

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MARCADORES TUMORAIS BIOQUÍMICOS E IMUNOCITOQUÍMICOS EM
EFUSÕES NEOPLÁSICAS CANINAS**

LUCIELE VARASCHINI TEIXEIRA

PORTO ALEGRE, 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MARCADORES TUMORAIS BIOQUÍMICOS E IMUNOCITOQUÍMICOS EM
EFUSÕES NEOPLÁSICAS CANINAS**

PORTO ALEGRE, 2012

Luciele Varaschini Teixeira

MARCADORES TUMORAIS BIOQUÍMICOS E IMUNOCITOQUÍMICOS EM
EFUSÕES NEOPLÁSICAS CANINAS

Félix Hilario Diaz González

Orientador e Presidente da Comissão Avaliadora

Anne Santos do Amaral (UFSM)

Membro da Comissão Avaliadora

Luiz Fernando Gaspar (UFPEl)

Membro da Comissão Avaliadora

Mirela Tinucci Costa (UNESP)

Membro da Comissão Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãs, pela confiança e carinho sempre. Mesmo longe estaremos sempre perto!!! Amo vocês!!!

Ao Wagner, meu psicólogo predileto!! Obrigada pelas horas boas e ruins que passamos juntos. Você me ensinou que tudo o que fazemos, seja bom ou ruim, é sempre um aprendizado. Te amo!!!

Ao Wallace, esse gatinho arteiro, que me distraiu em muitos momentos... Meu primeiro “filho”!!

Ao meu orientador Félix H. D. González pela confiança e oportunidade de desenvolver um trabalho na área que mais gosto: Citologia.

Ao meu co-orientador Daniel Gerardi pelos ensinamentos.

Aos amigos de verdade que fiz em Porto Alegre... é muito bom saber que posso contar com vocês o tempo todo!!

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (estagiários, residentes, ex-residentes e pós-graduandos), em especial à Tatiana Guerra e ao Francisco Conrado, pelas análises de muitos líquidos cavitários que chegavam quando o laboratório estava “a mil por hora”.

Aos residentes e professores da clínica de pequenos animais do Hospital de Clínicas Veterinárias, pela colaboração e ajuda nas amostras.

À Márcia Cordeiro, por algumas amostras fornecidas, muito obrigada!!

À Tatiane Terumi, minha colega, obrigada por tudo!!

À Silvia Terra, que me ajudou sempre e abriu horizontes em minha mente.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

***"O único homem que está isento de erros,
é aquele que não arrisca acertar."***

Albert Einstein

MARCADORES TUMORAIS BIOQUÍMICOS E IMUNOCITOQUÍMICOS EM EFUSÕES NEOPLÁSICAS CANINAS

Autor: Luciele Varaschini Teixeira

Orientador: Félix Hilario Díaz González

RESUMO

As efusões cavitárias são de ocorrência frequente na rotina clínica de cães. Na maior parte dos casos são efusões benignas, causadas por distúrbios hidrostáticos do sistema circulatório. As neoplasias são causas comuns de efusões em cães, contudo, nem sempre as células tumorais são encontradas no exame citopatológico. A dosagem de marcadores tumorais e o exame imunocitoquímico são alternativas para tornar o diagnóstico de neoplasia em efusões mais preciso. Os objetivos deste trabalho foram dosar os seguintes marcadores tumorais bioquímicos: antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno associado a câncer 72-4 (CA 72-4) e fragmento de citoqueratina 21-1 (CYFRA 21-1), que ainda não tiveram seu desempenho avaliado em efusões neoplásicas e não neoplásicas caninas, bem como marcadores imunocitoquímicos que incluem dois novos anticorpos primários (MOC-31 e D2-40) para a diferenciação entre carcinoma e mesotelioma. Trinta e duas amostras de líquidos cavitários abdominais e torácicos, provenientes do atendimento clínico do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram analisadas. De acordo com o exame citopatológico e ficha clínica do animal essas efusões foram classificadas em dois grupos: neoplásico e não neoplásico. A dosagem dos marcadores tumorais foi realizada pelo método imunoenzimático sanduíche (ELISA), conforme as instruções dos fabricantes. Para a avaliação imunocitoquímica foram utilizadas 14 amostras de efusões neoplásicas. A técnica foi realizada pelo método estreptavidina-biotina ligada a peroxidase ou a fosfatase alcalina, utilizando-se como cromógeno o DAB. Os marcadores tumorais CEA e CA 72-4 não tiveram resultados significativos na diferenciação entre efusões neoplásicas e não neoplásicas, enquanto que o CYFRA 21-1 obteve sensibilidade de 70%, especificidade de 94% e acurácia de 81% para o diagnóstico neoplásico. Em todas as amostras neoplásicas, imunocitoquímica e citopatologia foram compatíveis, verificando-se como válida a padronização dos novos anticorpos para a espécie canina. Este estudo demonstrou que novos marcadores tumorais, tanto bioquímicos como imunocitoquímicos, podem ser empregados no diagnóstico de neoplasias caninas. O marcador tumoral CYFRA 21-1 deve ser utilizado como auxílio diagnóstico para a espécie canina e os anticorpos MOC-31 e D2-40 devem ser incluídos em painéis imunocitoquímicos de rotina para a diferenciação entre carcinomas e mesoteliomas em efusões neoplásicas.

Palavras-chave: efusões neoplásicas, canino, marcadores tumorais, imunocitoquímica

**BIOCHEMICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL TUMOR MARKERS IN
CANINE NEOPLASTIC EFFUSIONS**

Author: Luciele Varaschini Teixeira

Advisor: Félix Hilario Díaz González

ABSTRACT

The cavity effusions frequently occur in the clinical routine of dogs. In most cases the effusions are benign caused by circulatory system disorders. Neoplasms are common causes of effusions in dogs, however not always the tumor cells are found in cytopathological analysis. The dosage of tumor markers is an alternative to make the neoplastic effusion diagnosis more accurate. The aims of this work were to determine the following biochemical tumor markers: carcinoembryonic antigen (CEA), cancer antigen 72-4 (CA 72-4) and cytokeratin fragment 21-1 (CYFRA 21-1), which have not had their performance evaluated in canine neoplastic and non-neoplastic effusions, as well as immunocytochemical markers including two new primary antibodies (MOC-31 and D2-40) for differentiation between carcinoma and mesothelioma tumors. Thirty-two samples of abdominal and thoracic cavity fluids, from the clinical care of the Veterinary Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul were analyzed. According to the cytopathology test and patient's clinical record the effusions were classified in two groups: neoplastic or non-neoplastic. The tumor markers measurement was performed by sandwich enzyme immunoassay (ELISA) according to the manufacturer instructions. Fourteen neoplastic samples were used for the immunocytochemical tests. The tests were performed by streptavidin-biotin method linked to peroxidase or to alkaline phosphatase using the DAB chromogen. The tumor markers CEA and CA 72-4 had no significant results for differentiating between neoplastic and non neoplastic effusions, whereas the tumor marker CYFRA 21-1 obtained 70% of sensibility, 94% of specificity and 81% of accuracy for the neoplastic diagnosis. In all neoplastic samples the immunocytochemical and cytological tests were compatible, which make valid their use for standardization of those new antibodies for the canine species. This study demonstrated that new tumor markers both biochemical and immunocytochemical could be used in the canine neoplastic diagnosis. The tumor marker CYFRA 21-1 must be used for the canine species, and the antibodies MOC-31 and D2-40 must be included in routine immunocytochemistry panel for the differentiation between carcinoma and mesothelioma in neoplastic effusions.

Key-words: neoplastic effusions, canine, tumor markers, immunocytochemistry

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Pág
Figura 1. Canino apresentando efusão abdominal (ascite) como consequência de uma insuficiência hepática crônica.....	17
Figura 2. Amostra de efusão abdominal canina compatível com transudato puro. Macroscopicamente a amostra apresenta-se incolor e de aspecto límpido (A). Baixa celularidade no exame na análise microscópica (B). Panótico rápido, 200x.....	18
Figura 3. Amostra de efusão abdominal canina compatível com transudato modificado. Macroscopicamente a amostra apresenta-se rosada e pouco turva (A); microscopicamente a celularidade é moderada e variável, composta por hemácias, células mononucleares (seta larga) e neutrófilos (seta estreita) (B). Panótico rápido, 400x.....	19
Figura 4. Amostra de efusão abdominal canina compatível com exsudato. Macroscopicamente a amostra apresenta-se alaranjada e turva (A); microscopicamente observa-se alta celularidade composta predominantemente por neutrófilos (seta) (B). Panótico rápido, 400x.....	21
Figura 5. Amostra de efusão pleural hemorrágica canina. Macroscopicamente a amostra apresenta-se avermelhada e turva (A); microscopicamente observa-se celularidade com prediminância de hemácias e macrófagos realizando eritrofagocitose (seta) (B). Panótico rápido, 400x.....	22
Figura 6. Análise citológica de efusão pleural de cão associada a linfoma, com linfócitos neoplásicos apresentando marcado pleomorfismo nuclear. Panótico rápido, 1.000x.....	24

- Figura 7.** Análise citológica de efusão pleural canina compatível com carcinoma mamário metastático. A fotomicrografia apresenta um aglomerado de células neoplásicas fortemente coesas, com citoplasma basofílico e vacuolizado (cabeça de seta), núcleo com cromatina grosseira e alguns nucléolos evidentes (setas estreitas). Panótico rápido, 400x..... 25
- Figura 8.** Análise citológica de efusão pleural canina compatível com osteossarcoma metastático. As células neoplásicas apresentam bordos citoplasmáticos irregulares, núcleo com cromatina frouxa e nucléolos evidentes (setas). Panótico rápido, 400x..... 26
- Figura 9.** Análise citológica de efusão pleural canina compatível com mesotelioma apresentando células mesoteliais neoplásicas dispostas em aglomerados e livres. Na fotomicrografia podem-se observar algumas características de malignidade, como multinucleação (seta), basofilia e vacuolização citoplasmática em todas as células. Panótico rápido, 400x..... 27
- Figura 10.** Amostras de efusão pleural quilosa canina apresentando aparência opaca, devido à grande quantidade de triglicérides (A). Microscopicamente observam-se eritrócitos (cabeça de seta) e linfócitos pequenos e médios (setas) (B). Panótico rápido, 400x..... 28
- Figura 11.** Macrófago contendo pigmento biliar (setas) em efusão abdominal canina. Há também vários neutrófilos livres..... 29

ARTIGO 1

- Figura 1.** Análise de Curva ROC do marcador CYFRA 21-1. Área debaixo da curva = 85,5% ±0,07 (I.C. 72,5% - 98,6%; $p < 0,001$). Sensibilidade = 70%, especificidade = 94% e acurácia = 81%..... 43

ARTIGO 2

- Figura 1.** Metástase pulmonar de carcinoma mamário em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para citoqueratina (1A) e para MOC-31 (1B) (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 200x)..... 52
- Figura 2.** Mesotelioma maligno em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para D2-40 (2A) e para citoqueratina (2B) (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 200x)..... 52
- Figura 3.** Metástase mediastínica de lipossarcoma. Efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para vimentina (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 400x)..... 53
- Figura 4.** Histiocitose maligna em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para vimentina (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 200x)..... 53
- Figura 5.** Linfoma tipo B em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para CD79 (5A) (método avidina-biotina-fosfatase alcalina, cromógeno DAB, 200x). Linfoma tipo T em efusão abdominal canina. Coloração citoplasmática positiva para CD3 (5B) (método avidina-biotina-fosfatase alcalina, cromógeno DAB, 200x)..... 53

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Pág
Tabela 1. Painel de anticorpos utilizados para diferenciar adenocarcinomas de mesoteliomas em efusões.....	35
ARTIGO 1	
Tabela 1. Distribuição das amostras de efusões dos grupos não neoplásico e neoplásico conforme a etiologia.....	41
Tabela 2. Mediana e amplitude dos marcadores tumorais para cada grupo e teste de comparação de intervalos (<i>ranks</i>) entre os grupos não neoplásico e neoplásico.....	43
ARTIGO 2	
Tabela 1. Relação dos anticorpos primários, fabricantes, diluições e recuperações antigênicas utilizados na técnica de ICQ.....	51
Tabela 2. Resultado da reatividade dos anticorpos relacionado ao tipo neoplásico.....	51

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Classificação das efusões na espécie canina.....	16
3.1.1 Transudato puro.....	17
3.1.2 Transudato modificado.....	18
3.1.3 Exsudato.....	19
3.1.4 Efusão hemorrágica.....	21
3.1.5 Efusão neoplásica.....	22
3.1.5.1 Linfomas.....	23
3.1.5.2 Carcinomas.....	24
3.1.5.3 Sarcomas.....	25
3.1.5.4 Mesoteliomas.....	26
3.1.6 Efusão quilosa.....	27
3.1.7 Efusão biliar.....	28
3.1.8 Uroperitônio.....	29
3.2 Marcadores tumorais bioquímicos.....	30
3.2.1 Antígeno carcinoembrionário (CEA).....	31
3.2.2 Antígeno associado ao câncer 72-4 (CA 72-4).....	32
3.2.3 Fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA 21-1).....	32
3.3 Marcadores imunocitoquímicos de efusões.....	32
3.3.1 Marcadores imunocitoquímicos para diferenciação entre mesoteliomas, adenocarcinomas e células mesoteliais reativas.....	34
3.3.2 Marcadores imunocitoquímicos para linfoma canino.....	35

3.3.3 Marcador imunocitoquímico para tumores mesenquimais.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Artigo 1.....	38
4.1.1 Desempenho dos marcadores tumorais CEA, CYFRA 21-1 e CA 72-4 na diferenciação de efusões neoplásicas e não neoplásicas em cães.....	38
4.1.2 Abstract.....	38
4.1.3 Introdução.....	39
4.1.4 Materiais e Métodos.....	40
4.1.5 Resultados.....	42
4.1.6 Discussão.....	44
4.1.7 Referências.....	45
4.2 Artigo 2.....	48
4.2.1 Uso do MOC-31 e do D2-40 como novos marcadores imunocitoquímicos em efusões neoplásicas caninas.....	48
4.2.2 Summary.....	49
4.2.3 Introdução.....	49
4.2.4 Materiais e Métodos.....	51
4.2.5 Resultados.....	53
4.2.6 Discussão.....	55
4.2.7 Referências.....	
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os casos de neoplasia tem se tornado cada vez mais frequentes na prática veterinária. Com isso, aumentaram as investigações na busca por métodos diagnósticos mais precisos e drogas mais eficazes no tratamento contra o câncer. Morris e Dobson (2007) sugeriram que um em cada dez cães desenvolverá alguma neoplasia durante a sua vida. Em um estudo nos Estados Unidos, com 2.000 cães, a maioria das mortes foi ocasionada por neoplasia (23%) (BRONSON, 1982). Dados mais recentes afirmam que de 4.844 mortes de cães, 7,8% tinham neoplasmas (FIGHERA et al., 2008).

Existem diversos tipos de fluidos corporais, que variam em suas aparências, propriedades físico-químicas e celularidade. A investigação de líquidos cavitários abdominal e torácico, também chamados efusões, é muito útil para avaliar processos inflamatórios, malignidades e hemorragias (MUNDT e SHANAHAN, 2011), através de técnicas citológicas, imunocitoquímicas (ICQ), bioquímicas e moleculares (KOSS, 2006).

Apesar do diagnóstico de uma neoplasia poder ser realizado mediante citopatologia, histopatologia, imunohistoquímica (IHQ), marcadores tumorais bioquímicos e exames de imagem, eles não devem ser utilizados isoladamente (MORRIS e DOBSON, 2007).

Os marcadores tumorais bioquímicos são amplamente utilizados no diagnóstico de neoplasmas em humanos e atualmente vem ganhando espaço na medicina veterinária (LECHOWSKI et al., 2002). Eles são úteis para o diagnóstico, estadiamento da doença, avaliação da resposta terapêutica, detecção de recidivas e de prognóstico (ALONZO, 2005; MATTOS et al., 2005).

O exame imunocitoquímico (ICQ) diagnóstico vem crescendo no espaço veterinário. Com o aprimoramento de técnicas e a necessidade de diagnósticos mais precisos na área oncológica, a ICQ torna-se fundamental nos dias atuais. As principais indicações deste exame incluem diagnóstico de neoplasmas indiferenciados, determinação da origem de tumores metastáticos, classificação de neoplasias, natureza benigna ou maligna do tumor e identificação de agentes infecciosos (ALVES et al., 1999; SUSTER et al., 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o desempenho de marcadores tumorais bioquímicos e imunocitoquímicos no diagnóstico de efusões neoplásicas na espécie canina.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a capacidade dos marcadores tumorais bioquímicos CEA, CA 72-4 e CYFRA 21-1 em diagnosticar efusões neoplásicas na espécie canina;
- Investigar a compatibilidade de marcadores imunocitoquímicos que utilizam os anticorpos MOC 31 e D2-40 comparando com a análise citológica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Classificação das efusões na espécie canina

Normalmente, uma pequena quantidade de fluido está presente nas cavidades abdominal, pleural e pericárdica, promovendo o deslizamento entre as membranas. Este líquido é um ultrafiltrado do sangue que extravasa dos capilares venosos e é quase totalmente reabsorvido pelos vasos linfáticos. O acúmulo anormal de líquido cavitário é consequência da diferença entre as pressões hidrostática e oncótica entre os vasos sanguíneos e as cavidades corpóreas, que pode ocorrer em uma série de enfermidades. Além desse fator, existem também as condições de alteração da permeabilidade endotelial e da integridade da drenagem linfática (O'BRIEN e LUMSDEN, 1988; PEMBLETON-CORBETT et al., 2000; SWANN e HUGHES, 2000).

A camada serosa, que reveste as cavidades, é composta por dois tipos de tecido: mesotelial e conjuntivo. O mesotélio é composto por uma monocamada de células, que expressam marcadores imunocitoquímicos epiteliais e mesenquimais. Estas células revestem os órgãos e as paredes das cavidades abdominal, pleural e pericárdica. Os vasos linfáticos estão intimamente ligados às cavidades corporais através de aberturas promovidas pelas células mesoteliais, atuando na reabsorção de partículas de proteínas e líquido extravasado pelos capilares venosos (SWANN e HUGHES, 2000; ZOCCHI, 2002; MUTSAERS, 2004).

O acúmulo de líquidos nas cavidades corporais, chamado efusão, ocorre com frequência na clínica veterinária, podendo estar presente como sinal clínico de várias enfermidades, como na insuficiência hepática crônica (Figura 1), devido à diminuição da pressão oncótica plasmática e/ou pelo sequestro das proteínas plasmáticas para o fluido abdominal (PEMBLETON-CORBETT et al., 2000; ZOCCHI, 2002, BUNCH, 2006).



Figura 1. Canino apresentando efusão abdominal (ascite) como consequência de uma insuficiência hepática crônica. Adaptado de: <http://www.petshopauqmia.com.br/2009/11/acumulo-de-liquido-abdominal-nos-caes/>

As efusões geralmente surgem em condições nosológicas, como parasitoses, neoplasias, afecções cardiovasculares, doenças metabólicas/ infecciosas/ degenerativas, ou traumas (DUNN, 2001). Elas são classificadas de acordo com os mecanismos patofisiológicos das enfermidades, como transudato puro, transudato modificado e exsudato.

Em diversos tipos de condições clínicas, como por exemplo traumas, podem-se encontrar outros tipos de efusões com características peculiares, tais como, efusão hemorrágica, efusão neoplásica, efusão quilosa, efusão biliar e uroperitônio. Os parâmetros para esta classificação baseiam-se na mensuração de proteína total, contagem celular e análise citológica (COWELL et al., 2009).

3.1.1 Transudato puro

Este tipo de efusão ocorre principalmente pela diminuição da concentração de proteínas plasmáticas (diminuição da pressão oncótica). O transudato puro contém baixas celularidade e concentração de proteínas (< 1.000 células nucleadas/ mL e até 25 g/L, respectivamente). Geralmente, a coloração é clara havendo pouca ou nenhuma turbidez. As células presentes são, na maior parte, mononucleares como linfócitos, macrófagos, monócitos e células mesoteliais, embora possam existir poucos polimorfonucleares como neutrófilos e eosinófilos (Figura 2). As células mesoteliais presentes se devem à ação irritante do líquido acumulado no interior da cavidade, causando hiperplasia do mesotélio (RAKICH e LATIMER, 2003; RIZZI et al., 2008).

A albumina é a principal proteína para a manutenção da pressão coloidosmótica intracapilar, portanto, nas enfermidades que cursam com a diminuição desta proteína há acúmulo de líquido nas cavidades corporais. Geralmente, quando a concentração de albumina se encontra próxima de 10 g/L ocorre extravasamento de líquido para as cavidades. As condições clínicas que resultam na formação de transudato puro incluem falha na síntese proteica (insuficiência hepática), baixa ingestão protéica (má nutrição), falha na absorção proteica (síndrome da má absorção intestinal) e perda de proteínas (hemorragias, parasitas intestinais, nefropatias) (BUNCH, 2006; WILLARD, 2006).

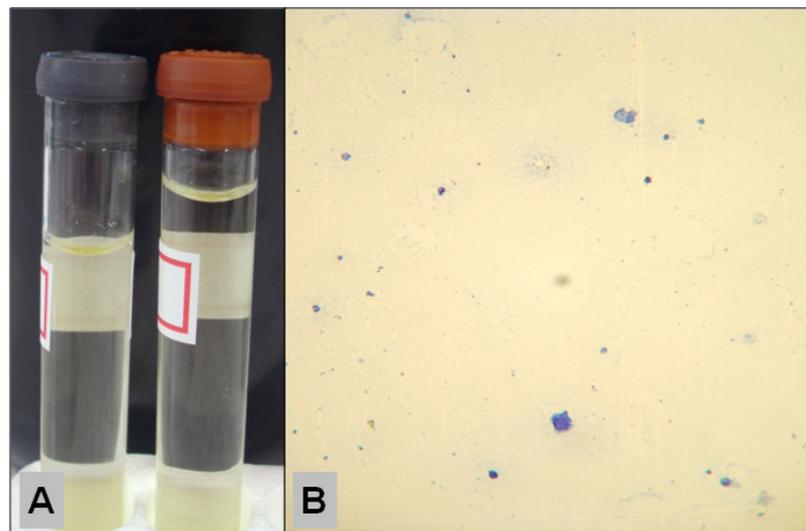


Figura 2. Amostra de efusão abdominal canina compatível com transudato puro. Macroscopicamente a amostra apresenta-se incolor e de aspecto límpido (A). Baixa celularidade no exame na análise microscópica (B). Panótico rápido, 200x.

3.1.2 Transudato modificado

Este tipo de efusão ocorre, geralmente, como consequência do aumento da pressão hidrostática intracapilar ou obstrução de vasos linfáticos e, portanto, na análise há elevação da concentração de proteínas e aumento da contagem de células nucleadas (Figura 3). A coloração varia de amarela clara a rosada e observa-se maior turbidez (WHELAN et al., 2007; STOCKHAM e SCOTT, 2008). A contagem de células nucleadas varia de 1.000 a 8.000/ μL e a concentração de proteína encontra-se entre 25 e 50 g/L. Semelhante ao transudato puro, no transudato modificado há predominância de

células mononucleares como macrófagos e linfócitos com baixa visualização de neutrófilos e células mesoteliais (SHELLY, 2001; COWELL et al., 2009).

Existem muitas enfermidades que cursam com este tipo de efusão, mas a causa mais comum de transudato modificado é a insuficiência cardíaca congestiva. Neste caso, o líquido apresenta-se serossanguinolento, pouco turvo e com quantidade variável de eritrócitos, macrófagos e linfócitos. As células mesoteliais apresentam-se normais ou reativas e em baixo número (FORRESTER et al., 1991; KING e GELENS, 1992; WRIGHT et al., 1999). Entre outras enfermidades que causam este tipo de efusão estão doença hepática, inflamações extensas (p. ex., granulomas) e neoplasias (COWELL et al., 2009).

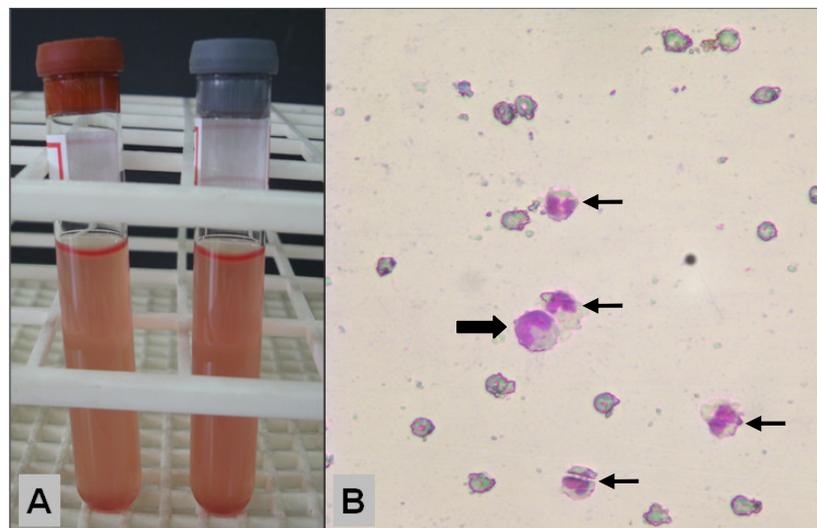


Figura 3. Amostra de efusão abdominal canina compatível com transudato modificado. Macroscopicamente a amostra apresenta-se rosada e pouco turva (A); microscopicamente a celularidade é moderada e variável, composta por hemácias, células mononucleares (seta larga) e neutrófilos (seta estreita) (B). Panótico rápido, 400x.

3.1.3 Exsudato

Esta efusão é causada por alteração mesotelial e/ ou aumento da permeabilidade endotelial. O exsudato resulta de uma resposta inflamatória pela presença de um corpo estranho de origem exógena (p.ex., agentes infecciosos), neoplasias ou de origem endógena (p.ex., imunocomplexos, urina, extravasamento de enzimas, bile) na cavidade.

A resposta inflamatória provoca a liberação de citocinas, aumentando a permeabilidade endotelial e mesotelial (O'BRIEN e LUMSDEN, 1988; ZOCCHI, 2002).

Neste tipo de efusão há predominância de células polimorfonucleares devido à quimiotaxia para a cavidade corporal (Figura 4). Também estão presentes, em menor número, macrófagos, monócitos, linfócitos e células mesoteliais. O processo inflamatório aumenta a permeabilidade vascular resultando em acúmulo de líquido com elevada concentração de proteína e alta celularidade (> 30 g/L e > 3.000 células nucleadas/ μ L, respectivamente). A coloração pode variar de rosada a âmbar e frequentemente o aspecto é turvo (KING e GELENS, 1992; SHELLY, 2001).

O exsudato é subclassificado em séptico ou não-séptico, dependendo da presença do agente infeccioso e alterações na morfologia celular, como degeneração de polimorfonucleares. Existem várias situações em que há acúmulo de líquido cavitário sem a ocorrência de infecção. Algumas vezes este tipo de exsudato é a evolução de um transudato modificado. O exsudato não-séptico está presente em várias enfermidades, como pancreatite, torção de órgãos internos e neoplasias (BAKER e LUMSDEN, 2000; COWELL et al., 2009).

Em algumas situações como ruptura de bexiga e ruptura de vesícula biliar, os exsudatos ganham nomenclaturas diferenciadas, uroperitônio e peritonite biliar, respectivamente. No caso de uroperitônio, o exsudato poderá ou não conter agentes infecciosos, além da inflamação química, o que dependerá da presença ou não de infecção vesical anterior ao rompimento (COWELL et al., 2009).

Em um exsudato séptico é comum a visualização de microrganismos livres ou fagocitados por macrófagos e neutrófilos. Geralmente observa-se também a degeneração destas células na tentativa de eliminação do agente infeccioso. Punções cavitárias traumáticas, perfuração do trato intestinal, migração de corpos estranhos e ruptura de abscessos são alguns exemplos de acúmulo de líquido cavitário séptico (BAKER e LUMSDEN, 2000; WALKER et al., 2000).

Algumas vezes, pode-se observar a predominância de eosinófilos em exsudatos ($> 10\%$), passando a se chamar efusão eosinofílica. Este tipo de efusão ocorre com frequência na clínica veterinária e está associada às neoplasias, como hemangiossarcomas, linfomas e mastocitose sistêmica. Outras causas de efusão eosinofílica são condições alérgicas, doenças parasitárias intestinais e cardíaca, granulomatose linfomatóide e pneumotórax (FOSSUM et al., 1993; BOUNOUS et al., 2000; SHELLY, 2001).

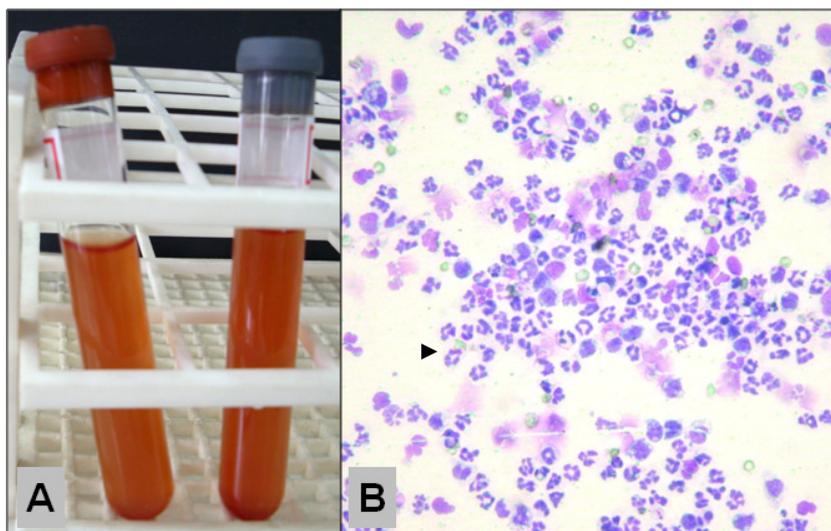


Figura 4. Amostra de efusão abdominal canina compatível com exsudato. Macroscopicamente a amostra apresenta-se alaranjada e turva (A); microscopicamente observa-se alta celularidade composta predominantemente por neutrófilos (seta) (B). Panótico rápido, 400x.

3.1.4 Efusão hemorrágica

Nesta efusão está presente grande quantidade de sangue (Figura 5A), o que deve ser verificado realizando-se o hematócrito da amostra. Um hematócrito entre 10 e 25% indica efusão hemorrágica. A ocorrência destes episódios está relacionada à ruptura ou alterações no endotélio vascular. A efusão hemorrágica pode ter origem iatrogênica, por punção de vasos ou órgãos na hora da coleta do líquido cavitário. Estas efusões não contêm plaquetas, podendo ser diferenciadas de contaminação iatrogênica da amostra (FORRESTER et al., 1991; SHELLY, 2001).

Nas efusões hemorrágicas verdadeiras há presença de quantidade considerável de macrófagos ativados (Figura 5B), além da visibilização de hemossiderina e cristais de hematoidina. Em líquidos hemorrágicos não existem valores numéricos definidos na contagem celular, porém, efusões com contagens altas de leucócitos podem ser consideradas como inflamatórias sendo classificadas como exsudato hemorrágico.

As efusões pericárdicas, na maioria das vezes, são hemorrágicas, principalmente na espécie canina. As causas são diversas, como traumas, neoplasias, coagulopatias, ruptura de átrio esquerdo. Muitas efusões pericárdicas hemorrágicas são causadas por neoplasias malignas ou doença pericárdica benigna idiopática (O'BRIEN e LUMSDEN, 1988; KERSTETTER et al., 1997; DUNNING, 1999).

O hemotórax e o hemoabdômen muitas vezes são causados por neoplasias malignas, como hemangiossarcoma, mesotelioma maligno, carcinoma metastático, osteossarcoma metastático, carcinoma pulmonar e linfoma. Para a obtenção do diagnóstico definitivo sempre são necessários outros exames complementares, além da citologia, devido aos resultados falsos positivos e falsos negativos (MANDELL e DROBATZ, 1995; HAMMOND e PESILLO-CROSBY, 2008; NAKAMURA et al., 2008).

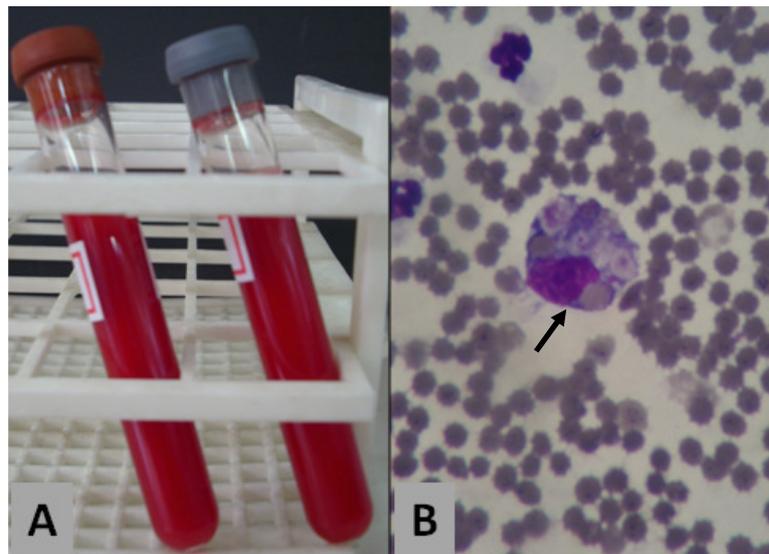


Figura 5. Amostra de efusão pleural hemorrágica canina. Macroscopicamente a amostra apresenta-se avermelhada e turva (A); microscopicamente observa-se celularidade com predominância de hemácias e macrófagos realizando eritrofagocitose (seta) (B). Panótico rápido, 400x.

3.1.5 Efusão neoplásica

As neoplasias são causas comuns de efusões em cães. O'Brien e Lumsden (1988) relataram que 57% das efusões pericárdicas e 11% das efusões peritoneais e pleurais resultaram de processos tumorais em cães. Contudo, nem sempre são encontradas células neoplásicas nos líquidos cavitários de origem tumoral ou, às vezes, são visibilizadas em pequena quantidade, dependendo do tipo de tumor. Os processos neoplásicos que ocorrem dentro das cavidades corporais podem gerar vários tipos de efusões, como transudatos, exsudatos e efusões hemorrágicas (CLINKENBEARD, 1992; EDWARDS, 1996).

O exame citológico das efusões neoplásicas possui acurácia de 64% em cães, como verificado por Hirschberger et al. (1999), em um estudo com 233 amostras. Muitas vezes o epitélio mesotelial encontra-se reativo devido ao processo inflamatório, sendo assim, as células mesoteliais podem ser confundidas com células neoplásicas. A irritação do mesotélio por substâncias ou corpo estranho, transforma as células mesoteliais normais em células com características malignas, que passam a apresentar multinucleação, anisocitose e anisocariose (O'BRIEN e LUMSDEN, 1988).

Os tipos tumorais que frequentemente causam efusões caninas são o carcinoma, mesotelioma, linfoma, hemangiossarcoma, mastocitoma e o histiocitoma. Assim como nas efusões hemorrágicas, não existe parâmetro numérico para efusões neoplásicas, embora a concentração de proteína nestas efusões seja superior a 30 g/L e o pH > 7,5 (EDWARDS, 1996).

As efusões neoplásicas possuem características citológicas de acordo com os diferentes tipos de tumores, porém, existem algumas peculiaridades comuns independente do tipo neoplásico, como vacuolização e basofilia citoplasmática, nucléolos evidentes, cromatina grosseira e pleomorfismo celular. Essas são algumas das características de malignidade presentes nas neoplasias encontradas em líquidos cavitários caninos (EDWARDS, 1996; WRIGHT et al., 1999; COWELL et al., 2009).

3.1.5.1 Linfomas

Os linfomas são neoplasias que frequentemente causam efusões em cães, tanto pleural como abdominal. Na análise citológica desta neoplasia são encontrados linfócitos de vários tamanhos e linfoblastos pleomórficos. Estas células apresentam características malignas, como cromatina nuclear grosseira, nucléolos evidentes, citoplasma basofílico e, por vezes, vacuolizado (Figura 6) (O'BRIEN e LUMSDEN, 1988; COWELL et al., 2009).

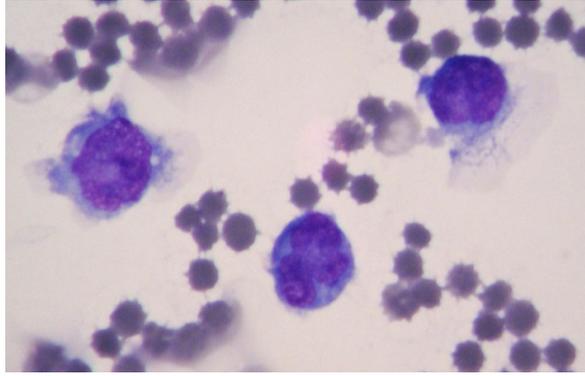


Figura 6. Análise citológica de efusão pleural de cão associada a linfoma, com linfócitos neoplásicos apresentando marcado pleomorfismo nuclear. Panótico rápido, 1.000x.

3.1.5.2 Carcinomas

Os carcinomas podem ter origem em órgãos distintos e geralmente causam metástases para os tecidos adjacentes. Na análise citológica das efusões devidas a carcinomas são encontrados aglomerados de células neoplásicas redondas altamente coesas, com bordos citoplasmáticos distintos, citoplasma basofílico e vacuolizado, núcleo com cromatina grosseira e nucléolos evidentes (Figura 7). Alguns critérios são de fundamental importância para a distinção entre carcinomas e outras neoplasias: a) gigantismo nuclear; b) marcada anisocariose; c) grandes e múltiplos nucléolos; d) pleomorfismo; e) multinucleação e f) figuras mitóticas (WRIGHT et al., 1999; COWELL et al., 2009).

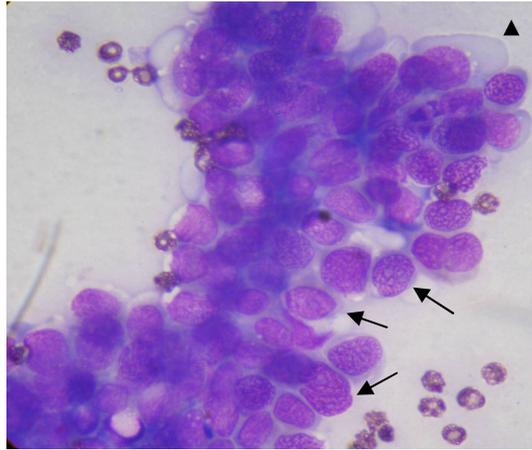


Figura 7. Análise citológica de efusão pleural canina compatível com carcinoma mamário metastático. A fotomicrografia apresenta um aglomerado de células neoplásicas fortemente coesas, com citoplasma basofílico e vacuolizado (cabeça de seta), núcleo com cromatina grosseira e alguns nucléolos evidentes (setas estreitas). Panótico rápido, 400x.

3.1.5.3 Sarcomas

Os sarcomas são raramente diagnosticados nas efusões, pois as células destes tumores são pouco esfoliativas. São tumores de origem mesenquimal e, portanto, formados por células fusiformes. Estas apresentam maior tamanho comparadas aos outros tipos celulares, aparecem livres ou em pequenos aglomerados e possuem características malignas como vacuolização citoplasmática, cromatina nuclear grosseira, nucléolos evidentes (Figura 8). Anormalidades como megalocitose, anisocariose, figuras mitóticas e multinucleação são frequentemente observadas (HAMMER e COUTO, 1992; WOOD et al., 1998; COWELL et al., 2009).

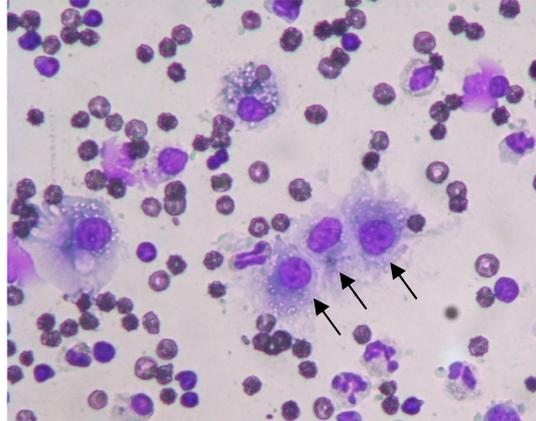


Figura 8. Análise citológica de efusão pleural canina compatível com osteossarcoma metastático. As células neoplásicas apresentam bordos citoplasmáticos irregulares, núcleo com cromatina frouxa e nucléolos evidentes (setas). Panótico rápido, 400x.

3.1.5.4 Mesoteliomas

Os mesoteliomas são tumores incomuns em cães, originados do revestimento das cavidades pleural, abdominal e pericárdica. As efusões causadas por este tipo de neoplasma contêm grande quantidade de células descamadas, mas de difícil distinção na análise citológica. Isto ocorre porque, a presença da neoplasia torna o epitélio reativo e as células não neoplásicas começam a apresentar características malignas (COWELL et al., 2009).

Os mesoteliomas também podem ser confundidos com carcinomas, por apresentarem morfologia semelhante. Portanto, para a obtenção do diagnóstico definitivo da neoplasia deve ser realizado exame imunocitoquímico. Na análise citológica das efusões causadas por mesotelioma é possível observar um grande número de células redondas, com bordos citoplasmáticos distintos e irregulares apresentando basofilia, núcleos grandes com cromatina grosseira, nucléolos proeminentes de tamanhos variáveis e múltiplos, células gigantes multinucleadas e figuras mitóticas (Figura 9) (CLINKENBEARD, 1992; BAKER e LUMSDEN, 2000).

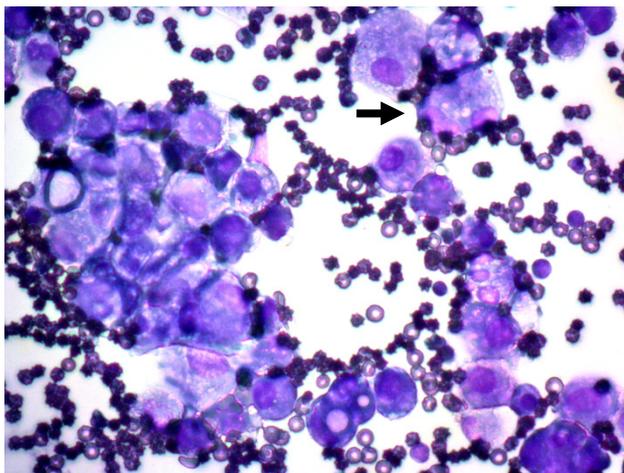


Figura 9. Análise citológica de efusão pleural canina compatível com mesotelioma apresentando células mesoteliais neoplásicas dispostas em aglomerados e livres. Na fotomicrografia podem-se observar algumas características de malignidade, como multinucleação (seta), basofilia e vacuolização citoplasmática em todas as células. Panótico rápido, 400x.

3.1.6 Efusão quilosa

Este tipo de efusão resulta da saída de linfa dos vasos linfáticos, caracterizada por líquido branco ou rosado e opaco, com contagem celular e proteína semelhante ao transudato modificado (Figura 10A). É importante, na suspeita de efusão quilosa, a dosagem de triglicerídeos, pois diferentemente das outras, nesta haverá concentração maior do que 100 mg/dL (WADDLE e GIGER, 1990). Após a centrifugação da amostra, esta continuará turva e esbranquiçada, devido à alta concentração de triglicerídeos (MEADOWS e MACWILLIAMS, 1994).

Na efusão quilosa há predominância de células mononucleares, principalmente linfócitos, por fazerem parte do sistema linfático (Figura 10B). Estas células vistas no líquido cavitário são pequenas e bem diferenciadas, diferentemente de linfomas que possuem grandes linfoblastos. Também podem estar presentes neutrófilos não degenerados e macrófagos como resposta inflamatória (FORRESTER et al., 1991; SHELLY, 2001; COWELL et al., 2009).

A efusão quilosa pode ocorrer devido a traumas, mas também pode ocorrer como consequências a neoplasias e outros distúrbios idiopáticos, como obstrução de ductos

abdominais. Cães da raça Afghan Hound têm maior predisposição para quilotórax do que outras raças caninas (FOSSUM et al., 1992; GORES et al., 1994).

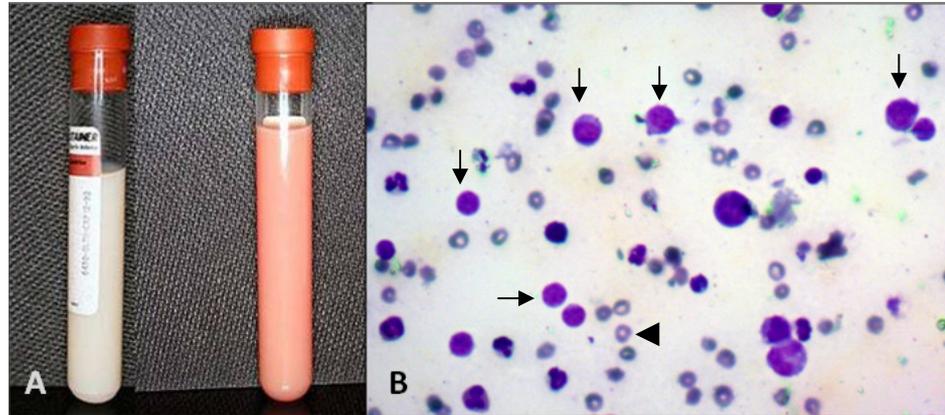


Figura 10. Amostras de efusão pleural quilosa canina apresentando aparência opaca, devido à grande quantidade de triglicerídeos (A). Microscopicamente observam-se eritrócitos (cabeça de seta) e linfócitos pequenos e médios (setas) (B). Panótico rápido, 400x.

3.1.7 Efusão biliar

Este tipo de efusão resulta da ruptura e/ou outras injúrias nos ductos e vesícula biliar, provocadas por traumas, inflamações (colangite), obstrução e iatrogenicidade. Quando a bile extravasa para a cavidade peritoneal, substâncias irritantes causam um processo inflamatório, inicialmente não séptico e agudo. Forma-se um exsudato de coloração amarelo-esverdeada a âmbar, com predominância de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos. Na análise citológica é possível observar material verde escuro, por vezes azulado no interior de macrófagos, compatível com pigmento biliar (Figura 11). Este material deve ser distinguido de hemossiderina, observada em efusões hemorrágicas, também presente no interior de macrófagos (O'BRIEN e LUMSDEN, 1988; AUMANN et al., 1998).

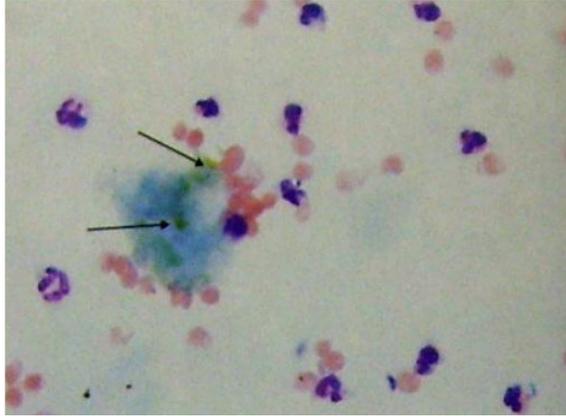


Figura 11. Macrófago contendo pigmento biliar (setas) em efusão abdominal canina. Há também vários neutrófilos livres. Adaptado de Cowell et al. (2009).

3.1.8 Uroperitônio

O uroperitônio é formado pelo extravasamento de urina para o espaço peritoneal, causando irritação química e formação de exsudato com coloração amarelo clara a âmbar. A concentração de proteína e contagem celular apresentam-se baixas, devido à diluição pela urina. Há predominância de neutrófilos segmentados não degenerados e picnóticos; entretanto, quando há ruptura vesical, os microrganismos podem contaminar a cavidade peritoneal, em caso de infecção do trato urinário, formando um exsudato (SCHMEIDT et al., 2001).

A dosagem de creatinina no soro e na efusão deve ser comparada, uma vez que as concentrações dos metabólitos são semelhantes em fluidos orgânicos e a creatinina deve ser totalmente excretada pelos rins. Assim, no uroperitônio a creatinina está mais concentrada na efusão do que no plasma. Alguns eletrólitos, como sódio e potássio também estão alterados no uroperitônio, resultando em hiponatremia e hipercalemia (AUMANN et al., 1998; COWELL et al., 2009).

3.2 Marcadores tumorais bioquímicos

Em 1846, Bence-Jones descobriu a presença de uma proteína na urina de pacientes com mieloma múltiplo, sendo até hoje utilizada como diagnóstico para esta doença. Através desta descoberta, os marcadores bioquímicos tumorais foram definidos como qualquer substância produzida por células neoplásicas ou pelo hospedeiro em resposta a presença do tumor, que podem ser detectadas em fluidos corporais e utilizadas no manejo de pacientes com câncer. Sendo assim, a introdução de marcadores tumorais na clínica oncológica possui ampla utilidade, principalmente no desenvolvimento de novas técnicas imunodiagnósticas (CHAN e SCHWARTZ, 2002).

O antígeno tumor-específico está presente somente nas células neoplásicas e pode ser detectado em tumores espontâneos ou induzido por algum agente. Este mecanismo não é bem entendido, acredita-se que um carcinógeno induza oncogenes dormentes, resultando em expressão anômala. O antígeno tumor-associado está presente tanto nas células neoplásicas como nas células normais do hospedeiro, sendo diferenciado pela forma molecular ou pela quantidade que se apresenta. As enzimas também podem ser utilizadas como marcadores tumorais bioquímicos, apresentando-se com elevação significativa dependendo do órgão afetado, porém com baixa especificidade. Os hormônios são frequentemente utilizados na detecção de neoplasias, cursando um aumento de produção pelo tecido endócrino ou por outro tipo de tecido (SELL, 1992).

Os marcadores tumorais bioquímicos estão relacionados com a gênese e crescimento neoplásico indicando a presença do tumor. Estes marcadores podem ser proteínas ou fragmentos de proteínas, como antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (CAPELOZZI, 2001; ALMEIDA, 2004; MATTOS et al., 2005) e podem ser mensurados qualitativa ou quantitativamente através de métodos bioquímicos, imunológicos, genômicos e proteômicos (CHAN e SCHWARTZ, 2002).

A detecção destas substâncias auxilia no manejo clínico dos pacientes, como no diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico. Além disso, proporciona novas modalidades de tratamento (TOMASICH et al., 2001; PACHECO et al., 2002; ALONZO, 2005; SILVEIRA, 2005).

O marcador tumoral ideal deve ter boa especificidade (detectar o tipo de neoplasia) e sensibilidade (detectar baixa quantidade de substâncias), reunindo

características para o diagnóstico precoce da neoplasia. Além disso, deve fornecer informações sobre a origem, extensão da doença, monitoração da resposta terapêutica e controle de recidivas. O marcador perfeito deveria ser produzido somente por células neoplásicas, descartando a interferência de outras doenças. Entretanto, a maioria dos marcadores existentes são pouco específicos e sensíveis, necessitando, muitas vezes, de outros testes como auxílio (GOMES, 1997; ALMEIDA, 2004; REIS, 2005; ROSA et al., 2005).

De acordo com o tipo de biomoléculas, os marcadores tumorais bioquímicos são classificados como (ALMEIDA et al., 2007; MALATI, 2007; CURI et al., 2008):

- Antígenos oncofetais: alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno oncofetal pancreático e sulfoglicoproteína fetal.
- Antígenos associados a tumores: CA125, CA19-9, CA15-3, CA72-4, CA50, etc.
- Hormônios: gonadotrofina coriônica, calcitonina, etc.
- Receptores de hormônios: estrógeno, progesterona, etc.
- Enzimas e isoenzimas: enolase neurônio-específica, glicosil transferases, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, etc.
- Outros: fragmentos de citoqueratina (CYFRA 21-1).

3.2.1 Antígeno carcinoembrionário (CEA)

O CEA é uma glicoproteína com peso molecular de 180 kDa, pertencente a superfamília das imunoglobulinas. Descoberto por Gold e Freedman em 1965, é o marcador mais utilizado até os dias atuais para investigar câncer gastrointestinal em humanos. O CEA é produzido por células normais, mas passa a ser superexpressado principalmente por adenocarcinomas de cólon, reto, mama e pulmão. Fumantes ativos e passivos expressam maior titulação deste marcador, porém, etnia, sexo e idade não influenciam no nível normal (WILSON et al., 1999).

Concentrações elevadas de CEA podem estar presentes em algumas doenças inflamatórias agudas e crônicas, como cirrose hepática, colelitíase, icterícias obstrutivas, abscessos hepáticos, úlceras gástricas, diabetes e doenças colagenosas vasculares (COOPER, 2005). Entretanto, concentrações muito elevadas estão presentes em carcinomas de diversos órgãos, linfoma e mieloma (GUIMARÃES et al., 2002). Estudos realizados por Botte et al. (1990) demonstraram que o CEA é o marcador

tumoral de primeira ordem para detecção de derrames pleurais malignos, mostrando sensibilidade de 57% e especificidade de 97%.

3.2.2 Antígeno associado ao câncer 72-4 (CA 72-4)

O CA 72-4 faz parte dos marcadores mucinosos associado a glicoproteínas, com peso molecular maior do que 10^6 kDa. Este antígeno foi caracterizado por dois anticorpos monoclonais murinos: CC-49 e B 72-3, ambos reconhecidos pela glicoproteína TAG-72 em soro humano, com peso molecular de 48 kDa (COLCHER et al., 1981).

Este marcador já foi identificado em epitélio fetal e em adenocarcinomas de vários órgãos. Possui elevada especificidade para as neoplasias, mas baixa sensibilidade para os órgãos afetados pelos tumores. Pode estar pouco elevado em doenças benignas e metastáticas, porém, possui maior sensibilidade para neoplasias em órgãos do trato digestivo, tomando a frente de outros marcadores (OHUCHI et al., 1989; VILLENA et al., 1996).

3.2.3 Fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA 21-1)

O CYFRA 21-1 é um determinante antigênico de 40 kDa presente na citoqueratina 19. Este antígeno foi definido por dois anticorpos monoclonais em murinos: KS 19-1 e BM 19-21 após imunização e estes anticorpos são específicos para a citoqueratina 19 (PUJOL et al., 1993; BONFRER et al., 1994).

Este marcador está presente no epitélio normal e em proliferação, sendo utilizado para detectar neoplasias principalmente pulmonares. Possui alta especificidade para carcinoma de células escamosas, embora possa gerar falsos positivos em algumas doenças benignas, como inflamações gastrintestinais, urológicas e ginecológicas (GOMES, 1997; ALMEIDA, 2004).

3.3 Marcadores imunocitoquímicos de efusões

A imunohistoquímica (IHQ), introduzida em 1966 por Nakane e Pierce, teve início como método diagnóstico na patologia de tumores. Hoje, com o aprimoramento das técnicas empregadas, obtém-se considerável sensibilidade para tipos teciduais

específicos. A imunocitoquímica (ICQ) constitui um ramo da IHQ, tendo sua aplicação em amostras celulares de esfregaços, escovados, lavados ou aspirados de lesões sólidas (BIBBO e LONGATTO FILHO, 2007).

A ICQ resume-se na marcação de determinadas proteínas presentes nas células por anticorpos mono ou policlonais. Assim, forma-se um complexo antígeno-anticorpo, onde o primeiro é a proteína celular a ser marcada (OERTEL e HUHNS, 1998).

As principais indicações de ICQ são:

- Identificar padrões de diferenciação, como tecido de origem da neoplasia, principalmente em neoplasmas não diferenciados;
- Identificar o órgão de origem dos tumores, pois muitos destes manifestam-se através de metástases. Entretanto, nem sempre esta conclusão é possível, mas essa prática reduz o número de hipóteses, direcionando o diagnóstico;
- Identificar correlações morfofuncionais através de substâncias liberadas pelas células tumorais, muitas vezes, acarretando distúrbios como nas síndromes paraneoplásicas;
- Avaliar o prognóstico em lesões neoplásicas ou pré-neoplásicas. Esta indicação é muito utilizada em tumores mamários e, atualmente, em linfomas devido à resistência aos quimioterápicos e pode ser estudada em amostras citológicas de efusões;
- Identificar o comportamento biológico das células, diferenciando-as de proliferações reacionais, neoplasias benignas ou malignas. Em amostras citológicas de efusões, alguns dos problemas mais comuns com os diagnósticos são as distinções entre: a) hiperplasia mesotelial e adenocarcinoma; b) hiperplasia mesotelial e mesotelioma; c) mesotelioma e adenocarcinoma; d) células linfoides reativas e linfomas; e) histogênese das células neoplásicas; f) origem do sítio primário das metástases.

Essas questões têm aumentado a busca por anticorpos mais específicos, otimizando a acuidade diagnóstica da citologia. Contudo, a ICQ ainda é limitada, pois depende de muitas variáveis para ser efetivamente comparada a IHQ (BIBBO e LONGATTO FILHO, 2007).

3.3.1 Marcadores imunocitoquímicos para diferenciação entre mesoteliomas, adenocarcinomas e células mesoteliais reativas

As efusões cavitárias podem ser causadas por uma série de tumores, podendo ser primárias como ocorre nos mesoteliomas, ou secundárias como adenocarcinomas, linfomas e sarcomas metastáticos. Embora a ocorrência de mesoteliomas seja inferior comparada a outras neoplasias, sua frequência vem aumentando, principalmente com a maior longevidade dos animais de estimação. Em efusões crônicas, muitas vezes há hiperplasia de células não neoplásicas, que acabam por se diferenciarem em células epiteliais, causando interpretação diagnóstica errônea (BEDROSSIAN, 1994). Muitas pesquisas têm tentado diferenciar adenocarcinomas de mesoteliomas, e assim, a ICQ está se tornando a principal técnica diagnóstica nestes casos (MOHANTY e DEY, 2003).

Vários tipos de marcadores imunocitoquímicos estão disponíveis para diferenciar adenocarcinomas e mesoteliomas em efusões, entretanto, o valor diagnóstico de marcadores isolados é limitado, necessitando-se grupos de anticorpos para diagnosticar uma determinada neoplasia (PEREIRA et al., 2006). A presença ou ausência de determinados antígenos nas células neoplásicas, sejam mesoteliomas ou adenocarcinomas, podem ser evidências úteis no estudo imunocitoquímico de efusões (Tabela 1). Contudo, os mais comumente utilizados são antígeno carcinoembrionário, BER-EP4 e CD15 para diagnóstico de adenocarcinomas, e HBME1, vimentina, calretinina e trombomodulina para diagnosticar mesoteliomas.

Tabela 1- Painel de anticorpos utilizados para diferenciar adenocarcinomas de mesoteliomas em efusões.

Anticorpo	Mesotelioma	Adenocarcinoma
CEA (antígeno carcinoembrionário)	Negativo	Positivo
EMA (antígeno de membrana epitelial)	Negativo	Positivo
Vimentina	Positivo	Negativo
CD15 (marcador de monócitos, granulócitos e células de adenocarcinoma)	Negativo	Positivo
BER-EP4 (marcador de adenocarcinomas)	Negativo	Positivo
Trombomodulina	Positivo	Negativo
Calretinina	Positivo	Negativo
Marcador mesotelial HBME-1	Positivo	Negativo
Mesotelina (K1)	Positivo	Negativo

Fonte: Adaptado de Bibbo e Longatto Filho (2001).

Atualmente, existem outros anticorpos para a diferenciação entre mesoteliomas, hiperplasia mesotelial reativa e adenocarcinomas, como MOC-31 e D2-40. O primeiro é um anticorpo monoclonal que reconhece glicoproteínas associadas à membrana das células neoplásicas de origem epitelial, enquanto que o segundo, também um anticorpo monoclonal, reage com o antígeno de membrana M2A presente em células germinativas e mesoteliais (WILLUDA et al, 1999; HECHT et al., 2006; LYONS-BOUDREAUX et al., 2008).

O D2-40 é muito utilizado no diagnóstico de mesotelioma epitelioide, além de outras neoplasias de origem epitelial e mesenquimal que envolvem crescimento vascular linfático. O MOC-31 está sendo utilizado para a diferenciação entre células mesoteliais reativas e adenocarcinomas, enquanto que estudos recentes descrevem boa eficácia do marcador D2-40 para mesoteliomas malignos, diferenciando-os de adenocarcinomas (ORDÓÑEZ, 2005; BHALLA et al., 2007).

3.3.2 Marcadores imunocitoquímicos para linfoma canino

Os linfomas caninos frequentemente causam efusões, principalmente pleurais (O'BRIEN e LUMSDEN, 1988). Nestes pacientes as análises citológicas e imunofenotípica do líquido cavitário são fundamentais para o diagnóstico neoplásico (PETRELLA et al., 1990).

Existem no mercado muitas combinações de anticorpos contra os diversos subtipos de linfomas, entretanto, os anticorpos mais utilizados são o CD3 e o CD79_α, os quais marcam linfócitos T e B, respectivamente (GUIJA DE ARESPACOHAGA et al., 2007).

3.3.3 Marcador imunocitoquímico para tumores mesenquimais

A vimentina é caracterizada como o principal filamento intermediário presente no citoesqueleto, principalmente de células mesenquimais, embora também possa ser encontrado em outras células não mesenquimais (FRANKE et al., 1978). Estes filamentos podem ser diferenciados imuno e bioquimicamente das outras classes de filamentos intermediários, de forma que a vimentina é utilizada como marcador imunoisto e citoquímico para a detecção de tumores derivados do mesênquima, os sarcomas (LEADER et al., 1987).

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos científicos, conforme os subtítulos descritos abaixo.

4.1 Artigo 1

4.1.1 Desempenho dos marcadores tumorais CEA, CYFRA 21-1 e CA 72-4 na diferenciação de efusões neoplásicas e não neoplásicas em cães

4.2 Artigo 2

4.2.1 Uso do MOC-31 e do D2-40 como novos marcadores imunocitoquímicos em efusões neoplásicas caninas

4.1 Artigo 1

4.1.1 Desempenho dos marcadores tumorais CEA, CYFRA 21-1 e CA 72-4 na diferenciação de efusões neoplásicas e não neoplásicas em cães

Luciele V. Teixeira¹, Tatiana A. Guerra¹, Francisco O. Conrado¹, Silvia R. Terra³,
Daniel G. Gerardi², Félix D. González¹

4.1.2 Abstract

Background: Many neoplasms cause abdominal and thoracic effusions in dogs. Biochemical tumor markers can be measured in body fluids and utilized for further diagnosis evidences. The objective of this study was to investigate the performance of tumor markers cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1), cancer-associated antigen 72-4 (CA 72-4) and carcinoembryonic antigen (CEA) to differentiate between malignant and not neoplastic canine effusions.

Methods: In thirty-two neoplastic (n=16) and non-neoplastic (n=16) samples of canine thoracic and abdominal effusions tumor markers CYFRA 21-1, CEA and CA72-4, were measured by sandwich enzyme immunoassay according to the manufacturer instructions. Statistical analysis comprise nonparametric Mann-Whitney U and Receiver Operating Characteristic Curve (ROC), that it was performed using the program IBM SPSS Statistics 19.

Results: Comparing the groups neoplastic and non neoplastic, statistical difference was found only for the marker CYFRA 21-1. The levels were significantly ($U = 37,00$; $p = 0.001$; $z = -3.43$) higher for the tumor group compared with the non-neoplastic. The cutoff point suggested by ROC curve analysis ($AUC = 85,5\% \pm 0,07$; $p < 0.001$) showed satisfactory levels of accuracy (81%), sensitivity (70%) and specificity (94%). The lack of significance between groups for markers CA 72-4 and CEA can be explained by the presence of other diseases in the non-neoplastic group, causing elevated levels of these markers.

¹Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

²Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais, UFRGS; ³Laboratório de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Autor para correspondência: Luciele Teixeira, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090; CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: +55 51 3308-8033; Fax: +55 51 3308-7305. E-mail: luciele.sm@gmail.com

***Conclusions:** This study concludes that the marker CYFRA 21-1 performed well, showing good sensitivity, specificity and accuracy in the diagnosis of neoplastic effusions in dogs. However, further investigations are necessary in patients with malignancy as those with benign effusions.*

***Key-words:** neoplastic effusion, dog, CEA, CA 72-4, CYFRA 21-1*

4.1.3 Introdução

As neoplasias são causas comuns de efusões em cães. O'Brien e Lumsden (1) relataram que 57% das efusões pericárdicas e 11% das efusões peritoneais e pleurais resultaram de processos tumorais em cães. Contudo, nem sempre as células neoplásicas estão presentes nas efusões, ou às vezes, são visibilizadas em pequena quantidade, dificultando o diagnóstico citopatológico (2, 3).

O estudo citopatológico das efusões é um dos principais métodos diagnósticos de malignidade, entretanto, apresenta sensibilidade de 60% (4, 5). Por isso, o uso dos marcadores tumorais bioquímicos para o diagnóstico de neoplasias é amplamente investigado na medicina humana (6-14) e os estudos sobre sua utilidade na medicina veterinária tem aumentado nos últimos anos (15-17).

Para melhor identificar as efusões malignas, vários estudos relataram a utilização de marcadores tumorais bioquímicos (10, 12). Estes marcadores são definidos como substâncias produzidas por células neoplásicas ou pelo hospedeiro em resposta a presença do tumor, que podem ser detectadas em fluidos corporais e utilizadas no manejo de pacientes com câncer (18).

O fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA 21-1) apresenta boa sensibilidade para carcinoma pulmonar de células escamosas e mesoteliomas, apesar de estar presente também no epitélio normal. Isto pode gerar falsos positivos em algumas doenças benignas, como inflamações gastrintestinais, urológicas e ginecológicas. O antígeno associado a câncer 72-4 (CA 72-4) é sensível para vários tipos de adenocarcinomas, principalmente na região gástrica. O antígeno carcinoembrionário (CEA) apresenta níveis elevados especialmente em neoplasmas de origem epitelial. Alguns estudos demonstram que a associação de marcadores tumorais torna mais sensível o diagnóstico de efusão maligna (6, 10, 19, 20).

O objetivo deste estudo foi investigar o desempenho dos marcadores tumorais bioquímicos CYFRA 21-1, CA 72-4 e CEA na diferenciação entre efusões neoplásicas e não neoplásicas de cães.

4.1.4 Materiais e Métodos

Animais e coleta das amostras

No período de oito meses, foram coletadas 59 amostras de efusões torácicas e abdominais caninas de animais provenientes do atendimento clínico do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, respeitando-se todos os procedimentos técnicos, conforme Kruth (21). O líquido coletado foi armazenado em tubos com e sem anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético) e imediatamente analisado. O presente trabalho foi aceito pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - UFRGS (projeto número 19.641).

Processamento das amostras

Os líquidos cavitários foram analisados física, química e citologicamente de acordo com Raskin e Meyer (22), Bibbo e Longatto Filho (23), e Cowell et al. (24). De acordo com o exame citopatológico as amostras foram separadas em dois grupos: neoplásico e não neoplásico. As efusões foram classificadas como neoplásicas quando no estudo citopatológico do líquido cavitário encontraram-se células malignas. Para o diagnóstico das efusões foram também estudados a ficha clínica e os exames de imagem de cada animal. Após as análises, o sobrenadante das amostras foi fracionado em alíquotas e, logo, armazenadas a -80°C para posterior mensuração dos marcadores tumorais bioquímicos.

Das 59 amostras analisadas, 32 foram escolhidas para a dosagem dos marcadores tumorais. As restantes foram descartadas devido à excessiva hemólise e/ou icterícia. Destas 32, dezesseis amostras foram diagnosticadas como não neoplásicas e dezesseis como neoplásicas, conforme os dados clínicos do paciente e exames complementares previamente realizados. Quando necessário, era realizada biópsia incisional ou necropsia para a confirmação do tipo neoplásico.

Etiologia das efusões

No grupo não neoplásico as amostras foram classificadas quanto à origem da efusão, enquanto que no grupo neoplásico as amostras foram classificadas quanto ao tipo de tumor (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das amostras de efusões dos grupos não neoplásico e neoplásico conforme a etiologia.

Grupo não neoplásico	n	Grupo neoplásico	n
Ruptura de ducto torácico	1	Mesotelioma	1
Insuficiência hepática	4	Carcinoma (2 colangiocarcinomas e 4 carcinomas mamários metastáticos)	6
Síndrome nefrótica	2	Sarcoma (3 hemangiossarcomas, 1 fibrossarcoma, 1 lipossarcoma metastático e 1 osteossarcoma metastático)	6
Efusão pericárdica idiopática	1	Histiocitose maligna	1
Insuficiência cardíaca	6	Linfoma (1 tipo B e 1 tipo T)	2
Parasitose intestinal	2		

Mensuração dos marcadores tumorais bioquímicos

Os marcadores CEA (Bioclin), CA 72-4 e CYFRA 21-1 (DRG International) foram mensurados pelo método imunoenzimático ELISA sanduíche (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), de acordo com instruções do fabricante. Para a leitura das amostras foi utilizado o leitor de placas SpectraMax M5 e o software SoftMax Pro5 (Molecular Devices). Os resultados de CEA e CYFRA 21-1 foram expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL) e de CA 72-4 foram expressos em unidade por mililitro (U/mL).

Análise estatística

Para comparar os níveis medianos dos marcadores tumorais entre o grupo não neoplásico e neoplásico foi utilizado o teste não-paramétrico *U* de Mann-Whitney. Posteriormente foi conduzida uma análise Receiver Operating Characteristic Curve (curva ROC) para estimar o ponto de corte, a área sob a curva e os níveis de acurácia, sensibilidade e especificidade para os marcadores com diferenças significativas entre os grupos. Para as análises foi utilizado o programa estatístico IBM SPSS Statistics 19. Em todas as análises adotou-se o nível significância de 5%.

4.1.5 Resultados

Concentração dos marcadores tumorais bioquímicos nos grupos não neoplásico e neoplásico

Na Tabela 2 são apresentados os valores medianos e a amplitude dos marcadores tumorais bioquímicos para os grupos não neoplásico e neoplásico. Os resultados do teste de comparação de intervalos *U* de Mann-Whitney entre os grupos não neoplásico e neoplásico são reportados na mesma tabela. Apenas o marcador CYFRA 21-1 apresentou níveis significativos ($p=0,001$) no grupo neoplásico em relação ao não neoplásico.

Tabela 2. Mediana e amplitude dos marcadores tumorais para cada grupo e teste de comparação de intervalos (*ranks*) entre os grupos não neoplásico e neoplásico.

Marcadores	Grupo – mediana (amplitude)		Mann-Whitney		
	Não neoplásico	Neoplásico	<i>U</i>	<i>z</i>	<i>p</i>
CEA (ng/mL)	0,89 (0,65-6,19)	0,92 (0,61-69,28)	115,50	-0,47	0,637
CYFRA 21-1 (ng/mL)	4,39 (3,31-7,53)	12,14 (4,21-34,68)	37,00	-3,43	0,001
CA72-4 (U/mL)	1,74 (1,15-2,97)	2,23 (1,09-129,70)	99,00	-1,09	0,274

A análise de curva ROC sugeriu o ponto de corte de 6,87 ng/mL para o marcador CYFRA 21-1, com nível de sensibilidade de 70%, especificidade de 94% e acurácia de 81%. A área debaixo da curva foi de 85,5% \pm 0,07 (I.C. 72,5% - 98,6%; $p = 0,001$), conforme a Figura 1. Conforme estes dados foram observados um caso falso positivo e cinco casos falsos negativos.

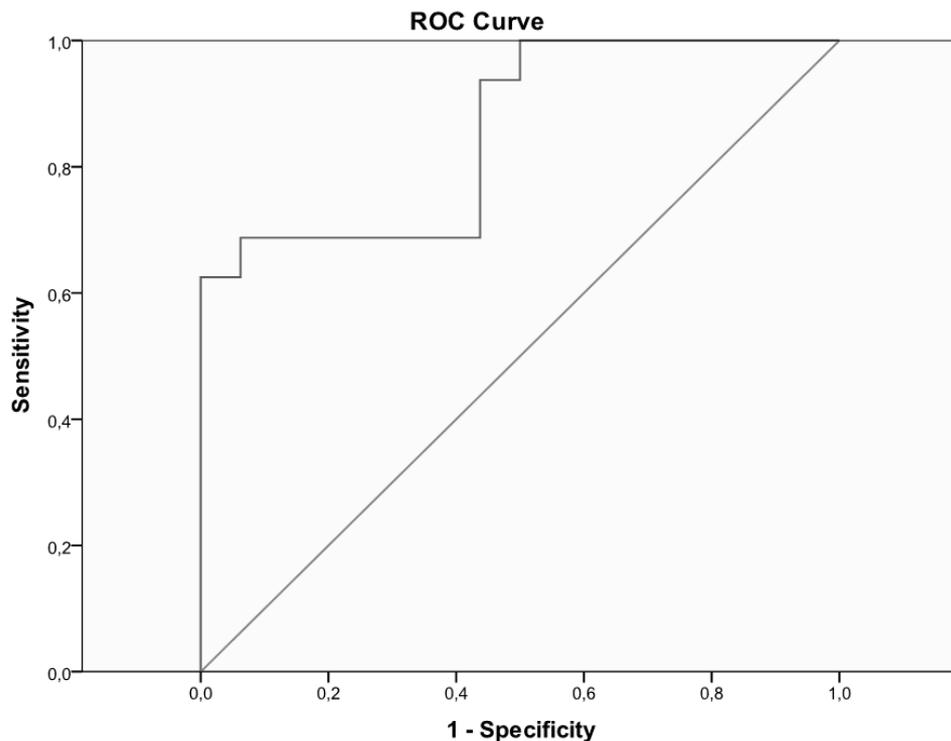


Figura 1. Análise de Curva ROC do marcador CYFRA 21-1. Área debaixo da curva = 85,5% \pm 0,07 (I.C. 72,5% - 98,6%; $p < 0,001$). Sensibilidade = 70%, especificidade = 94% e acurácia = 81%.

4.1.6 Discussão

Os marcadores tumorais bioquímicos são moléculas presentes tanto em indivíduos sadios como doentes, entretanto, naqueles portadores de neoplasmas malignos a concentração é mais elevada. A elevação da concentração desses marcadores está associada a diversas causas, como intensa descamação celular, necrose celular e aumento da secreção de certas proteínas. Dessa forma, os marcadores tumorais bioquímicos são utilizados amplamente para diagnosticar e prognosticar pacientes com câncer (25, 26).

Neste estudo foram investigados, pela primeira vez em cães, os níveis de CEA, CA 72-4 e CYFRA 21-1 em efusões caninas neoplásicas e não neoplásicas. Contudo as concentrações dos marcadores CEA e CA 72-4 não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos não neoplásico e neoplásico. Concordando com Trapé (26), isto pode ser explicado pela presença de outras doenças no grupo não neoplásico, que podem elevar os níveis desses marcadores.

O marcador CYFRA 21-1 apresentou níveis significativamente ($z = -3,43$; $p = 0,001$) mais elevados para o grupo neoplásico em relação ao grupo não neoplásico. O ponto de corte sugerido pela análise de curva ROC apresentou índices satisfatórios de acurácia (81%), sensibilidade (70%) e especificidade (94%) (27). Contudo, o marcador mostrou-se mais preciso no diagnóstico de casos positivos (efusões neoplásicas) do que de casos negativos (efusões não neoplásicas). Este resultado sugere que outros exames complementares devem ser feitos para a exclusão do diagnóstico de neoplasia. Neste estudo existiram cinco casos falsos negativos, que corresponderam aos dois linfomas, dois sarcomas e um carcinoma.

Porcel et al. (28) estudaram os marcadores tumorais CA 15-3, CA 19-9, CEA e CYFRA 21-1 em efusões malignas e benignas em humanos, concluindo que o CYFRA 21-1 não reage com tumores de células não epiteliais. Entretanto, neste estudo, amostras de quatro sarcomas e da histiocitose maligna apresentaram valores elevados deste marcador tumoral, o que pode ser explicado pela extensa lesão e reação inflamatória do tecido mesotelial. Paganuzzi et al. (29) relataram que níveis elevados de CYFRA 21-1 são sugestivos de mesotelioma, corroborando com o presente estudo.

Alguns casos observados com níveis elevados dos marcadores CEA e CA 72-4 no grupo neoplásico, correspondentes ao mesotelioma, a histiocitose maligna e ao fibrossarcoma, indicam que estes marcadores podem ser específicos em relação à

etiologia e a extensão do tumor, embora a diferença para o grupo de efusões não neoplásicas não tenha sido significativa. Da mesma forma, o número de falsos negativos (n = 5) observados em relação aos níveis do marcador CYFRA-21-1, sugerem que este marcador seja mais reativo a tipos característicos de enfermidades, como doenças crônicas cardíacas e hepáticas. Futuras investigações, com amostras mais homogêneas em relação ao tipo de tumor, podem esclarecer estas questões.

Com este estudo, conclui-se que os marcadores CA 72-4 e CEA não diferenciam efusões neoplásicas de não neoplásicas. O marcador CYFRA 21-1 teve bom desempenho, apresentando boa sensibilidade, especificidade e acurácia no diagnóstico de neoplasias em efusões caninas. Este trabalho representou um avanço nas pesquisas utilizando marcadores tumorais bioquímicos em efusões caninas, porém, são necessárias maiores investigações a respeito do uso destes marcadores para a espécie canina, tanto em pacientes portadores de malignidade como naqueles portadores de doença benigna.

4.1.7 Referências

1. O'Brien PJ, Lumsden JH. The cytologic examination of body cavity fluids. *Semin Vet Med Surg* 1988; 3:140–56.
2. Clinkenbeard KD. Diagnostic cytology: carcinomas in pleural effusions. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1992; 14:187–95.
3. Edwards NJ. The diagnostic value of pericardial fluid pH determination. *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32:63–7.
4. Fenton NK, Richardson, JD. Diagnosis and management of malignant pleural effusions. *Am J Surg* 1995; 170: 69-74.
5. Light RW. Pleural effusion related to metastatic malignancies. In: Light RW, editor. *Pleural diseases*. Philadelphia: Lippincott; 2001. p.108-34.
6. Romero S, Fernández C, Arriero JM, Espasa A, Candela A, Martín C, et al. CEA, CA 15-3 and CYFRA 21-1 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusion. *Eur Respir J* 1996; 9:17-23.
7. Ferrer J, Villarino MA, Encabo G, Felip E, Bernejo B, Vilá S, et al. Diagnostic utility of CYFRA 21-1, carcinoembryonic antigen, CA 125, neuron specific enolase, and squamous cell antigen level determinations in the serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Cancer* 1999; 86:1488-95.
8. Gross JL. Marcadores tumorais séricos em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, 1999. 103p.
9. Miédougé M, Rouzard P, Salama G, Pujazon, MC, Vicent C, Mauduyt MA, et al. Evaluation of Sevan tumour markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusions. *Br J Cancer* 1999; 81:1059-65.
10. Ferrer JS. Marcadores tumorales em líquido pleural. *Archivos Bronconeumología* 2000; 36:295-7.

11. Alatas F, Alatas O, Metintas M, Colak O, Harmanci E, Demir S. Diagnostic value of CEA, CA 15-3, CA 19-9, CYFRA 21-1, NSE and TSA assay in pleural effusions. *Lung Cancer* 2001; 31:9-16.
12. Buccheri G, Ferrigno D. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer* 2001; 34:65-9.
13. Villena V, Lopez-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Martín-Escribano P, Ortuño-de Solo B, Estenoz-Alfaro J. Diagnostic value of CA 549 in pleural fluid. Comparison with CEA, CA 15-3 and CA 72-4. *Lung Cancer* 2003; 78:736-40.
14. Trape J, Molina R, Sant F. Clinical evaluation of the simultaneous determination of tumor markers in fluid and serum and ratio in the differential diagnosis of serous effusions. *Tumor Biol* 2004; 25:276-81.
15. Lowseth LA, Gillett NA, Chang IY, Muggenburg BA, Boecker BB. Detection of alpha-fetoproteina in dog with hepatic tumors. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199:735-41.
16. Hahn KA, Richardson RC. Detection of serum Alpha-Fetoprotein in dogs with naturally occurring malignant neoplasia. *Vet Clin Path* 1995; 24:18-24.
17. Lechowski R, Jagielski D, Hoffmann-Jagielska M, Zmudzka M, Winnicka A. Alpha-fetoprotein in canine multicentric lymphoma. *Vet Res Commun* 2002; 26:285-96.
18. Chan DW, Schwartz MK. Tumor markers: Introduction and general principles. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK, editors. *Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. Washington, DC: AACC Press; 2002. 9-17. p.
19. Villena V, Lopez-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Martín-Escribano P, Ortuño-de Solo B, Estenoz-Alfaro J. *Cancer* 1996; 78:736-40.
20. Dejsomritrutai W, Senawong S, Pronkiamon B. Diagnostic utility of CYFRA 21-1 in malignant pleural effusion. *Respirology* 2001; 6:213-16.
21. Kruth AS. Abdominal Distention, Ascitis, And Peritonitis. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2004. p.150-53.
22. Raskin RE, Meyer DJ. *Atlas of Canine and Feline Cytology*. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. 430p.
23. Bibbo M, Longatto Filho A. Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derrames Cavitários – Conduta terapêutica e avaliações diagnósticas e prognósticas. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. 241p.
24. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH. Lesões cutâneas e subcutâneas. In: Cowell RL, editors. *Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos*. São Paulo: Medvet, 2009. p.78-111.
25. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem* 2002; 48:1151-9.
26. Trapé J, Filella X, Alsina-Donadeu M, Juan-Pereira L, Bosch-Ferrer A, Rigo-Binnin R. Increased plasma concentrations of tumor markers in the absence of neoplasia. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:1605-20.
27. Brown CD, Davis HT. Receiver operating characteristics curves and related decision measures: A tutorial. *Chemom Int Lab Systems* 2006; 80:24-38.
28. Porcel JM, Vives M, Esquerda A, Salud A, Pérez B, Rodríguez-Panadero F. Use of a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, câncer antigen 125, carbohydrate antigen 15-3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions. *Chest J* 2004; 126:1757-63.

29. Paganuzzi M, Onetto M, Morroni P, Filiberti R, Tassara E, Parodi S, Felletti R. Diagnostic value of CYFRA 21-1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesothelioma. *Chest* 2001;119:1138-42.

4.2 Artigo 2

4.2.1 Uso do MOC-31 e do D2-40 como novos marcadores imunocitoquímicos em efusões neoplásicas caninas

Luciele V. Texeira^{1,4}, Tatiana A. Guerra¹, Francisco O. Conrado¹, Tatiane W. Terumi²,
Fabiana Boabaid², Daniel G. Gerardi³, and Félix D. González¹

¹ Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil; ²Setor de Patologia Veterinária, UFRGS, Brasil; ³Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais, UFRGS, Brasil.

⁴Autor (a) para correspondência: Luciele V. Teixeira, Av. Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 91540-000. E-mail: luciele.sm@gmail.com.

4.2.2 Summary

Cytopathological analysis of effusions is important for detection of malignancies, however, it has low sensitivity. The use of MOC-31 and D2-40 immunocytochemical markers both cytokeratin AE1/AE3, vimentin, CD3 and CD79_{acy} for differentiating between the types of malignancies is important to obtain more accurate diagnoses. The present study aimed to standardize and include the immunocytochemical markers MOC-31 and D2-40 at least one panel, which allows defining the neoplastic type in canine effusions. Fourteen samples of canine thoracic and abdominal malignant effusions were diagnosed by cytopathology method. Subsequently, the samples were subjected to immunocytochemical technique using primary antibodies MOC-31, D2-40, cytokeratin, vimentin, CD3 and CD79_{acy}, by streptavidin-biotin method. The results were evaluated by two observers. Each marker was considered as positive when more than 5% of stained cells were presented. All immunocytochemistry markers were compatible with cytopathology analysis. The standardization and use of antibodies MOC-31 and D2-40 immunocytochemical markers was valid for the dogs in the differentiation of mesothelioma and carcinoma in those effusions. Immunocytochemical and cytological examination proved to be important aids in differentiating malignant effusions for the canine species.

4.2.3 Introdução

As efusões cavitárias são comuns em cães e estão presentes em vários tipos de doenças, incluindo processos neoplásicos malignos. A análise citopatológica dessas efusões é muito importante para o diagnóstico, principalmente de malignidades, embora apresente sensibilidade e especificidade de 64 e 99% na espécie canina, respectivamente (1-4).

A diferenciação entre carcinomas (CAs) e mesoteliomas (MMs) em amostras citológicas de efusões torna-se difícil, devido à morfologia celular destas neoplasias serem muito semelhantes. Por este fato, a investigação de marcadores imunocitoquímicos faz-se relevante para obtenção de diagnósticos mais precisos (5, 6).

Os marcadores vimentina, citoqueratina AE1/AE3, CD3 e CD79_{acy} são amplamente utilizados para diagnosticar diferentes tipos tumorais. Estes anticorpos conferem coloração positiva em sarcomas, carcinomas, linfoma de células T e linfoma de células B, respectivamente (7).

Existem muitos estudos na medicina humana com a finalidade de investigar marcadores imunocitoquímicos mais eficientes em efusões malignas. Entre estes marcadores, destacam-se o MOC-31 e o D2-40, principalmente, para a diferenciação entre CAs e MMs. O MOC-31 é expresso em tumores epiteliais, enquanto que o D2-40 é expresso em tumores de células germinativas. Contudo, alguns estudos tem sugerido que o segundo marcador também seja expresso em MMs (8-10).

O objetivo do presente estudo foi padronizar e incluir os marcadores imunocitoquímicos MOC-31 e D2-40 em um painel mínimo, que permita definir o tipo neoplásico em efusões caninas.

4.2.4 Materiais e métodos

Procedimento e processamento das amostras

No período de oito meses 59 amostras de efusões abdominais e torácicas caninas provenientes do atendimento clínico do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram analisadas. Das 59 amostras, dezesseis eram neoplásicas e dessas, duas mostraram-se impróprias para as análises. O

presente trabalho foi aceito pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - UFRGS (projeto número 19.641).

Todos os líquidos cavitários foram analisados física, química e citologicamente, de acordo com Raskin e Meyer (11), Bibbo e Longatto Filho (12) e Cowell et al (13). Após a análise, os sedimentos das amostras neoplásicas foram fixados em solução de formalina tamponada 10%, formando um *pellet* celular. Posteriormente, estes foram incluídos em parafina e processados pelas técnicas histológicas de rotina.

Imunocitoquímica

Os cortes citológicos (5 μ m) de cada amostra foram desparafinizados em xilol e re-hidratados com etanol. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado peróxido de hidrogênio 3%. Foram aplicadas as técnicas de imunocitoquímica (ICQ) pelo método de estreptavidina-biotina ligada à peroxidase, utilizando-se os anticorpos primários anti-citoqueratina, anti-vimentina, D2-40 e MOC-31. Para os anticorpos CD3 e CD79_{acy} foi utilizado o método estreptavidina-biotina ligada à fosfatase alcalina. Os fabricantes dos anticorpos primários, as recuperações antigênicas e as diluições empregadas na técnica de ICQ estão descritos na Tabela 1. O protocolo de trabalho foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante e, por vezes, alguns ajustes foram necessários.

Os resultados das análises ICQs foram avaliados por dois observadores (T.W.T. e L.V.T.) através de microscopia óptica. Foram utilizadas as magnitudes de 100x para a localização dos aglomerados celulares, logo passando para 200 e 400x. Em todas as lâminas foram examinados todos os campos onde foram encontradas células imunomarcadas. Cada marcador foi classificado como positivo quando a coloração ICQ foi superior a 5% da celularidade, independente da intensidade de marcação nas células.

Tabela 1. Relação dos anticorpos primários, fabricantes, diluições e recuperações antigênicas utilizados na técnica de ICQ.

Anticorpo primário	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica
CD3	Policlonal	Dako	1:500	Protease XIV (Sigma) 15 min/20°C
CD79 _{acy}	M7051	Dako	1:30	Tampão citrato pH 6,0/ micro-ondas/20 min
Citoqueratina	AE1/AE3	Dako	1:80	Tampão citrato pH 6,0/ 3 min/125°C/ panela de pressão
Vimentina	V9	Zimed	1:200	Tampão citrato pH 6,0/ 3 min/125°C/ panela de pressão
MOC-31	-	Dako	1:50	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ 7 min/125°C/ panela de pressão
D2-40	D2-40	Dako	1:50	Tampão Tris-EDTA pH 9,0/ micro-ondas/20 min.

4.2.5 Resultados

Na análise citopatológica das efusões neoplásicas foram diagnosticados seis sarcomas, quatro carcinomas, uma histiocitose maligna, um mesotelioma e dois linfomas. Os resultados da ICQ estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado da reatividade dos anticorpos relacionado ao tipo neoplásico.

Tipo neoplásico	<i>n</i>	CK	Vim	MOC-31	D2-40	CD3	CD79 _{acy}
Carcinoma	4	+	-	+	-	-	-
Histiocitose maligna	1	-	+	-	-	-	-
Linfoma	2	-	-	-	-	+(1/2)	+(1/2)
Mesotelioma	1	+	-	-	+	-	-
Sarcoma	6	-	+	-	-	-	-

Nota: *n*, número de amostras; CK, citoqueratina; Vim, vimentina. Dados de reatividade (+, positivo; -, negativo) referem-se à totalidade das amostras, exceto quando apontado entre parênteses.

Todos os carcinomas foram positivos para citoqueratina (Figura 1A) e para MOC-31 (Figura 1B). O mesotelioma foi positivo para D2-40 (Figura 2A) e para citoqueratina (Figura 2B). Os sarcomas e a histiocitose maligna foram positivos para vimentina (Figuras 3 e 4). Um dos linfomas era do tipo B (CD79_{acy} positivo, Figura 5A)

e o outro era do tipo T (CD3 positivo, Figura 5B). Os resultados da ICQ foram compatíveis com o diagnóstico citopatológico em todas as efusões neoplásicas.

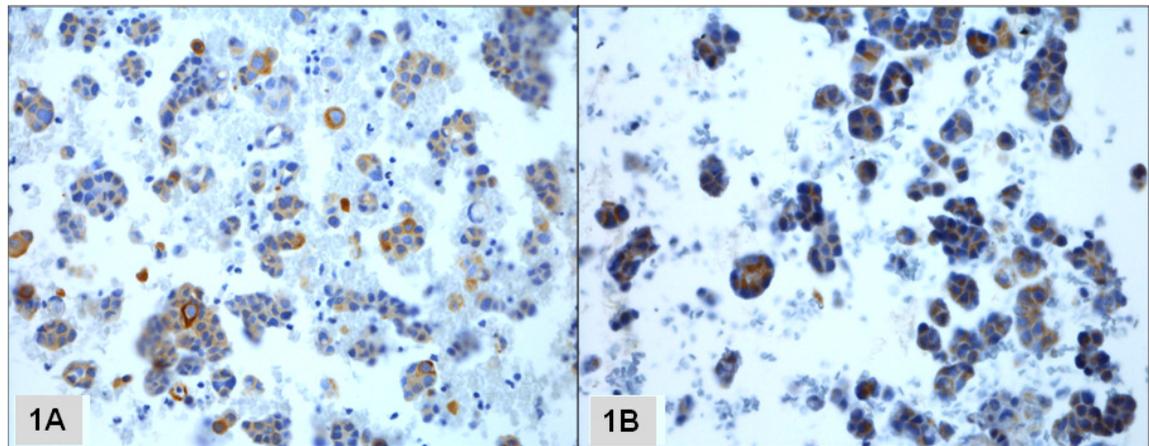


Figura 1. Metástase pulmonar de carcinoma mamário em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para citoqueratina (1A) e para MOC-31 (1B) (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 200x).

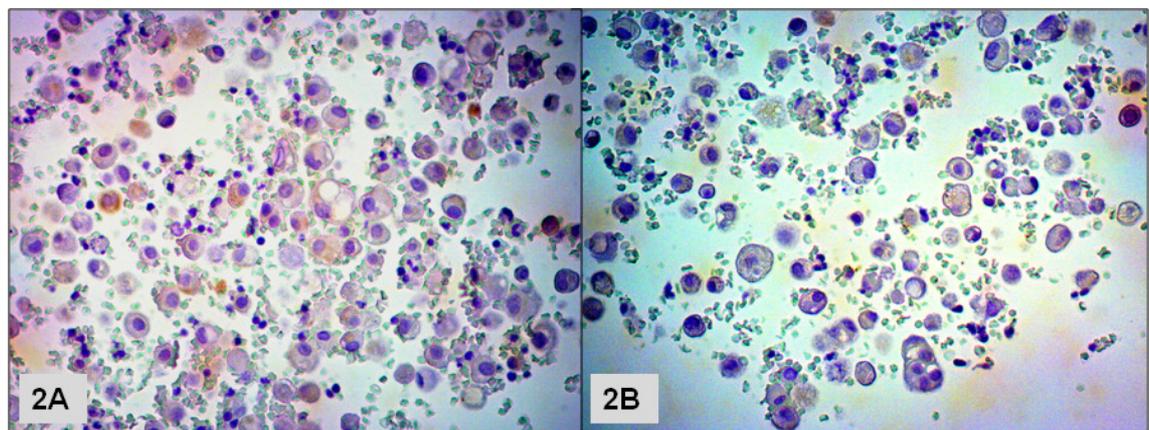


Figura 2. Mesotelioma maligno em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para D2-40 (2A) e para citoqueratina (2B) (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 200x).

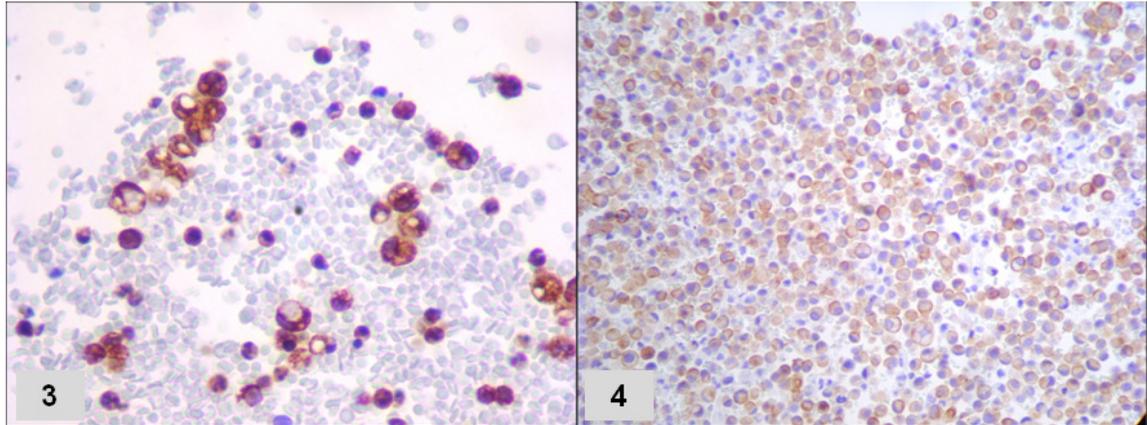


Figura 3. Metástase mediastínica de lipossarcoma. Efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para vimentina (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 400x). **Figura 4.** Histiocitose maligna em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para vimentina (método avidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, 200x).

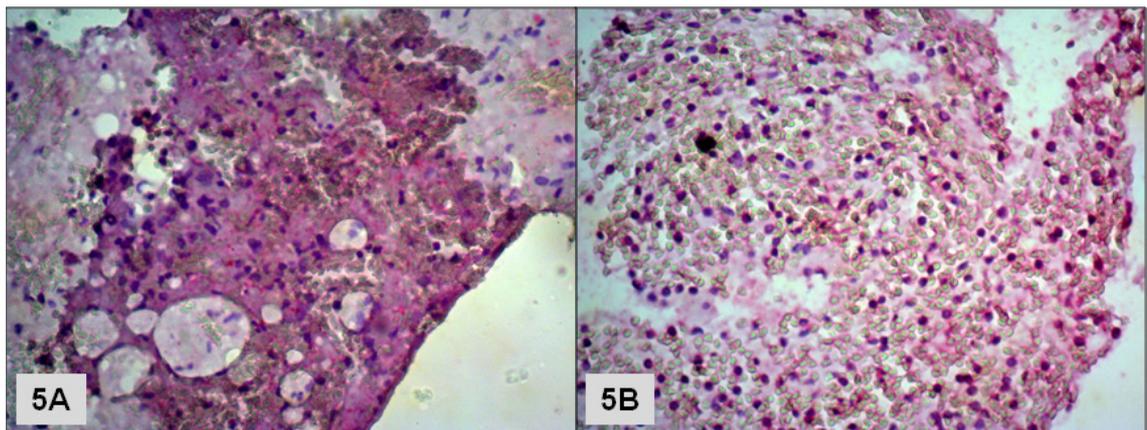


Figura 5. Linfoma tipo B em efusão pleural canina. Coloração citoplasmática positiva para CD79 (5A) (método avidina-biotina-fosfatase alcalina, cromógeno DAB, 200x). Linfoma tipo T em efusão abdominal canina. Coloração citoplasmática positiva para CD3 (5B) (método avidina-biotina-fosfatase alcalina, cromógeno DAB, 200x).

4.1.6 Discussão

Os marcadores imunocitoquímicos têm-se revelado de grande utilidade, juntamente com a citopatologia para o diagnóstico de neoplasias em efusões. O exame citopatológico é um dos principais meios de diagnóstico de efusões malignas, entretanto, em alguns casos, pode haver confusão entre tipos neoplásicos, como carcinomas, mesoteliomas e o próprio epitélio mesotelial reativo (14). No presente

estudo todas as amostras neoplásicas diagnosticadas citopatologicamente foram positivas para pelo menos um marcador imunocitoquímico.

Existem muitos estudos com o uso dos anticorpos MOC-31 e D2-40 na medicina humana (15-18). No presente trabalho, estes marcadores mostraram-se efetivos também para a espécie canina e poderão fazer parte de painéis imunocitoquímicos futuros.

A inclusão de marcadores para citoqueratina nos painéis imunocitoquímicos de efusões é justificada pela ocorrência de efusões carcinomatosas, em decorrência de neoplasmas metastáticos (19). Do mesmo modo, carcinomas de vários sítios primários também reagem com o anticorpo MOC-31, por ser um marcador epitelial (8,20). Neste trabalho foram utilizados os dois anticorpos citados como marcadores de carcinoma (citoqueratina AE1/AE3 e MOC-31) obtendo-se resultados positivos para ambos no exame imunocitoquímico. Os demais marcadores (vimentina, CD3, CD79_{acy} e D2-40) revelaram-se negativos.

O mesotelioma é uma neoplasia rara em cães e geralmente resulta em efusão cavitária (21-23). Na medicina humana, estudos realizados por Chu et al. (16) afirmaram que o marcador D2-40 tem apresentado melhores resultados no diagnóstico de mesotelioma do que aqueles sugeridos por Ordóñez (24) na medicina humana, em que se utilizaram calretinina, citoqueratina 5/6 e WT1. No presente estudo foram utilizados dois marcadores (citoqueratina AE1/AE3 e D2-40) para o diagnóstico imunocitoquímico de mesotelioma. Assim como nos carcinomas, a citoqueratina AE1/AE3 reage com as células de mesotelioma, visto que estas expressam fracamente proteínas epiteliais e mesenquimais (25). Desse modo, os marcadores anteriormente mencionados reagiram positivamente, enquanto que os demais (CD3, CD79_{acy}, MOC-31 e vimentina) apresentaram-se negativos para o neoplasma em questão.

Os sarcomas são raramente diagnosticados nas efusões, pois estes tumores são pouco esfoliativos (13). Entretanto, neste estudo os seis sarcomas foram diagnosticados citopatologicamente nas efusões e se mostraram positivos pelo exame imunocitoquímico, utilizando o marcador vimentina. Os demais anticorpos (CD3, CD79_{acy}, D2-40, MOC-31 e citoqueratina) não se mostraram reativos neste tipo de neoplasia.

Os linfomas são neoplasmas de freqüente ocorrência em cães e também provocam efusões. Na análise citopatológica destas efusões é possível visibilizar uma população pleomórfica de células linfóides maduras (linfócitos pequenos, médios e grandes) e imaturas (linfoblastos) (26). Com isso, a imunofenotipagem dos linfomas

tem valor prognóstico e pode contribuir no estabelecimento do protocolo terapêutico. Muitas vezes torna-se necessária a detecção do tipo e subtipo neoplásico por exame imunocitoquímico utilizando-se os marcadores CD3 para linfomas tipo T e CD79_{acy} para linfomas do tipo B (27-29). Neste estudo foram diagnosticados imunocitoquimicamente um linfoma do tipo B e um linfoma do tipo T, positivos para CD79_{acy} e CD3, respectivamente. Os demais marcadores não se mostraram reativos para este tipo neoplásico.

Os neoplasmas de linhagem histiocítica costumam ser imunorreativos a lisozima e CD18 (30), os quais não foram utilizados no presente estudo. Contudo, a histiocitose maligna é uma neoplasia de origem mesenquimal (31), podendo ser reativa a vimentina, como observado neste estudo. Os demais marcadores (CD3, CD79_{acy}, citoqueratina, MOC-31 e D2-40) não reagiram com o tipo neoplásico em questão.

Com base nos resultados do presente estudo, conclui-se que a padronização e utilização dos anticorpos MOC-31 e D2-40 como marcadores imunocitoquímicos foi válida para a espécie canina na diferenciação de mesotelioma e carcinoma nas efusões. O exame imunocitoquímico e o citopatológico mostraram-se ferramentas auxiliares importantes na diferenciação de efusões malignas para a espécie canina.

4.1.7 Referências

1. Hirschgerger J, DeNicola DB, Hermanns W et al. Sensitivity and specificity of cytologic evaluation in the diagnosis of neoplasia in body fluids from dogs and cats. *Vet Clin Path* 1999; 28: 142-146.
2. Hirschgerger J, Sauer UG. Klinisch-chemische untersuchung von körperhöhlenergüssen. *Tierärzti Prax* 1991; 19: 431-34.
3. Fenton NK, Richardson, JD. Diagnosis and management of malignant pleural effusions. *Am J Surg* 1995; 170: 69-74.
4. Light RW. Pleural effusion related to metastatic malignancies. In: Light RW, ed. *Pleural diseases*, 4th edn. Philadelphia: Lippincott, 2001; 108-34.
5. Koss LG, Melamed MR. Effusions in the presence of cancer. In: Koss LG, Melamed MR, eds. *Koss' Diagnostic cytology and its histopathological bases*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 919-48.
6. Pereira TC, Saad RS, Liu Y et al. The diagnosis of malignancy in effusion cytology: A pattern recognition approach. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 174-84.
7. Barra MB. O uso da imunocitoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Rev AMRIGS* 2006; 50: 173-84.
8. Willuda J, Honegger A, Waibel R et al. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: Engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* 1999; 59: 5758-67.

9. Bhalla R, Siddiqui MT, Mandich D et al. Diagnostic utility of D2-40 and podoplanin in effusion cell blocks. *Diagn Cytopathol* 2007; 35: 342-47.
10. Lyons-Bordeaux V, Mody DR, Zhai J et al. Cytologic malignancy versus benignancy: How useful are the “newer” markers in body fluid cytology? *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 23-28.
11. Raskin RE, Meyer DJ. *Atlas of Canine and Feline Cytology*, 2nd edn. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001.
12. Bibbo M, Longatto Filho A. *Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derrames Cavitários – Conduta terapêutica e avaliações diagnósticas e prognósticas*. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.
13. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH. *Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos*, 2nd edn. São Paulo: Medvet, 2009.
14. Bedrossian CWM. Diagnostic problems in serous effusions. *Diagn Cytopathol* 1998; 19: 131-6.
15. Lozano MD, Panizo A, Toledo GR et al. Immunocytochemistry in the differential diagnosis of serous effusions. *Cancer Cytopathol* 2000; 93: 68-72.
16. Chu AY, Litzky LA, Pacha TL et al. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 2005; 18: 105-10.
17. Kim JH, Kim GE, Choi YD et al. Immunocytochemical panel for distinguishing between adenocarcinomas and reactive mesothelial cells in effusion cell blocks. *Diagn Cytopathol* 2009; 37: 258-61.
18. Su XY, Li GD, Liu WP et al. Cytological differential diagnosis among adenocarcinoma, epithelial mesothelioma, and reactive mesothelial cells in serous effusions by immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol* 2010; 39: 900-8.
19. Gown AM, Bacchi CE. *Diagnostic immunohistochemistry of solid tumors*. United States and Canadian Academy of Pathology 2005. [Cited 15 Jan 2012.] Available from URL: <http://www.uscap.org/newindex.htm?scindex.htm>.
20. Went PT, Lugli A, Meier S et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004; 35: 122-8.
21. Morris J, Dobson J. Treatment options. In: Morris J, Dobson J, eds. *Small Animal Oncology*, London: Blackwell Science, 2001; 31-49.
22. Costa FS, Tostes RA, Andrade SF et al. Mesotelioma peritoneal em um cão: relato de caso. *Ver Clin Vet* 2002; 38: 45-9.
23. Terra RM, Teixeira LR, Beyruiti R et al. Mesotelioma pleural maligno: experiência multidisciplinar em hospital público terciário. *J Bras Pneumol* 2008; 34: 13-20.
24. Ordóñez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1031-51.
25. Mutsaers SE. The mesothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 9-16.
26. Vail DM, Young KM. Hematopoietic tumors. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. *Small Animal Clinical Oncology*, 4th edn. St. Louis: Saunders, 2007; 699-784.
27. Suster S, Moran CA. Immunohistochemistry in tumor diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2000; 17: 169-256.
28. Pileri AS, Grogan TM, Harris NL et al. Tumors of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. *Histopathol* 2002; 41: 1-29.
29. Campo E, Chott A, Kinney MC et al. Update on extranodal lymphomas. Conclusions of the Workshop held by the EAHP and the SH in Thessaloniki, Greece. *Histopathol* 2006; 48: 481-504.

30. Vail DM. Miscellaneous tumors. Histiocytic disorders. In: Withrow SJ, MacEwen EG, ed. *Small Animal Clinical Oncology*. Philadelphia: Saunders, 2001; 667-71.
31. Morris JS, McInnes EF, Bostock ED et al. Immunohistochemical and histopathological features of 14 malignant fibrous histiocytomas from Flat-coated Retrievers. *Vet Pathol* 2002; 39: 74-83.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Este trabalho visou incorporar novas ferramentas para diagnóstico de neoplasias na área veterinária, utilizando marcadores tumorais bioquímicos e imunocitoquímicos em efusões caninas.

A análise de efusões foi eleita para o presente estudo feita pelo fato de que envolvem as cavidades e os órgãos. Assim, o líquido livre permanece próximo aos tumores, podendo assim, conter maior quantidade de células e fragmentos celulares. Contudo, a determinação de dois tipos de marcadores tumorais bioquímicos (CA 72-4 e CEA) não teve resultado significativo para diferenciar efusões neoplásicas de não neoplásicas na espécie canina. Por isso, estudos futuros com estes e outros marcadores bioquímicos devem ser realizados em amostras mais homogêneas de fluidos corporais.

Muitos autores relatam sobre a baixa sensibilidade citopatológica em efusões neoplásicas, o que gera perspectivas para novas pesquisas na área de diagnóstico tumoral. O exame imunocitoquímico de efusões é muito útil para a confirmação da citopatologia, por isso, neste estudo, novos anticorpos primários (MOC-31 e D2-40) foram padronizados para a espécie canina, em busca de painéis mais eficientes. No entanto, estudos futuros devem ser realizados com maior número de amostras neoplásicas caninas, a fim de tornar rotineiro o uso dos marcadores padronizados. Além disso, outras pesquisas utilizando efusões benignas com células mesoteliais reativas devem ser estudadas, pois neste trabalho esta etapa não pôde ser realizada.

Conclui-se que:

- As análises citopatológica, imunocitoquímica e bioquímica de efusões são imprescindíveis para diagnosticar neoplasmas intracavitários, atuando como ferramentas diagnósticas auxiliares.

- O marcador tumoral CYFRA 21-1 mostrou-se eficiente na detecção de neoplasias em efusões caninas e deve ser utilizado rotineiramente na para esta espécie.

- Os marcadores imunocitoquímicos MOC-31 e D2-40 mostraram-se eficientes na diferenciação entre carcinoma e mesotelioma.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.R.C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. São Paulo: Atheneu, 2004. 372p.

ALMEIDA, J.R.C.; PEDROSA, N.L.; LEITE, J.B.; FLEMING, T.R.P.; CARVALHO, V.H.; CARDOSO, A.A.A. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Ver Bras Cancerol**, v.53, p.305-16, 2007.

ALONZO, T.A. Standards for reporting prognostic tumor marker studies. **J Clin Oncol**, v.23, p.9053-54, 2005.

ALVES, V.F.A.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia, 1999, 270p.

AUMANN, M.; WORTH, L.T.; DROBATZ, K.J. Uroperitoneum in cats: 26 cases (1986–1995). **J Am Anim Hosp Assoc**, v.34, p.315-24, 1998.

BAKER, R.; LUMSDEN, J.H. Pleural and peritoneal fluids. In: BAKER, R.; LUMSDEN, J.H, editors. **Color atlas of cytology of the dog and cat**. St. Louis: Mosby, 2000, cap. 9, p.159–76.

BEDROSSIAN, C.W.M. **Malignant Effusions: A Multimodal Approach to Cytologic Diagnosis**. New York: Igaku-Shoin Medical Publishers Inc., 1994. 275p.

BEDROSSIAN, C.W.M. Diagnostic problems in serous effusions. **Diagn Cytopathol**, v.19, p.131-6, 1998.

BHALLA, R.; SIDDIQUI, M.T.; MANDICH, D.; CARTUN, R.W.; FIEL-GAN, M.D.; NASSAR, A.; MANDAVILLI, S.R. Diagnostic utility of D2-40 and podoplanin in effusion cell blocks. **Diagn Cytopathol**, v.35, p.342-47, 2007.

BIBBO, M.; LONGATTO FILHO, A. **Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derrames Cavitários – Conduta terapêutica e avaliações diagnósticas e prognósticas**. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. 241p.

BONFRER, J.M.G.; GAARENSTROOM, K.N.; KENTER, G.G. Prognostic significance of serum fragments of cytokeratin 19 measured by Cyfra 21-1 in cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v.55, p.371-5, 1994.

BOTTE, G.; LAFERRERE, L.; ETCHEPARE, S.; DALURZO, D.; DUHART, J.E.; ADARO, F.V. Diagnostic value of tumor markers in pleural effusions. **Medicina (Buenos Aires)**, v.50, p.213-6, 1990.

BOUNOUS, D.I; BIENZLE, D.; MILLER-LEIBL, D. What is your diagnosis? Pleural effusion in a dog. **Vet Clin Pathol**, v.29, p.55–58, 2000.

BRONSON, R.T. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. **Am J Vet Res**, v.43, p.2057-59, 1982.

BUNCH, S.E. Manifestações clínicas da doença hepatobiliar. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap.35, p.455-65.

CAPELOZZI, V.L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **J Bras Pneumol**, v.27, p.321-8, 2001.

CHAN, D.W.; SCHWARTZ, M.K. Tumor markers: Introduction and general principles. In: DIAMANDIS, E.P.; FRITSCH, H.A.; LILJA, H.; CHAN, D.W.; SCHWARTZ, M.K. **Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications**. Washington, DC: AACC Press; 2002. Cap. 2, p.9-17.

CLINKENBEARD, K.D. Diagnostic cytology: carcinomas in pleural effusions. **Compend Contin Educ Pract Vet**, v.14, p.187-95, 1992.

COLCHER, D.; HAND, P.H.; NUTI, M.; SCHLOM, J.A. A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.78, p.3199- 3208, 1981.

COOPER, D.L. Marcadores tumorais. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Tratado de medicina interna**, 22ª ed., v.2, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1309-12p.

COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3ª ed. São Paulo: Editora Medvet, 2009. 475p.

CURI, S.M.; ROCHER, A.E.; PARONI, M.; SUAREZ, T.; PALAORO, L.A.; ROFRANO, J.A.; PENZUTTI, V. Utilidad de los marcadores tumorales em líquidos de punción pleural. **Acta Bioquím Clín Latinoam**, v.42, p.539-42, 2008.

DUNN, J.K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. 1076p.

DUNNING, D. Pericardial effusion. In: WINGFIELD, W.E. **Veterinary emerging medicine secrets**. Philadelphia: Hanley and Belfus, 1999. Chap.55, p.190-3.

EDWARDS, N.J. The diagnostic value of pericardial fluid pH determination. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.32, p.63-7, 1996.

FERRER, J.; VILLARINO, M.A.; ENCABO, G.; FELIP, E.; BERNEJO, B.; VILÁ, S.; ORRIOLS, R. Diagnostic utility of CYFRA 21-1, carcinoembryonic antigen, CA 125, neuron specific enolase, and squamous cell antigen level determinations in the serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. **Cancer**, v.86, p.1488-95, 1999.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SILVA, M.C.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, F.L.; BARROS, C.S.L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965-2004). **Pesq Vet Bras**, v.28, p.223-30, 2008.

FORRESTER, S.D.; FOSSUM, T.W.; ROGERS, K.S. Diagnosis and treatment of chylothorax associated with lymphoblastic lymphosarcoma in four cats. **J Am Vet Med Assoc**, v.198, p.291–4, 1991.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; WEBER K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.75, p.5034-8, 1978.

GOMES, F.R. Marcadores tumorais (alcances e limites). **Acta Méd Port**, v.10, p.75-80, 1997.

GOSES, B.R.; BERG, J.; CARPENTER, J.L.; ULLMAN, S.L. Chylous ascites in cats: nine cases (1978–1993). **J Am Vet Med Assoc**, v.205, p.1161–4, 1994.

GOWN, A.M.; BACCHI, C.E. Diagnostic immunohistochemistry of solid tumors. **United States and Canadian Academy of Pathology** 2005. Acessado 15 Jan 2012. Disponível em: <http://www.uscap.org/newindex.htm?scindex.htm>.

GUIJA, D.E.; ARESPACOHAGA, A.; SCHWENDENWEIN, I.; WEISSENBOCK, H. Retrospective study of 82 cases canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. **J Comp Pathol**, v.136, p.186-92, 2007.

GUIMARÃES, R.C.; RODRIGUES, V.H.; PÁDUA, C.A.J.; ANDRADE, F.A.F. Uso dos marcadores tumorais na prática clínica. **Prática Hospitalar (Belo Horizonte)**, v.4, p.1-8, 2002.

HAHN, K.A.; RICHARDSON, R.C. Detection of serum Alpha-Fetoprotein in dogs with naturally occurring malignant neoplasia. **Vet Clin Path**, v.24, p.18-24, 1995.

HAMMER, A.S.; COUTO, C.G. Diagnosing and treating canine hemangiosarcoma. **Vet Med**, v.87, p.188–201, 1992.

HAMMOND, T.N.; PESILLO-CROSBY, S.A. Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003–2005). **J Am Vet Med Assoc**, v.232, p.553-8, 2008.

HECHT, J.L.; PINKUS, J.L.; PINKUS, G.S. Monoclonal antibody MOC-31 reactivity as a marker for adenocarcinoma in cytologic preparations. **Cancer**, v.108, p.56–9, 2006.

HIRSCHBERGER, J.; DENICOLA, D.B.; HERMANN, W.; KRAFT, W. Sensitivity and specificity of cytologic evaluation in the diagnosis of neoplasia in body fluids from dogs and cats. **Vet Clin Path**, v.28, p.142–6, 1999.

KERSTETTER, K.K.; KRAHWINKEL, D.J.; MILLIS, D.L.; HAHN, K. Pericardiectomy in dogs: 22 cases (1978–1994). **J Am Vet Med Assoc**, v.211, p.736–40, 1997.

KING, L.G.; GELENS, H.C.J. Ascites. **Comp Contin Educ Pract Vet**, v.14, p.1063–75, 1992.

KOSS, L.G. **Koss's Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 5^a ed. Philadelphia, USA: Lippincott Company, 2006, 1804p.

LEADER, M.; COLLINS, M.; PATEL, J.; HENRY, K. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. **Histopath**, v.11, p.63–72, 1987.

LYONS-BORDEAUX, V.; MODY, D.R.; ZHAI, J.; COFFEY, D. Cytologic malignancy versus benignancy: How useful are the “newer” markers in body fluid cytology? **Arch Pathol Lab Med**, v.132, p.23-28, 2008.

MALATI, T. Tumor markers: an overview. **Indian J Clin Biochem**, v.22, p.17-31, 2007.

MANDELL, D.C.; DROBATZ, K. Feline hemoperitoneum 16 cases (1986–1993). **J Vet Emerg Crit Care**, v.5, p.93-7, 1995.

MATTOS, L.L.; MACHADO, L.N.; SUGIYAMA, M.M.; BOZZETTI, R.M.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arq méd ABC**. v.30, p.19-25, 2005.

MEADOWS, R.L.; MACWILLIAMS, P.S. Chylous effusions revisited. **Vet Clin Pat**, v.23, p.54–62, 1994.

MIÉDOUGÉ, M.; ROUZAUD, P.; SALAMA, G.; PUJAZON, M.C.; VICENT, C.; MAUDUYT, M.A.; REYRE, J.; CARLES, P.; SERRE, G. Evaluation of Sevan tumour markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusions. **Br J Cancer**, v.81, p.1059-65, 1999.

MOHANTY, S.K.; DEY, P. Serous effusions: Diagnosis of malignancy beyond cytomorphology - An analytic review. **Postgrad Med J**, v.79, p.569–74, 2003.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Oncologia de pequenos animais**. São Paulo: Roca.2007, 300p.

MUNDT, L.A.; SHANAHAN, K. **Graff's Textbook of Urinalysis and Body Fluids**, 2^a ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2011, 330p.

MUTSAERS, S.E. The mesothelial cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, p.9-16, 2004.
NAKAMURA, R.K.; ROZANSKI, E.A.; RUSH, J.E. Non-coagulopathic spontaneous hemothorax in dogs. **J Vet Emerg Crit Care**, v.18, p.292-7, 2008.

O'BRIEN, P.J.; LUMSDEN, J.H. The cytologic examination of body cavity fluids. **Semin Vet Med Surg**, v.3, p.140-56, 1988.

OERTEL, J.; HUHN, D. Immunocytochemistry. In: **New Diagnostic Methods in Oncology and Hematology**. Berlin: Springer-Verlag, 1998. Cap.1. p.1-34.

OHUCHI, N.; TAKAHASHI, K.; MATOBA, N. Comparison of serum assays for TAG 72, CA 19-9, and CEA in gastrointestinal carcinoma patients. **Jap J Clin Onc**, v.19, p.242-8, 1989.

ORDÓÑEZ, N. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. **Hum Path**, v.36, p.372–80, 2005.

ORDÓÑEZ, N.G. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. **Am J Surg Pathol**, v.27, p.1031-51, 2003.

PACHECO, F.A.; PASCHOAL, M.E.M.; CARVALHO, M.G.C. Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para uma terapia biológica. **J Bras Pneumol**, v.28, p.143-9, 2002.

PAGANUZZI, M.; ONETTO, M.; MORRONI, P.; FILIBERTI, R.; TASSARA, E.; PARODI, S.; FELLETTI, R. Diagnostic value of CYFRA 21-1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesothelioma. **Chest J**, v.119, p.1138-42, 2001.

PEMBLETON-CORBETT, J.R.; CENTER, S.A.; SCHERMERHORN, T.; YEAGER, A.E.; ERB, H.N. Serum effusion albumin gradient in dogs with transudative abdominal effusion. **J Vet Intern Med**, V.14, P.613-8, 2000.

PEREIRA, T.C.; SAAD, R.S.; LIU, Y.; SILVERMAN, J.F. The diagnosis of malignancy in effusion cytology: A pattern recognition approach. **Adv Anat Pathol**, v.13, p.174-84, 2006.

PETRELLA, T.; MATTOT, C.; CORNIER, F.; BAILLY, F.; MICHIELS, J.F. Diagnosis of two childhood cases of T lymphoblastic lymphoma by immunocytochemical study of pleural fluid. **Acta Cytol**, v.34, p.580–2, 1990.

PUJOL, J.L.; GRENIER, J.; DAURES, J.P.; DAVER, A.; PUJOL, H.; MICHEL, F.B. Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. **Canc Res**, v.53, p.61-6, 1993.

RAKICH, P.M.; LATIMER, K.S. Cytology. In: LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology**. 4th ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. Chap.12, p.304-330.

RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas of Canine and Feline Cytology**. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. 430p.

REIS, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário: papel dos marcadores tumorais. **Rev Bras Ginecol Obst**, v.27, p.222-7, 2005.

RIZZI, T.E.; COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. Effusions: abdominal, thoracic, and pericardial. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 2008, cap. 15, p.235–55.

SCHMEIDT, C.; TOBIAS, K.M.; OTTO, C.M. Evaluation of abdominal fluid: peripheral blood creatinine and potassium ratios for diagnosis of uroperitoneum in dogs. **J Vet Emerg Crit Care**, v.11, p.275-80, 2001.

SELL, S. **Serological Cancer Markers**. Totowa: The Humana Press, 1992. 529p.

SHELLY, S.M. Body cavity fluids. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas of canine and feline cytology**. Philadelphia: WB Saunders, 2001. Cap.6, p.187–205.

SILVEIRA, A.L. **Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento**. Florianópolis: UFSC, 2005. 320p.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Cavitary effusions. In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A., eds. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2nd ed. Ames: Blackwell, 2008, cap. 19, p.831–68.

SUSTER, S.; MORAN, C.A.; WICK, B. Immunohistochemistry in Tumor Diagnosis. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v.17, p.169-256, 2000.

SWANN, H.; HUGHES, D. Diagnosis and management of peritonitis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.30, p.603-15, 2000.

TOMASICH, F.D.S.; AUGUSTO, V.C.; LUZ, M.A.; DIAS, L.A.N.; KATO, M. Marcadores tumorais CEA e CA 72-4 na avaliação do câncer gástrico. **Rev Acta Oncol Bras**, v.21, p.211-5, 2001.

VILLENA, V.; LOPEZ-ENCUENTRA, A.; ECHAVE-SUSTAETA, J.; MARTÍN-ESCRIBANO, P.; ORTUÑO-DE-SOLO, B.; ESTENOZ-ALFARO, J. Diagnostic value of CA 72-4, Carcinoembryonic antigen, CA 15-3, and CA 19-9 assay in pleural fluid. **Cancer**, v.78, p.736-40, 1996.

VILLENA, V.; LOPEZ-ENCUENTRA, A.; ECHAVE-SUSTAETA, J.; MARTÍN-ESCRIBANO, P.; ORTUÑO-DE SOLO, B.; ESTENOZ-ALFARO, J. Diagnostic value of CA 549 in pleural fluid. Comparison with CEA, CA 15-3 and CA 72-4. **Lung Cancer**, v.78, p.736-40, 2003.

VILLENA, V.; LOPEZ-ENCUENTRA, A.; ECHAVE-SUSTAETA, J.; MARTÍN-ESCRIBANO, P.; ORTUÑO-DE-SOLO, B.; ESTENOZ-ALFARO, J. **Cancer**, v.78, p.736-40, 1996.

WADDLE, J.R.; GIGER, U. Lipoprotein electrophoresis differentiation of chylous and nonchylous leural effusions in dogs and cat and its correlation with pleural effusion triglyceride concentration. **Vet Clin Path**, v.19, p.80–5, 1990.

WALKER, A.L.; JANG, S.S; HIRSH, D.C. Bacteria associated with pyothorax of dogs and cats: 98 cases (1989–1998). **J Am Vet Med Assoc**, v.216, p.359–63, 2000.

WHELAN, M.F.; O'TOOLE, T.E.; CARLSON, K.R.; SUTHERLAND SMITH, J; BERG, J. Budd-Chiari-like syndrome in a dog with a chondrosarcoma of the thoracic wall. **J Vet Emerg Crit Care**, v.17, p.175-8, 2007.

WILLARD, M.D. Distúrbios do trato intestinal. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap.33, p.417-48.

WILLUDA, J.; HONEGGER, A.; WAIBEL, R.; SCHUBIGER, P.A.; STAHEL, R.; ZANGEMEISTER-WITTKER, U.; PLÜCKTHUN, A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: Engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. **Cancer Res**, v.59, p.5758-67, 1999.

WILSON, A.P.M.; VAN DALEN, A.; SIBLEY, P.E.C.; KASPER, L.A.; DURHAM, A.P.; SHAMI, A.S. Multicenter tumour marker reference range study. **Antic Res**, v.19, p.2749-52, 1999.

WOOD, C.A.; MOORE, A.S.; GILIATTO, J.M.; ABLIN, L.A.; BERG, R.J.; RAND, W.M. Prognosis for dogs with stage I or stage II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy alone: 32 cases (1991-1993). **J Am Anim Hosp Assoc**, v.34, p.417-421, 1998.

WRIGHT, K.N.; GOMPF, R.E.; DENOVO, R.C. Peritoneal effusion in cats: 65 cases (1981-1997). **J Am Vet Med Assoc**, v.214, p.375-81, 1999.

ZOCCHI, L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. **Eur Respir J**, v. 20, p.1545-58, 2002.