

FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO

***LINFOMAS CANINOS: ESTUDO MORFOLÓGICO E
IMUNOISTOQUÍMICO DE 55 CASOS E CORRELAÇÃO
DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53***

CAMPINAS

2004

FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO

***LINFOMAS CANINOS: ESTUDO MORFOLÓGICO E
IMUNOISTOQUÍMICO DE 55 CASOS E CORRELAÇÃO COM
DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de
Campinas para obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica.*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ VASSALO

CAMPINAS

2004

DE PC
 AMADA UNICAMP
24L
 EX
 O BC/ 60605
16.11.04
☐ ☒ ☐ ☒
 O 14.05
17.12.04
 D
 Id 331149

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

Su 24L

Sueiro, Felipe Augusto Ruiz

Linfomas caninos: estudo morfológico e imunoistoquímico de 55 casos e correlação da imunoexpressão da proteína p53 / Felipe Augusto Ruiz Sueiro. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : José Vassallo

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cão. 2. Linfoma. 3. Classificação. 4. Genes p53. 5. Fenótipo. 6. Linfoma – imunologia. I. José Vassallo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

SLP

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>vi</i>
ABSTRACT	<i>viii</i>
INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DE LITERATURA	12
O gene p53	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL E MÉTODOS	19
Animais	20
Estudo Morfológico	20
Imunoistoquímica	20
Avaliação Imunoistoquímica.....	22
Análise Estatística.....	22
Aprovação pelo Comitê de Ética.....	23
RESULTADOS	24
Linfomas não Hodkin.....	25
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
Figura 1 Neoplasia de origem mielóide/histiocitária (H.E. e imunomarcção para mieloperoxidase e lisozima).....	25
Figura 2 Apresentação clínica do linfoma multicêntrico.....	26
Figura 3 Linfoma linfoplasmocítico (H.E.).....	27
Figura 4 Linfoma difuso de grandes células B (H.E.).....	28
Figura 5 Linfoma difuso de grandes células B. Imunomarcção para CD79a.....	28
Figura 6 Linfoma T periférico SOE (H.E.).....	29
Figura 7 Linfoma T periférico SOE. Imunomarcção para CD3.....	29
Figura 8 Linfoma de grandes células anaplásicas de imunofenótipo T (H.E.).....	29
Figura 9 Imunomarcção para p53 (Linfoma difuso de grandes células B)...	30

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar o imunofenótipo dos linfomas caninos (LC) classificados de acordo com a nomenclatura da OMS para animais domésticos e correlacionar estes achados com a imunexpressão da proteína p53. A imunofenotipagem dos linfomas foi feita utilizando-se anticorpos anti-CD79a, CD3 e proteína p53, em cortes de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Dentre os 55 casos, 40 (72,7%) apresentaram imunofenótipo B, 12 (21,8%) imunofenótipo T e três (5,4%) foram linfomas não-B-não-T. Entre os linfomas de células B, 31 eram difusos de grandes células, 6 linfoplasmocíticos, um linfocítico, um folicular (grau II) e um inclassificado de baixo grau histológico. Um dos linfomas T-periféricos apresentou morfologia consistente com linfoma de grandes células anaplásicas. A imunomarcagem para a proteína p53 foi positiva em 24 linfomas B e 7 linfomas T. Os linfomas com alto grau histológico apresentaram positividade para p53 significativamente mais alta ($p=0,01$). A positividade para a p53 (mais que 10% de células positivas) tendeu a se correlacionar com o imunofenótipo T ($p=0,06$). A idade média dos pacientes foi significativamente mais alta nos casos positivos para a p53 ($p=0,02$). Estes dados são comparáveis com os resultados de linfomas humanos e corroboram a noção de que alguns LC compartilham similaridades na patogênese com os correspondentes humanos e, portanto, esquemas terapêuticos semelhantes poderiam ser efetivos.

Palavras-chave: linfomas caninos; imunoistoquímica; CD79a; CD3; proteína p53.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to determine the immunophenotype of canine lymphomas (CL) classified according to the WHO nomenclature for domestic animals and to correlate these findings with the immunoexpression of p53 protein. Immunophenotyping of lymphomas used antibodies to CD79a, CD3, and p53 protein, suitable for paraffin wax-embedded tissue sections. Among 55 cases, 40 (72.7%) were of the B-cell phenotype, 12 (21.8%) of a T-cell phenotype and three (5.4%) were non-B-non-T lymphoma. Among the B-cell lymphomas, 31 were large B-cell lymphomas, 6 lymphoplasmacytic, one lymphocytic, one follicular (grade II) and one unclassified low-grade. One of the peripheral T-cell lymphomas had morphology consistent with anaplastic large cell lymphoma. Immunolabelling for p53 occurred in 24 B-cell and 7 T-cell lymphomas. Lymphomas with high grade histology had significantly higher frequency of p53 positivity ($p=0.01$). Positivity for p53 (more than 10% positive cells) tended to correlate with the T-cell phenotype ($p=0.06$). Mean patient age was significantly higher in p53 positive cases ($p=0.02$). These data are comparable to results in human lymphomas and corroborate the notion that some CL share many similarities in pathogenesis with man and therefore similar therapeutic regimes may be effective.

Keywords: canine lymphomas; immunohistochemistry; CD79a; CD3; p53 protein.

INTRODUÇÃO

Há fortes indícios que a incidência de neoplasias nos animais domésticos, principalmente nos de estimação, vem aumentando ano a ano (PRIESTER, 1980). Essa maior incidência tem sido atribuída a uma maior expectativa de vida desses animais, e também por uma maior convivência dos animais com o homem. Por esta razão, os animais estariam tão sujeitos à ação de carcinógenos quanto ao homem. Não se deve deixar de lado também o fato de que os meios de diagnóstico de neoplasias têm sido aprimorados, recebendo maior atenção por parte dos profissionais veterinários, levando a um aparente aumento da incidência.

Dados evidenciam que cães desenvolvem neoplasias mais freqüentemente que a população humana: 360 casos/100.000 cães; 272 casos/100.000 homens; 264,3 casos/100.000 gatos (PRIESTER, 1980).

Juntamente com esse aumento na incidência das neoplasias nos animais, há também um avanço nas técnicas de diagnóstico e tratamento dessas entidades, requerendo cada vez mais um refinamento por parte do patologista veterinário e também do clínico veterinário a fim de se estabelecer novos critérios de classificação e estágio dos tumores. Por outro lado, estudos em Patologia Comparada vêm ganhando grande importância, principalmente na área da Oncologia, onde existe um interesse cada vez maior em se correlacionar a etiologia e as características das neoplasias nos animais e no homem a fim de se abrirem novas perspectivas no tratamento desse grupo de enfermidades.

Exemplo disso é o linfoma canino, um tumor freqüente que pode ter diferentes prognósticos, dependendo do seu tipo e imunofenótipo e que pode contribuir muito para os estudos sobre a patogênese dessa entidade e também para novas perspectivas de tratamento, trazendo benefícios para ambas espécies.

*REVISÃO DA
LITERATURA*

Tumores do sistema linfático e hematopoiético estão entre os tumores mais freqüentes em Medicina Veterinária (MADEWELL, 1985). O linfoma canino é muito similar em sua apresentação clínica, histopatológica e comportamento biológico aos linfomas não-Hodgkin (LNH) humanos.

O linfoma canino representa a terceira neoplasia mais comum em cães, representando 83% de todas as neoplasias hematológicas em cães (DORN *et al*; 1967 COUTO, 1985). A taxa de incidência anual foi calculada como 13 a 24 por 100.000 cães (BÄCKGREN, 1965; DORN *et al*, 1967). Acometendo mais freqüentemente cães com idade entre 5 a 10 anos, indistintamente machos e fêmeas. As raças Boxer, Scottish terriers, Bullmastiff, São Bernardo, Airedale terriers e Bulldogs são indicadas como as mais afetadas por essa neoplasia (MULLIGAN, 1949; PRIESTER, 1967; PRIESTER, 1980; VELDHOEN, 1998;).

Uma possível etiologia viral para esse tumor é constantemente sugerida (DORN *et al.*, 1967; ARMSTRONG *et al.*, 1978; HOHENHAUS *et al*, 1989; SQUIRES *et al*, 1990). Porém nunca comprovada (KAPLAN, 1978; SAFRAN *et al*, 1992).

Duas formas anatômicas do linfoma ocorrem predominantemente: a multicêntrica e a gastrointestinal (WEIPERS *et al*; 1964 JARRET *et al*, 1966), as formas tímica, cutânea e leucêmica são raras.

A forma multicêntrica é a mais comum, ocorrendo o envolvimento bilateral de quase todos os linfonodos superficiais e profundos, além do fígado e baço. Outros tecidos que podem estar envolvidos são rins, coração, pâncreas e medula óssea. Pode haver o envolvimento ocasional do olho, pele, musculatura esquelética e, raramente do sistema nervoso central. Paralisia causada pelo comprometimento da medula espinhal também foi relatado (GUPTA *et al*, 1970).

Clinicamente a forma multicêntrica se caracteriza por uma linfadenopatia periférica, indolor, onde os linfonodos se apresentam firmes, móveis e com cápsula tensa, podendo ou não estar associado a hepatomegalia e esplenomegalia. Os sinais clínicos dessa

entidade são variáveis e podem incluir letargia, anorexia, poliúria e/ou polidipsia, diarreia e episódios de êmese (MOULTON & HARVEY, 1990).

Na forma gastrointestinal todos os linfonodos mesentéricos estão comprometidos, porém os linfonodos superficiais não são afetados e o baço é raramente acometido.

Outros achados laboratoriais nos cães portadores de linfoma incluem imunossupressão, anemia (WELDEN *et al*, 1974; SCHALM *et al*, 1975), gamopatias mono e policlonais (MACEWEN & HURVITZ, 1977), glomerulonefrites (WILLERD *et al*, 1981), alterações nos níveis de eritropoietina e hipercalcemia (NELSON *et al*, 1983).

Uma divisão em linfomas caninos não-Hodgkin e linfomas de Hodgkin canino, semelhante à humana parece ser inapropriada, pois a existência de linfomas do tipo Hodgkin em cães ainda é controversa (MOULTON & HARVEY, 1990). O termo linfoma maligno canino é o termo mais usado internacionalmente para tumores de origem linfática em órgãos sólidos (linfonodos, fígado, baço), mas os termos “linfoma canino” e “linfossarcoma canino” são usados com sinônimos em diferentes países. Diversos trabalhos tentaram estabelecer a relação da classificação histológica do linfoma canino, pelas classificações de Kiel, Rappaport, Lukes-Collins com o prognóstico dessa neoplasia, porém os resultados são conflitantes (PAUL, 1990).

Estudos anteriores mostraram que os linfomas caninos são, em sua maioria de imunofenótipo B, em especial de grandes células, utilizando as classificações anteriores de linfomas não Hodgkin (WELLER *et al*, 1980; GREENLEE *et al*, 1990; TESKE *et al*, 1994c; CANIATTI *et al*, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al*, 1997). Os linfomas caninos, como os humanos (JAFFE *et al*, 2001), foram recentemente classificados de acordo com critérios morfológicos e imunofenotípicos, estabelecendo-se uma nova lista de entidades aceitas entre as neoplasias hematológicas (VALLI *et al*, 2002). Por causa de semelhanças morfológicas e imunofenotípicas, os linfomas caninos foram propostos como modelo animal para seus correspondentes humanos (OWEN *et al*, 1975; HAYES, 1978). Contudo, por ser recente, estudos baseados na nova nomenclatura da OMS para linfomas caninos são inexistentes.

Do ponto de vista genético, um risco relativo aumentado foi relatado entre algumas raças de cães, como Boxer, São Bernardo, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier e Bulldogs, enquanto há um risco reduzido em outras raças, como Dachshunds e Pomeranian (TESKE, 1994a).

A biologia molecular dos linfomas caninos tem sido estudada superficialmente. Um elevado risco de linfoma foi descrito em uma família de cães Bullmastiff na Grã-Bretanha, o que sugere fatores genéticos na patogênese desta doença (ONIONS, 1984). Trabalhos evidenciam também que aberrações cromossômicas numéricas e estruturais estão envolvidas na origem de casos espontâneos de linfoma canino (HAHN *et al*, 1994).

O gene p53

O gene p53 age com um gene supressor tumoral, cuja função está freqüentemente comprometida nas neoplasias hematológicas e não hematológicas humanas (NIGRO, 1989; WEINBERG *et al*, 1991; OREN *et al*, 1992 GREENBLATT *et al*, 1994). As alterações genéticas do p53 nos tumores humanos incluem perdas alélicas, mutações com troca de um aminoácido ou desvio de leitura e deleções intragênicas. Mutações do p53 são encontradas em aproximadamente 50% das neoplasias humanas (NIGRO *et al*, 1989; HARRIS *et al*, 1993; CHANG *et al*, 1995), sendo a maioria delas constituída por substituições de bases, que levam à produção de uma proteína incapaz de se ligar ao DNA ou de ativar a transcrição de genes alvos (VOGELSTEIN *et al*, 1992; HARRIS *et al*, 1993).

O gene p53 codifica uma proteína de 53kD, que está envolvida na transcrição gênica, síntese, reparo de DNA e apoptose (LEVINE *et al*, 1991; HARRIS *et al*, 1993). Sua principal função é interromper a replicação celular no ponto de checagem G₁/S do ciclo celular e secundariamente em G₂/M (SUGRUE *et al*, 1997), na presença de DNA danificado por estímulos mutagênicos físicos e químicos (FORRESTER *et al*, 1996; CALMELS *et al*, 1997).

A interrupção do ciclo celular em resposta aos estímulos citotóxicos permite o reparo dos danos do DNA e é fundamental para a estabilidade genética e viabilidade de células danificadas. A progressão do ciclo celular para a fase S após lesão do DNA, com a que ocorre em células tumorais com p53 mutante, leva à transmissão de mutações para outras células, desencadeando o processo neoplásico (VELCULESCU *et al*, 1996).

Em Medicina Veterinária a identificação de aberrações do gene supressor tumoral p53 foi demonstrada em linfomas caninos, bem como em outras neoplasias caninas (GAMBLIN *et al*, 1997; VELDHOEN *et al*, 1998; SETOBUCHI *et al*., 2001). Contudo, estes estudos sobre a proteína p53 em linfomas caninos não correlacionaram os achados com a sua imunomorfologia.

Enfim, o presente estudo insere-se no seguinte contexto:

- Os cães, principalmente os domésticos, compartilham o mesmo meio ambiente do homem, estando sujeitos a vários agentes carcinogênicos comuns;
- Os linfomas caninos apresentarem semelhanças clínicas, patológicas e imunofenotípicas com os correspondentes humanos; por outro lado, algumas diferenças estão por ser exploradas (e. g., etiologia viral);
- Alterações moleculares foram pouco exploradas nos linfomas caninos, em comparação com os correspondentes humanos (e. g., p53);
- Avanços diagnósticos e terapêuticos podem ser compartilhados entre estas espécies;
- Os linfomas caninos podem representar potencial modelo para estudos de patogênese e terapêutica dos correspondentes humanos;
- O aprofundamento do estudo morfológico, imunofenotípico e de aspectos moleculares dos linfomas caninos podem contribuir para o avanço da Patologia Comparada.

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é determinar o imunofenótipo de linfomas caninos atendidos no serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal, avaliando a aplicabilidade da nomenclatura da Organização Mundial de Saúde para Neoplasias Hematopoéticas dos Animais Domésticos (VALLI *et al*, 2002) e correlacionar esses achados com a imunexpressão da proteína p53.

***MATERIAL E
MÉTODO***

Animais

Foram estudados 65 casos diagnosticados como linfoma canino pelo Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, durante o período de 1990 a 2000. Os dados sobre a idade, gênero do animal e localização da neoplasia foram obtidos das pastas clínicas dos animais.

Estudo morfológico

Fragmentos dos respectivos casos fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina foram submetidos ao estudo morfológico e imunoistoquímico. Cortes histológicos dos blocos de parafina de 5 micrômetros de espessura processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE) foram utilizados para o estudo morfológico, seguindo os critérios da Organização Mundial de Saúde para Classificação dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos (Valli et al, 2002).

Imunoistoquímica

Cortes histológicos do mesmo material incluído em parafina foram obtidos e colocados sobre lâminas previamente lavadas e desengorduradas e tratadas em solução de organossilano (3-aminopropiltriethoxissilano, SIGMA, St. Louis, MO, USA, cód. A3648) em 20% de acetona. Em seguida, os cortes foram mantidos em estufa a 100°C durante uma hora. Após esse procedimento os cortes foram submetidos à desparafinação com xilol e reidratação em gradiente decrescente de álcool, até a concentração de 50%. Cada um destes banhos foi feito por 5 minutos. Seguiu-se lavagem em água destilada.

A seguir, foram feitas incubações dos cortes subsequentemente:

- a. Imersão em solução de peróxido de hidrogênio 30%, três banhos de 3 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena, seguida de duas lavagens de 5 minutos em tampão fosfato salino pH 7,6 (doravante denominado PBS).

- b. Recuperação antigênica em calor úmido usando o tampão citrato 10 mM, pH 6,0 a 90° C em uma panela a vapor [Steam Cuisine 700 Hi Speed – T-Fal®], durante 35 minutos.
- c. Esfriamento em temperatura ambiente, por 20 minutos, seguido de duas lavagens de 5 minutos em PBS.
- d. Incubação, por toda a noite (18 horas) a 6° C (geladeira comum), com os seguintes anticorpos primários diluídos em soro albumina bovina (1% BSA em PBS): anti-CD79a (Dakopatts, Carpenteria, CA, USA, monoclonal produzido em camundongo, clone: HM57), diluição 1:50; anti-CD3 (Dakopatts, policlonal produzido em coelho, cód. A0452), diluição de 1:50; anti-myeloperoxiydase (Dakopatts, policlonal, produzido em coelho, cód. A398), diluição de 1:400; anti-lisozima (Dakopatts, policlonal, produzido em coelho, cód. A099), diluição de 1:400; anti-CD30 (Dakopatts, monoclonal, produzido em camundongo, clone: Ber-H2), diluição de 1:50; e anti-proteína p53 (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra, policlonal, produzido em coelho, clone CM1), diluição de 1:100. No dia seguinte, o excesso de anticorpo foi retirado dos cortes e realizaram-se duas lavagens de 5 minutos em PBS.
- e. Aplicação do sistema de detecção e amplificação do sinal EnVision-peroxidase (Dakoppats, cód. K1491). Exceção feita para o anticorpo anti-CD-79a, onde a detecção e amplificação da reação foi realizada pelo sistema de amplificação catalisado pela tirosina, CSA (Catalized Signal Amplification-Peroxidase, Dakopatts, cód. K1500), segundo recomendações do fabricante.
- f. Revelação da peroxidase através da reação com 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, EUA, cód. D5637) a 3% em PBS, por 5 minutos a 37° C.
- g. Lavagem em água corrente por 5 minutos.

- h. Contracoloração com hematoxilina de Harris diluída a 50% em água destilada por 1 minuto.
- i. Lavagem em água corrente para retirada do excesso de corante.
- j. Desidratação dos cortes em gradiente crescente de álcoois, clarificação em xilol e montagem com lamínula em meio permanente Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha, cód. 7961)

Avaliação Imunoistoquímica

A avaliação da imunomarcção foi realizada em microscópio óptico e os tumores eram considerados de imunofenótipo B quando pelo menos 10% das células neoplásicas reagiam exclusivamente para o CD79a, e imunofenótipo T quando pelo menos 10% das células reagiam exclusivamente para o CD3. Ambos os marcadores apresentam reatividade transmembrana celular. Os anticorpos anti-lisozima e anti-mieloperoxidase mostraram reatividade intracitoplasmática, de aspecto granular.

A avaliação das células neoplásicas positivas para a proteína p53 (marcação nuclear, independentemente do grau de reatividade) foi feita de forma semiquantitativa, onde os casos totalmente negativos recebiam o grau 0, os casos com positividade até 10% das células marcadas recebiam grau 1, e os casos com mais que 10% das células positivas recebiam grau 2.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa SAS (Statistical Analysis System), através dos testes de Qui-quadrado, Teste Exato de Fisher ou Teste de Mann-Whitney (valor de $p < 0,05$).

Aprovação pelo Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), protocolo no. 269-1, fornecido em 05 de julho de 2001.

RESULTADOS

Após a marcação imunoistoquímica, 55 casos foram confirmados como linfoma não-Hodgkin. Dez casos foram classificados como tumores de origem mielóide/histiocitária (positividade exclusiva para anticorpos anti-mieloperoxidase e/ou anti-lisozima) (Figura 1).

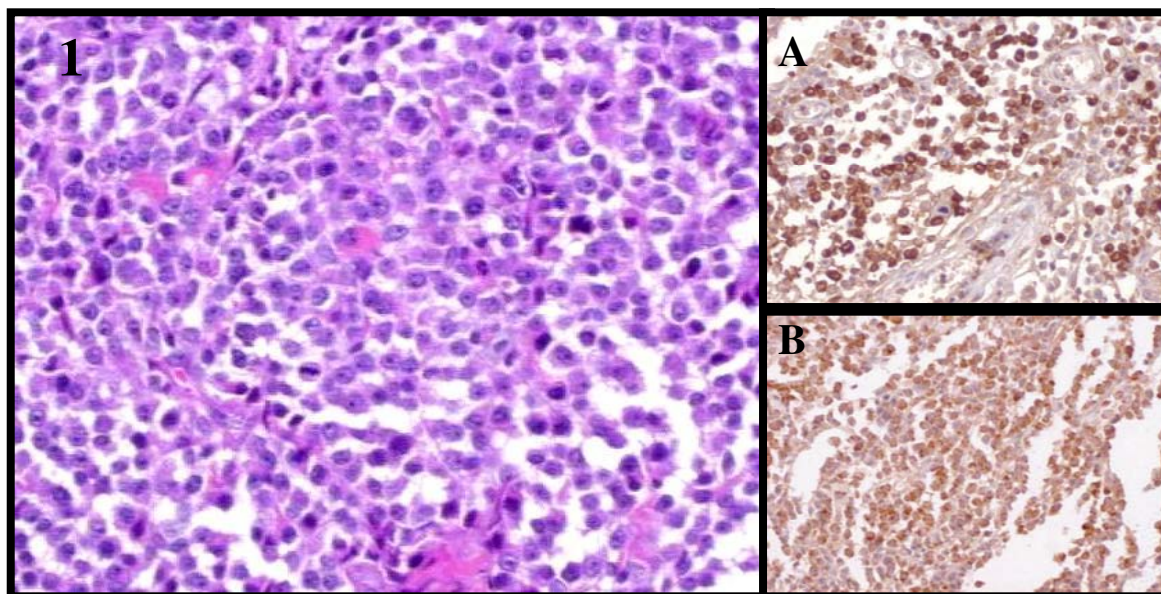


Figura 1-Neoplasia de células redondas de origem mielóide/histiocitária (H.E. 400x). *Inset* A: marcação para mieloperoxidase (100x). *Inset* B: marcação para lisozima (100x).

Linfomas não Hodgkin

Os resultados a seguir dizem respeito apenas ao objeto deste estudo, que foram os casos de linfomas caninos.

Dentre os cães acometidos por linfoma figuravam as raças: Boxer, 9 animais (16,3%); Cocker, 5 animais (9,1%); Pastor Alemão, 6 animais (10,9%); Rottweiler, 4 animais (7,2%); Poodle, 3 animais (5,4%); Fila Brasileiro, 2 animais (3,6%); Pinscher, 2 animais (3,6%); outras raças, 6 animais (10,9%): Tecke, Basset Hound, Doberman, Fox Paulistinha, Dogue Alemão, Tenerife, cada uma com um animal e 18 animais sem raça definida (SRD, 39,7%).

Dos 55 casos analisados, 34 (61,8%) eram machos e 21 (38,2%) fêmeas.

A média de idade desses animais foi de 6,58 anos (DP:3,2), sendo a distribuição por faixa etária: 20 animais (36,3%) entre 1 e 5 anos, 29 animais (52,7%) entre 6 e 10 anos e 6 animais (11%) com idade acima de 10 anos.

A apresentação clínica do linfoma foi multicêntrica em 41 cães (74,5%), cutânea em 7 (12,7%), esplênica em 3 (5,4%), gastrointestinal em 2 (3,6%), hepática em 1 (1,8%) e em um linfonodo cervical isolado em 1 (1,8%). (Figura 2).

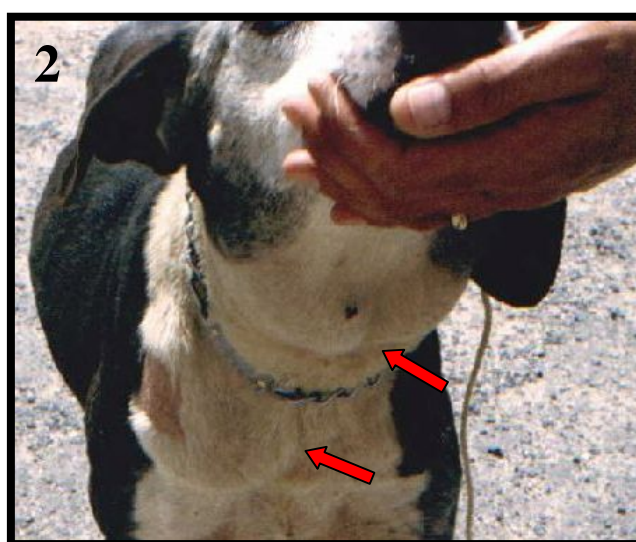


Figura 2-Apresentação clínica do linfoma multicêntrico. Observar linfadenomegalia de linfonodos submandibulares e retro-escapulares (setas).

Entre os 55 casos, 40 (72,7%) apresentaram imunofenótipo B e 12 (21,8%) imunofenótipo T. Em 3 casos (5,4%), todos com morfologia de alto grau, nenhuma marcação imunoistoquímica foi detectada (negativos para CD79a, CD3; lisozima, mieloperoxidase) e o imunofenótipo ficou indeterminado.

Os linfomas B foram caracterizados como linfomas de baixo grau histológico em 9 casos (16,3%): 1 linfocítico, 6 linfoplasmocíticos, 1 folicular e 1 não-classificado (Figura 3).

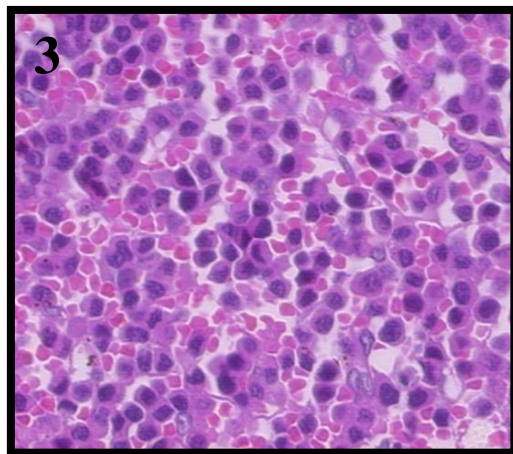


Figura 3-Linfoma linfoplasmocítico. Observar núcleo excêntrico e citoplasma basofílico (H.E. 400x).

Trinta e um casos (56,3%) foram classificados como linfomas B de alto grau histológico (Figuras 4; 5). A maioria dos linfomas de baixo grau apresentaram diferenciação plasmocítica (6 de 9 ou 66,6%) e diferenciação plasmoblástica foi observada em 12 dos 31 casos de linfomas difusos de grandes células B (38,7%). O único caso diagnosticado como linfoma folicular foi graduado como II (presença de 8 a 15 blastos por campo de grande aumento - 400x).

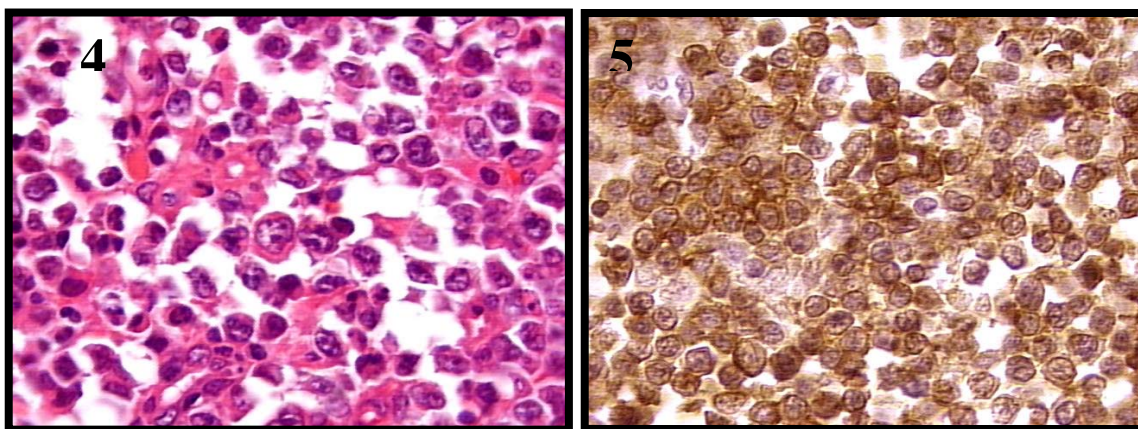


Figura 4-Linfoma difuso de grandes células B. Observar alto pleomorfismo nuclear (H.E. 1000x).

Figura 5-Linfoma difuso de grandes células B, imunomarcação para CD79a. Observar forte marcação transmembrana (1000x)

Entre os linfomas de células T, apenas 1 caso (1,8%) apresentou histologia de baixo grau e 11 casos (20%) apresentaram-se de alto grau histológico (Figuras 6; 7). Em 1 dos casos de linfoma T foi observada morfologia consistente com linfoma de grandes células anaplásicas, porém não houve reatividade para o marcador CD30 (Figura 8). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos de alto e baixo graus histológico quando a idade dos animais foi considerada ($p= 0.73$).

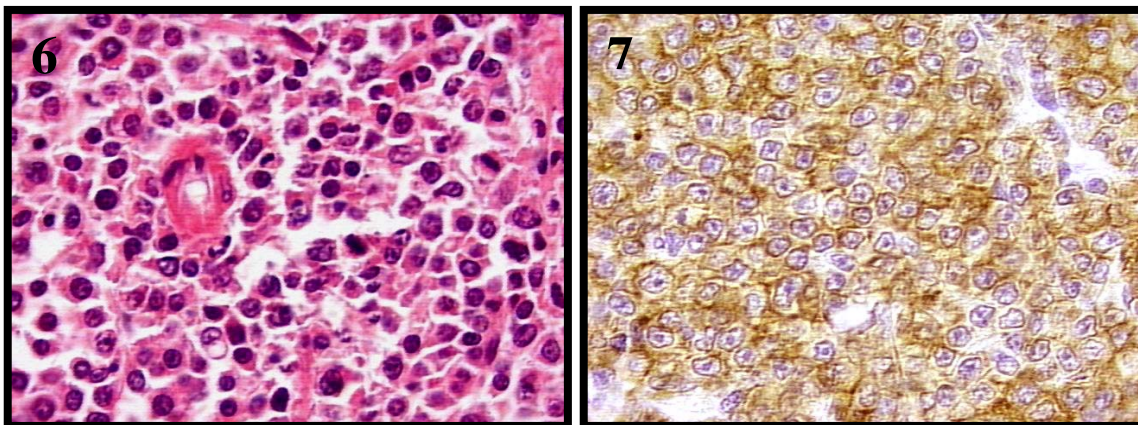


Figura 6-Linfoma T periférico SOE, (H.E. 1000x).

Figura 7-Linfoma T periférico SOE, imunomarcação para CD3. Observar forte marcação transmembrana (1000x).

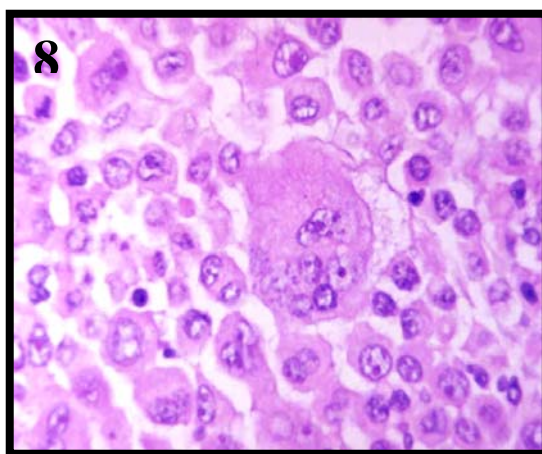


Figura 8-Linfoma de grandes células anaplásicas de imunofenótipo T. Observar alto pleomorfismo nuclear e presença de células multinucleadas (H.E. 1000x).

Imunoistoquímica para proteína p53

A marcação imunoistoquímica para a proteína p53 foi realizada em apenas 52 casos com imunofenótipo confirmado como B ou T (Figura 9). A imunopositividade para

p53 ocorreu em 24 de 40 (60%) linfomas B: em 14/40 (35%) desses casos, a marcação esteve presente em mais de 10% das células neoplásicas (grau 2), e em 10 casos a marcação foi evidente em menos que 10% das células neoplásicas (grau 1).

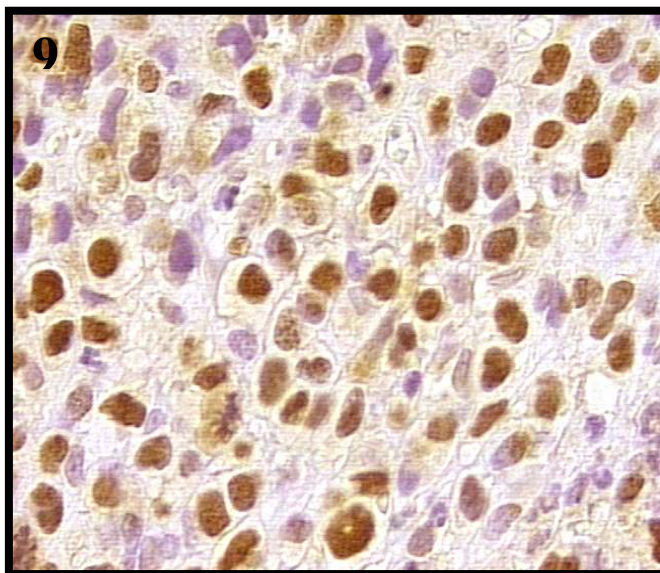


Figura 9-Imunomarcção nuclear para p53 em um caso de linfoma difuso de grandes células B (1000x).

Dentre os 9 linfomas B de baixo grau histológico, houve imunoexpressão de p53 em 4 (44,4%), sendo em 3 casos a marcação em menos de 10% das células (grau 1) e em apenas 1 caso a marcação foi superior a 10% das células (grau 2). Dentre os 31 linfomas difusos de grandes células B, houve imunoexpressão de p53 em 20 casos (64,5%), sendo que em 7 casos a marcação foi em menos de 10% das células (grau 1) e em 13 imunomarcção superior a 10% das células neoplásicas..

Entre os linfomas de células T, 7 casos (58,3%) foram imunopositivos para p53, todos com positividade em mais de 10% das células neoplásicas (grau 2), e todos citologicamente classificados como alto grau. Não houve diferença estatística na imunoexpressão da proteína p53 entre os linfomas B e T quando comparados os casos positivo x negativo ($p=1,0$), nem entre os graus 1 e 2 ($p=0,066$). Também não houve diferença estatística para a imunoexpressão de p53 entre os casos de alto e baixo grau histológico ($p=0,66$). A imunoexpressão da proteína p53 em mais que 10% das células

(grau 2) foi estatisticamente superior nos linfomas de alto grau do que nos linfomas citologicamente classificados como baixo grau ($p=0,01$).

A Tabela 1 resume os dados sobre morfologia, imunofenótipo e imunoexpressão da proteína p53.

A média de idade dos animais negativos para a imunomarcagem de p53 foi de 5,38 anos (DP: 2,5) e a média de idade dos animais positivos para imunomarcagem de p53 foi de 7,48 anos (DP:3,35). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,02$).

Interessantemente, 8 dos 9 animais da raça Boxer e 3 dos 4 animais da raça Rottweiler com linfoma não-Hodgkin apresentaram imunoexpressão para proteína p53.

Essa proporção de imunopositividade não foi observada e nenhum outro grupo racial, estando presente em 2/6 Pastor Alemão, 2/5 Cocker e 1/3 Poodle.

Tabela 1-Dados dos 55 linfomas caninos.

Imuno-fenótipo	Número de casos	Morfologia (N)	Positividade para p53(%)
Linfoma de células B	40 (72,7%)	Baixo grau histológico (9)	44,4%
		◆ Linfoplasmocítico (6)	50%
		◆ Linfocítico (1)	zero
		◆ Folicular; grau II (1)	100%
		◆ Inclassificado (1)	zero
		Linfoma difuso de grandes células B (31)	64,5 %
Linfoma de células T	12 (21,8%)	Baixo grau histológico (1)	zero
		Linfomas de grandes células T (11)	63,6%
Não-B-não-T	3 (5,4%)	Linfomas de grandes células	NR*

* NR: não realizada

DISCUSSÃO

Os avanços da Oncologia Veterinária nos campos do diagnóstico e tratamento requerem cada vez mais refinamento por parte do patologista veterinário e também do clínico veterinário a fim de se estabelecerem novos critérios de classificação e estágio dos tumores. O uso da Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, VALLI *et al*, 2002), que é baseado na nomenclatura humana recentemente publicada (OMS, JAFFE *et al*, 2001), pode facilitar a comunicação entre patologistas veterinários e humanos e pesquisadores, favorecendo a oncologia comparada.

Nossos resultados mostraram que 72,7% dos linfomas caninos analisados eram de imunofenótipo B e 21,8% eram T. Estes resultados são semelhantes aos obtidos em um estudo cooperativo de 1378 casos de linfomas não-Hodgkin humanos, no qual 88% correspondia ao imunofenótipo B e 12% a neoplasias T/NK (THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT, 1997). O predomínio do imunofenótipo B entre os linfomas caninos também foi encontrado por outros autores. TESKE e colaboradores (1994c) identificaram 58,9% de linfomas B e 37,9% de linfomas T entre 95 casos estudados. Em um estudo com 18 casos, CANIATTI e colaboradores (1996) diagnosticaram 14 (77,7%) casos com imunofenótipo B e 3 com imunofenótipo T. FOURNEL-FLEURY e colaboradores (1997) estudaram 47 casos de linfomas em tecidos congelados e identificaram 29 (61,7%) com imunofenótipo B e 18 (38,3%) com imunofenótipo T. Estes mesmos pesquisadores estudaram 92 casos de linfoma em tecido parafinado e identificaram 67 (72,8%) de linfomas B e 24 (26,1%) de linfomas T.

Imunofenotipar os casos de linfoma canino é de grande importância clínica e científica, pois uma parcela dos linfomas T pode apresentar morfologia de células B (TESKE *et al*, 1994c). Somente 3 (5,4%) casos analisados em nossa pesquisa não se mostraram positivos para nenhum marcador, provavelmente decorrente de problemas de fixação do material, ou por se tratarem de casos de imunofenótipo nulo real. Uma pequena proporção de linfomas não-B-não-T também foi relatada por outros pesquisadores (FOURNEL-FLEURY *et al*, 1997; TESKE *et al*, 1994c). Em nenhum dos nossos casos ocorreu co-expressão dos marcadores CD79a e CD3, como relatado em alguns casos por THOMAS e colaboradores, 2001.

Entre os casos analisados nesta pesquisa, o linfoma difuso de grandes células B foi o tipo mais freqüente (26/52; 50%). Esse tipo histológico é também o mais freqüente entre os humanos, representando 30,6% (THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT, 1997). Em um estudo com 72 casos de linfoma canino, WELLER e colaboradores (1980) classificaram 40 casos (55,5%) como linfoma "histiocítico" de acordo com a classificação de Rappaport (RAPPAPORT, 1966). GREENLEE e colaboradores (1990) identificaram 83 (47,2%) linfomas do tipo centroblástico e 45 (25,6%) do tipo imunoblástico em 176 casos de linfoma canino, de acordo com a classificação de Kiel. (LENNERT, 1978) TESKE e colaboradores (1994c) identificaram 47 linfomas do tipo centroblástico e 5 do imunoblástico com imunofenótipo B entre 95 casos analisados (54%). Entre 92 casos de linfoma imunofenotipados como B por FOURNEL-FLEURY *et al* (1997), 38 casos eram do tipo centroblástico (41,3%) e 13 do tipo imunoblástico (14,1%).

A freqüência de linfomas linfoplasmocíticos entre os linfomas B (6/55=10,9%) é maior do que a encontrada entre os linfomas não-Hodgkin em humanos (1,2%; THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT, 1997). Por outro lado, apenas um único caso de linfoma folicular foi diagnosticado no presente trabalho (1,9%), em contraste com os linfomas não-Hodgkin humanos, onde eles representam 22,1% dos casos (THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT, 1997). Por sua vez, WELLER e colaboradores (1980) encontraram 7 casos de linfoma do tipo "nodular" entre 72 casos de linfoma canino (9,7%), de acordo com a classificação de Rappaport. GREENLEE e colaboradores (1990) diagnosticaram 6 casos de linfoma linfoplasmocítico e tipo linfoplasmocitóide (3,4%) e 18 casos do tipo centroblástico-centrocítico (10,2%) entre 176 caso estudados, usando a classificação de Kiel. TESKE e colaboradores (1994c) reportaram 1 caso do tipo imunocitoma (1,1%) e 1 tipo centroblástico-centrocítico (1,1%) entre 92 casos de linfoma canino estudados. Em outro estudo realizado por FOURNEL-FLEURY e colaboradores (1997), 2 casos de 92 estudados foram classificados como linfoplasmocítico e 1 como centroblástico-centrocítico. A diferença encontrada na freqüência de casos de linfoma linfoplasmocítico entre os casos identificados neste estudo e de outros pesquisadores pode ser decorrente da variação geográfica ou de critérios diagnóstico usado pelos diferentes pesquisadores.

A quase totalidade dos anticorpos produzidos especificamente para as espécies domésticas são para citologia ou tecidos congelados, o que tornam seu uso limitado. O uso desses anticorpos se mostra ineficiente na imunomarcção em tecidos parafinados, devido às alterações que a estrutura terciária dos antígenos sofrem pelo efeito da fixação em formalina. As técnicas de recuperação antigênica mais empregadas hoje (tratamentos enzimáticos, irradiação por microondas em cortes incubados em solução tampão citrato, denaturação em calor úmido mediante incubação dos cortes em solução tampão citrato) nem sempre são eficientes quando empregadas sem uma técnica adequada de amplificação da reação. Isto pode inviabilizar a imunomarcção principalmente dos tecidos que sofreram fixação prolongada ou se a quantidade de antígeno no tecido for escassa.

Dentre os anticorpos utilizados neste trabalho, o anticorpo anti-CD3 mostrou-se específico, com uma forte marcação na membrana citoplasmática dos linfócitos T de maneira intensidade homogênea nos casos positivos. O uso da recuperação antigênica pelo calor úmido e o uso do sistema EnVision não permitiram maiores diluições do anticorpo. Por outro lado, a reação não apresentou coloração inespecífica de fundo.

O anticorpo anti-CD79a promoveu uma marcação em citoplasma e membrana citoplasmática, tendo necessitado de um sistema de detecção mais sensível, o CSA. Porém ficou evidente a mais intensa coloração inespecífica de fundo, além de uma marcação inespecífica em vasos sanguíneos.

Os marcadores anti-lisozima e mieloperoxidase foram muito eficientes na marcação de células de origem mielóide/histiocitária. O seu uso é muito importante, como pode ser observado em nosso estudo, onde 10 dos 65 casos (15,4%) previamente diagnosticados como linfomas, baseando-se exclusivamente na morfologia das células tumorais, tiveram seu diagnóstico modificado para neoplasia de origem mielóide/histiocitária. Nesses casos, as células tumorais apresentaram imunoexpressão citoplasmática granular para mieloperoxidase e/ou lisozima e foram negativas para CD79a e CD3. Não fosse a utilização destes marcadores em um painel juntamente com os demais, as 10 neoplasias poderiam ter sido consideradas linfomas não-B-não-T. A importância do uso de marcadores mielóides/histiocitários no estudo de neoplasias indiferenciadas já havia sido demonstrado por VASSALLO e colaboradores em 1993. Por outro lado, nossa

experiência demonstrou que não foi possível a aplicação do anti-CD30 humano em tecido canino.

O anticorpo CM-1 policlonal usado em nossos estudos reage tanto com a proteína p53 mutante, quanto com a selvagem. Anticorpos policlonais são geralmente menos específicos, porém outros anticorpos monoclonais direcionados contra a proteína p53 usados rotineiramente em patologia humana não reagiram com os tecidos de cão em nossas tentativas prévias. Outros autores já demonstraram a superexpressão da proteína p53 em tumores caninos, incluindo o linfoma canino, utilizando-se do mesmo anticorpo policlonal (JAFJE *et al*, 2000; GAMBLIN, *et al*, 1997).

Levando em conta que a meia-vida da proteína p53 mutante é longa (mais que 12 horas), enquanto que a proteína p53 selvagem possui meia-vida curta (aproximadamente 30 minutos), considera-se que a quantidade de proteína p53 selvagem marcada por este anticorpo policlonal é insignificante (BATSAKIS *et al*, 1995). Corroborando a existência de mutação no gene p53 em linfomas caninos, VELDHOFEN e colaboradores (1998), analisando a seqüência de DNA do gene p53 encontraram mutações em 3 dos 8 casos de linfomas caninos examinados (37,5%). Nossa pesquisa identificou uma forte marcação nuclear para p53 (graus 1 e 2) em 31 dos 52 casos (59,6%). Essa proporção é muito maior do que a relatada por outros autores, como GAMBLIN e colaboradores (1997), que encontraram 40% de positividade. Neste estudo, porém, trabalharam apenas com 15 casos de linfoma canino e ainda não foi referida sua imunofenotipagem.

A positividade para p53 esteve presente em 60% dos linfomas B examinados no presente trabalho. Em humanos, a superexpressão da proteína p53 foi identificada em 24/93 casos (26%) de linfomas B de alto grau histológico (PIRIS *et al*, 1994) e em 9/32 casos em outro estudo similar (PAGNANO *et al*, 2002).

A superexpressão da proteína p53 em linfomas não-Hodgkin humanos está associada com um menor sobrevida (PIRIS *et al*, 1994; PAGNANO *et al*, 2001; PAGNANO *et al*, 2002). Nosso estudo foi delineado para se determinar a prevalência da superexpressão da proteína p53 em casos de linfomas B e T de cão e esta pesquisa foi baseada em casos de arquivo. Portanto, o acompanhamento clínico desses casos nem

sempre esteve disponível para determinar a influência da detecção de p53 na sobrevida dos animais. Estudos desse tipo são mais difíceis de se realizar, necessitando de protocolos de pesquisa e banco de dados bem controlados. Nem todos os proprietários de animais optam por um tratamento, preferindo sacrificá-los. Além disto, os tratamentos em animais não estão padronizados como para as neoplasias humanas.

Apesar de não ser estatisticamente significante, os linfomas T tenderam a apresentar uma maior proporção de células tumorais imunopositivas para a proteína p53 ($p=0,06$). Outros estudos clínicos têm mostrado que os linfomas T caninos apresentam menor sobrevida, bem como menor taxa de remissão completa (GREENLEE *et al*, 1990; TESKE *et al*, 1994b). A maior frequência da imunoexpressão da proteína p53 poderia estar envolvida no pior prognóstico dos linfomas T descritos por esses pesquisadores. Novos estudos controlados devem ser feitos a fim de se compreender o exato papel do acúmulo de p53 nestas neoplasias.

A imunoexpressão da proteína p53 em mais que 10% das células (grau 2) foi estatisticamente superior nos linfomas de alto grau do que nos linfomas citologicamente classificados como baixo grau ($p=0,01$), sugerindo uma correlação entre o padrão citológico dos linfomas e seu potencial genético de malignidade.

A maior média de idade (7,48 anos; DP=3,35) estatisticamente significante dos animais cujos tumores foram imunopositivos para proteína p53 (graus 1 e 2) corrobora os estudos que indicam que as mutações genéticas tendem a acumular-se com o avançar da idade. Assim, a capacidade de reparo do DNA tende a diminuir, aumentando a susceptibilidade para surgimento de neoplasias (WARNER, 2002).

Outro indício da influência da genética na patogênese dos linfomas caninos pode ser sugerido por este trabalho, através da maior frequência com que animais das raças Boxer e Rottweiler apresentam a superexpressão da proteína p53. Este achado vem de encontro aos resultados de PRIESTER (1967) e de TESKE (1994a) que relatam maior predisposição, principalmente da raça Boxer, para o desenvolvimento de linfomas.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram a aplicabilidade da nova nomenclatura da Organização Mundial da Saúde para classificação de linfomas caninos, em associação com a imunofenotipagem através de marcadores leucocitários humanos. Mostram também que existem correspondências na frequência dos tipos de linfomas e analogias na imunoexpressão da proteína p53 com sua contrapartida humana. Estes dados enfatizam o valor potencial dos linfomas caninos como modelos experimentais para estudo da sua patogênese e terapêutica.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

TOMLEY, F. M.; ARMSTRONG, S. J.; OWEN, L. M. Studies on a possible viral aetiology of canine lymphosarcoma and mammary tumors. **Procedures of British Association of Cancer Research**, 38:175, 1978.

BÄCKGREN, A. W. Lymphatic leucosis in dogs. **Acta veterinaria Scandinavica**, 6:16S-26S, 1965.

BATSAKIS, J.; EL-NAGGAR, A. p53: Fifteen years after discovery. **Advances in Anatomic Pathology**, 2: 71-88, 1995.

CANIATTI, M.; ROCCAABIANCA, P.; SCANZIANI, E.; PALTRINIERI, S.; MOORE, P. F. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine needle aspiration biopsy. **Veterinary Pathology**, 33: 204-212, 1996.

CALMELS, L.; HAINUT, P.; OHSHIMA, H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. **Cancer Research**, 57: 3365-69, 1997.

CHANG, J.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**, 13:1009-22, 1995.

COUTO, C. G. Canine lymphomas: something old, something new. **Compendio on Continue Education Practice in Veterinary**, 7:291-302, 1985.

DAY, M. J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, 112:79-96, 1995.

DORN, R. C.; TAYLOR, D. O. N.; HIBBARD, H. H. Epizootiological characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. **American Journal of Veterinary Research**, 28:933-1001, 1967.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, P. A. et al. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, 117:35-59, 1997.

FORRESTER, K.; AMBS, S.; LUPOLD, S. E.; KAPUST, S. D.; SPILLARE, R. E. A.; WEINBER, W. C. et al. Nitric oxid-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. **Procedures of National Academy of Science USA**, 93:2442-47, 1996.

GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 58:857-863,1997.

GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A. K.; CALVANO, S. E.; MATUS, R. E. et al. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, 66:480-490,1990.

GREENBLATT, M. S.; BENETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Research**, 54 (18):4855-78,1994.

GUPTA, B. N.; FLA, F. L.; WHITENACK, D. L. Posterior paralysis resulting from malignant lymphoma in a dog. **Journal of AmericanVeterinary Medical Association**,156:1898-1902, 1970.

HAGA, T.; YOKOMORI, K.; NAKAYAMA, H.; HAYASHI, T.; GOTO, N.; TAKAHASHI, R.; FUJIWARA, K. Canine and feline lymphoid and myeloid tumors encountered in Tokyo. **Japanese Journal of Veterinary Science**, 50:809-813, 1988.

HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C.; HAHN, E. A.; CHRISMAS, C. L. diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Pathology**, 31:528-40, 1994.

HAYES, H. M. The comparative epidemiology of selected neoplasms between dogs, cats, and humans. A review. **European Journal of Cancer**, 14:1299-1308, 1978.

HARRIS, C.C.; HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **The New England Journal of Medicine**, 329 (18):1318-27, 1993.

HOHENHAUS, A. E.; MATUS, R.E.; QUIMBY, F. N. Lymphocyte blastogeneses and identification of reverse transcriptase activity in a dog with lymphoid neoplasia. **Procedures of Veterinary Cancer Society**, 9:61, 1989.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. **World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon. International Agency for Research on Cancer Press, 2001.

JAFFE, M. H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H. W.; KERWIN, S. C.; HEDLUND, C. S.; LOPEZ, M. K. et al. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, 37:40-46, 2000.

JARRET, W. F. H.; CRIGHTON, G. W.; DALTON, R. G. Leukaemia and lymphosarcoma in Animals and Man. I. Lymphosarcoma or leukaemia in the Domestic Animals. **Veterinary Record**, 79:693-99, 1966.

KAPLAN, H. S. Etiology of lymphoma and leukemias: role of C-type RNA viruses. **Leukemia Research**, 2:253-271, 1978.

LENNERT, K. **Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease**. New York. Springer Verlag, 1978.

LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, 351 (6326):453-56, 1991.

MACEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer Metastasis Reviews**, 9:125-136, 1990.

MACEWEN, E. G.; HURVITZ, A. I. Diagnosis and management of monoclonal gammopathies. **Veterinary Clinical of North American Small Animal Practice** 7:119-32, 1977.

MADEWELL, B. R. Canine lymphoma. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 15:709-723, 1985.

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

MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of lymphoid and hematopoietic tissues. In: J. E. MOULTON (Ed.): **Tumors in domestic animals**. Berkeley: University of California Press, p.268-71, 1990.

MULLIGAN, R. M. **Neoplasms of the dog**. In: _ MULLIGAN, R. M. Baltimore: Willian and Wilkins, 1949.

NELSON, R. W.; HUGER, D.; ZENJANI, E. D. Renal lymphosarcoma with inappropriate erythropoietin production in a dog. **Journa of American Veterinary Medical Association**. 182:1396-7, 1983.

NIGRO, J. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, 342 :705-8, 1989.

ONIONS, D. E. RNA-dependent DNA polymerase activity in canine lymphosarcoma. **European Journal of Cancer**, 16:345-350, 1980.

ONIONS, D. E. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, 72:909-912, 1984.

OWEN, L. N. Serial transplantation of canine lymphocytic leukemia. **European Journal of Cancer**, 7, 525-8, 1971.

OWEN, L. N.; BOSTOCK, D. E.; BETTON, G. R.; ONIONS, D. E.; HOLMES, J.; YOXALL, A.; GORMAN, N. The role of spontaneous canine tumours in the evaluation of the aetiology and therapy of human cancer. **Journal of Small Animal Practice**, 16:155-162, 1975.

PAGNANO, K. B. B.; SILVA, M. D.; VASSALLO, J.; ARANHA, F. J. P.; SAAD, S. T. O. Apoptosis-regulating proteins and prognosis in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphomas. **Acta Haematology**, 107:29-34, 2002.

PAGNANO, K. B. B.; VASSALLO, J.; LORAND-METZE, I.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O. p53, Mdm2, and c-myc overexpression is associated with a poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. **American Journal of Hematology**, 67:84-92, 2001.

PIRIS, M. A.; PEZELLA, F.; MARTINEZ-MONTERO, J. C.; ORRADRE, J. L.; VILLUENDAS, R.; SANCHEZ-GEATO, M.; et al. p53 and bcl-2 Expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. **British Journal of Cancer**, 69: 337-341, 1994.

PAUL, G. Lymphomas ind dogs: A morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, 66:480-90, 1990.

PRIESTER, W. A. Canine lymphoma: relative risk in the boxer breed. **Journal of the National Cancer Institute**, 39, 833-845, 1967.

PRIESTER, W. A. The occurrence of tumors in domestic animals. **National Cancer Institute Monograph**. Maryland: NIH Publication, 1980, p.158.

RAPPAPORT, H. Tumors of the hematopoietic system. **Atlas of Tumor Pathology**. Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology, 1966, section 3, pt. 8, pp. 8-97.

SAFRAN, N.; PERK, K.; EYAL, O. Isolation and preliminary characterisation of a novel retrovirus isolated from a leukemic dog. **Research of Veterinary Science**, 52:250-255, 1992.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROLL, E. J. **Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975.

SETOGUCHI, A.; SAKAI, T.; OKUDA, M.; MINEHATA, K.; YAZAWA, M.; ISHIZAKA, T. et al. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 62:433-439, 2001.

SQUIRES, R. A.; GORMAM, N. T.; PADUA, R. A.; ONIONS, D. E. Defective endogenous retroviral elements in a canine lymphosarcoma cell line. **Proc. Am. Coll. Vet. Intern. Med.** 8:1039, 1990

SUGRUE, M. M.; SHIN, D. Y.; LEE, S. W.; AARONSON, S. A. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. **Procedures of National Academy Science USA**, 94:9648-53, 1997.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, 16:209-219, 1994a.

TESKE, E.; VAN HEERDE, P.; RUTTEMAN, G. R.; KURZMAN, I. D.; MOORE, P. F.; MACEWEN, E. G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 205:1722-1728, 1994b.

TESKE, E.; WISMAN, P.; MOORE, P. F.; VAN HEERD, P. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. **Experimental Hematology**, 22:1179-1187, 1994c.

The non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, 89: 3909-3918, 1997.

THOMAS, R.; SMITH, K. C.; GOULD, R.; GOWER, S. M.; BINNS, M. M. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. **Chromosome Research**, 9:649-657, 2001

VALLI, V. E.; JACOBS, R. M.; PARODI, A. L.; VERNAU, W.; MOORE, P. F. Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals). **Washington, D. C. Armed Forces Institute of Pathology, 2002.**

VAN HOOSIER, F. L.; STENBACK, W. A.; MUMFORD, D. M.; HILL, W. A.; DUNN, S. C.; MACDONALD, E. J. et al. Epidemiological findings and electron microscopic observations in human leukemia and canine contacts. **International Journal of Cancer**, 3:7-16, 1968.

VAN PELT, R. W.; CONNOR, G. H. Clinicopathological survey of malignant lymphoma in the dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 152:976-989, 1968.

VASSALLO, J.; ALTEMANI, A. M.; CARDINALI, I. A.; CRESPO, A. N.; LIMA, C. S. P.; EID, K. A.; SOUZA, C. A. Granulocytic sarcoma of the larynx preceding chronic myeloid leukemia. **Pathology Research and Practice**, 189:1084-86, 1993.

VELCULESCU, V.E.; EL-DEIRY, W.S. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. **Clinical Chemistry**, 42 (6):858-68, 1996.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**, 16: 249-255, 1998.

VOGELSTEIN, B; KINZLER, K.W. p53 function and disfunciton. **Cell**, 70 (4):523-26, 1992.

WARNER, H. R. Recent progress in understanding the relationship among aging, replicative senescence, cell turnover and cancer. **In Vivo**, 16:393-396, 2002.

WEIPERS, W. L. et al. Lymphosarcoma in Domestic Animals. **Ann Rep Br Emp Cancer Campaign**, 42:682-85, 1964.

WEINBERG, R. Tumor suppressor genes. **Science**, 254:1138-254, 1991.

WELLER, R. E.; HOLMBERG, C. A.; THEILEN, G. H.; MADEWELL, B. R. Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma. **American Journal of Veterinary Research**, 41:1310-1314, 1980.

WELDEN, P. L.; STORB, R.; KORB, H. J. Immune reactivity in dogs with spontaneous malignancy. **Journal of National Cancer Institute**. 53:1049-53, 1974.

WILLARD, M. D., KREHBIEL, J. D., SCHMIDT, G. M., Serum and urine protein abnormalities associated with lymphocytic leukemia and glomerulonephritis in a dog. **Journal of American Animal Hospital Association**. 17:381-86, 1981.