a outros medicamentos (FAN; KITCHELL, 2000).

Em relação à sobrevida verificamos que a remissão do tumor está diretamente associada a esta variável, ou seja, cães tratados com protocolos complexos como o VELCAP-L podem ter uma sobrevida com qualidade variando de 10 a 20 meses. Entretanto, cães tratados apenas com prednisona tendem a sobreviver poucas semanas, podendo chegar a poucos meses, resposta similar a obtida em pacientes não tratados. O único ponto favorável ao uso da prednisona consiste na possibilidade de minimizar a progressão da doença de forma rápida, permitindo apenas pouco tempo de qualidade de vida aceitável aos pacientes que não serão tratados com protocolos mais adequados.

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo constatamos que o linfoma cutâneo é freqüente em cães de nossa região e deve ser considerado dentre os diagnósticos das afecções que acometem a pele. As fêmeas foram mais acometidas, o que implica na necessidade de investigações futuras sobre uma modulação hormonal na patogenia da doença. Não houve diferença na ocorrência da forma epiteliotrópica e não epiteliotrópica, no entanto a classificação histológica do tipo de linfoma cutâneo auxilia na escolha do protocolo terapêutico mais adequado e consequentemente no aumento da sobrevida do paciente.

3.8 REFERÊNCIAS

1. BEALE, K. M.; BOLON, B. Canine cutaneous lymphosarcoma: Epitheliotropic and non-epitheliotropic, a retrospective study. In: **Ihrke PJ, Mason IS, White, SD**, eds. **Advances in Veterinary Dermatology**. v. 2 Oxford Pergamon, p. 273 – 283, 1993.
2. BHANG, D. H.; CHOI, U. O.; KIM, M. K.; CHOI, E. H.; KANG, M. S.; HWANG, C. Y.; KIM, D. Y.; YOUN, H. Y.; LEE, C. H. Epitheliotropic cutaneous lymphoma (*Mycosis fungoides*) in a dog. **Journal of Veterinary Science** v. 7 (1), p. 97 - 99, 2006.
3. BOUCHARD, H. Epitheliotropic lymphoma in a dog. **Canadian Veterinary Journal** v. 41, p. 628 – 630, 2000.
4. CHUN, R.; GARRET, L. D.; VAIL, D. M Cancer chemotherapy. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 4ed. St. Louis: Missouri State, p. 19 – 30, 2007.
5. CHUN, R.; GARRET, L. D.; VAIL, D. M. Evaluation of a High-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 120 – 124, 2008.
6. DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; MESSICK, J. B. Canine Lymphosarcoma: Clinical features. **Compedium Continuing Education for Veterinarians**, v.25, n.08, p. 572 – 582, 2003.
7. DOBSON, J. M.; BLACKWOOD, L. B.; McLINNES, E. F.; BOSTOCK, D. E.; NICHOLILS, P.; HOATHER, T. M.; TOM, B. D. M. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, p. 377 - 384, 2001.
8. FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. Lomustine. **Compedium Continuing Education for Veterinarians**, v. 22, p. 934 – 936, 2000.

9. FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma **Veterinary Medicine**, p. 58 - 65, 2002.
10. FOSTER, A. P.; EVANS, E.; KERLIN R. L.; VAIL, D. M. Cutaneous T-cell lymphoma with Sézary syndrome in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 26, p. 188 - 192, 1997.
11. FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 35 - 59, 1997.
12. GROSS, T. I. Lymphocytic Tumors. In: **Skin Diseases of the Dog and Cat - Clinical and Histopathologic Diagnosis**, 2a ed., Blackwell Publishing, 2005.
13. HENRY, C. J. The etiology of cancer: Chemical, physical and hormonal factors. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 4ed. St. Louis: Missouri State, p. 12 - 19, 2007.
14. HENSON, K.
15. L.; ALLEMAN, A.R.; CULTER, T. J.; GINN, P. E.; KELLEY, L. C. Regression of subcutaneous lymphoma following removal of an ovarian granulomatosa theca cell tumor in a horse. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. V. 212, p. 1419 – 1422, 1998.
16. JACOBS, R. M.; MESSICK, J. B.; VALLI, V. E. Tumors of the hemolymphatic system. In: **MEUTEN, D.J.** Tumors in domestic animals. 4ed. Iowa: Iowa State Press, p. 19 – 198, 2002.
17. LEE, J. S.; BRACCI, P. M.; HOLLY, E. A. Non-Hodgkin lymphoma in women: reproductive factors and exogenous hormone use. **American Journal of Epidemiology**. v. 168 (1), p. 278 – 288, 2008.
18. LURIE, D. M.; MILNER, R. J.; SUTER, S. E.; VERNAU, W. Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 102 – 110, 2008.
19. MACY, D.W. The etiology of cancer: Cancer-causing virus. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 4ed. St. Louis: Missouri State, p. 19 – 30, 2007.
20. MELLANBY, R. J.; HERRTAGE, M. E.; DOBSON, R. J. Treatment of canine lymphoma by veterinarians in first opinion practice in England. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 198 - 202, 2002.
21. 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 CD2 and CD79a cell markers. **Onderspoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 309 - 313, 1996.

22. MOORE, P.; OLIVRY, T.; NAYDAN, D. Canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (*Mycosis fungoides*) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. **American Journal of Pathology**, v. 144, p. 421 – 429, 1994.
23. MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Retrospective study of canine lymphoma in period 1990 – 2004, North region the of Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, suplemento, p. 46 – 52, 2007.
24. MORRINSON, W. B **Cancer in dogs and cats**. 2nd ed., Teton Newmedia, Jackson, p. 643 -665, 2002.
25. MOULTON, J. E; HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues *In: MOULTON, J.E.* Tumors in Domestic Animals. London: University of California Press, p. 231 - 44, 1990.
26. OWEN, L. TNM Classification of tumors in domestic animals. Geneva. **World Health Organization**, p. 46 - 47, 1980..
27. PONCE, F.; MAGNOL, J. P.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T. TURINELLI, V.; MONFRAY, K. C.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 158 – 166, 2004.
28. RALLIS, T.; KOUTINAS, A.; LEKKAS, S.; PAPADIAMANTIS, C. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma), in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, p. 590-596, 1992.
29. SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. *In: Muller in Kirk's Small Animal Dermatology*, 5th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 1064 - 1084, 1995.
30. SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M. Características anátomo-clínicas dos linfomas caninos. **Jornal de Anatomopatologista**, v.7. n. 2, p. 06 - 08, 1992.
31. SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P.; FIGUEIREDO, L. M. A.; ROCHA, N. S. Características Anatomoclínicas dos Linfomas Caninos na região de Botucatu/SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina**. v. 51, n. 3, p. 245 - 9, 1999.
32. SUZANO, S. M. C. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do p53 nos linfomas caninos. **Botucatu, 2007**. Tese apresentada na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
33. TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 4, p. 209 - 219, 1994.
34. UENO, H.; ISOMURA, H.; TANABE, S; TABUCHI, H.; YAMADA, K.; SATO, M.; Solitary nonepitheliotropic T-cell lymphoma in a dog, **Journal of Veterinary Medicine Science** v. 66 (4), p. 437 – 439, 2004.

35. VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Hematopoietic tumors: Canine lymphoma and lymphoid leukemia. *In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4ed. St. Louis: Missouri State, p. 699 – 733, 2007.
36. 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, v. 3, p. 149 - 153, 1993.
37. WILLEMZE, R.; BELJAARDS, R. C; MEIJER, C. J. L. M. Classification of primary cutaneous T-cell lymphomas. *Histopathology*, v. 24 p. 405 – 415, 2007.

4 ARTIGO B – ASSOCIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA E KI-67) EM LINFOMA MULTICÊNTRICO CANINO COM O GRAU DE MALIGNIDADE E IMUNOFENOTIPAGEM.

4.1 RESUMO

O linfoma é a denominação de um grupo heterogêneo de tumores malignos com origem em tecido linfóide. Possuem apresentações clínicas distintas que dificultam uma adequada compreensão de seu comportamento biológico. A determinação da proliferação celular por meio de exames imuno-histoquímicos tem contribuído com esta compreensão, auxiliando na escolha de protocolos antineoplásicos para cada apresentação. Neste estudo foram avaliados cortes histológicos de 55 cães com linfoma multicêntrico, sendo 30 machos e 25 fêmeas dos quais 39 eram de raça definida e 16 sem definição racial, com idade média de 5,4 anos. Morfologicamente 70% dos casos eram de alto grau de malignidade e 30% de baixo grau, sendo 32 linfomas de células T e 23 de células B. A proliferação celular foi avaliada imuno-histoquimicamente utilizando-se o anticorpo PCNA e Ki-67. O índice de proliferação celular obtido com o PCNA foi de $90,0 \pm 3,96$ nos linfomas de alto grau e de $82,0 \pm 2,60$ nos de baixo grau considerando todas as células marcadas ($p = 0,483$). Ao estabelecer como positivas apenas as células fortemente marcadas, a média obtida foi de $84,72 \pm 3,79$ e $64,19 \pm 3,50$ para os linfomas de alto e baixo grau de malignidade, respectivamente ($p = 0,038$). O índice de proliferação celular observado com o anticorpo Ki-67 foi de $64,0 \pm 9,03$ e $9,50 \pm 2,49$ nos tumores de alto e baixo grau, respectivamente ($p = 0,0045$). Não houve associação entre o índice de proliferação celular e o imunofenótipo.

Palavras - chave: Linfoma multicêntrico. Proliferação celular. PCNA. Ki-67. Cães.

4.2 ABSTRACT

Lymphoma is a heterogeneous group of malignant tumors of lymphoid origin. Have distinct clinical presentation that difficult the understanding the biological behavior. The cellular proliferation can be determined by immunohistochemistry techniques and may be helpful in antineoplastic therapy choices for each presentation. In this study were evaluated 55 histological preparations of multicentric lymphoma dogs, 30 males and 25 females, 39 pure breeds and 16 mixed breeds, mean age were 5,4 years. High malignant grade were 70% of cases and low malignant grade represented 30%, 32 T cell lymphoma and 23 B cell lymphoma. The mean cellular proliferation by PCNA antibody were $90,0 \pm 3,96$ in high malignant grade lymphomas and $82,0 \pm 2,60$ in low malignant grade concerning all marked cells ($p = <0,483$). If consider positive only the highly marked cells, mean were $84,72 \pm 3,79$ in high grade dogs and $64,19 \pm 3,50$ in low grade lymphomas ($p = 0,038$). The Ki-67 antibody cellular proliferation was $64,0 \pm 9,03$ within high malignant grade and of $9,50 \pm 2,49$ within low grade ($p = 0,0045$). There was no association with mitotic cell rate of both antibodies and the phenotype.

Key words: Lymphoma. Cellular proliferation. PCNA. Ki-67. Dogs.

4.3 INTRODUÇÃO

O linfoma ou linfoma não Hodgkin é um neoplasma comum entre os cães. Sua origem provém das células linfóides, sendo o tumor mais freqüente que acomete o sistema hemolinfático de cães e o terceiro em ocorrência nesta espécie. Acredita-se que a incidência da doença seja de 24 a 33 para cada 100.000 cães (TESKE, 1994a; DHALIWAL; KITCHELL; MESSICK, 2003).

Em humanos, o linfoma não Hodgkin representa um grupo heterogêneo de tumores que foram morfológicamente classificados por Rappaport (1966) e Lukes e Colins (1974). Posteriormente instituiu-se a classificação de *KIEL* (LENNERT, 1978) e o sistema *Working Formulation* (ROBB-SMITH, 1982). Em 1990, Lennert e Feller, adaptaram a classificação de *KIEL* introduzindo uma subdivisão em linfoma de células T ou de células B. Harris et. al. (1994) propuseram uma revisão da classificação das neoplasias linfóides na Europa e América, estabelecendo subgrupos e uma subdivisão dos linfomas de baixo grau e de alto grau de malignidade, com valor prognóstico.

Estes sistemas de classificação foram adaptados para a medicina veterinária. No entanto, alguns subgrupos do linfoma não Hodgkin humano não apresentam um correspondente na medicina veterinária (TESKE et al., 1994a; DOBSON et al., 2001). Além destes fatores, até o início dos anos 2000 ainda existia grande diversidade nos resultados de imunomarcção decorrente da grande variabilidade de marcadores. Em decorrência disto, em meados da década de 90, iniciou-se a determinação de índices de proliferação celular nos tumores dos animais, com o intuito de correlacionar a proliferação celular com o comportamento biológico, auxiliando na escolha do tratamento e no estabelecimento do prognóstico (FOURNEL-FLEURY et al., 1997a).

Há vários métodos descritos para avaliar a proliferação celular, entre estes se destaca a avaliação por imuno-histoquímica através de marcadores como o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e o Ki-67 (PHILLIPS et al., 2000; ZACCHETTI et al., 2003)

O PCNA é um auxiliar da DNA-polimerase-delta que atua na replicação e também no reparo de moléculas de DNA lesadas através da excisão de nucleotídeos, formando um complexo quaternário com a proteína p21, a ciclina D e a CDK (cinina dependente de ciclina). Nas fases G1, G2 e M do ciclo celular, a expressão imuno-histoquímica do PCNA é reduzida, contudo aumenta em até sete vezes na fase S (RABENHORST; BURINI; SCHIMITT, 1993).

O antígeno Ki-67 é uma não-histona nuclear que faz parte da estrutura proteica conhecida como suporte cromossômico (HALL, et al., 1988). Em humanos, sua expressão é determinada pelo gene situado no *locus* 10q 25 e ocorre no final da fase G1, G2 e M. Considera-se que há uma relação direta entre a expressão do antígeno e a fração de crescimento de uma população celular, sendo por isto considerado um excelente marcador para proliferação celular com valor prognóstico nos linfomas não-Hodgkin humano e canino (ESPOSITO et al. 2000; BAUER; ZERVOS; MORTIZ, 2007).

O objetivo deste estudo foi descrever os aspectos epidemiológicos e avaliar a associação entre os índices de proliferação celular pela marcação imuno-histoquímica anti-PCNA e anti-Ki-67 com o grau de malignidade e o fenótipo de linfomas multicêntricos em cães.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Amostras

Foram selecionados os blocos de parafina do arquivo do laboratório de Patologia Animal da Universidade Estadual de Londrina de cães com diagnóstico de linfoma multicêntrico, atendidos no Hospital Veterinário desta mesma instituição, no período de janeiro de 1990 a agosto de 2008. Destes animais, os que obtiveram diagnósticos apenas citológicos ou que receberam algum protocolo quimioterápico previamente, incluindo corticosteróides, foram excluídos da amostra. A definição de linfoma multicêntrico seguiu os critérios estabelecidos por Jacobs (2002) (Figura 1) e o estadiamento clínico foi realizado de acordo com o proposto pela OMS (OWEN, 1980) (Figura 2).

Os dados referentes ao gênero, idade e raça foram colhidos retrospectivamente a partir dos prontuários.

Forma	Localização
Multicêntrica	Linfonodos periféricos e profundos podendo envolver outros órgãos como fígado, baço, rins, pulmões, olhos, trato digestivo e medula óssea.
Alimentar (Digestiva)	Trato digestivo e linfonodos regionais. Pode infiltrar em órgãos abdominais.
Mediastínica (Tímica)	Timo e linfonodos regionais.
Cutânea	Envolvimento da pele em forma de nódulos únicos ou múltiplos, acompanhados ou não de envolvimento sistêmico
Extra-nodal	Envolve qualquer outro órgão isoladamente.

Figura 1 – Quadro de classificação anatômica para linfoma em cães (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002)

Estágio clínico	
I	Envolvimento de apenas um linfonodo.
II	Envolvimento de vários linfonodos superficiais, com ou sem envolvimento de tonsilas.
III	Linfoadenomegalia generalizada.
IV	Envolvimento de fígado e/ou baço, com ou sem linfoadenomegalia generalizada.
V	Envolvimento de sangue, medula óssea e/ou outros órgãos.
Subestágio clínico	
a	Sem sinais clínicos da doença.
b	Com sinais clínicos da doença

Figura 2 – Quadro demonstrativo do estadiamento clínico do linfoma canino proposto pela OMS, (OWEN, 1980)

4.4.2 Exame Histopatológico e Classificação Morfológica

Foram obtidos cortes histológicos de 5µm de espessura dos blocos previamente selecionados que foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) e submetidos à classificação morfológica de *Kiel* (LENNERT; FELLER, 1990) (Figura 3).

Grau de malignidade	Sistema <i>Kiel</i>
Baixo grau	Linfocítico
	Linfoplasmocítico
	Centrocítico/centroblástico
	Centrocítico
Alto grau	Centroblástico
	Imunoblástico
	Linfoblástico B
	Linfoblástico T

Figura 3 – Quadro de classificação histológica do linfoma não Hodgkin pelos critérios do sistema *Kiel* (LENNERT; FELLER, 1990)

4.4.3 Exame Imuno-Histoquímico

Os cortes histológicos foram colocados sobre lâminas previamente tratadas com poli L-lysina (Sigma) sendo posteriormente desparafinizados. Para a recuperação antigênica, os cortes foram incubados em solução de EDTA Tween 20, pH 9.0 e submetidos à fervura durante 10 minutos, em microondas com temperatura máxima, por duas vezes. Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio 20 volumes (1:2).

Para determinação do fenótipo utilizou-se para linfócitos T, anticorpo policlonal anti-CD3 pronto para o uso (DAKO Corp., N1580) por 1 hora de incubação à 4° C, e para marcação de linfócitos B, anticorpo monoclonal anti-CD79a (DAKO) na diluição de 1:50 por 18 horas à 4°C. Para determinação do índice de proliferação celular utilizou-se o anticorpo monoclonal anti Ki-67 (Zymed 7B11), na concentração de 1:50 por 18 horas à 4°C, e o anticorpo monoclonal anti PCNA (Zymed PC10), na concentração de 1:200 por 1 hora à 4°C.

Os cortes foram submetidos ao método do polímero (Envision System, Dako Corp., N1491). A atividade da peroxidase foi detectada com uma solução de 3,3'diaminobenzidina. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Para todas as reações foram utilizados cortes controle positivos de linfonodos humanos e caninos (anticorpos anti-CD3 e anti-CD79a), carcinoma mamário humano e canino (anticorpos anti PCNA e anti Ki-67). Para os controles negativos substituiu-se o anticorpo primário por solução de albumina bovina.

Para análise de proliferação celular, foi realizada a contagem de 500 células com objetiva de 40x, em campos aleatórios. Os campos foram divididos em quatro quadrantes iguais, sendo contadas apenas as células pertencentes ao primeiro quadrante. O índice de proliferação celular foi expresso em médias para cada anticorpo. Para o anticorpo anti-PCNA foram estabelecidas duas médias, a primeira considerando todas as células marcadas e a segunda apenas as células fortemente marcadas.

4.4.4 Análise Estatística

A associação entre a proliferação celular, a classificação morfológica e o fenótipo foi analisada por meio do software SigmaStat. Primeiramente determinou-se pelo teste de normalidade se os valores encontrados eram paramétricos. Para valores paramétricos foi utilizado o teste T (Student) e para valores não paramétricos o teste de Mann Whitney, considerando um grau de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.5 RESULTADOS

Foram selecionados 55 cães com linfoma multicêntrico. Destes, 55% (30/55) eram machos e 45% (25/55) fêmeas, sendo 70% (39/55) de raça definida e 30% (16/55) sem definição de raça (SRD). A mediana da idade foi igual a 5,4 anos (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição do gênero e das raças de 55 cães com linfoma multicêntrico de uma população hospitalar, de acordo com a média, mediana e amplitude das idades, Londrina – PR, 2008.

	(n)	Média Idade	Mediana Idade	Intervalo de Idade
Gênero	55			
Macho	30	6,10	5,50	1,00 – 13,00
Fêmea	25	5,20	4,00	2,00 – 12,00
Raça definida	39	5,18	5,00	1,00 – 12,00
Rottweiler	07	4,86	4,00	2,00 – 9,00
Boxer	06	5,83	6,00	1,00 – 12,00
Pastor Alemão	05	4,00	3,00	2,00 – 8,00
Doberman	04	7,50	7,50	3,00 – 12,00
Cocker Spaniel	03	8,00	7,00	7,00 – 10,00
Dogue Alemão	03	3,33	2,00	2,00 – 6,00
Fila Brasileiro	03	5,00	5,00	5,00 – 5,00
Labrador	02	3,50	3,50	3,00 – 4,00
Pit Bull	02	5,50	5,50	3,00 – 8,00
Collie	01	4,00	4,00	
Husky Siberiano	01	4,00	4,00	
Pinscher	01	6,00	6,00	
Teckel	01	3,00	3,00	
Sem raça definida - SRD	16	6,94	6,00	2,00 – 13,00
Total	55	5,69	5,00	1,00 – 13,00

Quando realizada a classificação morfológica verificou-se que 70% (39/55) dos casos correspondiam a linfomas de alto grau de malignidade (Figura 4) e 30% (16/55) a linfomas de baixo grau (Figura 5). A distribuição dos subtipos morfológicos está disposta na tabela 2. O padrão arquitetural difuso foi observado em todas as amostras.

Ao avaliar a imunofenotipagem destes linfomas, verificamos uma frequência de 58% (32/55) de linfoma de células T e 42% (23/55) de linfoma de células B, não sendo observada nenhuma marcação positiva para ambos os anticorpos (Figuras 6 e 7).

Tabela 2 – Distribuição dos subtipos morfológicos de alto e baixo grau de malignidade, de acordo com o sistema *Kiel* e seus respectivos fenótipos, em um grupo de 55 cães com linfoma multicêntrico atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2008.

	(n)	Fenótipo B	Fenótipo T
Baixo grau de malignidade	16	08	08
Linfocítico	10	02	08
Centrocítico	04	04	00
Centrocítico/centroblástico	02	02	00
Alto grau de malignidade	39	15	24
Imunoblástico	28	08	20
Linfoblástico	07	03	04
Centroblástico	04	04	00
Total	55	23	32

Em relação à proliferação celular, constatou-se que a média de células marcadas pelo anticorpo PCNA nos linfomas de alto grau foi de $90,0 \pm 3,96$ e nos de baixo grau (Figura 8) de $82,0 \pm 2,60$ ($p = 0,483$). No entanto, ao estabelecer uma média de células fortemente marcadas pelo anticorpo PCNA, linfomas de alto grau apresentaram média de $84,72 \pm 3,79$ e os de baixo grau de malignidade $64,19 \pm 3,50$ ($p = 0,038$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos valores da média e desvio padrão de marcação celular para o anticorpo PCNA, e associação com o grau de malignidade e imunofenótipo de 55 linfomas multicêntricos de 55 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2008.

	(n)	Média de todas as células marcadas (PCNA)	Média das células fortemente marcadas (PCNA)
Baixo grau de malignidade	16	82,00 ± 2,60	64,19 ± 3,50
Linfocítico	10	82,00 ± 2,92	63,00 ± 2,23
Centrocítico	04	81,75 ± 2,28	61,50 ± 1,50
Centrocítico/centroblástico	02	82,00 ± 3,00	67,00 ± 4,19
Alto grau de malignidade	39	90,00 ± 3,96	84,72 ± 3,79
Imunoblástico	28	90,21 ± 4,07	85,20 ± 3,10
Linfoblástico	07	90,14 ± 3,14	84,10 ± 3,45
Centroblástico	04	88,25 ± 4,02	84,17 ± 3,32
Valores de “p” – teste T		p = 0,289	p = 0,012
Linfoma de células B	23	88,00 ± 6,15 ^a	84,54 ± 2,68 ^b
Linfoma de células T	32	87,48 ± 4,23 ^a	82,60 ± 3,97 ^b

a: $p = 0,476$; b: $p = 0,379$

Nos mesmos grupos foram determinados os índices de proliferação celular com o anticorpo Ki-67 (Figura 9), obtendo-se valores não paramétricos através do cálculo de normalidade. Os resultados estão expostos na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição dos valores das medianas de marcação celular para o anticorpo Ki-67 e associação com o grau de malignidade e imunofenótipo, de 55 linfomas multicêntricos de 55 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2008.

	(n)	Mediana das células marcadas
Baixo grau de malignidade	16	9.50 ± 2.49^a
Linfocítico	10	8.50 ± 2.73
Centrocítico	04	10.50 ± 1.48
Centrocítico/centroblástico	02	9.00 ± 2.00
Alto grau de malignidade	39	64.00 ± 9.03^b
Imunoblástico	28	63.50 ± 8.52
Linfoblástico	07	65.00 ± 8.47
Centroblástico	04	59.00 ± 12.54
Valores de <i>p</i> – Teste Mann Whitney		<i>p</i> = 0.0045 ^(a,b)
Linfoma de células B	23	57.00 ± 27.78 ^c
Linfoma de células T	32	58.50 ± 24.30 ^c
Valor de <i>p</i> – Teste Mann Whitney		<i>p</i> = 0.682

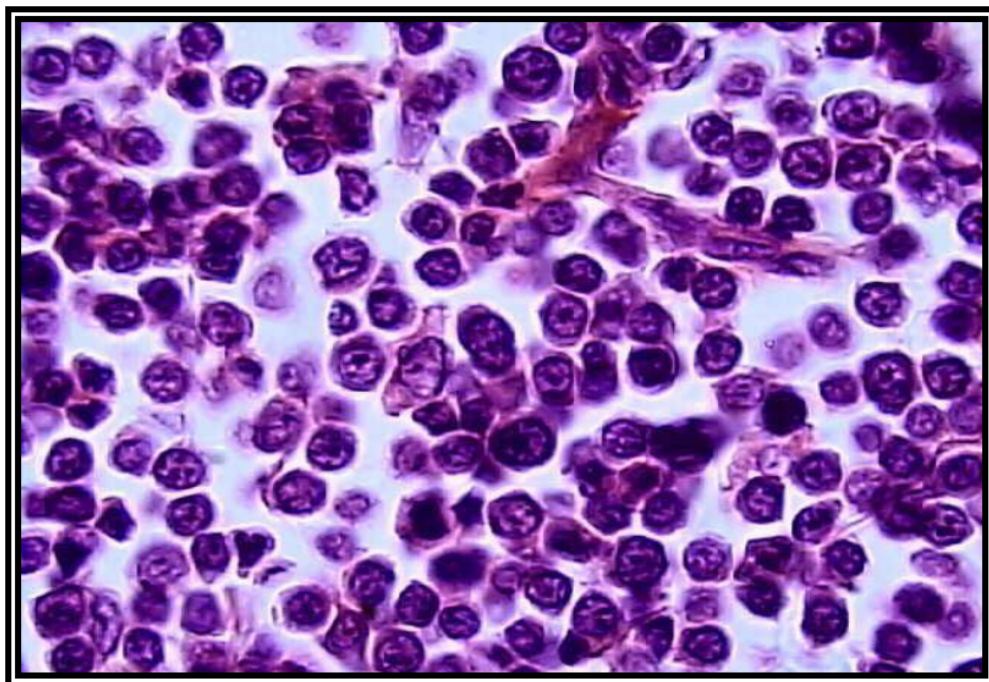


Figura 4 – Fotomicrografia de linfonodo canino. Observar o padrão difuso de células neoplásicas redondas com nucléolo único e central. Linfoma imunoblástico (alto grau de malignidade), sistema *Kiel*. HE 40X.

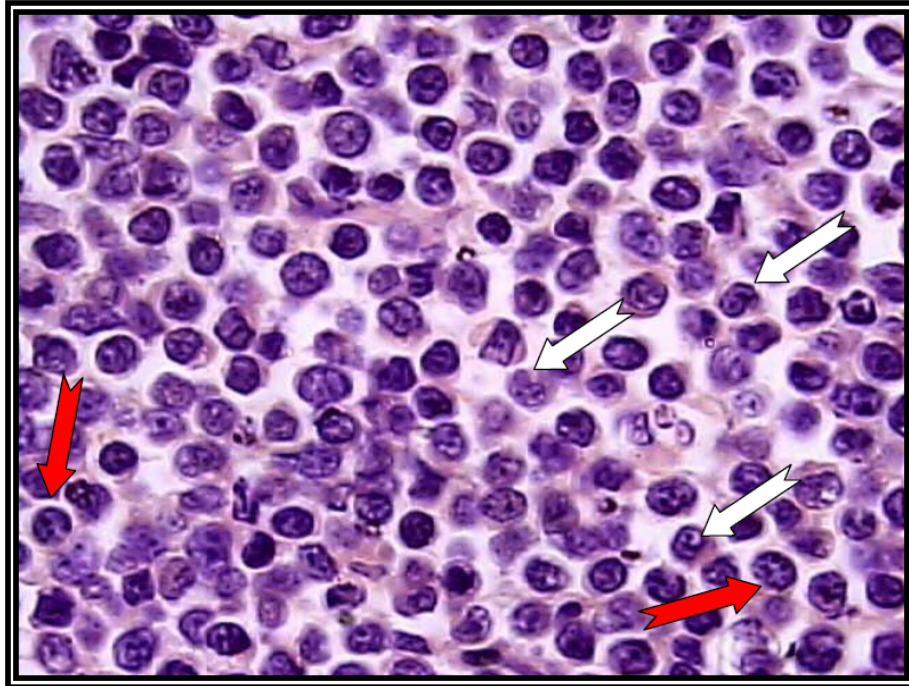


Figura 5 – Fotomicrografia de linfonodo canino. Observar o padrão difuso de células neoplásicas redondas com reentrância nuclear (setas brancas) e com nucléolos evidentes (algumas com nucléolos na periferia – centroblastos – setas vermelhas). Linfoma centrocítico com componente centroblasto (baixo grau de malignidade) – sistema *Kiel*. HE 40X.

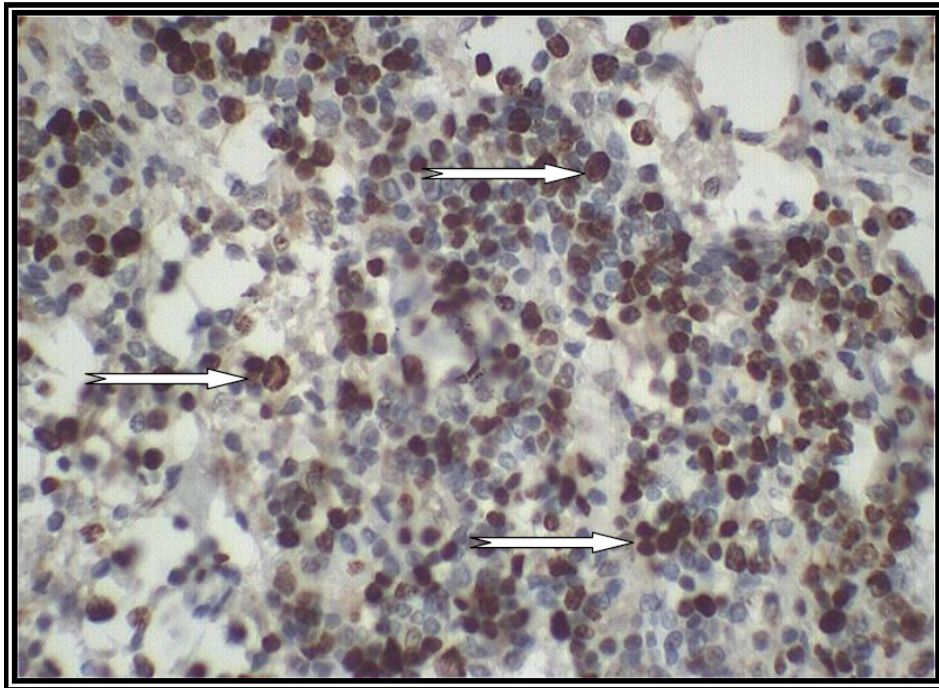


Figura 6 – Fotomicrografia de linfoma canino multicêntrico de células T. Positividade para anticorpo primário anti-CD3 (setas). Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris. 40X

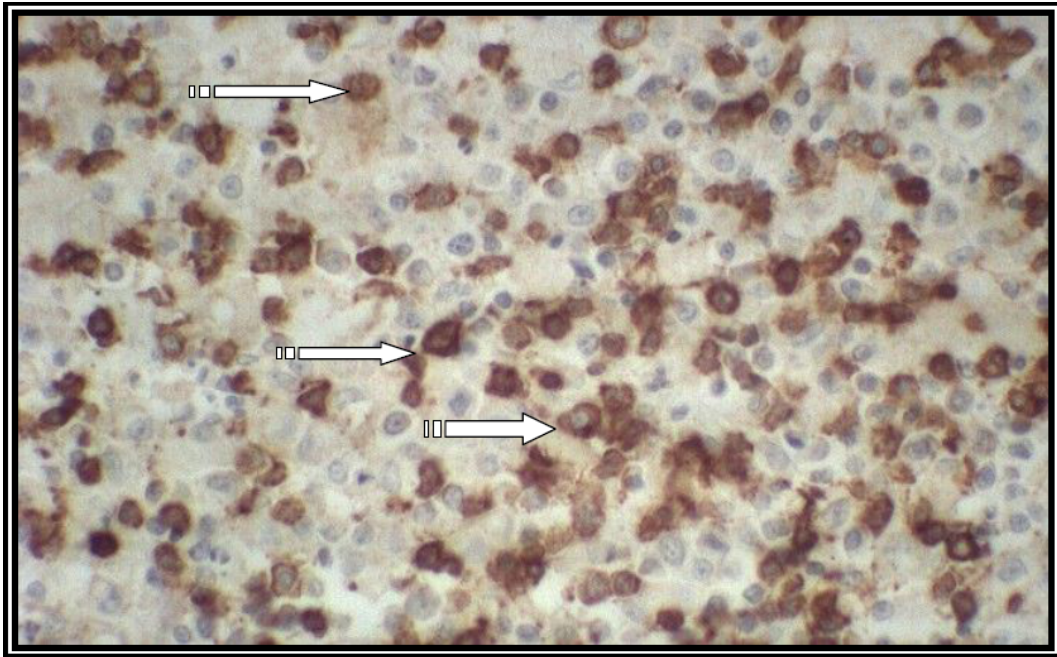


Figura 7 – Fotomicrografia de linfoma canino multicêntrico de células B. Positividade para anticorpo primário anti-CD79a (setas). Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris. 40X

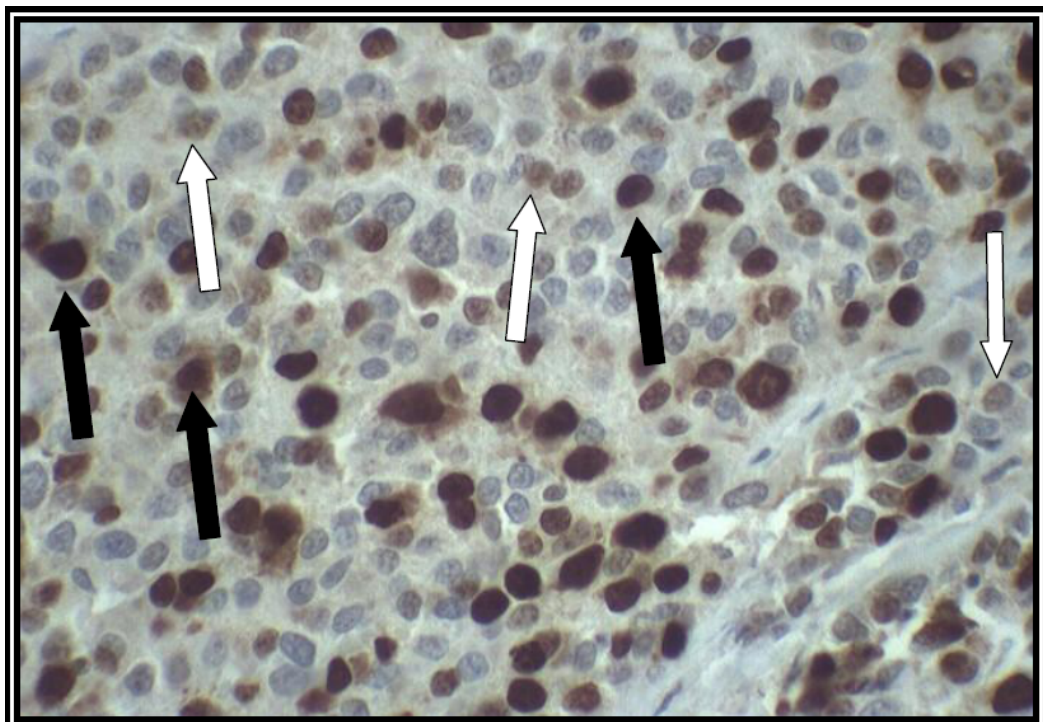


Figura 8 – Linfoma canino multicêntrico de alto grau de malignidade (sistema *Kiel*). Positividade para anticorpo anti-PCNA. Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com Hematoxilina de Harris. Setas pretas apresentam células fracamente marcadas e setas brancas células fortemente marcadas pelo anticorpo anti-PCNA 40X.

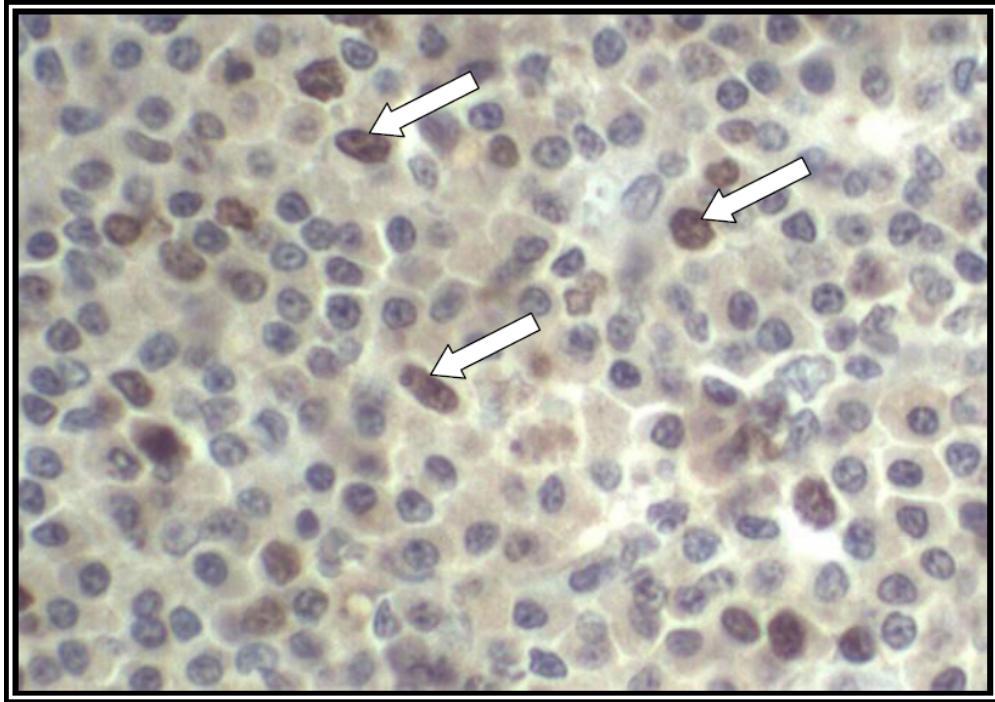


Figura 9 – Linfoma canino multicêntrico de baixo grau de malignidade (sistema *Kiel*). Positividade para anticorpo anti-Ki67 (setas). Imunoperoxidase, Envision, DAB, contracorado com hematoxilina de Harris. 40X

4.6 DISCUSSÃO

A influência do gênero na ocorrência de linfoma em cães é controversa. Neste estudo observou-se uma maior frequência em machos, de modo semelhante ao relatado por outros autores quando consideradas todas as apresentações anatômicas do linfoma (RALLIS et al., 1992; SEQUEIRA; FRANCO, 1992; SEQUEIRA et al., 1999, MORENO; BRACARENSE, 2007a). No entanto, não há nenhuma comprovação de que o gênero influencie no estabelecimento do linfoma em cães (MOULTON; HARVEY, 1990). Quanto à classificação morfológica, o predomínio de padrão difuso em relação ao folicular ao se avaliar a arquitetura do tecido, é a mesma relatada por Teske (1994b) e Fournell-Fleury et al. (1997a). Acredita-se que isto ocorra em decorrência de uma maior agressividade do linfoma canino, comparado com o linfoma não-Hodgkin humano, e pelo fato de normalmente haver uma demora maior do proprietário em buscar auxílio veterinário (ARESPACOHAGA; SCHWENDENWEIN; WEISSENBOCK, 2007). Desta forma, o padrão difuso do linfoma em cães não tem qualquer correlação com o prognóstico, ao contrário do que pode ser observado no homem onde a presença de padrão difuso caracteriza pior prognóstico (GREENLEE et al.,

1990; TESKE, 1994a; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a; KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999).

Em relação à classificação de *Kiel* verificou-se que os linfomas de alto grau eram significativamente mais freqüentes, de modo similar ao relatado na literatura nacional (SUZANO et al., 2008) e internacional (PARODI; DARGENT; CRESPEAU, 1988; TESKE, 1994a; FOURNEL-FLEURY et al., 1997a). Considerando-se estes dados pode-se formular a hipótese de que o linfoma canino é mais agressivo do que o humano (TESKE et al., 1993; TESKE, 1994b; TESKE; VAN HEERDE, 1996; FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Em humanos, tem-se demonstrado a associação

entre o grau de malignidade, fatores geográficos e fatores de risco para o desenvolvimento do linfoma (FISHER; FISCHER, 2004), como por exemplo no linfoma centrocítico de células B que está associado ao vírus Epstein-Barr que é o agente causador do linfoma tipo Burkitt na África (GROVES et al., 2000).

Na medicina a classificação morfológica dos subtipos de linfoma tem grande influência no prognóstico, determinação do tempo de sobrevida e escolha do protocolo quimioterápico adequado (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; ARESPACOHAGA; SCHWENDENWEIN; WEISSENBOCK, 2007). Ponce et al. (2004) ao classificarem pelo sistema *Kiel* os subtipos do linfoma em cães, constataram que os animais com linfoma de alto grau apresentaram resposta menos efetiva no tempo da primeira remissão e no tempo de sobrevida, do que cães com linfoma de baixo grau de malignidade.

Em relação à imunofenotipagem, grandes avanços tem sido obtidos para desenvolver anticorpos capazes de marcar células de tecido congelado ou fixado em parafina (MILNER et al.; 1996; SUZANO, 2004). Isto tem contribuído para melhor compreensão do comportamento biológico do linfoma, sendo que o fenótipo T é considerado o de pior prognóstico (TESKE et al., TESKE; VAN HEERDE, 1996; BOYCE; KITCHELL, 2000; JAGIELSKI et al. 2002; CHUN; GARRET; VAIL, 2008). Assim como características regionais estão envolvidas no aparecimento de determinados subtipos morfológicos do linfoma humano, fatores ambientais também podem estar envolvidos no fenótipo do tumor, como pode ser observado no Japão e leste da China, em que pessoas infectadas com o HTLV-1 (vírus linfotrópico humano T, tipo I), tem maior incidência de linfoma não Hodgkin do tipo T (PROIETII et al., 2005).

Em vários trabalhos relacionados à imunofenotipagem do linfoma em cães constatam-se diferenças significativas na apresentação do fenótipo predominante. Na Europa e América os linfomas de células B são mais os mais freqüentes tanto em cães como em

humanos (FISHER et al., 1995; TESKE; VAN HEERDE (1996); DOBSON et al., 2001; FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Neste estudo, no entanto, constatamos que os linfomas de células T apresentaram maior ocorrência, de modo similar ao descrito na literatura nacional (De MOURA, 2000; MORENO; BRACARENSE, 2007b). Em outros estudos, a frequência entre os imunofenótipos foi igual (SUZANO et al., 2008) ou superior para os linfomas de células B (SUEIRO, 2004)..

O PCNA é considerado um marcador de proliferação celular com algumas importantes limitações, como a longa meia vida de 20 horas (MIGUEL, 1995). Este fator pode superestimar o índice de proliferação celular de um tecido e não fornecer um resultado acurado. A marcação de células pelo anticorpo anti-PCNA, gera um padrão de coloração que pode variar do mais intenso ao fracamente marcado (LOHR et al. 1997). Ao avaliarmos os tecidos de linfoma canino marcados com PCNA, estabelecemos dois padrões de contagem para estas células, com intuito de minimizar estas falhas e encontrar resultados confiáveis. Desta forma, quando determinamos o índice de proliferação celular contando todas as células marcadas, encontramos valores que não apresentaram significância estatística entre linfomas de alto e baixo grau de malignidade. No entanto, ao estabelecermos como positivas apenas as células intensamente marcadas, observamos que os linfomas de alto grau apresentam um índice de proliferação celular significativamente mais elevado.

Devido à meia vida longa do PCNA, o núcleo pode permanecer positivo, com menor intensidade na marcação, mesmo após a divisão celular ter cessado (VAIL et al. 1996). Desta forma, estas células não devem ser consideradas ao se estabelecer o índice de proliferação, com intuito de evitar falsos positivos (KIUPEL; BOSTOCK; BERGMANN, 1998).

A associação entre o índice de proliferação celular marcado pelo PCNA e o tempo de sobrevida é bem conhecida em humanos com linfoma. A marcação auxilia ainda na diferenciação entre as hiperplasias linfóides e os linfomas de baixo grau (TIPOE; JIN; WHITE, 1996). Em cães, no entanto, há poucas informações sobre esta associação. Phillips et al. (2000) relataram que, em cães, o índice de marcação pelo PCNA estava diretamente relacionado ao tempo da primeira remissão e ao intervalo livre da doença, porém sem associação com o grau de malignidade.

Neste estudo a associação significativa entre proliferação celular elevada e linfomas de alto grau foi observada quando da utilização do anticorpo ki-67. Outros autores também constataram esta associação tanto em humanos como em cães (FORNEL-FLEURY et al., 1997a; PHILLIPS et al., 2000; WANG et al., 2005; SUZANO et al., 2008). O Ki-67 é

considerado um excelente marcador para proliferação celular, superior ao PCNA. No entanto, algumas considerações devem ser feitas quando da sua utilização para evitar falhas na interpretação como indicador prognóstico (FOURNEL-FLEURY, et al., 1997b). O suprimento nutricional para a célula neoplásica pode influenciar a expressão do Ki-67, o que faz com que uma amostra obtida do centro do neoplasma apresente um valor inferior ao real fator de crescimento tumoral (GERDES; BECKER; KEY, 1992). Outro fator que interfere diretamente na marcação imuno-histoquímica é o tempo de permanência na solução de formalina. Quanto menor o tempo, maior a confiabilidade nos valores obtidos para definir o índice de proliferação celular. (ZACCHETTI, et al., 2003).

Fournell-Fleury et al. (1997b) avaliaram 92 cães com linfoma e observaram índices de proliferação celular com Ki-67 nos animais com baixo grau de malignidade, entre 3 e 16%, e nos de alto grau índices entre 39 a 60%. Diante destes valores, estes autores estabeleceram um limite de 21% como o limiar entre os tumores de baixo e alto grau de malignidade.

Em nosso trabalho, nenhum animal com baixo grau de malignidade apresentou valor superior a 21%, oscilando entre 4 e 13%. Do mesmo modo, todos os cães classificados como portadores de linfoma de alto grau, apresentaram valores superiores a 21%, ficando bem acima do valor limítrofe entre as duas classificações (46 – 79%).

Em relação ao fenótipo, não foi detectada associação entre esta variável e os índices de proliferação detectados por PCNA ou Ki-67, assim como relatado por outros autores, sugerindo que o tipo celular T ou B não tem influência nos índices de proliferação (FOURNEL-FLEURY et al. 1997b; SUZANO et al. 2008). A importância de estudos com marcadores de proliferação está relacionada à melhor compreensão do comportamento biológico do linfoma em cães (FOURNEL-FLEURY et al., 1997b).

Como o número de animais em alguns grupos de subtipos morfológicos do linfoma foi pequeno, os valores encontrados podem não representar um valor exato da proliferação. Além disto, Fournell-Fleury et al. (1997b) descrevem a possibilidade de discrepância nos índices de proliferação de um mesmo subtipo morfológico, destacando a importância do marcador Ki-67 como auxiliar na determinação do grau de malignidade sem com isto substituir a avaliação morfológica. Desta forma, o emprego do índice de proliferação celular através do anticorpo Ki-67 deve ser considerado em avaliações individuais, pois cães e seres humanos com alto índice de proliferação apresentam uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico (FOURNEL-FLEURY et al. 1997b; PHILLIPS et al. 2000).

4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de métodos imuno-histoquímicos para determinação de índices de proliferação celular nos linfomas caninos representa uma importante ferramenta na avaliação da resposta à terapia instituída e do tempo de sobrevida ou período livre da doença. Neste estudo constatamos que tanto o anticorpo PCNA como o Ki-67 apresentaram associação significativa entre o grau de malignidade e a proliferação celular, contribuindo para uma melhor compreensão do comportamento biológico do linfoma canino.

4.8 REFERÊNCIAS

1. ARESPACOCCHAGA, A. G.; SCHWENDENWEIN, I.; WEISSENBOCK, H. Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, p. 186 – 192, 2007.
2. BAUER, N. B.; ZERVOS, D. MORTIZ, A. Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki-67 equally reflect proliferation in fine aspirates of normal, hiperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n= 101). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 928 – 935, 2007.
3. BOYCE, K. L.; KITCHELL, B. E. Treatment of canine lymphoma with COPLA/LVP. **Journal of American Hospital Association**, v. 36, p. 404 – 409, 2000.
4. CHUN, R.; GARRET, L. D.; VAIL, D. M. Evaluation of a High-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 120 – 124, 2008.
5. De MOURA, V. M. B. D. Classificação citohistológica e imonofenotipagem dos linfomas caninos. **Botucatu, 2000. 107p.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.
6. DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; MESSICK, J. B. Canine Lymphosarcoma: Clinical features. **Compedium Continuing Education for Veterinarians**, v. 25, n. 08, p. 572 – 582, 2003.
7. DOBSON, J. M.; BLACKWOOD, L. B.; McLINNES, E. F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLILS, P.; HOATHER, T. M.; TOM, B. D. M. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, p. 377 - 384, 2001.

8. ESPOSITO, J. P.; CAMARGO, R. S.; LONGATTO FILHO, A.; di LORETO, C.; KANAMURA, C. T.; TOLOSA, E. M. C. Immunohistochemical expression of markers PCNA, Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of upper aerodigestive tract. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 27, n. 5, p. 327 – 331, 2000.
9. FISHER, S. G.; FISHER, R. I. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. **Oncogene**, v. 23, p. 6524 – 6534, 2004.
10. FISHER, D. J.; NAYDAN, D.; WERNER, L. L.; MOORE, P. P. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 24, n. 04, p. 118 – 123, 1995.
11. FOURNELL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 35 - 59, 1997a.
12. FOURNELL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; CHABANNE, J.; GHENATI, J.; MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BYRON, P. A.; FELMAN, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined *in situ* by the expression of the Ki-67 antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 61 – 72, 1997b.
13. FOURNELL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J. L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GUERNATI, I.; MAGNOL, J. P. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 92 - 109, 2002.
14. GERDES, J.; BECKER, M. H. G.; KEY, G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely tissues. **Journal of Pathology**, v. 168, n. 01, p. 85 – 87, 1992.
15. GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A. K.; CALVANSO, S. E.; MATUS, R. E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A. I.; LIEBERMAN, P. H. Lymphoma in dogs. A morphologic, immunologic and clinical study. **Cancer**, v. 66, p. 480 - 490, 1990.
16. GROVES, F. D.; LINET, M. S.; TRAIS, L. B.; DEVESA, S. S. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 15, p. 1240 – 1251, 2000.
17. HALL, P. A.; RICHARDS, M. A.; GREGORY, W. M.; D'ARDENNE, A. J.; LISTER, T. A.; STANSFELD, A. G. The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. **Journal of Pathology**, v. 154, p. 223 – 235, 1988.

18. HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; STEIAN, H.; BANKS, P. M. CHAM, J. K.; CLEARY, M. L.; DELSOL, G.; De WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K. C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group, **Blood**, v. 1, n. 84 (5), p. 1361 – 1392, 1994.
19. JACOBS, R. M.; MESSICK, J. B.; VALLI, V. E. Tumors of the hemolymphatic system. *In: MEUTEN, D.J.* Tumors in domestic animals. 4ed. Iowa: Iowa State Press, p. 19 – 198, 2002.
20. JAGIELSKI, D.; LECHOWSKI, M.; HOFFMANN-JAGIELSKA, M.; WINIARCZYK, S. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998 – 2000). **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 49, p. 419 – 424, 2002.
21. KIUPEL, M.; BOSTOCK, D.; BERGMANN, V. The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, p. 407 – 418, 1998.
22. KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 292 - 300, 1999.
23. LENNERT, K. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *In: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease: Histopathology and diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas*, **K. Lennert and N. Mohri**, ed. Springer Verlag, New York, p. 83 - 111, 1978.
24. LENNERT, K.; FELLER, A. C. **Die Kiel-Klassifikation, In: Histopathologie der non-Hodkin's Lymphome**, 2nd. Ed. K. Lennert and A.C. Feller, Eds, Springer Verlag, Berlin, p. 212 - 221, 1990.
25. LOHR, C. V.; TEIFEKE, J. P.; FAILING, K.; WEISS, E. Characterization of the proliferation state in mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 212 – 221, 1997.
26. LUKES, R. J.; COLLINS, R. D. Immunologic characterization of human malignant lymphomas, **Cancer**, v. 34, s. 4, p. 1488 - 1503, 1974.
27. MIGUEL, A. PCNA and p53. **European Journal of Cancer: Part B – Oral Oncology**, v. 31, n. 06, p. 403 – 404, 1995.
28. 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 CD2 and CD79a cell markers. **Onderspoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 309 - 313, 1996.
29. MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Retrospective study of canine lymphoma in period 1990 – 2004, North region of the of Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, suplemento, p. 46 – 52, 2007a.

30. MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Canine T-cell lymphoma: a morphological, epidemiologic and clinical study of 38 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, suplemento, p. 103 - 110, 2007b.
31. MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues *In: MOULTON, J. E.* Tumors in Domestic Animals. London: University of California Press, p. 231 - 244, 1990.
32. OWEN, L. TNM Classification of tumors in domestic animals. Geneva. **World Health Organization**, p. 46 - 47, 1980.
33. PARODI, A. L.; DARGENT, F.; CRESPEAU, F. Histological classification of canine malignant lymphomas. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, p. 178 – 192, 1988.
34. PHILLIPS, B. S.; KASS, P. H.; NAYDAN, D. K.; WINTHROP, M. D.; GRIFFEY, S. M.; MADEWELL, B. R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 111 – 117, 2000.
35. PONCE, F.; MAGNOL, J. P.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; MONFRAY, K. C.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 158 – 166, 2004.
36. PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B, CATALAN-SOARES, B. C.; MURPHY, E. L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v.24, p. 6058 – 6068, 2005.
37. RABENHORST, S. H.; BURINI, R. C.; SCHIMITT, F. C. L. Marcadores de proliferação celular. **Revista Brasileira Patologia Clinica**, v. 29, n. 01, p. 24 – 28, 1993.
38. RALLIS, T.; KOUTINAS, A.; LEKKAS, S.; PAPADIAMANTIS, C. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma), in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, p. 590 - 596, 1992.
39. RAPPAPORT, H. Malignant lymphomas: nomenclature and classification. Tumors of the hematopoietic system. **Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology**, p. 97 – 161, 1966.
40. ROBB-SMITH, A. H. U. S. National Cancer Intitute working formulation of non-Hodgkin's lymphomas for clinical use, **Lancet**, v. 21, n. 2, p. 432 – 434, 1982.
41. SEQUEIRA, J. L. FRANCO, M. Características anátomo-clínicas dos linfomas caninos. **Jornal de Anatomopatologista**, v.7. n. 2, p. 06 - 08, 1992.
42. SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P.; FIGUEIREDO, L. M. A.; ROCHA, N. S.. Características Anatomoclínicas dos Linfomas Caninos na região de Botucatu/SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 245 -249, 1999.

43. SUEIRO, F. A. R.; Linfomas caninos : estudo morfológico e imunoistoquímico de 55 casos e correlação da imunoposição da proteína P53. **Campinas, 2004**. Tese apresentada na Universidade de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
44. SUZANO, S. M. C. Classificação citológica e imunocitoquímica dos linfomas caninos. **Botucatu, 2004, 110p**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.
45. SUZANO, S. M. C.; SEQUEIRA, J. L.; PESSOA, A. W. P.; PORTO, C. D.; OLIVEIRA, D. E. Cell proliferation in canine lymphoma. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, n. 04, p. 313 – 319, 2008.
46. TESKE, E.; van HEERDE, P.; RUTTEMAN, G. R.; KURZMAN, I.; MOORE, P. F.; MacEWEN, E. G. Prognostic factors in canine non-Hodgkin's lymphoma: a prospective study in 138 dogs. *In: Non-Hodgkin's lymphoma in the dog: characterization and experimental therapy*, E. Teske, ed. Proefschrift Universiteit Utrecht, p. 83 – 100, 1993.
47. TESKE, E. Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. **Veterinary Quarterly**, v.16, s. 1. p. 29 – 30, 1994a.
48. TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n.4, p. 209 - 219, 1994b.
49. TESKE, E.; van HEERDE, P.; RUTTEMAN, G. R.; KURZAMAN, D. I.; MOORE, P.F.; MacEWEN, G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1722 - 1728, 1994.
50. TESKE, E.; van HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 03, p. 112 – 115, 1996.
51. TIPOE, G. L.; JIN, Y.; WHITE, F. H. The relationship between vascularity and cell proliferation in human normal and pathological lesion of the oral cheek epithelium. **Oral Oncology European Journal Cancer**, v. 32B, n. 01, p. 24 – 31, 1996.
52. VAIL, D. M.; KISSEBERTH, W. C.; OBRADIVICH, J. E.; MOORE, F. M.; LONDON, C. A.; MacEWEN, E. G.; RITTER, M. A. Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. **Experimental Hematology**, v. 24, p. 807 – 815, 1996.
53. WANG, S. A.; WANG, L.; HOCHBERG, E. P.; MUIKANSKY, A.; HARRIS, N. L.; HASSERJIAN, R. P. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation indice: Morphologic an clinical features. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 29, p. 1490 – 1496, 2005.

54. ZACCHETTI, A.; van GARDEREN, E.; TESKE, E.; NEDERBRAGT, H.; DIERENDONCK, J.H.; RUTTEMAN, G.R. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparasion of Ki-67 an proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine lelabelling by immunihisticchemistry. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 111, p. 430 – 438, 2003.

5 CONCLUSÃO

- O linfoma cutâneo é mais freqüente em nossa região comparado a outras localidades.
- Cadelas representam a maioria entre os cães com linfoma cutâneo, devendo ser melhor investigada a influência de hormônios sexuais na ocorrência de determinadas apresentações do linfoma.
- Raças de pequeno porte apresentaram maior frequência de linfoma cutâneo em nossa região, porém deve-se destacar que são raças mais populares em nosso meio.
- Não houve diferença entre a ocorrência de linfoma cutâneo epiteliotrópico e a de não epiteliotrópicos
- Linfoma multicêntrico teve maior ocorrência em raças definidas e de grande porte.
- Há maior ocorrência de linfoma de alto grau assim como de células T na apresentação multicêntrica em nossa região.
- Presença de significância estatística ao associar o grau de malignidade com o índice de proliferação celular pelo PCNA ao considerar apenas as células fortemente marcadas como positivas.
- Presença de significância estatística ao associar o grau de malignidade com o índice de proliferação celular pelo Ki-67.
- Ausência de significância estatística ao associar o índice de proliferação celular pelo PCNA e Ki-67 com o fenótipo do linfoma multicêntrico.

REFERÊNCIAS

1. ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de Imnuo-histoquímica**. 1ª Ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, p. 270, 1999.
2. BAUER, N.B.; ZERVOS, D.; MORTIZ, A. Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki-67 equally reflect proliferation in fine aspirates of normal, hiperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n = 101). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 928 – 935, 2007.
3. CROW, S. E. Lymphosarcoma (malignant lymphoma) in the dog: diagnosis and treatment. **The Compendium on Continuing Education**, v. 4, n. 4, p. 283-292, 1982.
4. DAY, M. J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, p. 79 - 96, 1995.
5. De MOURA, V.M.B.D. Classificação citohistológica e imunofenotipagem dos linfomas caninos. **Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Botucatu – SP, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área de concentração em Ciência Veterinária)**, n. 4921, 2000.
6. De MOURA, V.M.B.D.; SEQUEIRA, J.L.; AMORIN, R. L.; BANDARRA, E.P. Aspectos Epidemiológicos dos Linfomas Caninos – Na região de Botucatu -SP. **Nosso Clínico**, n. 31, p. 32 - 40, 2003.
7. DeBOER, D. J.; TURREL, J. M.; MOORE, P.F. Mycosis fungoides in a dog: demonstration of T-cell specificity and response to radiotherapy. **Journal of the Americam Animal Hospital Association**, v. 26, p. 566 - 572, 1990.
8. DOBSON, J. M.; BLACKWOOD, L. B.; McLINNES, E. F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLILS, P.; HOATHER, T. M.; TOM, B. D. M. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, p. 377 - 384, 2001
9. ESPOSITO, J.P.; CAMARGO, R.S.; LONGATTO FILHO, A.; di LORETO, C.; KANAMURA, C.T.; TOLOSA, E.M.C. Immuistochemical expression of markers PCNA, Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of upper aerodigestive tract. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 27, n. 5, p. 327 – 331, 2000.
10. FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma **Veterinary Medicine**, p. 58 - 65, 2002.
11. FURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 35 - 59, 1997a.

12. FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; CHABANNE, J.; GHENATI, J.; MARCHAL, T.; BONNEFOND, C.; BYRON, P.A.; FELMAN, P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined *in situ* by the expression of the Ki-67 antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 61 – 72, 1997b.
13. FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J. L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GUERNATI, I.; MAGNOL, J. P. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 92 - 109, 2002.
14. FRENCH, R. A.; SEITZ, S. E.; VALLI E. O. Primary epitheliotropic alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 33, 349 - 352, 1996.
15. GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A K.; CALVANSO, S. E.; MATUS, R. E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A I.; LIEBERMAN, P. H. Lymphoma in dogs. A morphologic, immunologic and clinical study. **Cancer**, v. 66, p. 480 - 490, 1990.
16. GRIFFEY, S.M.; KRAEGEL, S.A; MADEWELL, B.R. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67 (MIB-1) and mitotics counts. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 321 - 332, 1999.
17. HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIAN, H.; BANKS, P.M.; CHAM, J.K.; CLEARY, M.L; DELSOL, G.; De WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group, **Blood**, v. 1, n. 84 (5), p. 1361 – 1392, 1994.
18. KELLEY, L.C.; MAHAFFEY, E.A. Equine malignant lymphomas: morphological and immunohistochemical classification. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 241-252, 1998.
19. KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 292-300, 1999.
20. LENNERT, K. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *In*: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease: Histopathology an diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas, **K. Lennert and N. Mohri**, Springer Verlag, New York, p. 83 - 111, 1978.
21. LENNERT, K.; FELLER, A.C. Die Kiel-Klassifikation, *In*: Histopathologie der non-Hodkin's Lymphome, 2nd. Ed. **K. Lennert and A.C. Feller**, Eds, Springer Verlag, Berlin, p. 212 - 221, 1990.
22. LUKES, R.J.; COLLINS, R.D. Immunologic characterization of human malignant lymphomas, **Cancer**, v. 34, s. 4, p. 1488 - 1503, 1974.
23. MELLANBY, R.J.; HERRTAGE, M.E.; DOBSON, R.J. Treatment of canine lymphoma by veterinarians in first opinion practice in England. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 198 - 202, 2002.

24. 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 CD2 and CD79a cell markers. **Onderspoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 309 - 313, 1996.
25. MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Retrospective study of canine lymphoma in period 1990 – 2004, north region the of Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, suplemento, p. 46 – 52, 2007a.
26. MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Canine T-cell lymphoma: a morphological, epidemiologic and clinical study of 38 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, suplemento, p. 103 - 110, 2007b.
27. OWEN, L. TNM Classification of tumors in domestic animals. Geneva. **World Health Organization**, p. 46 – 47, 1980.
28. PHILLIPS, B.S.; KASS, P.H.; NAYDAN, D.K.; WINTHROP, M.D.; GRIFFEY, S.M.; MADEWELL, B.R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 111 – 117, 2000.
29. RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHIMITT, F.C.L. Marcadores de proliferação celular. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 29, n. 01, p. 24 – 28, 1993.
30. RALLIS, T.; KOUTINAS, A.; LEKKAS, S.; PAPADIAMANTIS, C. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma), in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, p. 590 - 596, 1992.
31. RAPPAPORT, H. Malignant lymphomas: nomenclature and classification. Tumors of the hematopoietic system. **Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology**, p. 97 – 161, 1966.
32. RASSNICK, K.M.; MAULDIN, G.E.; AK-SARRAF, R.; MAULDIN, G. N.; MOORE, A. S.; MOONEY, S. C. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, MOOP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000), v. 16, p. 576 - 580, 2002.
33. ROBB-SMITH, A.H. U.S. National Cancer Institute working formulation of non-Hodgkin's lymphomas for clinical use, **Lancet**, v, 21, n. 2, p. 432 – 434, 1982.
34. SUEIRO, F.A.R. Linfomas caninos: estudo morfológico e imuno-histoquímico de 55 casos e correlação da imunoexpressão da proteína p53. **Tese apresentada na Universidade de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas**, 2004.
35. SUZANO, S.M.C. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do p53 nos linfomas caninos. **Botucatu, 2007**. Tese apresentada na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
36. TESKE, E. Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. **Veterinary Quarterly**, v.16, s. 1. p. 29 – 30, 1994a.

37. TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 4, p. 209 - 219, 1994b.
38. TESKE, E.; van HEERDE, P.; RUTTEMAN, G. R.; KURZAMAN, D. I.; MOORE, P.F.; MacEWEN, G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1722 - 1728, 1994.
39. TESKE, E.; van HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 03, p. 112 – 115, 1996.
40. THRALL, M.; MACY, D.W.; SNYDER, S. P.; HALL, R. L. Cutaneous lymphosarcoma and leukemia in a dog resembling Sézary syndrome in man. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 182 - 186, 1984.
41. VAIL, D.M.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors: Canine lymphoma and lymphoid leukemia. *In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4ed. St. Louis: Missouri State, p. 699 – 733, 2007.
42. ZACCHETTI, A.; van GARDEREN, E.; TESKE, E.; NEDERBRAGT, H.; DIERENDONCK, J.H.; RUTTEMAN, G. R. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparasion of Ki-67 an proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine lelabelling by immunihisticchemistry. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 111, p. 430 – 438, 2003.