

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE SUPRESSOR DE TUMOR
TP53 E IMUNORREATIVIDADE DA p53 EM LINFOMAS
CANINOS**

Sabryna Gouveia Calazans

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck

Co-orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL- SP- BRASIL

SETEMBRO – 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

SABRYNA GOUVEIA CALAZANS – nascida em 12 de outubro de 1979, na cidade do Recife-PE, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Recife PE em março de 1998, concluindo-o em 15 de agosto de 2003. Em Agosto de 2004 iniciou o curso de mestrado pelo programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), concluindo-o em fevereiro de 2006. Em março de 2006 iniciou o curso de doutorado pelo mesmo programa e instituição, onde prestou atendimento no Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” até o corrente ano.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos concedida (processo nº 06/55732-2) e pelo auxílio financeiro (processo nº 07/02949-7).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck, pela oportunidade, confiança e por ter compartilhado comigo seu conhecimento e experiência. Por ter contribuído com a minha formação profissional e pessoal durante esses anos de pós-graduação. Tenha sempre meu respeito e gratidão.

À Minha co-orientadora Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, por ter me acolhido com tanta gentileza em seu laboratório e pelos seus ensinamentos na área. Por me estimular diante de dificuldades ou conquistas, pela amizade e carinho que sempre me incentivaram tanto.

À Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, pela fundamental participação neste trabalho e, por inúmeras vezes, simplificar o que parecia complicado. Pela constante disposição em ajudar, por seu entusiasmo, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira, pelo auxílio com as análises histopatológicas, ensinando cada detalhe com paciência e atenção. Pela gentileza e prestatividade.

À Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, a quem admiro por seu profissionalismo e agora pela dedicação ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV). Obrigada também pela atenção, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, por sua amizade, generosidade, humildade e competência. Por tudo que aprendi sobre oncologia ou sobre a vida. Minha admiração e amizade.

Aos Profs. Drs. Antônio Carlos Alessi e Rosemeri Vasconcelos do Dpto. de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp-Jaboticabal, pelas correções durante o Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, pelo auxílio ao longo do curso de pós-graduação e pela contribuição durante o Exame de Qualificação. Também agradeço a suas orientadas Maria Luísa de Cápua, Flávia Coleta, Aline Godoy, Manuela Vieira, Mariana Miotto e Mariane Fráguas pelo coleguismo e amizade proporcionados durante nossos experimentos.

À “antiga” e à “nova” geração de pós-graduandos do SOV que tive a felicidade de encontrar durante esses anos: Marcos Russomano, Andriago De Nardi, Márcio Vasconcelos, Juliana Furlani, João Humberto de Castro, Simone Fernandes, Sabrina Rodigheri, Jane César, Fábio Motta, Sabrina Costa, Thiago Munhoz, Carolina João, Joice Lara, Aline Godoy, Geórgia Magalhães, Érika Terra, Giovanni Vargas e Sofia Borin, pela amizade e por tudo que aprendi com cada um de vocês.

Aos residentes e funcionários do Hospital Veterinário, pelo companheirismo, tornando o ambiente de trabalho proveitoso e agradável.

Aos estagiários do SOV, pelo empenho e contribuição durante o período de coleta de material.

Aos proprietários e seus respectivos cães que participaram deste trabalho, pela colaboração, parceria e compreensão.

Ao técnico do Laboratório de Histologia da FCAV/Unesp-Jaboticabal, Orandi Mateus, pelo auxílio com a confecção dos blocos de parafina, por sua simpatia, prestatividade e bom humor de sempre.

Aos pós-graduandos Marcela Rodrigues, Pedro Pinczowski, Rafael Torres Neto, Giuliana Croce e Sabrina Costa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/Unesp-

Botucatu, pelo auxílio com a imunistoquímica, por sempre nos receberem tão prestativos e gentis.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Lemos, pela simpatia e atenção durante as análises moleculares no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV/Unesp-Jaboticabal.

À técnica do LGBBA Eliane Alves, pela paciência, boa vontade e otimismo com as reações de PCR.

Aos pós-graduandos do LGBBA pelo auxílio e companhia durante o experimento.

À Prof^a Dr^a Catarina Takahashi pelo estágio concedido no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da USP-Ribeirão Preto e aos seus orientados, especialmente Monica Mayorano, pelos seus ensinamentos sobre biologia molecular.

Ao Prof. David J. Argyle, pelo estágio concedido na Universidade de Edimburgo e por sua atenção e disposição que me dedicou durante esse período.

Aos pós-graduandos Thalia Blacking, Gurå Bergkvist e Yu Liu, da Universidade de Edimburgo, pelos ensinamentos, dicas de técnicas moleculares e pelas conversas nas horas vagas.

À Prof^a Mala Renwick, à ex-residente Chiara Penzo e à enfermeira Linda Roberts, por terem me permitido acompanhar suas atividades no *Royal (DICK) School of Veterinary Studies Hospital for Small Animals Oncology Service*.

À amiga Fernanda Gonçalves, por me acolher em sua casa em Edimburgo, pela companhia durante dois congelantes meses. Graças a você, foi tudo mais fácil. Aos companheiros Alexandros Sykakis, Jacob Lisakowski e Diego Perelli, pelos momentos de descontração durante esse período.

Aos queridos amigos-irmãos da Família Nutronco: Ricardo Vasconcelos, Fernanda Gonçalves, Ana Gabriela Valério, Eduardo Deberaldini, Simone Fernandes,

Sabrina Rodigheri, Kellen Oliveira, Eliana Teshima e Marco Augusto Silva, por terem sido os melhores companheiros que uma República pode ter. À Carmem Morello, por ter cuidado de nós por todos esses anos.

Aos demais amigos em Jaboticabal: Márcio Brunetto, Márcia Gomes, Soraia Souza, Elizabeth Schmidt e Juliana Borges, pelos finais de tarde ou finais de semana.

À minha querida Paçoca Rolha, gorda e gostosa, companheira inseparável principalmente nas horas de comer e de dormir. Por sempre me receber em casa com alegria e por entender minhas viagens ou meus finais de semana no laboratório.

Aos meus pais que, apesar da distância, confiaram em mim, ofereceram proteção e apoiaram minhas decisões a cada dia. Também agradeço a toda minha família, pelo carinho que sempre me recebem.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Linfoma Canino.....	2
2.2 Gene Supressor de Tumor TP53.....	4
2.3 Mutações em Íntrons e o Desenvolvimento de Neoplasias.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Animais.....	11
3.1.1 Seleção.....	11
3.1.2 Estadiamento.....	11
3.1.3 Quimioterapia Antineoplásica.....	12
3.2 Coleta e Armazenamento das Amostras.....	13
3.3 Processamento do Material.....	13
3.3.1 Histopatologia e Imunoistoquímica.....	13
3.3.2 Extração do DNA Genômico.....	16
3.3.3 Reação de PCR.....	17
3.3.4 Sequenciamento.....	19

3.4 Análise Estatística.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Dados Epidemiológicos e Clínicos.....	20
4.2 Diagnóstico Histopatológico e Imunofenótipo.....	22
4.3 Reatividade da p53.....	22
4.4 Reações de PCR e Sequenciamento.....	25
5 CONCLUSÕES.....	37
6 REFERÊNCIAS.....	38
Apêndice	52
A. Soluções Utilizadas na Técnica de Imunoistoquímica	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL(chronic lymphocytic leukemia)/lymphoma</i>
BHRF	<i>Bcl-2-related BamH1 rightward reading frame</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Dab	3,3'diaminobenzidina
dNTP	<i>Desoxiribonucleotide triphosphate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EBNA 5	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 5</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
FASR	<i>Fas receptor</i>
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HE	Hematoxilina-eosina
Ig	Imunoglobulina
IGF-BP3	<i>insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
LMP1	<i>latent membrane protein 1</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOXA	Proteína pró-apoptótica; (noxa: nocivo em latim)
OMS	Organização Mundial de Saúde
p21	<i>Protein 21</i>
p53	<i>Protein 53</i>

PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PO	<i>Per os</i>
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
REAL	<i>Revised European American Lymphoma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SRD	Sem raça definida
SV40	<i>Simian virus 40</i>
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TBE	TRIS/Borato/EDTA
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRIS-HCl	<i>Trisaminomethane hydrochloride</i>
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Estadiamento clínico dos linfomas caninos proposto pela OMS.....	11
Quadro 2 -	Protocolo de quimioterapia da Universidade de Wisconsin para os linfomas caninos.....	12
Quadro 3 -	Classificação histopatológica de Kiel para os linfomas não-Hodgkin.	14
Quadro 4 -	Anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica. Jaboticabal, 2009.....	14
Quadro 5 -	Recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e incubação com anticorpo primário realizados nas reações de imunoistoquímica. Jaboticabal, 2009	15
Quadro 6 -	Sequências dos primers utilizados na amplificação da região dos exons quatro a nove do gene TP53. Jaboticabal, 2009.....	18
Quadro 7 -	Programa da reação de PCR. Jaboticabal, 2009.....	18
Quadro 8 -	Identificação, raça, sexo, peso, idade, localização anatômica, estadiamento clínico, tempo de sobrevida, classificação histológica (morfologia celular e grau de malignidade), imunofenótipo e reatividade da p53 dos cães com linfoma. Jaboticabal, 2009.....	21

Quadro 9 -	Número de casos, média e desvio padrão da imunorreatividade da p53 em cães com linfoma de acordo com fatores clínico-patológicos e tempo de sobrevivência. Jaboticabal, 2009.....	25
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vias de sinalização dependentes da p53. A p53 promove parada no ciclo celular pela ativação da p21, que controla a fosforilação de complexos ciclina-cdk. O reparo do DNA ocorre pela conjugação da p21 ao PCNA ou por estímulo direto da p53 ao gene XPC. A expressão de diversos mediadores da apoptose é regulada diretamente pela p53. A p53 também é capaz de inibir a angiogênese controlando a expressão da trombospondina. Adaptado de PECORINO L., (Molecular Biology of Cancer, 2008)..... 06
- Figura 2 - Esquema representativo do gene TP53, dividido em exons e íntrons e a região amplificada pelos *primers* P1, P2, P3 e P4. Jaboticabal, 2009..... 17
- Figura 3 - Distribuição dos cães quanto à localização anatômica dos linfomas. Jaboticabal, 2009..... 30
- Figura 4 - Distribuição dos estádios (III, IV e V) e subestádios (“a” e “b”) clínicos apresentados pelos cães com linfoma. Jaboticabal, 2009..... 30
- Figura 5 - Distribuição dos tipos histológicos e graus de malignidade dos linfomas, de acordo com a classificação de Kiel. Jaboticabal, 2009..... 31
- Figura 6 - Fotomicrografia de linfoma imunoblástico de alto grau de cão. As células são grandes e apresentam nucléolo central evidente. Classificação de Kiel. Hematoxilina-eosina, 400x. Jaboticabal,

	2009.....	31
Figura 7 -	Fotomicrografia de linfoma centrocítico de baixo grau. As células são pequenas, com núcleo irregular. Classificação de Kiel. Hematoxilina-eosina, 640x. Jaboticabal, 2009.....	32
Figura 8 -	Distribuição dos imunofenótipos dos linfomas. Jaboticabal, 2009.....	32
Figura 9 -	Fotomicrografia de linfoma T de cão. Positividade para o anticorpo anti-CD3. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 640x. Jaboticabal, 2009.....	33
Figura 10 -	Fotomicrografia de linfoma B de cão. Positividade para o anticorpo anti-CD79. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 100x. Jaboticabal, 2009.....	33
Figura 11 -	Fotomicrografia de linfoma com ausência de marcação para o anticorpo anti-p53. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 400x. Jaboticabal, 2009.....	34
Figura 12 -	Fotomicrografia de linfoma com positividade para o anticorpo anti-p53. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 640x. Jaboticabal, 2009.....	34
Figura 13 -	Cão, fêmea, American Pitbull, cinco anos. Linfoma alimentar. (A) Massa localizada em intestino delgado. (B) Fígado do mesmo animal, confirmando seu comprometimento. Jaboticabal, 2009.....	35

- Figura 14 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 1º par de *primers*. Padrão de migração de 558pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009..... 35
- Figura 15 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 2º par de *primers*. Padrão de migração de 578pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009..... 35
- Figura 16 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 3º par de *primers*. Padrão de migração de 570pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009..... 36
- Figura 17 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 4º par de *primers*. Padrão de migração de 579pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009..... 36
- Figura 18 - Eletroesferograma obtido pela reação de sequenciamento realizado com o *primer* P3 (*Forward*). Programa MEGA, versão 4.0. Jaboticabal, 2009..... 36

RESUMO

ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE SUPRESSOR DE TUMOR TP53 E IMUNORREATIVIDADE DA p53 EM LINFOMAS CANINOS

Sabendo-se da influência das mutações no gene TP53 no desenvolvimento das neoplasias e da discrepância entre os resultados obtidos pelas técnicas de sequenciamento e imunohistoquímica, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a sequência do TP53 e a imunorreatividade da p53, relacionando-as com fatores clínico-patológicos em cães com linfoma. Foram avaliados 12 cães com linfoma e cinco cães saudáveis. Amostras de neoplasia/linfonodo e de bulbo piloso foram obtidas. O diagnóstico histopatológico foi determinado pela classificação de Kiel. O imunofenótipo e a imunomarcagem da p53 foram determinados por imunohistoquímica. Para a imunomarcagem com a p53, utilizou-se anticorpo policlonal anti-p53 (CM1) na diluição de 1:500. A região do gene TP53 compreendida entre os exons quatro e nove (incluindo íntrons) foi amplificada por PCR e submetida ao sequenciamento. A média da imunorreatividade da p53 nos cães com linfoma foi $27,33\% \pm 12,14\%$, diferente da média do grupo controle ($0,75 \pm 0,5$) ($P < 0,05$). A ausência de marcação da p53 foi observada em apenas um caso de linfoma de baixo grau de malignidade, cujo cão apresentou um ano de sobrevivência. O outro caso de linfoma de baixo grau de malignidade apresentou a menor marcação da p53 (14,12%). O linfoma com maior marcação da p53 (50,56%) consistiu em um linfoma alimentar cujo cão evoluiu para o óbito no dia da consulta. As maiores médias de marcação foram observadas nos linfomas cutâneos, estágio clínico V, subestádio "b", imunofenótipo B e tempo de sobrevivência de até trinta dias, sem diferença estatística ($P > 0,05$). Apesar dos resultados obtidos pela imunohistoquímica, nenhuma mutação foi encontrada nas sequências analisadas. É possível concluir que a imunorreatividade da p53 pela imunohistoquímica não está primariamente relacionada a mutações na região compreendida entre os exons quatro a nove do gene TP53 nos linfomas caninos.

Palavras-chave: cão, linfossarcoma, p53.

SUMMARY

MUTATIONAL ANALYSIS OF TUMOR SUPPRESSOR GENE TP53 AND IMMUNOSTAINING OF p53 IN CANINE LYMPHOMAS

TP53 mutations are usually involved in cancer, but sequencing and immunohistochemistry results are often controversial. Thus, the aim of this study was to analyse both TP53 sequence and p53 immunostaining and to associate their findings to clinical-pathological features in dogs with lymphoma. Twelve dogs with lymphoma and five healthy dogs were included in this study. Tumor and hair sample was collected. Histopathological diagnosis was performed according to Kiel classification. Immunohistochemistry was performed to identify immunophenotype as well as p53 expression. Polyclonal antibody anti-p53 (CM1) was used at a 1:500 dilution. The region that encompasses exons 4-9 was amplified by means of PCR reactions and sequencing was then performed. p53 immunolabeling mean was $27,33\% \pm 12,14$ in canine lymphoma group. It was statistically different from control group mean ($0,75 \pm 0,5$) ($P < 0,05$). Only one p53-negative case was observed in a dog with low grade lymphoma, which presented one-year survival. Other low grade lymphoma presented lowest p53 immunoreactivity (14,12%). Highest reactivity (50,56%) was observed in dog with alimentary lymphoma, which died in the day of diagnosis. The highest immunolabeling means were verified in cutaneous presentation, clinical stage V, substage "b", immunophenotype B and survival time up to 30 days, but there was no significant difference ($P > 0,05$). Nevertheless, gene mutations were not observed in any sequence. In conclusion, p53 immunostaining is not essentially related to mutation in the gene TP53, particularly to the region between exons 4-9.

Keywords: dog, lymphosarcoma, p53

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, sabe-se que o câncer é uma doença genética cuja iniciação e progressão envolvem processos nos quais o DNA acumula uma série de lesões. Os cães, assim como os homens, comumente desenvolvem uma variedade de neoplasias, proporcionando valioso modelo na investigação dos mecanismos da oncogênese.

O linfoma canino apresenta muitas semelhanças com o linfoma humano, particularmente com relação às características histológicas, imunológicas e a responsividade aos agentes antineoplásicos, tornando-se um potencial modelo de estudo para a espécie humana. O gene supressor de tumor TP53 regula mecanismos anti-tumorais que previnem o acúmulo das mutações potencialmente oncogênicas e a instabilidade genômica. Quando inativado pode promover o crescimento celular descontrolado e a progressão tumoral. Contudo, os mecanismos que envolvem as mutações no TP53, bem como seu significado clínico, não estão bem estabelecidos em cães com linfoma.

A imunoistoquímica tornou-se em um período curto de tempo, uma das técnicas mais utilizadas em laboratórios de diagnóstico e de pesquisa. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na detecção da proteína p53 mutante em diversas neoplasias. Atualmente, as tecnologias em genética molecular têm facilitado os estudos dos genes, fornecendo maior conhecimento dos mecanismos etiológicos e abrindo perspectivas para a descoberta de medidas de prevenção no futuro. Com o advento da PCR, (*Polymerase Chain Reaction*), é possível obter um número elevado de cópias de DNA de um gene específico, que pode ser utilizada no sequenciamento para investigações de mutações.

Entretanto, mutações no TP53 nem sempre apresentam resultados compatíveis com a imunorreatividade da p53 e esta discrepância tem sido alvo de crescente interesse nas pesquisas relacionadas ao gene. Sabendo-se da influência das alterações do TP53 no desenvolvimento das neoplasias, este trabalho teve como objetivo analisar a sequência deste gene, bem como a expressão da p53, relacionando-as a fatores clínico-patológicos, como localização anatômica, estadiamento clínico, classificação histológica, imunofenótipo e tempo de sobrevivência em cães com linfoma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfoma Canino

O linfoma (linfossarcoma ou linfoma maligno) é uma neoplasia caracterizada pela proliferação clonal de linfócitos malignos nos órgãos linfóides, como medula óssea, linfonodos, baço e fígado (VONDERHAAR & MORRISON, 2002; TUREK et al., 2008). Devido à contínua migração destas células, os linfomas podem se originar em praticamente qualquer tecido do organismo (FAN, 2003; VAIL & YOUNG, 2007). É uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas no cão e corresponde a mais de 80% das neoplasias hematopoiéticas nesta espécie (DHALIWAL et al., 2003a). A etiologia é desconhecida (DHALIWAL et al., 2003a; VAIL & YOUNG, 2007), sendo acometidos normalmente os cães a partir da meia-idade, sem predileção por sexo (ETTINGER, 2003; TUREK et al., 2008). Cães sem raça definida (SRD) e das raças Pastor Alemão, Boxer, Rottweiler, Poodle, Cocker Spaniel e Fila Brasileiro são frequentemente acometidos no Estado de São Paulo (SEQUEIRA et al., 1999; FRÁGUAS, 2008).

Considerando-se a apresentação clínica, o linfoma em cães pode ser classificado quanto à localização anatômica em multicêntrico, alimentar ou gastrointestinal, cutâneo, mediastinal ou tímico e extranodal. O linfoma multicêntrico é mais comum, caracterizado por linfadenomegalia acompanhada ou não de hepatosplenomegalia. Nos cães com linfoma alimentar, a presença de massas abdominais palpáveis é relativa. Linfomas cutâneos são considerados raros, de difícil tratamento e progressão rápida; as lesões são variadas e dependem do estágio de evolução. A apresentação mediastinal caracteriza-se pela presença de uma massa no mediastino, frequentemente associada com efusão pleural. Dentre os linfomas extranodais mais comuns estão os linfomas nasais, oculares e cardíacos (DHALIWAL et al., 2003a; TUREK et al., 2008). Os sinais clínicos variam de acordo com a localização do tumor, porém sinais sistêmicos como linfadenopatia, apatia, hiporexia, hipertemia e efusões são comuns (VAIL & YOUNG, 2007; TUREK, 2008). Muitos cães apresentam anemia, hipoalbuminemia, linfocitose e trombocitopenia nos exames laboratoriais (PRICE et al., 1991; CARDOSO et al., 2004; TUREK, 2008). A hipercalcemia, mais freqüente em cães com linfomas de células T, é a síndrome paraneoplásica mais comum, causada principalmente por um peptídeo com

ação semelhante ao paratormônio, denominado PTHrp (*Parathyroid hormone related peptide*) e liberado pelas próprias células neoplásicas (TESKE, 1996; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

O estadiamento clínico do linfoma canino obedece às regras estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (OWEN, 1980) e tem sido vastamente aplicado em pesquisas relacionadas a esta neoplasia (FLORY et al., 2007). Este esquema classifica os linfomas em estádios I a V, de acordo com a extensão da doença, considerando ainda a presença de sinais sistêmicos (subestádios “a” e “b”). Além de estimar a extensão da doença, o estadiamento clínico influencia o prognóstico e o planejamento terapêutico (VAIL & YOUNG, 2007). O estadiamento clínico é considerado um importante fator prognóstico em cães com linfoma (JAGIELSKI et al., 2002). A maioria dos cães apresenta-se em estádios clínicos avançados, já que os estádios iniciais podem passar despercebidos pelos proprietários (DOBSON & GORMAN, 1993).

Diversos protocolos de classificação histopatológica têm sido propostos para o linfoma canino. Os esquemas de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), Working Formulation (ROSENBERG et al., 1982), REAL (*Revised European American Lymphoma*) (HARRIS, 1994) e WHO (*World Health Organization*) (JAFFE et al., 2001) foram desenvolvidos para o linfoma humano, mas se prestam bem aos linfomas caninos (PARODI et al., 1988; GREENLE et al., 1990; TESKE, 1996; DE MOURA et al., 2001a). Independente do sistema empregado, a histopatologia fornece o diagnóstico e tem valor prognóstico relevante, particularmente quando associada com imunofenótipo (de células T ou B) e estadiamento clínico (ISAACSON, 2000; DOBSON, 2004; PONCE et al., 2004). Morfologicamente, são determinados o padrão de crescimento e o tamanho das células (DE MOURA et al., 2001a). Os linfomas de baixo a médio grau de malignidade abrangem os linfomas linfocítico, centrocítico, centrocítico-centroblástico, linfomas de células T pleomórfico, linfoplasmacítico e os linfomas de zona T, enquanto os infomas de alto grau de malignidade classificam-se em imunoblástico, centroblástico, linfoblástico e linfoma de grandes células anaplástico (ROSENBERG et al., 1982; LENNERT & FELLER, 1990; HARRIS, 1994). Os cães apresentam com maior

frequência, linfomas de médio a alto grau, independente do esquema de classificação histopatológica empregado (GREENLE et al., 1990; FOURNEL-FLEURY et al., 1997).

Entretanto, grande parte dos esquemas de classificação histopatológica atuais exige a imunofenotipagem do linfoma, procedida frequentemente mediante imunistoquímica (DE MOURA et al., 2001b; FOURNEL-FLEURY et al., 2002; SUEIRO et al., 2004). O imunofenótipo B é mais comum nos cães com linfoma, ao passo que o imunofenótipo T é considerado um indicador prognóstico fidedigno, sugestivo de períodos de remissão e sobrevida mais curtos (KIUPEL et al., 1999; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

Cães com linfoma respondem bem à quimioterapia antineoplásica (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; TUREK et al., 2008), sendo esta a principal conduta terapêutica a ser instituída. A poliquimioterapia é a modalidade mais utilizada no tratamento destes animais (DHALIWAL et al., 2003b). A administração de ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona (MELLANBY et al., 2002; DOBSON, 2004), constitui um dos protocolos mais utilizados para o tratamento do linfoma canino, desde sua descrição na literatura em 1973, por SQUIRE e colaboradores. Contudo, o protocolo da Universidade de Wisconsin, que adiciona L-asparaginase e doxorrubicina aos fármacos anteriores, é apontado como o mais eficaz, proporcionando períodos de remissão e sobrevida mais duradouros (CHUN et al., 2000).

Os cães, assim como os homens, comumente desenvolvem uma variedade de neoplasias, proporcionando valioso modelo na investigação dos mecanismos da oncogênese (KRAEGEL et al., 1995). O linfoma canino apresenta muitas semelhanças com o linfoma humano, particularmente com relação às características histológicas, imunológicas e a responsividade aos agentes antineoplásicos (TESKE, 1996). Devido a esta similaridade, o linfoma canino torna-se um potencial modelo de estudo para a espécie humana (GREENLE et al., 1990; TESKE, 1996; DHALIWAL et al., 2003a)

2.2 Gene Supressor de Tumor TP53

Atualmente, sabe-se que o câncer é uma doença genética cuja iniciação e progressão envolvem processos nos quais o DNA acumula uma série de lesões. Desta

forma, acredita-se que a oncogênese seja resultante de alterações estruturais e/ou funcionais de alguns genes cuja função é controlar o crescimento normal e a diferenciação das células que compõem o organismo (SILVA, 2004). Os proto-oncogenes geralmente estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular e quando mutados são chamados oncogenes. De maneira oposta, os genes supressores de tumor atuam restringindo a proliferação celular (CAMARGO, 1999; PECORINO, 2008). A ativação de proto-oncogenes associados com a inativação de genes supressores de tumor são as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento tumoral (MORRISON, 2002; SILVA, 2004).

Nos cães, o gene supressor de tumor TP53 (*tumor protein 53*) está localizado no cromossomo cinco e codifica a proteína p53 (*phosphoprotein 53*), reguladora de diferentes vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos ao DNA (depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, oncoproteínas virais, e ativação de oncogenes celulares, etc) (SILVA, 2004; MAXIMOV & MAXIMOV, 2008). A p53 regula mecanismos antitumorais que previnem o acúmulo das mutações potencialmente oncogênicas e a instabilidade genômica. Estes mecanismos incluem a ativação de proteínas de reparo do DNA, parada no ciclo celular na fase G1/S e apoptose, além de inibirem a angiogênese. Por conseguinte, sua inativação pode resultar no crescimento celular descontrolado e na progressão tumoral (VOGELSTEIN et al., 2000; NASIR et al., 2001; ARGYLE, 2008) (Figura 1).

A identificação dos genes envolvidos na oncogênese consiste no primeiro passo para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e de terapias alternativas mais específicas e eficazes (PARMIGIANI & CAMARGO, 2004). De acordo com VELDHOEN & MILNER (1998), a p53 humana e canina apresentam estrutura e função semelhantes, por isso considerar a p53 canina como um dos principais alvos para o desenvolvimento de novas terapias para ambas as espécies. O TP53 está alterado em diversas neoplasias humanas, apresentando-se mutado em mais de 50% dos casos (PIETSCH et al., 2006).

Mutações neste gene também têm sido identificadas em cães com carcinoma de tireóide (DEVILLE et al., 1994), carcinoma de células escamosas (TEIFKE & LÖHR,

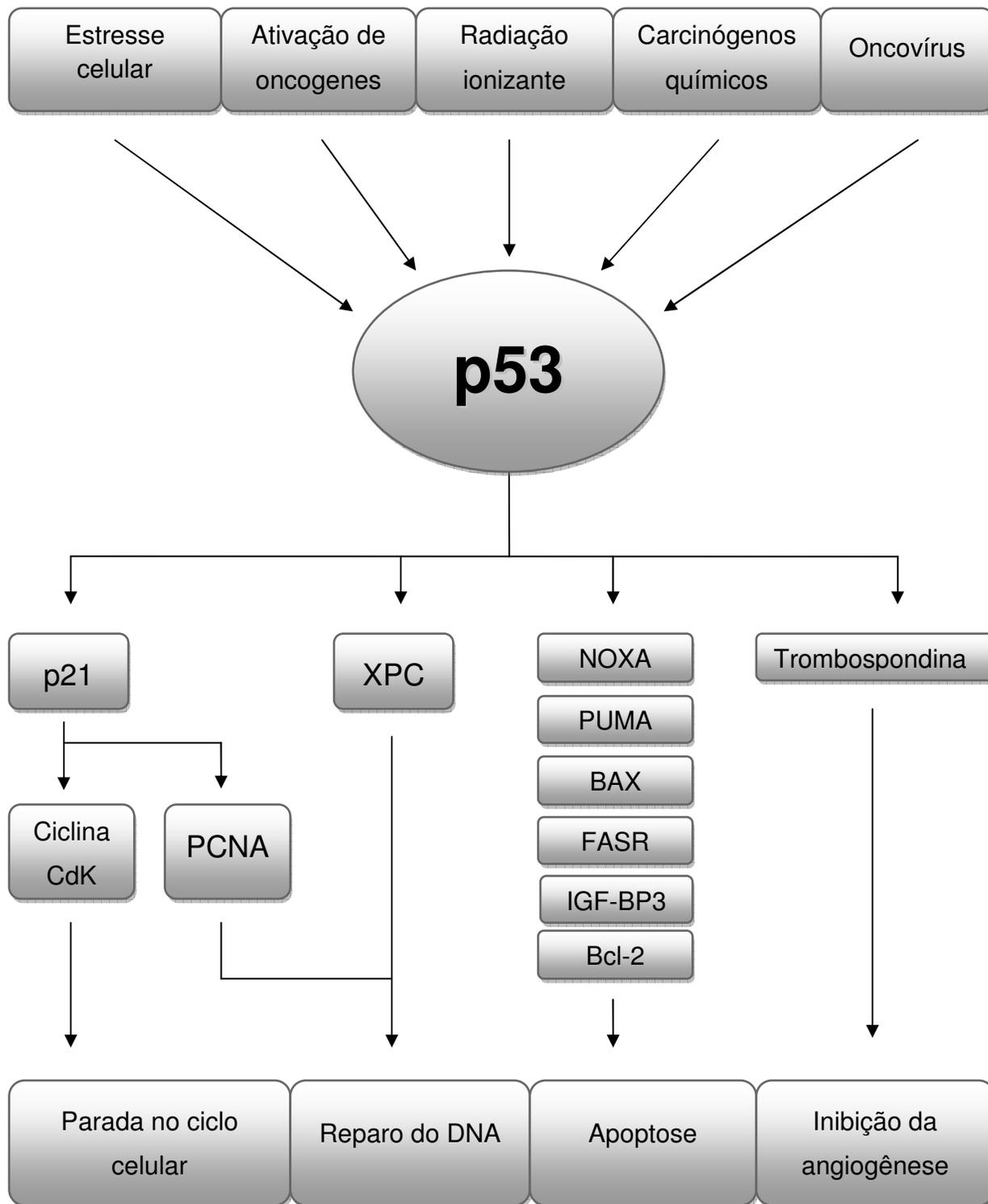


Figura 1 – Vias de sinalização dependentes da p53. A p53 promove parada no ciclo celular pela ativação da p21, que controla a fosforilação de complexos ciclina-cdk. O reparo do DNA ocorre pela conjugação da p21 ao PCNA ou por estímulo direto da p53 ao gene XPC. A expressão de diversos mediadores da apoptose é regulada diretamente pela p53. A p53 também é capaz de inibir a angiogênese controlando a expressão da trombospondina. Adaptado de PECORINO L., (Molecular Biology of Cancer, 2008).

1996), osteossarcoma (JOHNSON et al., 1998), melanoma (ROELS et al., 2001), tumor de mama (CHUNG-HO & OH-KYEONG, 2002), tumor venéreo transmissível (GERARDI, 2008), entre outras neoplasias. Contudo, os mecanismos que envolvem as mutações no TP53, bem como seu significado clínico, não estão bem estabelecidos em cães com linfoma (SOKOLOWSKA et al., 2005).

A perda da função do TP53 comumente resulta de eventos mutacionais, como mutações pontuais do tipo *nonsense* ou *missense*, perdas alélicas, rearranjos e deleções (LEVINE et al., 1994). A grande maioria das mutações encontradas no TP53 em tumores humanos está distribuída sobre o domínio central da região codificadora, entre os exons cinco e nove, afetando a capacidade da p53 de se ligar a sequências no DNA. Uma ou mais mutações podem ser herdadas ou podem surgir como consequência da exposição a carcinógenos ambientais ou a agentes infecciosos (SILVA, 2004). Em seres humanos, mutações germinativas em um dos alelos do gene TP53 estão associadas com uma síndrome denominada Li Fraumeni, caracterizada pela susceptibilidade a desenvolver uma série de neoplasias distintas (BARSINSKI, 2004).

VELDHOEN et al. (1998) relataram pela primeira vez, uma mutação herdada no TP53 de um cão da raça Bull Mastiff, cuja presença de um único alelo funcional da p53 selvagem pode ter resultado em predisposição ao linfoma. Este achado confirmou o concluído por ONIONS (1984), que sugeriu predisposição de cães da raça Bull Mastiff da mesma família a desenvolverem linfomas. NASIR & ARGYLE (1998), ao sequenciarem o exon cinco do gene TP53 de um cão da raça Bull Mastiff com linfoma, observaram uma mutação do tipo substituição no códon 145 (G → A), resultando em uma substituição do aminoácido arginina (CGC) por histidina (CAC). Outro estudo identificou a inserção de um par de bases (AC) no exon sete, resultando em uma mutação do tipo *frameshift* (alteração no quadro de leitura) no códon 234 e a incorporação de um códon de parada na posição 247 (VELDHOEN et al., 1998), cuja presença no domínio central do TP53 pode ter sido suficiente para abolir a expressão da proteína (HARVEY & LEVINE, 1991). O TP53 também pode conter polimorfismos que comprometem suas funções, de natureza e mecanismos de ação parcialmente conhecidos, cujo impacto no desenvolvimento do câncer e na eficácia da terapia estão

sendo progressivamente compreendidos. Deste modo, haplótipos do TP53 (combinações de diferentes polimorfismos neste gene) devem ser avaliados em conjunto com os estudos de mutações únicas que predominam na literatura (PIETSCH et al., 2006).

O estudo da imunorreatividade da p53 em cães, através da imunistoquímica, tem se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa (KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2000). A p53 nos tecidos normais possui meia-vida muito curta, sendo mantida em baixos níveis por mecanismos que garantem sua rápida degradação. Assim, pelos ensaios de imunistoquímica, é possível detectar a p53 mutante em neoplasias, uma vez que esta adota conformação mais resistente à degradação do que a proteína selvagem (não-mutante) (SILVA, 2004). Em um estudo retrospectivo realizado pelo Departamento de Patologia Veterinária da Unesp – Jaboticabal demonstrou-se que a superexpressão da p53 estava relacionada com comportamento agressivo conferido aos linfomas de alto grau histológico nos cães. Este estudo também sugeriu maior intensidade de imunorreatividade das células em linfomas de células T (SUEIRO et al., 2004). Entretanto, resultados obtidos por SOKOLOWSKA et al. (2005), apesar de confirmarem a maior expressão da p53 nos linfomas caninos de células T, não indicaram associação com a classificação histológica. O valor prognóstico da expressão da p53 por imunistoquímica também tem sido avaliada em algumas neoplasias caninas. A superexpressão desta proteína está associada com tempo de sobrevida mais curto em cadelas com neoplasia mamária, enquanto que em cães com mastocitoma, a expressão da p53 não tem se revelado um marcador prognóstico confiável (MUKARATIRWA, 2005).

Entretanto, mutações no TP53 nem sempre apresentam resultados compatíveis com a imunorreatividade da p53 e esta discrepância tem sido alvo de crescente interesse nas pesquisas relacionadas ao gene (HENSON, 1996; TOLBERT et al., 1999; KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2000; HANAZONO et al., 2006).

2.3 Mutações em Íntrons e o Desenvolvimento de Neoplasias

A função dos íntrons, segmentos que se localizam entre os exons, não codificantes de proteínas, começou a ser reconhecida especialmente após o sequenciamento do genoma humano em 2003, embora permaneça até hoje no campo das especulações (SOLHA & SILVA, 2004). Enfoque particular tem sido destinado às mutações nos íntrons, antes conhecidos como “DNA-lixo”. Ao contrário do que se era postulado, sequências intrônicas são importantes para a biologia das células e sua maior ou menor presença num organismo pode estar relacionada ao estágio de desenvolvimento de doenças complexas e funcionar como um marcador do grau de malignidade de certas formas de câncer (LOZANO & LEVINE, 1991; VARLEY et al., 1998; LEHMAN et al., 2000; REIS et al., 2004).

Estudos realizados com câncer de próstata humana demonstraram que mais da metade das sequências de DNA não codificantes produzem transcritos que interferem com a expressão de proto-oncogenes. Essa modulação, quando de alguma forma é alterada, pode contribuir para o desenvolvimento de um tumor (REIS et al., 2004). Outras neoplasias também podem estar relacionadas com mutações em íntrons, inclusive do TP53. Diversas pesquisas reforçam o conceito de que polimorfismos nos íntrons do TP53 estão associados com maior risco ao câncer de mama e ovariano em mulheres (WANG-GOHRKE et al. 1999; LEHMAN et al., 2000; FISZER-MALISZEWSKA et al., 2003). Dos polimorfismos intrônicos do TP53 humano que reconhecidamente interferem na sua expressão, dois são bem estabelecidos. O primeiro e mais estudado, ocorre no íntron três e caracteriza-se pela inserção de 16pb na posição do nucleotídeo 11951. O segundo é identificado por uma transversão de G → C na posição do nucleotídeo 13964 do íntron seis (PIETSCH et al., 2006).

O processo de *splicing* também apresenta fundamental importância na integridade funcional das proteínas. Este é o fenômeno pelo qual os íntrons são removidos de um RNA precursor, produzindo um RNA maduro funcional. Nos eucariotos, cada íntron é constituído de uma sequência GU inicial (3') e uma sequência AG final (5'). Para que o *splicing* ocorra corretamente, estes sítios devem ser reconhecidos e, mutações nestes nucleotídeos podem prejudicar o evento,

comprometendo a formação da proteína (BÉROUD & SOUSSI, 2003). Adicionalmente, os íntrons geram a possibilidade de que uma mesma seqüência de DNA codifique mais de uma proteína através do *splicing* alternativo. Este processo é possível devido a mudanças na fase leitura que permitem que regiões do íntron, ora “se tornem exons” para a produção de uma proteína diferente (SOLHA & SILVA, 2004; WAIZBORT & SOLHA, 2007).

Embora o genoma do cão esteja finalizado (LINDBLAD-TOH et al, 2005), são raros os estudos sobre as seqüências dos íntrons no gene TP53 em cães (KRAEGEL et al., 1995; CHU et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Seleção

Foram selecionados 12 cães com diagnóstico citológico de linfoma, com ou sem raça definida, entre machos e fêmeas, atendidos no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/Unesp - Jaboticabal, durante o período de julho de 2006 a julho de 2007. Como grupo controle foram considerados cinco cães provenientes do Canil Municipal de Sertãozinho – São Paulo.

3.1.2 Estadiamento

Após anamnese e exame físico, o estadiamento clínico do linfoma foi estabelecido para cada paciente, com base em exames hematológicos, mielograma, urinálise, exames radiográficos do tórax e ultrassom do abdome (Quadro 1).

Quadro 1 – Estadiamento clínico dos linfomas caninos proposto pela OMS.

Classificação clínica da OMS para o linfoma em cães	
Estádio I	Envolvimento limitado a um linfonodo
Estádio II	Envolvimento de linfonodos regionais
Estádio III	Aumento generalizado dos linfonodos
Estádio IV	Envolvimento do fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia
Estádio V	Envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos
a: sem sinais sistêmicos	
b: com sinais sistêmicos	

Adaptado de OWEN, 1980

3.1.3. Quimioterapia Antineoplásica

Os animais foram tratados com o protocolo de quimioterapia da Universidade de Wisconsin, constituído de sulfato de vincristina, L-asparaginase, ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisona (GARRET et al., 2002) (Quadro 2):

Quadro 2 - Protocolo de quimioterapia da Universidade de Wisconsin para os linfomas caninos.

SEMANA	QUIMIOTERÁPICO	DOSE E VIA DE ADMINISTRAÇÃO
1	L-Asparaginase	400 UI/Kg – IM
	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
	Prednisona	2 mg/kg - PO
2	Ciclofosfamida	250 mg/m ² - PO
	Prednisona	1,5 mg/kg - PO
3	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
	Prednisona	1 mg/kg - PO
4	Doxorrubicina	30 mg/m ² - IV
	Prednisona	0,5 mg/kg - PO
6	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
7	Ciclofosfamida	250 mg/m ² - PO
8	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
9	Doxorrubicina	30 mg/m ² - IV
11	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
13	Ciclofosfamida	250 mg/m ² - PO
15	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
17	Doxorrubicina	30 mg/m ² - IV
19	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
21	Ciclofosfamida	250 mg/m ² - PO
23	Vincristina	0,7 mg/m ² - IV
25	Doxorrubicina	30 mg/m ² - IV

Adaptado de Garret et al. (2002).

O tratamento é interrompido após a 25ª semana se houver remissão completa da neoplasia.

IM: intramuscular; IV: intravenosa; PO: via oral.

Considerou-se como tempo de sobrevida, o período entre o dia do diagnóstico ao óbito do paciente.

3.2 Coleta e Armazenamento das Amostras

Dos cães com linfoma, foram coletadas amostras da neoplasia e de tecido normal (bulbo piloso), antes do início do tratamento. A obtenção dos bulbos pilosos objetivou a detecção de possíveis mutações herdadas, caso presentes no tecido normal. As amostras de neoplasia foram obtidas do linfonodo ou tecido acometido, mediante biópsia incisional, enquanto as amostras de pêlo foram obtidas por arrancamento, com o auxílio de uma pinça. Dos animais do grupo controle, foram coletados linfonodos inguinais e pêlos. Parte das amostras tumorais ou de linfonodos foi conservada em formalina neutra tamponada a 10% (pH 7,6) durante 24 horas e em álcool a 70% durante 48 horas, para realização da análise histopatológica e imunoistoquímica. A outra parte das amostras, assim como as amostras de pêlo, foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

3.3 Processamento do Material

3.3.1 Histopatologia e Imunoistoquímica

Para a classificação histopatológica, determinação do imunofenótipo e da imunomarcagem da p53, as amostras de neoplasia conservadas em formalina/álcool foram incuídas em parafina e submetidas a protocolos específicos para cada análise. Estas técnicas foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/Unesp - Botucatu.

Foram realizados cortes histológicos de cinco micrômetros, corados pelo método histoquímico Hematoxilina-eosina (HE) e utilizados para análise e classificação histológica dos linfomas. Empregou-se a classificação histopatológica de Kiel (LENNERT & FELLER, 1990), proposta para os linfomas não-Hodgkin humanos, pela qual são considerados a morfologia celular e o grau de malignidade (Quadro 3).

Quadro 3 - Classificação histopatológica de Kiel para os linfomas não-Hodgkin.

GRAU DE MALIGNIDADE	MORFOLOGIA CELULAR
ALTO	Centrobástico Linfobástico T ou B Imunobástico Anaplásico
BAIXO	Linfocítico Linfoplasmocítico Centrocítico Centrobástico-centrocítico

Adaptado de (LENNERT & FELLER, 1990)

A determinação do imunofenótipo e a imunomarcagem da p53, foram obtidas mediante técnica de imunistoquímica, utilizando anticorpo primário específico para cada reação (Quadro 4). Foram realizados cortes de três micrômetros, montados em lâminas previamente preparadas com cola líquida a base de organossilano (cód. A3648, Sigma[®]). Anteriormente à reação, as lâminas permaneceram em estufa a 56°C durante 60 minutos. Em seguida, foram deparafinizadas em banhos de xilol, reidratadas em gradiente decrescente de álcool e lavadas com água destilada.

Quadro 4 – Anticorpos utilizados nas reações de imunistoquímica. Jaboticabal, 2009.

ANTICORPO	CLONE	CÓDIGO	MARCA	DILUIÇÃO*
Anti-CD3	Policlonal	A0452	DakoCytomation [®]	1:100
Anti-CD79a	HM57	M7050	DakoCytomation [®]	1:50
Anti-p53	Policlonal CM1	NCL-p53-CM1	Novocastra [®]	1:500

*Diluição em solução a 0,1% de albumina sérica bovina em solução tampão de TRIS.

Para as reações com os anticorpos anti-CD3 (células T) e anti-CD79a (células B), a recuperação antigênica foi realizada com solução de EDTA (pH 8) (Apêndice A), em banho-maria a 95°C, durante 30 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão das lâminas em água oxigenada 10 volumes, durante 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário a 4°C, em câmara úmida, durante 18 horas (Quadro 5).

Para a reação com o anticorpo anti-p53, a recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato de sódio, 10mM (pH 6,0), em panela de pressão, durante três minutos após atingir pressão. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela utilização do *Dual Endogenous Enzyme Block* (cód. S2003, DakoCytomation®), durante 10 minutos, seguido do *Protein Block Serum-Free* (cód. X0909, DakoCytomation®), durante 10 minutos e do *Goat Serum (Normal)* (cód. X0907, DakoCytomation®), diluído em solução tampão TRIS, (Apêndice A), na proporção de 1:40, durante 20 minutos. Durante o bloqueio, as lâminas permaneceram incubadas em estufa a 27°C. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário a 27°C, em câmara úmida, durante 2 horas (Quadro 5).

Quadro 5 – Recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e incubação com anticorpo primário realizados nas reações de imunistoquímica. Jaboticabal, 2009.

ANTICORPO	Recuperação antigênica	Bloqueio da peroxidase endógena	Incubação com anticorpo primário
Anti-CD3	EDTA (pH 8) Banho-maria (95°C) 30 minutos	H ₂ O ₂ (10 vol) 20 minutos	Câmara úmida Geladeira (4°C) 18 horas
Anti-CD79a	EDTA (pH 8) Banho-maria (95°C) 30 minutos	H ₂ O ₂ (10 vol) 20 minutos	Câmara úmida Geladeira (4°C) 18 horas
Anti-p53	Citrato de sódio (pH 6,0) Panela de pressão 3 minutos	<i>Dual Endogenous Enzyme Block</i> (10 minutos) <i>Protein Block Serum-Free</i> (10 minutos) Goat Serum (Normal) (20 minutos) 27°C	Câmara úmida Ambiente (27°C) 2 horas

Após a incubação com os respectivos anticorpos, as lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS (Apêndice A). Os cortes foram incubados com um anticorpo secundário conjugado a um polímero e moléculas de peroxidase do kit *EnVision Dual-link* (cód. K4063, DakoCytomation®) em estufa a 27°C, durante 60 minutos. A revelação (ligação antígeno-anticorpo) foi visibilizada com substrato cromogênico

3,3'diaminobenzidina (Dab), *Liquid* (cód. K3466, DakoCytomation®), durante três minutos e os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris. Posteriormente, os mesmos cortes foram desidratados em alcoóis, diafanizados em xilol e as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínula.

Para a confecção das lâminas de controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por imunoglobulina da espécie em que o anticorpo primário foi produzido (CD3 e p53: Ig de coelho; CD79a: Ig de camundongo). Como controle positivo das reações com o anticorpo anti-p53, foram utilizados cortes de carcinoma de células escamosas de cão.

As lâminas foram avaliadas por microscopia de luz. O imunofenótipo T ou B foi determinado conforme marcação positiva para o anticorpo anti-CD3 ou anti-CD79, respectivamente. A avaliação da reatividade da p53 foi realizada em objetiva de 40x. Foram contadas as células positivas para o anticorpo e todas as células presentes em cinco campos aleatórios. Estes valores foram transformados em percentual de células positivas. Considerou-se como reação positiva para a marcação da p53, apenas os linfomas que apresentaram o percentual mínimo de 5% de células positivas. Para esta análise, utilizou-se um equipamento analisador de imagens, que integra um microscópio óptico (Leica DMR) acoplado a uma câmera digital (Leica DFC500), gerando imagens em um programa computacional de análise morfométrica Leica QWin Plus.

3.3.2 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico e a técnica de PCR foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/Unesp-Jaboticabal.

As extrações dos DNAs genômicos das amostras de neoplasia e dos pêlos foram realizadas utilizando-se o *kit DNeasy Blood and Tissue* (cód. 69506, Qiagen®), conforme instruções do fabricante. Para verificação da integridade do DNA, realizou-se eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X (TRIS-HCL 89mM; EDTA 2,5mM e ácido bórico 89mM, pH 8,3), com brometo de etídeo (0,05µg/mL). Aplicou-se 2,0µL de DNA genômico diluídos em 3,0µL de tampão de corrida (TRIS-HCl 0,1M, pH

6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%) durante aproximadamente uma hora em tensão de 100V. O gel foi fotodocumentado em aparelho Gel Doc 2000 (Bio-Rad®) para visibilização das bandas.

As amostras foram posteriormente tratadas com RNase - Ribonuclease A (cód. R-4875, Sigma®) para eliminar o RNA presente e melhorar a qualidade do DNA. Após este procedimento, realizou-se quantificação em espectrofotômetro Beckman-DU®, pela razão entre leituras de absorbâncias a 260 e 280nm. As amostras foram aliqüotadas e diluídas em água ultrapura, obtendo-se concentração final de 100ng/μL. Parte deste material foi armazenada em freezer a -20°C (estoque) e outra parte em geladeira a 4°C, sendo utilizada à medida que as reações de PCR fossem efetuadas.

3.3.3 Reação de PCR

Para amplificação da região dos exons quatro a nove do gene TP53 (incluindo íntrons) foram confeccionados quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) a partir da seqüência de nucleotídeos depositada no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), acesso nº U62133. As seqüências destes *primers* foram determinadas com auxílio do *Primo Pro 3.4: PCR Primer Design* (<http://www.changbioscience.com/primo/primo.html>) (Figura 2) (Quadro 6).

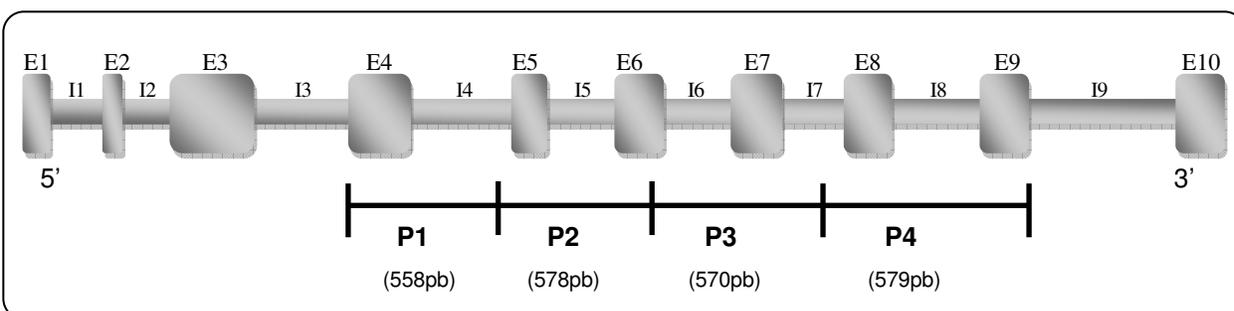


Figura 2 - Esquema representativo do gene TP53, dividido em exons e íntrons e a região amplificada pelos *primers* P1, P2, P3 e P4. Jaboticabal, 2009.

Para a reação de PCR, foram misturados 10pM de cada *primer* (Bio-synthesis®) com 100ng do DNA genômico, 0,2mM de cada dNTP (cód. 10297-018, Invitrogen®), 2mM de Sulfato de Magnésio (Invitrogen®), 1X PCR *buffer* (Invitrogen®) e 1U de

Platinum Taq DNA Polimerase high fidelity (cód. 11304-029, Invitrogen®), obtendo-se volume final de 25µL. O programa de PCR foi realizado em termociclador e constituiu-se de 40 ciclos (Quadro 7).

Quadro 6 - Sequências dos *primers* utilizados na amplificação da região dos exons quatro a nove do gene TP53. Jaboticabal, 2009.

Pares de <i>primers</i>	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento obtido (pb)
P1 (forward) P1 (reverse)	CCCTACAGTCTTCGGAGCTG AGACGCTCAACTGCTGAGCTG	558
P2 (forward) P2 (reverse)	CAGCTCAGCAGTTGAGCGTC AAGGCACCACCACACTGTGTC	578
P3 (forward) P3 (reverse)	TGTGGTGGTGCCTTATGAGCC GACTCCTAGCCACCCTCATC	570
P4 (forward) P4 (reverse)	ATGAGGGTGGCTAGGAGTCAG AGCCTTGGTACCTGAAGGG	579

Quadro 7 - Programa da reação de PCR. Jaboticabal, 2009.

ETAPA*	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	95	5 minutos
2	95	1 minuto
3	X	30 segundos
4	72	1 minuto
5	72	5 minutos
6	4	∞

*Etapas 2 a 4 são repetidas 40 vezes; x: temperatura de anelamento do iniciador; ∞: tempo infinito (de armazenamento).

As reações de PCR foram padronizadas com a temperatura de anelamento a 64°C para os pares de primers 1, 2 e 3. Para o par de primers 4, a temperatura de anelamento estabelecida foi de 67°C. Para a verificação dos fragmentos amplificados na reação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) com brometo de etídio. Os produtos obtidos foram purificadas com o *kit QIAquick PCR*

Purification (cód. 28104, Qiagen®) e armazenados em geladeira a 4°C, até que o seqüenciamento fosse realizado.

3.3.4 Sequenciamento

Os produtos amplificados por PCR foram enviados em duplicata ao Centro de Estudos do Genoma Humano (USP), que realizou o sequenciamento de DNA utilizando o *MegaBACE* 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare®. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o *kit DYEnamic ET Dye Terminator* (com *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*), código US81090. As seqüências obtidas foram alinhadas com a seqüência do cromossomo cinco do cão depositada no *GenBank*, (ref. NC_006587/*Canis familiaris chromosome 5, whole genome shotgun sequence*), com auxílio do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 4.0. A homologia entre as seqüências foi verificada pela ferramenta *Clustal W*, disponível no programa.

3.4 Análise Estatística

Realizou-se o teste *t* de *Student* para verificar se houve diferença das médias do percentual de imunorreatividade da p53 entre cães saudáveis e com linfoma e também entre as localizações anatômicas cutânea e multicêntrica, estádios clínicos III e V, subestádios “a” e “b”, imunofenótipo B e T e tempo de sobrevivência (até 30 dias ou entre dois e cinco meses). Considerou-se o grau de significância 5%. Análise descritiva dos dados foi empregada para o restante dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição dos animais com relação a raça, sexo, peso, idade, localização anatômica, estadiamento clínico, tempo de sobrevida, classificação histopatológica (morfologia celular e grau de malignidade), imunofenótipo e reatividade da p53 estão apresentados no Quadro 8.

4.1 Dados Epidemiológicos e Clínicos

Dos doze cães avaliados, sete eram machos (58,33%) e cinco fêmeas (41,67%). A idade variou entre três e dez anos ($5,83 \pm 2,12$) e o peso entre oito e 41Kg ($22,92 \pm 11,27$). Com relação à raça, os animais apresentaram a seguinte distribuição: três cães SRD (25%), dois da raça Poodle (16,67%), dois American Pit Bulls (16,67%), dois Rottweilers (16,67%) e três pertenciam a outras raças (25%) (Boxer, Bull Terrier e Bulldog inglês). Cães das raças Boxer, Basset Hound e Rottweiler são considerados predispostos ao desenvolvimento do linfoma (VONDERHAAR & MORRISON, 2002; VAIL & YOUNG, 2007). Apesar de estas raças estarem presentes nesta pesquisa, os cães sem raça definida (SRD) prevaleceram (25%) devido a sua alta ocorrência na casuística do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

De acordo com a localização anatômica, seis cães (50%) apresentaram a forma multicêntrica, manifestada principalmente por linfadenopatia regional ou generalizada, seguida por cinco casos de linfoma cutâneo (42%) e um de linfoma alimentar (8%) (Figura 3). A localização anatômica dos linfomas caninos é bastante variável, sendo a apresentação multicêntrica, a mais comum (TESKE, 1994; DHALIWAL et al., 2003a), conforme observado neste estudo. Entretanto, a forma cutânea foi a segunda mais freqüente, contradizendo a literatura, que considera esta apresentação rara (TESKE, 1994; DHALIWAL et al., 2003a).

Quadro 8 - Identificação, raça, sexo, peso, idade, localização anatômica, estadiamento clínico, tempo de sobrevida, classificação histológica (morfologia celular e grau de malignidade), imunofenótipo e reatividade da p53 dos cães com linfoma. Jaboticabal, 2009.

ID	RAÇA	SEXO	PESO (KG)	IDADE (ANOS)	LOCAL. ANAT.	ESTAD.	TEMPO DE SOBREVIDA	MORFOLOGIA CELULAR	GRAU DE MALIGNIDADE	IMUNO-FENÓTIPO	REATIVIDADE p53 (%)
L1	B. Terrier	Fe	20	5	M	IVa	1 ano	CC-CB	BAIXO	B	0
L2	Buldog	Fe	20	4	M	IIIa	>5 meses	CC	BAIXO	B	14,12
L3	SRD	Ma	17	10	C	Vb	7 dias	IB	ALTO	T	19,13
L4	Rottweiler	Ma	40	6	C	Va	2 meses	CB	ALTO	B	20,22
L5	Poodle	Ma	8	7	M	Vb	9 dias	CB	ALTO	B	20,70
L6	Rottweiler	Ma	41	4	M	Vb	4 dias	AN	ALTO	T	21,08
L7	Boxer	Fe	26	4	M	IIIb	30 dias	CB	ALTO	B	24,12
L8	Poodle	Ma	8	7	C	Va	30 dias	AN	ALTO	T	34,44
L9	SRD	Ma	10	9	C	Va	3 meses	CB	ALTO	B	41,60
L10	A. Pitbull	Fe	30	5	A	IVb	Óbito*	LB	ALTO	B	50,56
L11	SRD	Ma	25	6	C	Vb	Óbito*	LB	ALTO	T	-
L12	A. Pitbull	Fe	30	3	M	IIIa	3 meses	IB	ALTO	B	-

ID: identificação do animal. Para sexo, Ma: macho, Fe: fêmea; para localização anatômica, C: cutâneo, M: multicêntrico, A: alimentar; para morfologia celular, IB: imunoblástico, CC: centrocítico, CB: centroblastico, AN: anaplásico, LB: linfoblástico.

* paciente evoluiu para o óbito no dia da consulta.

- não determinada.

Considerando-se o estadiamento clínico, a maioria dos cães com linfoma é diagnosticada em estádios avançados (III, IV ou V) (GREENLEE et al., 1990; SEQUEIRA, 1992; TESKE, 1994; VONDERHAAR & MORRISON 2002; VAIL & YOUNG 2007). Sete cães apresentaram estágio V (58,33%), três apresentaram estágio III (25%) e dois, estágio IV (16,67%). Nenhum paciente foi diagnosticado em estágio inicial (I ou II), provavelmente devido à inabilidade dos proprietários em identificar estas fases no cão. Seis animais apresentaram subestádio “a” (50%) e seis, subestádio “b” (50%) (Figura 4). Os sinais sistêmicos mais comuns foram apatia e hiporexia. A presença de sinais sistêmicos é considerada por VONDERHAAR & MORRISON (2002), um fator prognóstico desfavorável e sugestivo de tempo de sobrevida mais curto.

4.2 Diagnóstico Histopatológico e Imunofenótipo

Dois cães apresentaram baixo grau de malignidade (16,67%), enquanto dez apresentaram linfoma de alto grau (83,33%) (Figura 5). A predominância dos linfomas de alto grau é frequentemente verificada nas pesquisas sobre esta neoplasia em cães (GREENLEE 1990; TESKE 1994, FOURNEL-FLEURY et al. 1997, PONCE et al. 2004, PESSOA, 2005). Dos linfomas de alto grau, observaram-se quatro tipos histológicos: dois imunoblásticos (16,67%) (Figura 6), quatro centroblasticos (33,33%), dois anaplásicos (16,67%) e um linfoblástico (8,33%). Um linfoma centrocítico-centroblastico (8,33%) e um centrocítico (8,33%) (Figura 7) constituíram os dois casos de linfoma de baixo grau de malignidade.

A distribuição dos imunofenótipos (Figura 8) foi de quatro linfomas T (33,33%) (Figura 9) e oito linfomas B (66,67%) (Figura 10), confirmando a maior frequência dos linfomas B em cães, comumente observada em estudos anteriores (TESKE 1994, FOURNEL-FLEURY et al. 2002).

4.3 Reatividade da p53

A marcação da p53 mutante variou de 14,12 a 50,56%, com média $27,33 \pm 12,14\%$. Esta média diferiu estatisticamente da média do grupo controle

(0,75±0,5%) (P<0,05). Estes resultados contradizem a maioria dos estudos encontrados na literatura que revelam que a marcação da p53 nos linfomas caninos é baixa, raramente alcançando valores acima de 10% (SUEIRO et al. 2004; SOKOLOWSKA et al., 2005; SUZANO, 2007).

Não foi possível estimar a reatividade em duas amostras (L11 e L12) devido ao número escasso de células por campo. Quando presente, a marcação apresentou-se restrita ao núcleo. O controle positivo (carcinoma de células escamosas) apresentou marcação intensa, ao passo que o controle negativo não apresentou marcação.

Dos casos avaliados, apenas um (10%) não apresentou marcação (L1) (Figura 11). Este foi o único linfoma classificado como centrocítico-centroblástico (baixo grau de malignidade), cujo cão alcançou o maior tempo de sobrevivência (um ano). O outro caso de linfoma de baixo grau de malignidade (L2) apresentou a menor marcação da p53 (14,12%) (Quadro 8). Embora os linfomas de baixo grau estejam representados por apenas dois cães, estes resultados sugerem que cães com linfoma de baixo grau podem apresentar tempo de sobrevivência mais longo. Semelhantemente, estudos de Navaratnam et al. (1998) e Pagnano et al. (2001) associaram a superexpressão da p53 com prognóstico desfavorável em pacientes humanos acometidos por linfoma.

O linfoma com maior marcação da p53 (L10) (Figura 12) consistiu no caso de linfoma alimentar, caracterizado pela presença de massas neoplásicas ao longo do intestino delgado (Figura 13A) e linfadenopatia regional, além de comprometimento hepático (Figura 13B). Este animal apresentou tempo de sobrevivência mais curto em relação aos demais, pois evoluiu para o óbito no dia da consulta (Quadro 8). Curiosamente, este linfoma foi classificado como linfoblástico, seguindo padrão histológico do linfoma de Burkitt humano, um tumor de ocorrência rara e intimamente relacionado à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (KERBAUY, 2008). Entre os linfomas humanos, o linfoma de Burkitt é o que apresenta alterações na p53 com maior frequência, em torno de 35% (GAIDANO et al., 1991; KERBAUY, 2008), além de habitualmente apresentarem maior porcentagem de células marcadas, quando comparados aos demais tipos histológicos (VILLUENDAS et al., 1997).

Neste estudo, 90% (9/10) dos linfomas apresentaram positividade para a p53, frequência superior às observadas por Gamblin et al. (1997) (40% de casos positivos), Sueiro et al. (2004) (59% de casos positivos), Suzano (2007) (72,5% de casos positivos) e Gerardi (2008) (56,25% de casos positivos). Este resultado pode ser justificado pelo fato de que a maior parte dos animais (80%) apresentava linfoma de alto grau, cuja positividade da p53 pela imunistoquímica é mais freqüente (MARTINEZ-DELGADO et al., 1997; KLUMB & CAVALCANTI-JÚNIOR, 2002; SUEIRO et al., 2004).

Quando analisados os fatores clínico-patológicos com relação à localização anatômica, os linfomas cutâneos e multicêntricos apresentaram médias de marcação da p53 $28,85\% \pm 10,10\%$ e $20,00\% \pm 4,21\%$, respectivamente. De acordo com o estadiamento clínico, as médias foram $19,12\% \pm 7,07$ para o estágio III e $26,19\% \pm 9,46$ para o estágio V. Os subestádios “a” e “b” apresentaram médias de marcação iguais a $22,59 \pm 12,63$ e $27,12\% \pm 13,23$, respectivamente. A média dos linfomas de alto grau foi $28,98 \pm 11,85$. Os imunofenótipos apresentaram médias $24,88\% \pm 8,33$ e $28,55\% \pm 14,24$ para os tipos T e B, respectivamente. O grupo de animais que alcançaram tempo de sobrevivência entre dois e cinco meses apresentou média $25,31\% \pm 14,43$, enquanto no grupo com sobrevivência máxima de um mês, a média de marcação foi $28,34\% \pm 12,20$ (Quadro 9).

Apesar das médias não terem sido estatisticamente diferentes ($P > 0,05$) entre nenhuma das variáveis, as maiores médias de marcação foram observadas nos linfomas cutâneos, estágio clínico V, subestádio “b”, imunofenótipo B e tempo de sobrevivência de até trinta dias (Quadro 9). De fato, a apresentação cutânea, o estágio clínico avançado e o subestádio “b” são reconhecidamente indicadores de prognóstico desfavorável em cães com linfoma (JAGIELSKI et al., 2002; VONDERHAAR & MORRISON, 2002; VAIL & YOUNG, 2007). Contudo, o valor preditivo e prognóstico da p53 nas neoplasias linfóides permanece incerto em homens e em cães (KLUMB & CAVALCANTI-JÚNIOR, 2002; SUEIRO et al., 2004). Controversamente, os linfomas de células B apresentaram maior média de marcação, ao passo que Sueiro et al. (2004) e Sokolowska et al. (2005) relacionaram a maior expressão da p53 ao imunofenótipo T.

Quadro 9 – Número de casos, média e desvio padrão da imunorreatividade da p53 em cães com linfoma de acordo com fatores clínico-patológicos e tempo de sobrevida. Jaboticabal, 2009.

	NÚMERO DE CASOS	MÉDIA (%) ± DESVIO PADRÃO
LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA		
Alimentar	1	50,56*
Cutâneo	4	28,85±10,10
Multicêntrico	4	20,00±4,21
ESTÁDIO CLÍNICO		
III	2	19,12±7,07
IV	1	50,56*
V	6	26,19±9,46
SUBESTÁDIO		
A	4	22,59±12,63
B	5	27,12±13,23
GRAU DE MALIGNIDADE		
Baixo	1	14,12*
Alto	8	28,98±11,85
IMUNOFENÓTIPO		
T	3	24,88±8,33
B	6	28,55±14,24
TEMPO DE SOBREVIDA		
Dois a cinco meses	4	25,31±14,43
Zero a 30 dias	6	28,34±12,20

*Valor absoluto (n=1)

4.4 Reações de PCR e Sequenciamento

As reações de PCR com os pares de *primers* P1, P2, P3 e P4 amplificaram fragmentos de 558, 578, 570 e 579pb, respectivamente (Figuras 14, 15, 16 e 17). As sequências das amostras dos cães com linfoma (neoplasia e bulbo piloso) e dos cães controles (linfonodos e bulbo piloso) mostraram-se idênticas à sequência do TP53 do genoma canino (Figura 18).

A ausência de mutação no gene TP53 associada com a superexpressão da proteína p53 tem sido relatada em diversas pesquisas a respeito do linfoma humano (CESARMAN et al., 1993; VILLUENDAS et al., 1993; MARTINEZ-DELGADO et al., 1997; OKA et al., 1998). No entanto, este é o primeiro trabalho a discutir este tema na espécie canina.

A superexpressão na avaliação p53 por imunistoquímica é usualmente atribuída à presença de mutações no gene que a codifica, aumentando a meia-vida da proteína em até 8 a 12 horas (MARTINEZ-DELGADO et al., 1997). Deste modo, o acúmulo da p53 mutante pode ser facilmente detectado na reação imunistoquímica. Por outro lado, a forte positividade na maioria das células tumorais também pode estar associada com a estabilização da proteína por outro mecanismo diferente de mutação (HALL & LANE, 1994). Vale ressaltar que no presente trabalho, a reação de imunistoquímica também foi realizada em linfonodos de cães saudáveis, que apresentaram média de marcação significativamente inferior às amostras de linfoma ($P < 0,05$). Assim, independente do mecanismo envolvido na estabilização da proteína, é provável que a detecção da p53 nas amostras de linfoma esteja associada à neoplasia.

A primeira hipótese a ser considerada para que ocorra reatividade da p53 sem a presença de mutação no respectivo gene, é a sensibilidade das técnicas. Este estudo utilizou o anticorpo policlonal CM1 que, apesar de ser o clone mais adequado para estudos com neoplasias caninas (ZACCHETTI et al., 2007), também marca a p53 selvagem (SUEIRO et al., 2004). Dentro deste contexto, Cesarman et al. (1993) analisaram a reatividade da p53 em 15 amostras de linfomas anaplásicos humanos e observaram positividade em todos os casos. Três destes apresentaram marcação de 5%, enquanto os demais apresentaram marcações entre 12 a 60%. Apesar da alta frequência de positividade e da porcentagem de marcação ser relativamente alta, apenas um caso apresentou mutação no gene TP53. Os autores afirmaram que o anticorpo monoclonal PAb 1801 utilizado no estudo também marca células com a p53 selvagem. Adicionalmente, o mesmo estudo determinou o índice de proliferação celular através da marcação do Ki-67, que mostrou forte relação com a p53. Desta forma, acredita-se que as células positivas para p53 podem estar relacionadas com a proliferação celular, como sugerido Danova et al. (1990) e não necessariamente com a presença de mutação no gene. Entretanto, o mecanismo que levaria ao aumento da reatividade da p53, bem como a relação entre p53 e Ki-67 não foram elucidados.

Estudo semelhante foi realizado por Oka et al. (1998), que utilizaram o mesmo clone PAb 1801 para determinar a imunorreatividade da p53 em linfomas humanos. A marcação da p53 por imunistoquímica foi observada em 59/202 casos. Apenas 3/59

casos apresentaram mutações pontuais, detectadas pelo seqüenciamento. Estes pesquisadores assim como Cesarman et al. (1993) também argumentaram que em algumas situações, o acúmulo da p53 pode advir da alta taxa de proliferação presente nas neoplasias malignas e reforçaram que a superexpressão da p53 mostrou-se intimamente associada com os linfomas de alto grau.

Villuendas et al. (1993) avaliaram 16 casos de linfomas humanos e concluíram que a detecção da p53 não está fundamentalmente envolvida com mutações no gene. Apenas 4/16 casos apresentaram mutações. Neste mesmo estudo, a porcentagem de células marcadas variou de 1 a 52%, sendo as maiores marcações (40, 50 e 52%) observadas em linfomas de Burkitt. Curiosamente, na nossa pesquisa, a maior marcação da p53 foi observada em um linfoma linfoblástico tipo Burkitt humano. Entretanto, cabe enfatizar que o clone utilizado no trabalho de Villuendas et al. (1993) era o PAb 1801.

O seqüenciamento de DNA é uma técnica de alta sensibilidade, considerado definitivo na detecção de mutações (KLUMB & CAVALCANTI JÚNIOR, 2002; HIRATA et al., 2006). Não é possível descartar a possibilidade de que algumas amostras possam ter sido contaminadas com células normais. A contaminação pode ocorrer durante a separação do material após a biópsia ou mesmo durante a extração do DNA. Entretanto, este evento é considerado acidental e mesmo tendo ocorrido, a proporção de células normais deveria ser maior do que a de células neoplásicas, para que os resultados do sequenciamento fossem alterados.

Outra possibilidade válida é que as mutações podem estar presentes fora da região analisada do gene TP53. Para a maioria das neoplasias na espécie humana e canina, as mutações localizam-se na região compreendida entre os exons cinco a oito (CARON DE FROMENTEL & SOUSSI, 1992; van LEEUWEN et al., 1997; CHU et al., 1998). Na espécie humana, apenas 6% das mutações ocorrem fora deste segmento (CARON DE FROMENTEL & SOUSSI, 1992). MARTINEZ-DELGADO et al. (1997) estudaram 94 linfomas humanos, dos quais 16 apresentaram superexpressão da p53, associada com a ausência de mutação entre os exons cinco a nove. Apenas uma mutação foi observada fora desta região (exon 10). Estes autores sugeriram que

ausência de mutação nos 15 casos restantes provavelmente está relacionada a outros mecanismos de estabilização da proteína.

As mutações previamente relatadas no gene TP53 de cães com linfoma, semelhantemente ao linfoma humano, encontram-se entre os exons cinco a oito (NASIR & ARGYLE, 1998; VELDHOEN et al., 1998), embora nenhuma mutação tenha sido descrita em íntrons. Este estudo analisou a região compreendida entre os exons quatro a nove do gene TP53, incluindo íntrons e nenhuma mutação foi encontrada. As sequências obtidas nos cães com linfoma e sadios foram comparadas com a sequência do gene TP53 do genoma do cão, concluída em 2005 por Lindblad-Toh e colaboradores. De acordo com Veldhoen et al. (1998), a presença de uma mutação em tecido normal indica que esta foi provavelmente herdada de uma célula germinativa. Com o objetivo de detectar este tipo de mutação, a reação de seqüenciamento também foi realizada em amostras de DNA do bulbo piloso. Todavia, nenhuma mutação foi encontrada nestas amostras, assim como nas amostras de DNA extraídos dos linfomas.

Estes resultados permitem sugerir que a alta porcentagem de células positivas para p53 encontradas neste estudo pode ser decorrente de mutações fora do domínio central do gene TP53, inclusive na região promotora. Adicionalmente, vale ressaltar que a integridade do RNA mensageiro não foi avaliada e, portanto não é possível determinar a eficiência da transcrição e da tradução, processos susceptíveis a ocorrência de falhas, frequentemente envolvidos na patogênese das neoplasias (PECORINO, 2008)

A inativação da p53 também pode ocorrer pela perda, sequestração ou ligação a outras proteínas, como proteínas virais (KLUMB et al., 2002). Ainda que a etiologia dos linfomas caninos não tenha sido elucidada, a relação entre os vírus e o desenvolvimento de linfomas é amplamente relatada e discutida na literatura há pelo menos 30 anos (JARRET, 2006). A p53 foi descrita pela primeira vez em 1979, em células transformadas pelo vírus SV40, nas quais ela se associava com o antígeno T (LANE & CROWFORD, 1979). Atualmente, sabe-se que o este vírus símio está frequentemente associado com alguns tipos de linfoma na espécie humana (VILCHEZ et al., 2002). Outro vírus reconhecidamente relacionado ao linfoma humano é o Epstein-

Barr. De acordo com Klumb et al. (2000), algumas proteínas do EBV têm ação oncogênica: LMP1 atua na transformação de linfócitos, EBNA 5 na inativação do gene supressor de tumor TP53 e a proteína BHRF tem homologia com a proteína antiapoptótica bcl2. Esses achados reforçam a participação do vírus como um cofator na etiologia do linfoma de Burkitt. A p53 também pode estar associada a alguns tipos de adenovírus e herpesvírus envolvidos na patogênese do linfoma (FETT-CONTE & SALLES, 2002).

Por outro lado, a p53 pode apresentar-se ligada à proteína MDM2, sua antagonista, referenciada na maioria dos estudos que associaram a imunomarcação pela imunistoquímica com a ausência de mutações (MARTINEZ DELGADO et al., 1997; OKA et al., 1998; KLUMB & CAVALCANTI-JÚNIOR, 2002; ZACCHETTI et al., 2007). Em outra abordagem, Maestro et al. (1997) sugeriram que o acúmulo da p53 na ausência de mutação estaria associado à expressão da proteína p21, interferindo no ciclo celular.

Por fim, outra hipótese a ser considerada é a regulação gênica através de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e a modificação das histonas (JONES & BAYLIN, 2007). Estes mecanismos têm sido descritos em linhagens celulares de neoplasias linfóides na espécie humana (SAHAJIRI et al., 2005; OPAVSKY, et al., 2007) e é conveniente aceitar que ocorram de maneira semelhante em cães. Revisando os mecanismos epigenéticos de silenciamento gênico, Baylin & Ohm (2006) sugeriram que o aumento da expressão da SIRT1, uma enzima da família das histonas desacetilases, poderia aumentar o tempo de vida da célula através da modulação da p53. Contudo, os mecanismos epigenéticos de desenvolvimento do câncer ainda não foram completamente elucidados.

Diante do exposto e frente aos resultados obtidos, sugere-se que estudos futuros avaliem outros mecanismos envolvidos na regulação da p53, diferentes da mutação no DNA.

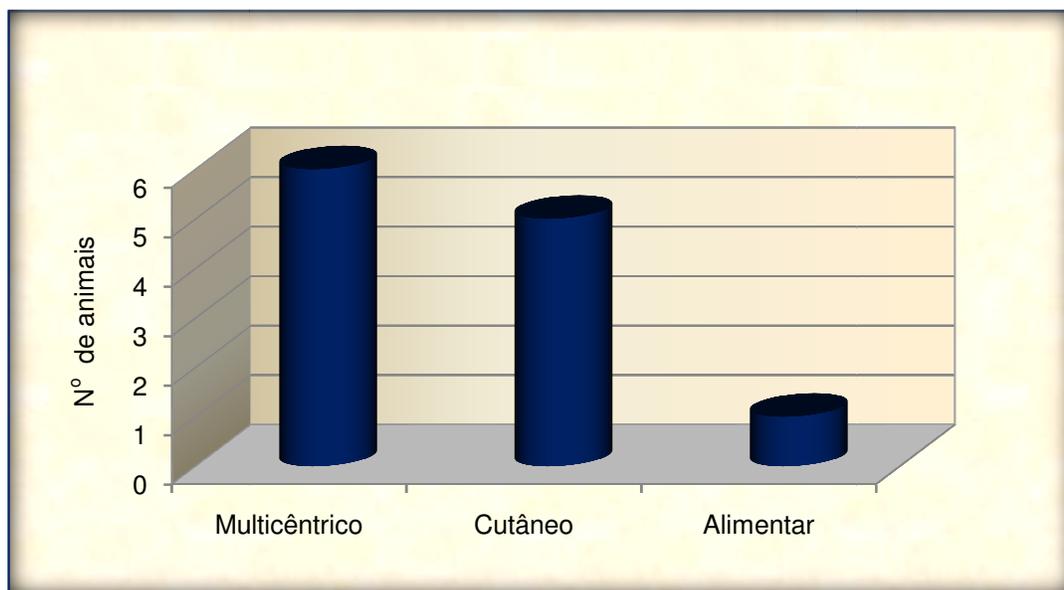


Figura 3 - Distribuição dos cães quanto à localização anatômica dos linfomas. Jaboticabal, 2009.

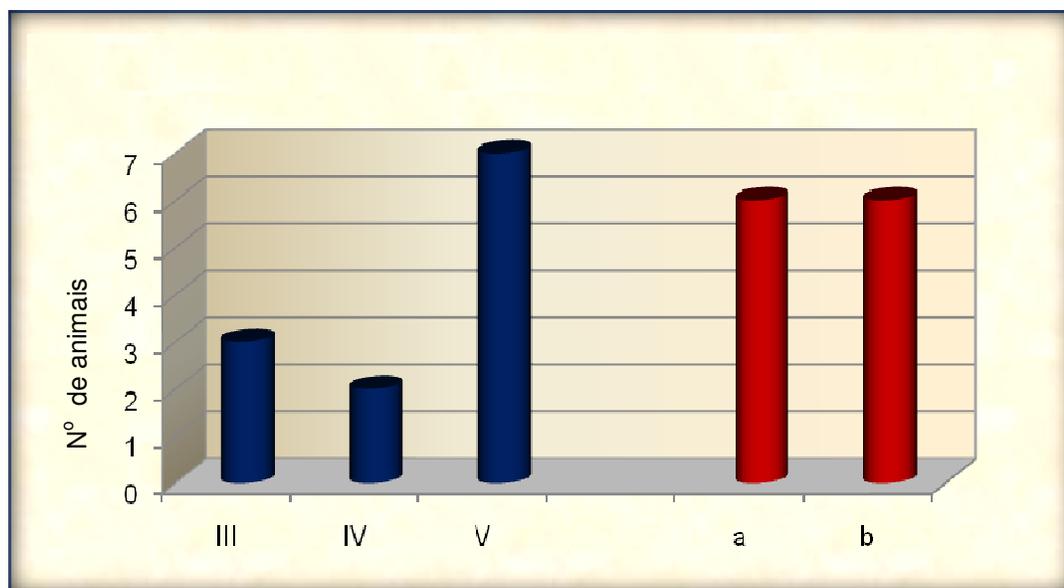


Figura 4 - Distribuição dos estádios (III, IV e V) e subestádios ("a" e "b") clínicos, apresentados pelos cães com linfoma. Jaboticabal, 2009.

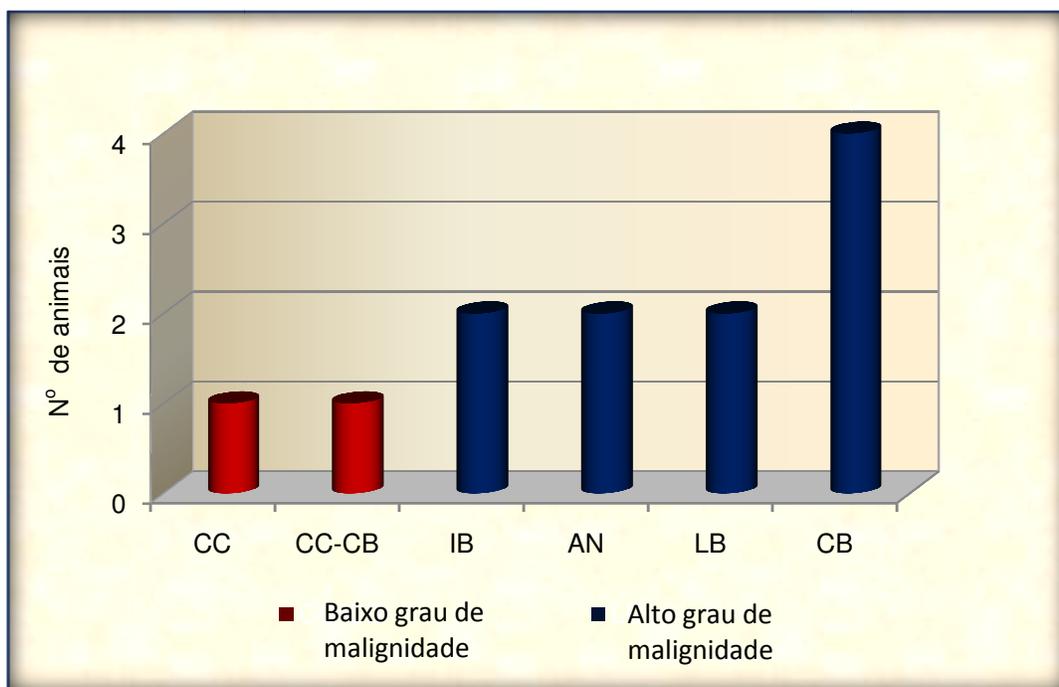


Figura 5 - Distribuição dos tipos histológicos e graus de malignidade dos linfomas, de acordo com a classificação de Kiel. CC: Centrocítico; CC-CB:centrocítico-centroblástico; IB: imunoblástico; AN: anaplásico; LB: linfoblástico; CB: centroblástico. Jaboticabal, 2009.

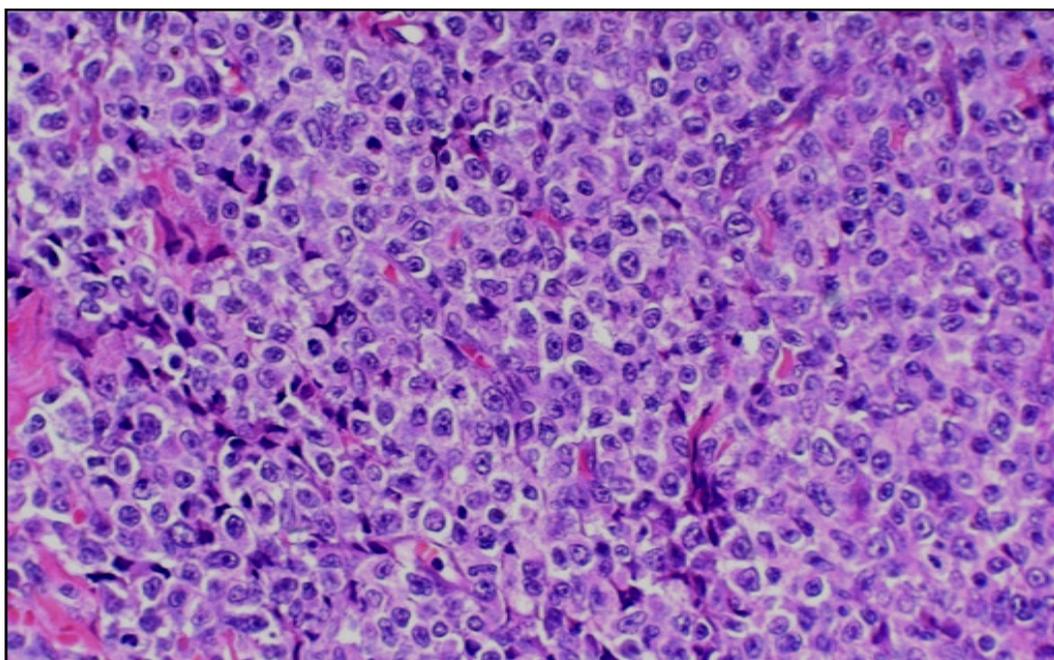


Figura 6 - Fotomicrografia de linfoma imunoblástico de alto grau de cão. As células são grandes e apresentam nucléolo central evidente. Classificação de Kiel. Hematoxilina-eosina, 400x. Jaboticabal, 2009.

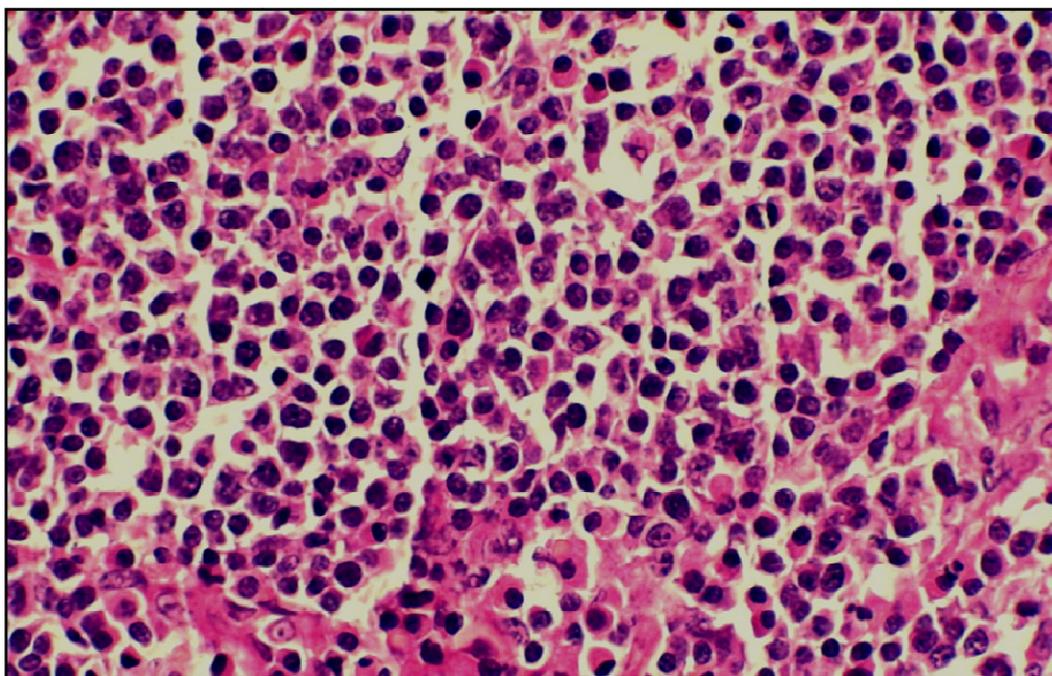


Figura 7 – Fotomicrografia de linfoma centrocítico de baixo grau de cão. As células são pequenas, com núcleo irregular. Classificação de Kiel. Hematoxilina-eosina, 640x. Jaboticabal, 2009.

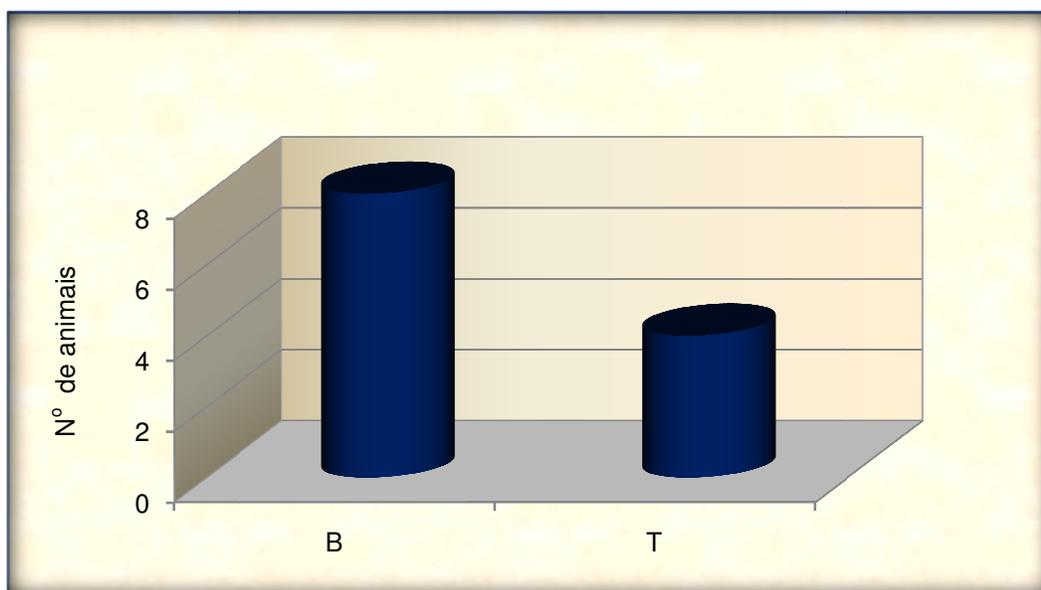


Figura 8 - Distribuição dos imunofenótipos dos cães com linfoma. Jaboticabal, 2009.

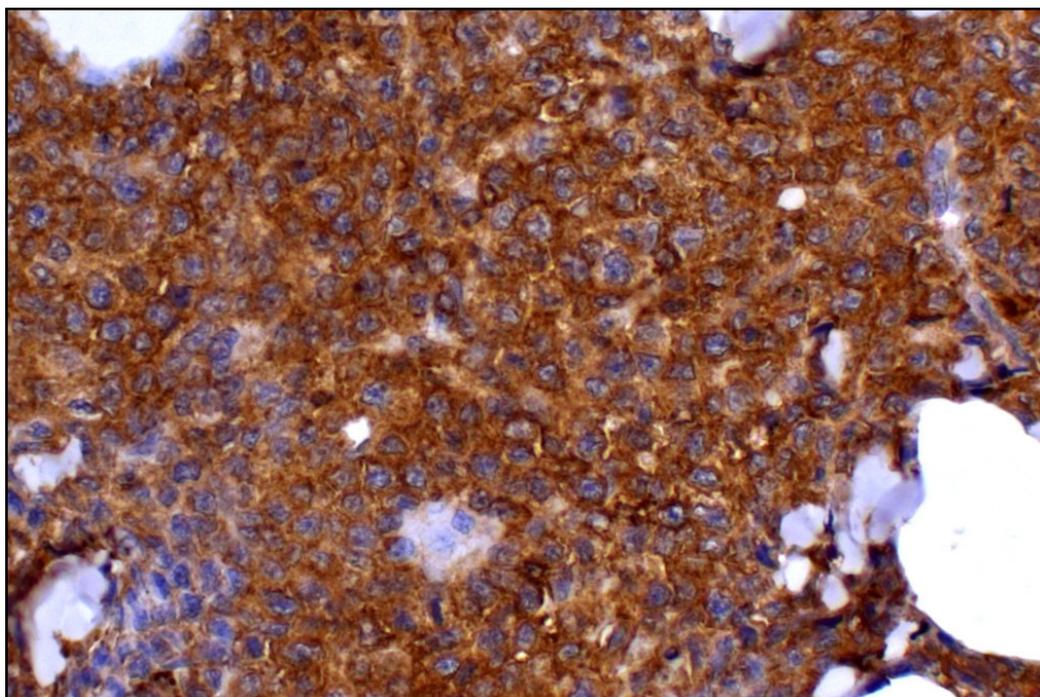


Figura 9 - Fotomicrografia de linfoma T de cão. Positividade para o anticorpo anti-CD3. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 640x. Jaboticabal, 2009.

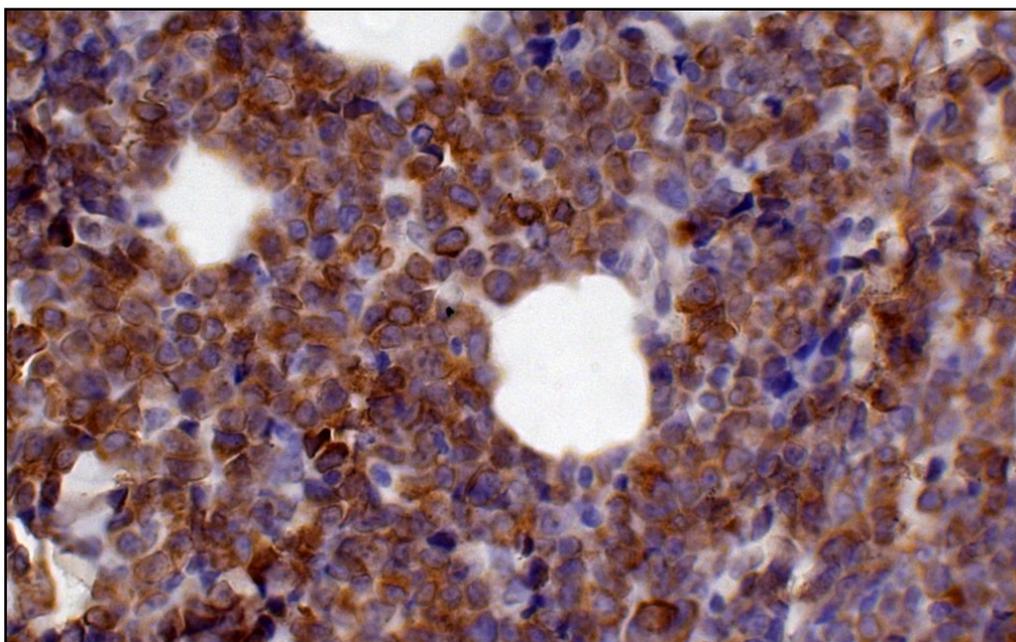


Figura 10 - Fotomicrografia de linfoma B de cão. Positividade para o anticorpo anti-CD79. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 640x. Jaboticabal, 2009.

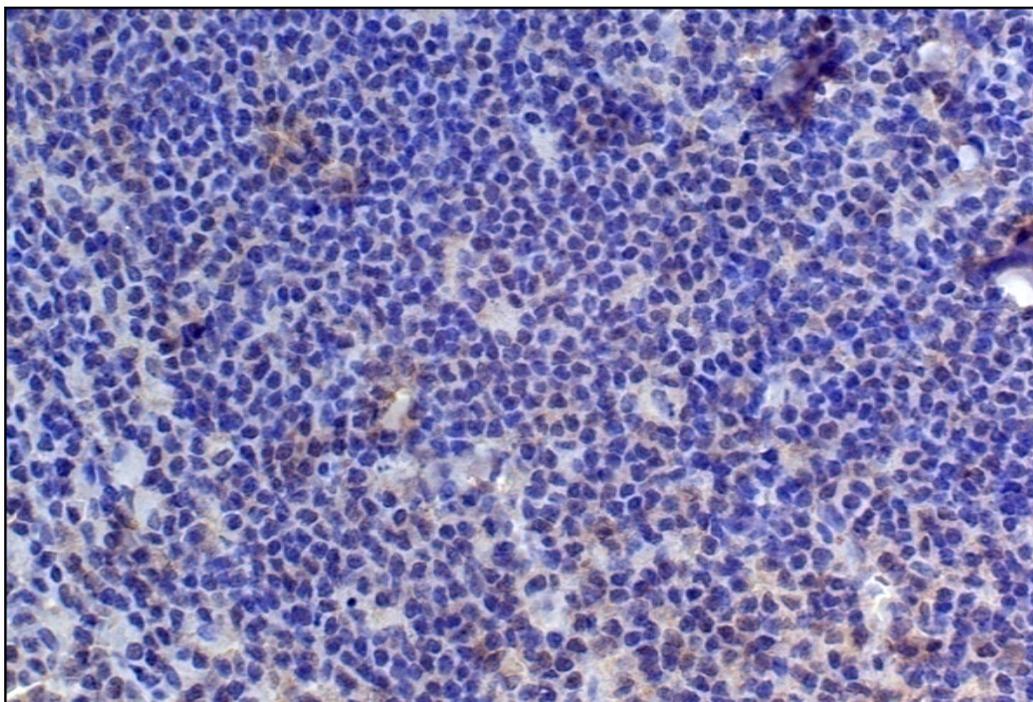


Figura 11 - Fotomicrografia de linfoma de cão com ausência de marcação para o anticorpo anti-p53. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 400x. Jaboticabal, 2009.

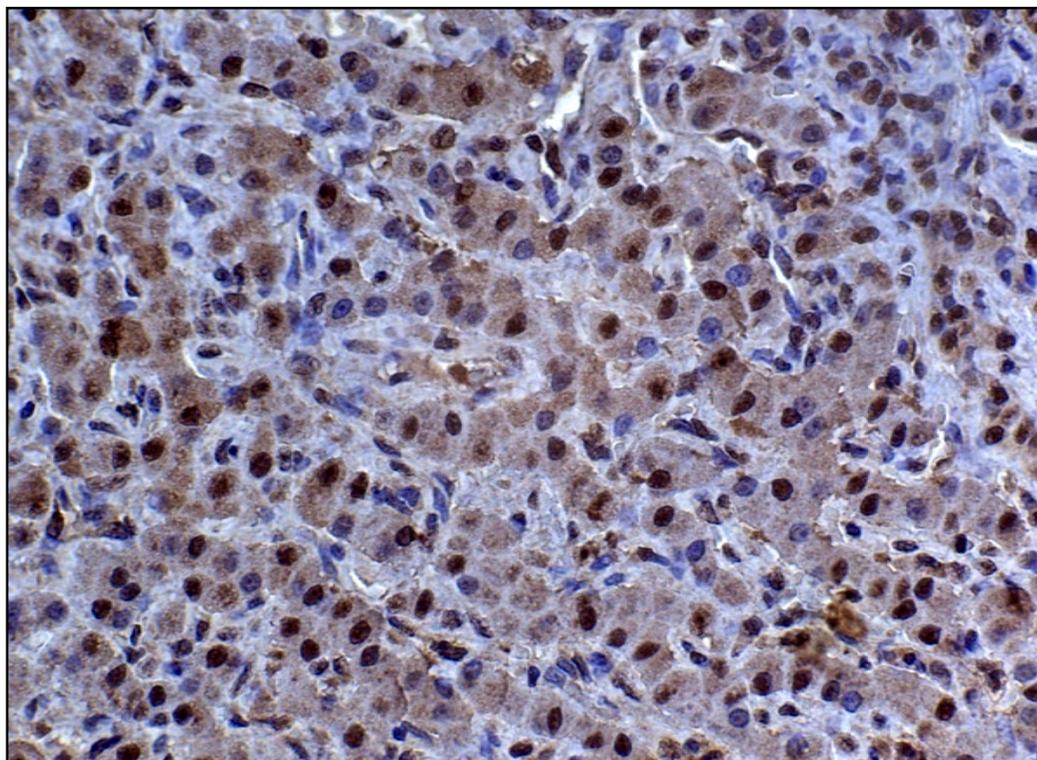


Figura 12 - Fotomicrografia de linfoma de cão com positividade para o anticorpo anti-p53. EnVision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris, 640x. Jaboticabal, 2009.

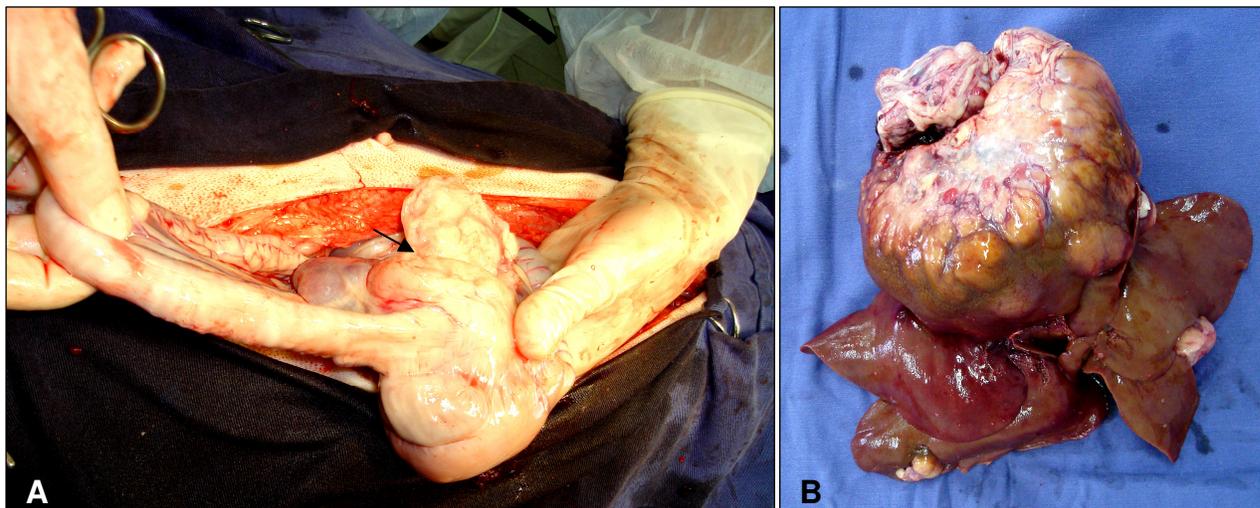


Figura 13 - Cão, fêmea, American Pitbull, cinco anos. Linfoma alimentar. (A) Massa localizada em intestino delgado (seta). (B) Fígado do mesmo animal, confirmando seu comprometimento. Jaboticabal, 2009.

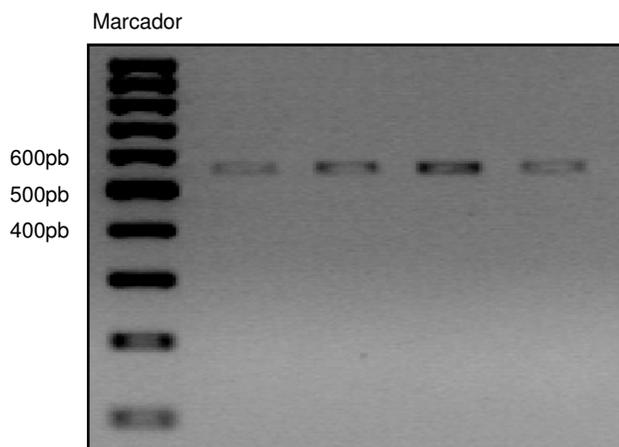


Figura 14 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 1º par de *primers*. Padrão de migração de 558pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009.

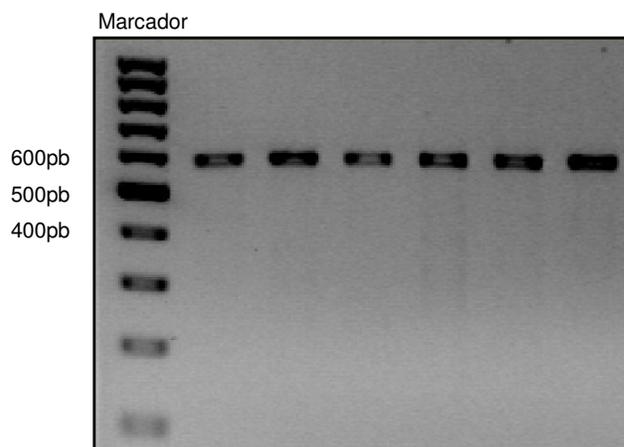


Figura 15 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 2º par de *primers*. Padrão de migração de 578pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009.

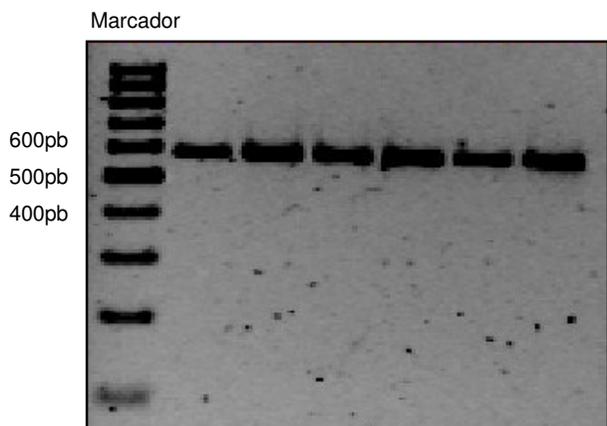


Figura 16 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 3º par de *primers*. Padrão de migração de 570pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009.

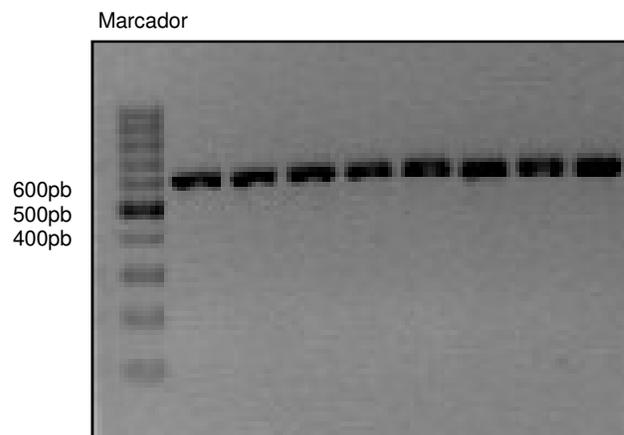


Figura 17 - Eletroforograma de produtos amplificados com o 4º par de *primers*. Padrão de migração de 579pb em gel de agarose 1,5%. Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas®). Jaboticabal, 2009.

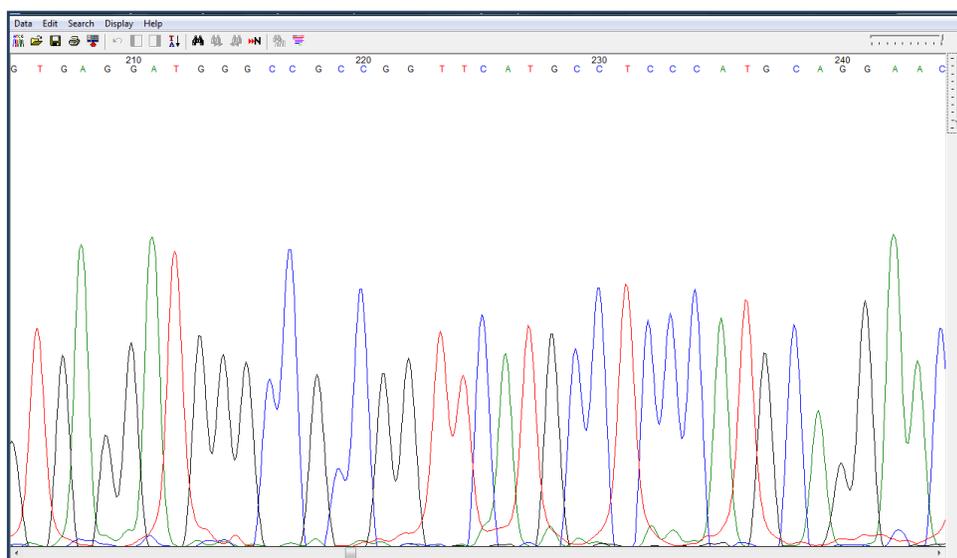


Figura 18 - Eletroesferograma obtido pela reação de sequenciamento realizado com o *primer* P3 (*Forward*). Programa MEGA, versão 4.0. Jaboticabal, 2009.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que:

1. A imunorreatividade da p53 pela imunohistoquímica é freqüente nos linfomas caninos de alto grau de malignidade.
2. A imunorreatividade da p53 pela imunohistoquímica não está primariamente relacionada a mutações na região entre os exons quatro a nove do gene TP53 nos linfomas caninos.
3. Outros mecanismos diferentes de mutação no gene TP53 podem estar envolvidos na patogênese do linfoma em cães.

6 REFERÊNCIAS¹

ARGYLE, 2008 Introduction: cancer biology and terminology. In: ARGYLE, D.J.; BREARLEY, M.J.; TUREK, M.M. **Decision Making in Small Animal Oncology**. 2.ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008. cap.1, p.3-17.

BARSINSKI, M.A. Morte celular. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. 1ª ed. São Paulo:Editora Atheneu, p.57-63, 2004.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.107–116, 2006.

BÉROUD, C.; SOUSSI, T. The UMD-p53 Database: new mutations and analysis tools. **Human Mutation**, v.21, p.176-181, 2003.

CAMARGO, A.A.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G. Mutação e Câncer. In: ROSSI, B.M.; PINHO, M. **Genética e Biologia Molecular Para o Cirurgião**. 1ª. ed. São Paulo:Lemar, 1999, p.111-123.

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q.; PADOVANI, C.R. **Archives of Veterinary Science**, v.9, p.25-29, 2004.

CARON DE FROMENTEL, C.; SOUSSI, T. p53 tumor suppressor gene: A model for investigating human mutagenesis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 4, p.1-15, 1992.

CESARMAN, E.; LINGHIRAMI, G.; CHADBURN, A.; KNOWLES, D.M. High Levels of p53 Protein Expression Do Not Correlate with p53 Gene Mutations in Anaplastic Large Cell Lymphoma. **American Journal of Pathology**, v.143, p.845-856, 1993.

¹ ABNT – NBR 6023 ago. 2002

CHU, L.L.; RUTTEMAN, G.R.; KONG, J.M.; GHAREMANI, M.; SCHMEING, M.; MISDORP, W.; VAN GARDEREN, E.; PELLETIER, J. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.50, p.11-25, 1998.

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**, Lawrence, v. 14, p. 120-124, 2000.

CHUNG-HO, L.; OH-KYEONG, K. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.3, p.321-325, 2002.

DANOVA, M.; GIORDANO, M.; MAZZINI, G.; RICCARDI, A. Expression of p53 protein during the cell cycle measured by flow cytometry in human leukemia. **Leukemia Research**, v.14, p.417-422, 1990.

DE MOURA, V. M. B. D., SEQUEIRA, J. L., AMORIM, R. L., et al. Classificação citohistológica dos linfomas caninos. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, vol. 4, p. 53-59, 2001a.

DE MOURA, V. M. B. D., SEQUEIRA, J. L., AMORIM, R. L., et al. Imunofenotipagem dos linfomas caninos em tecido incluído em parafina. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, vol. 4, p. 71-75, 2001b.

DEVILLE, P.; VAN LEEUMEN, I.S.; VOESTEN, A.; RUTTERMAN, G.R.; VOS, J.H.; CORNELISSE, C.J. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. **Anticancer Research**, v.14, p.2039-2046, 1994.

DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, p.573-581, 2003a.

DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: diagnosis and treatment. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, p.584-599, 2003b.

DOBSON, J. Classification of canine lymphoma: a step forward. **The Veterinary Journal**, v.167, p.125-126, 2004.

DOBSON, J.M.; GORMAN, N.T. Canine multicentric lymphoma. **Journal of Small Animal Practice**, v.34, p.594-598, 1993.

ETTINGER, S.N. Principles of treatment for canine lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, p. 92-102, 2003.

FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, jan. 2002.

FISZER-MALISZEWSKA, L.; KAZANOWSKA, B.; KUSNIERCZYK, P.; MANGCZAK, M.; NIEPIEKLO, W.; POCHRON-ZEMAN, B.; NOWAKOWSKA, B. Is p53 variant G13964C associated with predisposition to cancer? **Journal of Applied Genetics**, v.44, p.547–552, 2003.

FETT-CONTE, A.C.; SALLES, A.B.C.F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.24, p.85-89, 2002.

FLORY, A.B.; RASSNICK, K.M.; STOKOL, T.; SCRIVANI, P.V.; ERB, H.N.. Stage migration in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v 21, p.1041-1047, 2007.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, 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.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J. L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J. P. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological and clinical study of 46 new cases. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 92-109, 2002.

FRÁGUAS, M.F.; CÁPUA, M.L.B.; CALAZANS, S.G.; COLETA, F.E.D; GODOY, A.V.; MIOTTO, M.R.; DALECK, C.R.; SANTANA, A.E. Estudo Retrospectivo de 108 Casos De Linfoma Canino. **Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, Maceió, 2008.

GAIDANO, G.; BALLERINI, P.; GONG, J.Z.; INGHIRAMI, G.; NERI, A.; NEWCOMB, E.W.; MAGRATH, I.T.; KNOWLES, D.M.; DALLA-FAVERA, R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.88, p.5413-5417, 1991.

GARRETT, L.D.; THAMM, D.H.; CHUN, R.; DUDLEY, R.; VAIL, D.M. Evaluation of a 6-Month Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterunary Internal Medicine**, v.16, p.704–709, 2002.

GERARDI, G.D. Reatividade de tecidos neoplásicos caninos à proteína associada à resistência a múltiplas drogas-1 (MRP1), à glutationa-s-transferase pi (GSTpi) e à proteína p53. Jaboticabal, 2008, 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências

Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal.

GREENLEE, P.G.; QUIMBY, F.W.; CALVANO, S.E.; KIMMEL, M.; LIEBERMAN, P.H. Lymphomas in dogs. **Cancer**, v. 66, p. 480-490, 1990.

HALL, P.A.; LANE, D.P. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? Revisited! **Journal of Pathology**, v.172, p.1-4, 1994.

HANAZONO, K.; NATSUGOE, S.; STEIN, H.J.; AIKOU, T.; HOEFLER, H.; SIEWERT J.R. Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 _expression. **Oncology Reports**. v.15, p.821-824, 2006.

HARVEY, D.; LEVINE, A.J. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. **Genes & Development**, v.5, p.2375-2385, 1991.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; BANKS, P.M.; CHAN, J.K.C.; CLEARY, M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C.; GROGAN, T.M.; ISAACSON, P.G.; KNOWLES, D.M.; MASON, D.Y.; MULLER-HERMELINK, H.; PILERI, S.A.; PIRIS, M.A.; RALFKIAER, E.; WARNKE, R.A.; A revised European-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. **Blood**, v.84, p.1361-1392, 1994.

HENSON, D.E. Loss of p53 immunostaining intensity in breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.88, p.1015-1019, 1996.

HIRATA, M.H.; TAVARES, V.; CRESPO, R.D.C. HIRATA. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.39, p.522-34, 2006.

ISAACSON, P.G. The current status of lymphoma classification. **British Journal of Haematology**, v.209, p.258-266, 2000.

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

JAGIELSKI, D., LECHOWSKI, R., HOFFMANN-JAGIELSKA, et al. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). **Journal of Veterinary Medicine A**, vol. 49, p. 419-424, 2002.

JARRETT, R.F. Viruses and lymphoma/leukaemia. **Journal of Pathology**, v. 208, p.176–186,2006.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B.The Epigenomics of Cancer. **Cell**, v.128, p. 683–692, 2007.

JOHNSON, A.S.; COUTO, A.G.; WEGHORST, C.T. Mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. **Carcinogenesis**, v.19, p.213-217, 1998.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D.; LUDWIG, C.; RUDAS, M.; KAPPEL, S.; JANSCHKE, E.; WENZEL, C.; SCHLAGBAUER-WAKL, H.; MITTLBÖCK, M.; GNANT, M.; STEGER, G.; JAKESZ, R. TP53 Mutation and p53 Overexpression for Prediction of Response to Neoadjuvant Treatment in Breast Cancer Patients. **Clinical Cancer Research**, v.6, p.50-56, 2000.

KERBAUY, F.R. Mutações do gene p53 em linfomas de Burkitt: Muito além do gene c-myc. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30, p.1-4, 2008.

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

KLUMB, C.E. Epidemiologia do linfoma de Burkitt no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22 (supl.2), p.204-205, 2000.

KLUMB, C.E.; CAVALCANTI-JÚNIOR, G.B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.24, p.111-125, 2002.

KRAEGEL, S.A.; PAZZI, K.A.; MADEWELL, B.R. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3-8. **Cancer Letters**, v.92, p.181-186, 1995.

LANE, D.P.; CRAWFORD, L.V. T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v.278, p.261-263, 1979.

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

LEHMAN, T.A.; HAFFTY, B.G.; CARBONE, C.J.; BISHOP, L.R.; GUMBS, A.A.; KRISHNAN, S.; SHIELDS, P.G.; MODALI, R.; TURNER, B.C. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. **Cancer Research**, v.60, p.1062-1069, 2000.

LEVINE, A.J.; CHANG, A.W.; DITTMER, D.; NOTTERMAN, D.D.; SILVER, A.; THORN, K.; WELSH, M.; WU, M. The p53 tumor-suppressor gene. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 123, p.817-823, 1994.

LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C.M.; MIKKELSEN, T.S.; KARLSSON, E.K.; JAFFE, D.B.; KAMAL, M.; CLAMP, M.; CHANG, J.L.; KULBOKAS, E.J.; ZODY, M.C.; MAUCELI, E.; XIE, X.; BREEN, M.; WAYNE, R.K.; OSTRANDER, E.E.; PONTING, C.P.; GALIBERT,

F.; SMITH, D.R.; JONG, P.J.; KIRKNESS, E.; ALVAREZ, P.; BIAGI, T.; BROCKMAN, W.; BUTLER, J.; CHIN, C.; COOK, A.; CUFF, J.; DALY, M.J.; DECAPRIO, D.; GNERRE, S.; GRABHERR, M.; KELLIS, M.; KLEBER, M.; BARDELEBEN, C.; GOODSTADT, L.; HEGER, A.; HITTE, C.; KIM, L.; KOEPFLI, K.; PARKER, H.G.; POLLINGER, J.P.; SEARLE, S.M.J.; SUTTER, N.B.; THOMAS, R.; WEBBER, C.; Broad Institute Genome Sequencing Platform; LANDER, E.S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, p.803-819, 2005.

LOZANO,G.; LEVINE, A.J. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. **Molecular Carcinogenesis**, v.4, p.3–9, 1991.

MUKARATIRWA, S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. **Veterinary Quarterly**, v.27, p.52-64, 2005.

MAESTRO, R.; GLOGHINI, A.; DOGLIONI, C.; PICCININ, S.; VUKOSAVLJEVIC, T.; GASPAROTTO, D.; CARBONE, A.; BOIOCCHI, M. Human non-Hodgkin's lymphomas overexpress a wild-type form of p53 which a functional transcriptional activator of cyclin-dependent kinase inhibitor p21. **Blood**, v.89, p.2523-2528, 1997.

MARTINEZ-DELGADO, B.; ROBLEDO, M.; ARRANZ, E.; INFANTES, F.; ECHEZARRETA, G. MARCOS, B.; SANZ, C.; RIVAS, C.; BENITEZ, J. Correlation Between Mutations in p53 Gene and Protein Expression in Human Lymphomas. **American Journal of Hematology**, v.55, p.1–8, 1997.

MAXIMOV, G.K.; MAXIMOV, K.G. the role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.22, p.664-668, 2008.

MELLANBY, R.J.; HERRTAGGE, M.E.; DOBSON, J. M. Treatment of canine lymphoma by veterinarians in first opinion practice in England. **Journal of Small Animal Practice**, v.43, p.198-202, 2002.

MORRISON, W.B. Gene regulation, signal transduction and câncer. In:_____. **Cancer in dogs and cats**. 2. ed. Wyoming: Teton New Media, 2002. cap.2, p. 9-18.

NASIR, L.; ARGYLE, D.J. Mutational analysis of the tumor suppressor gene p53 in lymphosarcoma in two bull mastiffs. **Veterinary Record**, v.145, p. 23-24, 1998.

NASIR, L.; RUTTERMAN, G.R.; REID, S.W.J.; SCHULZE, CH.; ARGYLE, D.J. Analysis of mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. **Cancer Letters**, v.174, p.83-89, 2001.

OKA,T.; SARKER, A.B.; TERAMOTO, N.; YOSHINO, T.; AKAGI, T. p53 protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is infrequently related to p53 gene mutations. **Pathology International**, v.48, p.15-21, 1998.

ONIONS, D.E. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.72, p.909-911, 1984.

OPAVSKY, R.; WANG, S.H.; TRIKHA, P.; RAVAL, A.; HUANG, Y.; WU Y.Z.; RODRIGUEZ, B.; KELLER, B.; LIYANARACHCHI, S.; WEI, G.; DAVULURI, R.V.; WEINSTEIN, M.; FELSHER, D.; OSTROWSKI, M.; LEONE, G.; PLASS, C. CpG island methylation in a mouse model of lymphoma is driven by the genetic configuration of tumor cells. **PLoS Genetics**, v.3, p. 1757-1769, 2007.

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

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

PARMIGIANI, R.B.; CAMARGO, A.A. O genoma humano e o câncer. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. 1ª ed. São Paulo:Editora Atheneu, p.3-11, 2004.

PARODI, A. L.; DARGENT, F.; CRESPEAU, F. Histological classification of canine malignant lymphomas. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 35, p. 178-192, 1988.

PECORINO, L. Molecular Biology of cancer – mechanisms, targets and therapeutics. 2ª ed. New York:Oxford University Press, 2008, 320p.

PESSOA, A. W. P. **Classificação citoistológica, imunoistoquímica, lesão de DNA, morfometria e índice de proliferação celular dos linfomas em cães**. Botucatu, 2005, 227p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

PIETSCH E.C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M.E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v.25, p.1602–1611, 2006.

PONCE, F.; MAGNOL, J.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of morfological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, v.167, p.158-166, 2004.

PRICE, G.S.; PAGE, R.L.; FISCHER, B.M.; LEVINE, J.F.; GERIG, T.M. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, p.259-262, 1991.

REIS, E.M.; NAKAYA, H.I.; LOURO, R.; CANAVEZ, F.L.; FLATSCHART, A.V.F.; ALMEIDA, G.T.; EGIDIO, C.M.; PAQUOLA, A.C.; MACHADO, A.A.; FESTA, F.; YAMAMOTO, D.; ALVARENGA, R.; SILVA, C.C.; BRITO, G.C.; SIMON, S.D.;

MOREIRA-FILHO, C.A.; LEITE, K.R.; CAMARA-LOPES, L.H.; CAMPOS, F.S.; GIMBA, E.; VIGNAL, G.M.; EL-DORRY, H.; SOGAYAR, M.C.; BARCINSKI, M.A.; SILVA, A.M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. **Oncogene**, v.23, p.6684-6692, 2004.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.19-25, 2001.

ROSENBERG, S. A.; BERARD, C. W.; BROWN, B. W.; BURKE, J.; DORMAN, R. F.; GLATSTEIN, E.; HOPPE, R. T.; SIMON R. Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's Lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. **Cancer**, v.49, p.2112–2135, 1982.

ROSENTHAL, R. C.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, p.774-781, 1990.

SAKAJIRI, S.; KUMAGAI, T.; KAWAMATA, N.; SAITOH, T.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. **Experimental Hematology**, v.33, p.53–61, 2005.

SEQUEIRA, J.L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E.P.; FIGUEIREDO, L.M.A.; ROCHA, N.S. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p.245-250, 1999.

SILVA, A.R.L. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. 1ª ed. São Paulo:Editora Atheneu, p.29-42, 2004.

SOKOLOWSKA, J.; CYWINSKA, A.; MALICKA, E. p53 expression in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, 172-175, 2005.

SOLHA, G.C.; SILVA, E.P. Onde está o lugar do conceito de Gene? **Episteme**, n. 19, p. 45-68, 2004.

SQUIRE, R.A.; BUSH, M.; MELBY, E.C.; NEELEY, L.M.; YARBOROUGH, B. Clinical and pathological study of canine lymphoma: clinical staging, cell classification and therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v.51, p.565-574, 1973.

SUEIRO, F.A.R.; ALESSI, A.C.; VASSALLO; J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, p.207-213, 2004.

SUZANO, S.M.C. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do p53 nos linfomas caninos. Botucatu, 2007, 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Campus de Botucatu.

TEIFKE, J.P.; LÖHR, C.V. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p.205-210, 1996.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v. 6, p. 59-71, 1996.

TOLBERT, D. M.; NOFFSINGER, A. E.; MILLER, M. A.; DEVOE, G. W.; STEMMERMANN, G. N.; MACDONALD, J. S.; FENOGLIO-PREISER, C. M. p53 immunoreactivity and single-strand conformational polymorphism analysis often fail to predict p53 mutational status. **Modern Pathology**, v.12, p.54-60, 1999.

TUREK, M.M.; SABA, C.; PAOLONI, M.C. Canine lymphoma and leukemia. In: ARGYLE, D.J.; BREARLEY, M.J.; TUREK, M.M. **Decision Making in Small Animal Oncology**. 2.ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008. cap.9, p.161-196.

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S. J; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 40 ed. Philadelphia: Saunders, 2007. cap.31, p.699-720.

van LEEUWEN, I.S.; CORNELISSE, C.J.; MISDORPA, W.; GOEDEGEBUURE, S.S.; KIRPENSTEIJN, J.; RUTTEMAN, G.R. P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. **Cancer Letters**, v.1, p.173-178, 1997.

VARLEY, J. M.; CHAPMAN, P.; MCGOWEN, G.; THORNCROFT, M.; WHITE, G. R.; GREAVES, M. J.; SCOTT, D.; SPREADBOROUGH, A.; TRICKER, K. J.; BIRCH, J. M.; EVANS, D. G.; REDDEL, R.; CAMPLEJOHN, R. S.; BURN, J.; BOYLE, J. M. Genetic and functional studies of a germline TP53 splicing mutation in a Li-Fraumeni-like family. **Oncogene**, v.16: 3291–3298, 1998.

VELDHOEN, N.; MILNER, J. Isolation of canine p53 cDNA and detailed characterization of the full length canine p53 protein. **Oncogene**, v.16, p.1077-1084, 1998.

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**, v.16, p.249-255, 1998.

VILCHEZ, R.A.; MADDEN, C.R.; KOZINETZ C.A.; HALVORSON S.J.; WHITE Z.S.; JORGENSEN, J.L.; FINCH, C.J.; BUTEL, J.S. Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. **The Lancet**, v.9, p.817-823, 2002.

VILLUENDAS R.; PIRIS, M.A.; ALGARA, P.; SHNCHEZ-BEATO, M.; SHNCHEZ-VERDE, L.; MARTINEZ, J.C.; ORRADRE, J.L.; GARCIA, P.; LOPEZ, C.; AND

MARTINEZ, P. The Expression of p53 Protein in Non-Hodgkin's Lymphomas Is Not Always Dependent on p53 Gene Mutations. **Blood**, v.82, p.3151-3156, 1993.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v.408, p.307-310, 2000.

VONDERHAAR, M. A.; MORRISON, W. B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats**. 2. ed. Wyoming: Teton New Media, 2002. cap. 45, p. 641-665.

WAIZBORT, R; SOLHA, G.C. Os genes interrompidos: o impacto da descoberta dos íntrons sobre a definição de gene molecular clássico. **Revista da SBHC**, v. 5, p.63-84, 2007.

WANG-GOHRKE, S.; WEIKEL, W.; RISCH, H.; VESPRINI, D.; ABRAHAMSON, J.; LERMAN, C.; GODWIN, A.; MOSLEHI, R.; OLIPADE, O.; BRUNET, J-S.; STICKELER, E.; KIEBACK, D.G.; KREIENBERG, R.; WEBER, B.; NAROD, S.A.; RUNNEBAUM, I.B. Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germ line mutations. **British Journal of Cancer**, v.81, p.179-183, 1999.

ZACCHETTI, A.; van GARDEREN. E.; RUTTEMAN, G.R. Immunohistochemical evaluation of p53 expression with different antibodies in malignant canine tumours with or without p53 gene mutation. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.5, p.108–118, 2007.

APÊNDICE

A. SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA:EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético):

- 1000mL de água destilada
- 0,3722g de EDTA

TRIS solução tampão:

- 1000mL de água destilada
- 6,0g Trizma base (Sigma[®], cód.T1503).
- 8,5g cloreto de sódio
- Acertar o pH em 7,4

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)