

# • **Imunofenotipagem dos linfomas caninos em tecido incluído em parafina**

## • *Immunophenotyping of canine lymphoma in paraffin embedded tissue*

\*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP  
Departamento de Clínica Veterinária  
Serviço de Patologia Veterinária  
Caixa Postal 560  
Distrito de Rubião Júnior s/n  
CEP 18618-000 – Botucatu – SP  
End. Eletrôn.: bandarreaep@fmvz.unesp.br

Veridiana Maria Brianezi Dignani De Moura<sup>1</sup> - CRMV-SP - n°10085

Julio Lopes Sequeira<sup>2</sup> - CRMV-SP - n°3572

Renée Laufer Amorim<sup>1</sup> - CRMV-SP - n°8303

\* Enio Pedone Bandarra<sup>3</sup> - CRMV-SP - n°0786

<sup>1</sup> Doutoranda em Medicina Veterinária – Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia Veterinária – FMVZ/UNESP/Botucatu/SP.

<sup>2</sup> Professor Assistente Doutor – Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia Veterinária – FMVZ/UNESP/Botucatu/SP.

<sup>3</sup> Professor Adjunto – Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia Veterinária – FMVZ/UNESP/Botucatu/SP.

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a utilização da técnica de imunoistoquímica para realizar a imunofenotipagem dos linfomas caninos em tecido incluído em parafina. Para isso, foram utilizados os anticorpos anti-CD3 para células T e anti-CD79a para células B. Os resultados demonstraram que os linfomas T são os de maior ocorrência (60,2%), seguidos pelos linfomas B (32,6%) e T/B (7,2%). Realizando a classificação imunofenotípica destes linfomas, concluiu-se que os marcadores linfóides anti-CD3 (Dako A0452) e anti-CD79a (Dako M7051), espécie-específicos para humanos, apresentam reatividade cruzada com a espécie canina, sendo eficientes na determinação da linhagem linfóide dos linfomas caninos. Constatou-se ainda, que a técnica de imunoistoquímica aplicada em tecido incluído em parafina, apresenta excelentes resultados, principalmente com o avanço na descoberta de novos anticorpos mono e policlonais espécie-específicos ou que apresentem reatividade cruzada entre as espécies.

**Palavras-chave:** cão, linfoma, imunoistoquímica, anticorpos, CD3, CD79a.

### Introdução e Revisão de Literatura

**L**infomas são neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação de células nativas do tecido linfóide, que são linfócitos, histiócitos e, seus precursores e derivados (COTRAN *et al.*, 1994; VONDERHAAR; MORRISON, 1998). Também chamado de

linfossarcoma e linfoma maligno, é um dos tumores de maior ocorrência nos cães (CAPURRO *et al.*, 1992; VALLI, 1993; TESKE, 1994; MILNER *et al.*, 1996; VONDERHAAR; MORRISON, 1998).

Os linfomas caninos podem ser classificados anatomicamente em: multicêntricos, tímicos, digestivos, cutâneos e solitários; quanto a citomorfologia em: baixo,

médio e alto grau; e quanto a imunomorfologia em: linfomas T, linfomas B e linfomas não B/não T, bem como de celularidade mista (B/T) (MOULTON; HARVEY, 1990; TESKE *et al.*, 1994a; JONES *et al.*, 1997; DE MOURA *et al.*, 1999; SEQUEIRA *et al.*, 1999).

A classificação imunomorfológica dos linfomas caninos é feita através da técnica de imunistoquímica, utilizando-se marcadores celulares específicos. Em Medicina Veterinária, esta técnica é pouco utilizada devido ao alto custo e ausência de marcadores espécie-específicos em alguns casos (MILNER *et al.*, 1996; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; DE MOURA *et al.*, 1999).

Até bem pouco tempo, a determinação do imunofenótipo dos linfomas em cães só era realizada utilizando-se métodos como a citometria de fluxo ou imunistoquímica em cortes de congelação (APPELBAUM *et al.*, 1984; GREENLEE *et al.*, 1990; CANIATTI *et al.*, 1996; TESKE; Van HEERDE, 1996). Na verdade, a maior dificuldade para a diferenciação da linhagem celular dos linfomas em material incluído em parafina, residia na ausência de um marcador específico e eficiente para as neoplasias da linhagem B (MILNER *et al.*, 1996).

Atualmente, com uma maior disponibilidade de anticorpos monoclonais capazes de interagir com antígenos de células linfóides humanas presentes em material fixado em formalina e incluído em parafina, muitas dificuldades diagnósticas puderam ser solucionadas (ALVES *et al.*, 1999; BACCHI; BACCHI, 1999). Essa realidade tornou-se verdade em Medicina Veterinária quando observou-se que vários desses anticorpos espécie-específicos para células humanas, apresentavam reatividade cruzada com outras espécies. Tal fato, especialmente nos casos de neoplasias linfóides em cães, permite a determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos com grande sucesso (APPELBAUM *et al.*, 1984; TESKE *et al.*, 1994b; MILNER *et al.*, 1996; DARBES *et al.*, 1997; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

MILNER *et al.* (1996); FOURNEL-FLEURY *et al.* (1997), descreveram a aplicação de métodos imunistoquímicos para a classificação imunofenotípica dos linfomas caninos em cortes histológicos de tecido incluído em parafina, utilizando o anticorpo policlonal anti-CD3 para marcar linfomas de células T e o anticorpo monoclonal anti-mb1 (CD79a) para marcar linfomas de células B.

O anticorpo policlonal anti-CD3 é um marcador de superfície celular altamente sensível e específico para a demonstração das células linfóides T. O anticorpo monoclonal anti-mb1 (CD79a/clone HM57) é também um marcador de superfície celular e reage contra antígenos humanos e caninos, detectando a linhagem de células linfóides B em seus diferentes momentos de diferenciação, marcando de "blastos" a "citos", sendo, portanto, um marcador de amplo espectro e alta especificidade (AL-

VES *et al.*, 1999; BACCHI; BACCHI, 1999).

Diante do exposto, observa-se que novas técnicas têm sido desenvolvidas no intuito de colaborar no estabelecimento do diagnóstico e prognóstico das neoplasias de maneira geral. Portanto, a determinação do imunofenótipo nos linfomas caninos apresenta-se como mais um método diagnóstico e adiciona dados ao estudo do comportamento desta neoplasia na espécie em questão. Ainda, tendo em vista as semelhanças do ponto de vista epidemiológico, morfológico e imunofenotípico, permite avaliar a possibilidade da utilização dos linfomas caninos como modelo dos linfomas não-Hodgkin nos seres humanos.

## Material e Métodos

Foram classificados imunofenotipicamente 98 casos de linfoma canino existentes no arquivo do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ-UNESP-Botucatu-S.P., no período de julho de 1969 a julho de 2000.

Cortes histológicos de três micrômetros (3mm) obtidos em micrótomo rotativo foram submetidos à técnica de imunistoquímica (ALVES *et al.*, 1999), utilizando-se os marcadores linfóides anti-CD3 (Dako A0452) para identificação de células T, e anti-CD79a (Dako M7051) para células B. A reação utilizou o complexo avidina-biotina-peroxidase de acordo com o princípio proposto por HSU *et al.* (1981), também conhecida como técnica de imunoperoxidase.

Cada anticorpo foi diluído em solução de albumina bovina (BSA 1%) nas concentrações de: 1:100 para o anticorpo CD3 e 1:50 para o CD79a. Os cortes foram distendidos sobre lâminas histológicas previamente mergulhadas em solução de organossilano (3-Aminopropyl-Triethoxysilane - Sigma Chemical CO - A 3648).

A desparafinização dos tecidos foi obtida por banhos seqüenciais em xilol, procedendo-se então, a hidratação por passagens em álcool etílico a 100%, 95%, 85% e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em solução de EDTA 10mM/pH8,0, previamente aquecida a 95°C, utilizando-se panela de cozimento a vapor ("steamer" - T-falÒ), durante 25 minutos.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, utilizou-se solução de peróxido de hidrogênio (20 volumes), diluída em água destilada na concentração de 1:1 e, em seguida, banhos de TRIS pH7,4. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 18 horas a 4°C (*overnight*), em câmara úmida, com os anticorpos primários anti-CD3 (Rabbit anti-human T cell) e anti-CD79a (Mouse anti-human B cell), nas concentrações de 1:100 e 1:50, respectivamente.

Após dois banhos com solução tampão de TRIS pH 7,4, as lâminas foram novamente incubadas utilizan-

do-se o kit LSAB (Dako-K0690), seguindo-se as instruções do fabricante. A revelação da reação foi obtida empregando-se a solução de Diaminobenzidina (DAB – Sigma Chemical CO – D5637) por quatro minutos ao abrigo da luz. Sequencialmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Meyer em banho de 10 minutos e lavagem em água destilada. Em seguida, eram desidratadas por passagens em álcool 85%, 95% e 100% e diafinizadas em xilol. A montagem das lâminas foi realizada utilizando-se resina sintética (Permount – Fisher).

As neoplasias que apresentaram positividade para os dois anticorpos foram classificadas como linfomas T/B e, os casos de linfomas não-T/não-B não foram considerados neste estudo.

## Resultados

Os resultados obtidos utilizando-se a técnica de imunohistoquímica e os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79a, para a determinação do imunofenótipo dos linfomas caninos apresentam-se na Tabela 1 e Figuras 1 a 3.

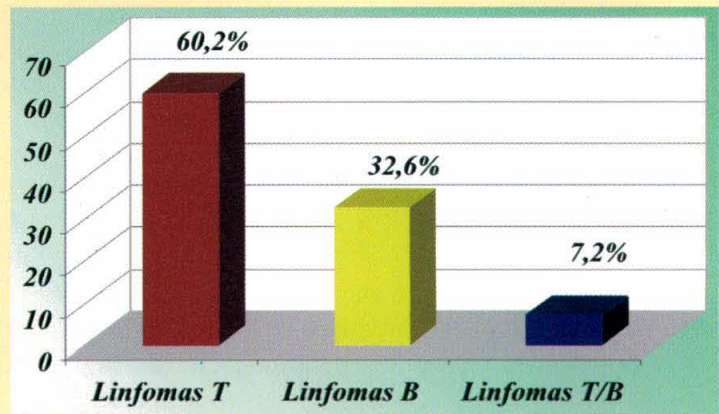
Os linfomas T foram os mais frequentes, sendo observados em 60,2% dos casos. Em seguida, apresentaram-se os linfomas B com 32,6%, e os linfomas T/B com 7,2% de frequência. Estes valores estão apresentados na Tabela e Figura 1. As Figuras 2 e 3 representam os tipos T e B marcados pelos anticorpos CD3 e CD79a. Os linfomas do tipo T/B (celularidade mista) apresentaram positividade para ambos os anticorpos utilizados.

## Discussão e Conclusões

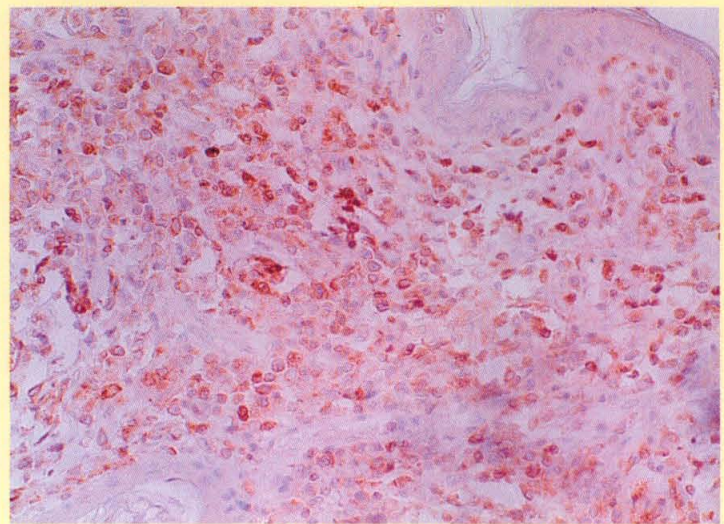
O uso de marcadores específicos para tecido linfóide apresenta grande utilidade na prática diagnóstica, pois através da aplicação de anticorpos mono ou policlonais em tecido incluído em parafina, pode-se definir, não só o diagnóstico da

**Tabela 1** - Imunofenotipagem dos linfomas caninos.

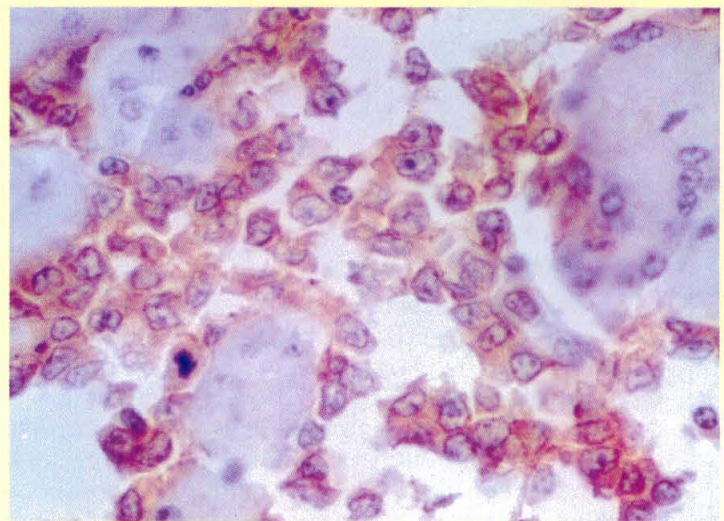
Imunofenótipo	Número de casos	Frequência
T	59	60,2%
B	32	32,6%
T/B	7	7,2%
Total	98	100%



**Figura 1.** Frequência de linfomas caninos quanto ao imunofenótipo.



**Figura 2.** Linfoma de células T. Reação imunoistoquímica positiva (coloração acastanhada) para o anticorpo anti-CD3/250x.



**Figura 3.** Linfoma de células B. Reação imunoistoquímica positiva (coloração acastanhada) para o anticorpo anti-CD79a/600x.

neoplasia, assim como melhor caracterizá-la do ponto de vista histogenético (ALVES *et al.*, 1999; BACCHI; BACCHI, 1999).

A determinação do imunofenótipo é a base para a atual classificação dos linfomas na patologia humana. Em medicina veterinária esta técnica vem sendo utilizada com restrições, devido ao alto custo e ausência de marcadores espécie específicos (MILNER *et al.*, 1996; FURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

Os trabalhos veterinários que utilizam esta técnica baseiam-se no princípio da reatividade cruzada que certos anticorpos possam apresentar. Diante disto, talvez, se a produção de anticorpos fosse específica para a espécie canina, os resultados pudessem refletir um padrão diferente e mais preciso (DARBES *et al.*, 1997).

APPELBAUM *et al.* (1984), estudando o imunofenótipo dos linfomas caninos, concluíram que esta neoplasia revela uma heterogenicidade que não pode ser avaliada pela histopatologia clássica. Sendo assim, o conhecimento do imunofenótipo das células neoplásicas permite uma correlação entre o comportamento clínico do tumor e sua resposta a quimioterapia.

No presente estudo, o imunofenótipo de células T ocorreu na maioria dos casos (60,2%), seguidos pelos linfomas B (32,6%) e T/B (7,2%). Tal achado é contraditório com a literatura humana e veterinária, em que a prevalência imunofenotípica dos linfomas é de células B (APPELBAUM *et al.*, 1984; TESKE, 1994; TESKE *et al.*, 1994b; TESKE; Van HEERDE, 1996; FURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

O fato de se ter trabalhado com tecido fixado em solução de formalina tamponada a 10% e incluído em parafina pode justificar tal discrepância, uma vez que vários pesquisadores utilizaram a técnica de imunistoquímica em material congelado (APPELBAUM *et al.*, 1984; GREENLEE *et al.*, 1990; CANIATTI *et al.*, 1996;

TESKE; Van HEERDE, 1996). Ainda, de acordo com MILNER *et al.* (1996), o anticorpo utilizado para a marcação de clones de células B não é eficiente em alguns casos, apresentando marcação espúria.

Em humanos do mundo ocidental, a prevalência de linfomas é de células B, porém na Ásia o perfil mais comum é o linfoma tipo T (TESKE *et al.*, 1994b). Essas diferenças geográficas que ocorrem na espécie humana talvez possam se refletir nos animais domésticos.

De acordo com FURNEL-FLEURY *et al.* (1997), estudos de imunofenotipagem são difíceis de serem comparados devido à ausência de um consenso entre os diferentes autores, com relação à especificidade dos diferentes marcadores utilizados.

Além disso, deve-se considerar a categoria citohistológica em que essas neoplasias se encaixam, ou seja, se são linfomas de baixo grau, grau intermediário ou alto grau, pois sabe-se que a maioria dos linfomas T são de grau intermediário e baixo grau (TESKE, 1994; TESKE *et al.*, 1994b; FURNEL-FLEURY *et al.*, 1997). No entanto, esta variável não foi avaliada no presente estudo, uma vez que a proposta dos autores foi apenas determinar o imunofenótipo dos linfomas caninos sem estabelecer qualquer relação com a morfologia celular.

Diante dos resultados, concluiu-se que a técnica de imunistoquímica, utilizando marcadores linfóides específicos para células T e B em tecido incluído em parafina, é um método eficiente na determinação do imunofenótipo dos linfomas não-Hodgkin nos cães. Constatou-se também, que a grande maioria dos linfomas caninos são da linhagem linfóide T.

É importante ressaltar que a ciência veterinária deve manter-se em contínuo avanço, utilizando novas técnicas como a de imunistoquímica para que se possa, cada vez mais, conhecer a gênese e o comportamento de neoplasias malignas como os linfomas caninos não-Hodgkin.

## SUMMARY

The use of immunohistochemistry techniques to classify canine lymphomas in paraffin embedded tissues was the object of this study. Anti-CD3 antibodies for T-cells and anti-CD79a antibodies for B-cells were used. T-cell lymphomas were more frequent (60.2%), followed by B-cell lymphomas (32.6%) and T/B-cell lymphomas (7.2%). Using the lymphoid anti-CD3 (Dako A0452) and anti-CD79a (Dako M7051) markers specific for humans, we concluded that these antibodies showed cross-reactivity with canine tissue and can be used in determining the lymphoid line of canine lymphomas. We also showed that the immunohistochemistry technique used in paraffin embedded tissues had excellent results, specially with the development of new mono and polyclonal antibodies with cross reactivity between species.

**Key words:** dog, lymphoma, immunohistochemistry, antibody, CD3, CD79a.

## REFERÊNCIAS

1. ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p. 135-151.
2. APPELBAUM, F. R.; SALE, G. E.; STORB, R.; CHARRIER, K.; DEEG, H. J.; GRAHAM, T.; WULFF, J. C. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. **Hematological Oncology**, v. 2, n. 2, p. 151-168, 1984.
3. BACCHI, C. E.; BACCHI, M. M. Immunohematopathology markers in paraffin sections. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 22, n. 3, p. 195-205, 1999.
4. CANIATTI, M.; ROCCABIANCA, P.; SCANZIANI, E.; PALTRINIERI, S.; MOORE, P. F. Canine lymphoma: Immunocytochemical analysis of fine needle aspiration biopsy. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 2, p. 204-212, 1996.
5. CAPURRO, C.; BURACCO, P.; ROSSI, L. Lymphoma in dogs. **European Journal of Com. Animal Practice**, v. 2, n. 2, p. 7-19, 1992.
6. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Pathologic basis of disease**. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. p. 634-643.
7. DARBES, J.; MAJZOUB, M.; HERMANN, W. Evaluation of the cross-reactivity between human and feline or canine leucocyte antigens using commercially available antibodies. Brief communication. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, v. 9, n. 1, p. 94-97, 1997.
8. DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA, E. P. Linfoma Canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV - SP**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.
9. 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, n. 1, p. 35-59, 1997.
10. GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A. K.; CALVANO, S. E.; MATUS, R. E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A. I.; LIEBERMAN, P. H. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, v. 66, n. 3, p. 480-490, 1990.
11. HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, n. 29, p. 577-580, 1981.
12. JONES, C. J.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Veterinary pathology**. 6. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997. p. 1009-1042.
13. MILNER, R. J.; PEARSON, J.; NESBITT, 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**, v. 63, n. 4, p. 309-313, 1996.
14. MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumours of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumours in domestic animals**. London: University of California Press, 1990. p. 231-244.
15. SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P.; FIGUEIREDO, L. M. A.; ROCHA, N. S. Características Anatómicas dos Linfomas Caninos na região de Botucatu / SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 245-249, 1999.
16. 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.
17. TESKE, E.; Van HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. **The Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 112-115, 1996.
18. 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**, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994a.
19. TESKE, E.; WISMAN, P.; MOORE, P. F.; Van HEERDE, P. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. **Experimental Hematology**, v. 22, n. 12, p. 1179-1187, 1994b.
20. VALLI, V. E. O. The hematopoietic system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. New York: Academic Press, 1993. v. 3, p. 149-153.
21. VONDERHAAR, M. A.; MORRISON, W. B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1998. p. 667-695.