



INÊS DE BRITO NEVES BARROCA

**Linfoma canino: estudo de 307 casos com
imunofenotipagem em lâminas citológicas previamente
coradas**

Orientador(a): Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha

Co-orientador(a): Prof. Joana Fonseca

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2021

INÊS DE BRITO NEVES BARROCA

**Linfoma canino: estudo de 307 casos com
imunofenotipagem em lâminas citológicas
previamente coradas**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, com o Despacho de Nomeação de Júri N° 295/2021, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves

Arguente: Professor Doutor Pedro Faísca

Orientadora(a): Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2021

Ao meu Pai.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Dr^a Nazaré Cunha, por ser a principal impulsionadora do meu conhecimento e do meu percurso académico, por todo o apoio e amizade.

Ao Professor Dr. David Ramilo pela admirável ajuda na análise estatística.

A toda a equipa do Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH), Professora Ana Lúcia, Adriana, João, Vanessa, José e, em especial, à orientadora de estágio, Professora Joana Fonseca. Todo o apoio que me deram e conhecimentos transmitidos foram extraordinários.

À Sara e à Sandra da Unilabs – Laboratório de Anatomia Patológica.

À minha família, Mãe, Manas e Avó, por sempre acreditarem em mim e nas minhas conquistas e por todo o apoio que me deram nos momentos mais difíceis do curso.

Aos amigos que fiz na ULHT, nada disto teria sido possível sem vocês. Obrigada, Cláudia, Pedro, Jéssica, Catarina, Britany, Inês, Sara, Alejandro.

Aos meus colegas de casa, Álvaro e António, que se tornaram a minha segunda família e tornaram a minha estadia em Lisboa a melhor do mundo.

Ao meu companheiro de vida, Nuno, por todo o amor, amizade e apoio.

Resumo

O linfoma é uma das neoplasias caninas mais frequentes, podendo ser facilmente diagnosticado por citologia. A determinação do imunofenótipo é importante para o tratamento e prognóstico, podendo realizar-se através de imunocitoquímica. O uso de lâminas citológicas previamente coradas é ainda pouco instituído mas amplamente desejável, pois permite uma prévia validação da qualidade da amostra.

Este trabalho teve como objetivos: determinar o imunofenótipo de 307 casos de linfoma canino através de imunocitoquímica em lâminas citológicas previamente coradas, realizar uma análise descritiva da amostra e determinar a relação entre o imunofenótipo e as variáveis raça, porte, idade e sexo.

Recolheram-se dados referentes aos casos submetidos ao laboratório CEDIVET no período de Abril/2020 a Março/2021 para imunofenotipagem de linfoma em lâminas citológicas previamente coradas (n=384). Foram incluídos no estudo amostras de linfonodos, baço, fígado e massas extra-cavitárias com diagnóstico citológico de linfoma. Foram excluídos os casos referentes à espécie felina ou cuja amostra fosse esfregaço sanguíneo (n=77). Realizou-se análise estatística descritiva e estatística inferencial.

O imunofenótipo foi determinado em 92,8% dos casos, com 84,2% linfomas B e 15,8% linfomas T. Observou-se um predomínio de cães sem raça definida/cruzados, maioritariamente machos, de porte grande e com uma média de idade de 8,6 anos. Verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre o imunofenótipo T e a raça Boxer.

A imunocitoquímica possibilitou a imunofenotipagem da maioria dos casos. Verificou-se a existência de relação entre o imunofenótipo e raça. Foi, ainda, o primeiro estudo em Portugal a referir a utilização de lâminas citológicas previamente coradas para análise imunocitoquímica, tendo uma casuística notoriamente superior aos poucos previamente reportados na literatura mundial.

Palavras-chave: linfoma canino; citologia; imunocitoquímica.

Abstract

Lymphoma is one of the most frequent canine neoplasms and can be easily diagnosed by cytology. Classifying the immunophenotype is important for treatment and prognosis, and it can be done through immunocytochemistry. The use of previously stained cytological slides is poorly established but highly desirable, as it allows a previous validation of the quality of the sample.

This study aimed to classify 307 cases of canine lymphoma through immunocytochemistry on previously stained cytological slides, perform a descriptive analysis of the sample and evaluate the relationship between the immunophenotype and variables such as breed, size, age, and sex.

Data referring to cases submitted to the CEDIVET laboratory between April/2020 and March/2021 for lymphoma immunophenotyping on previously stained cytological slides were collected (n=384). Samples from lymph nodes, spleen, liver and extra-cavitary masses with cytological diagnosis of lymphoma were included in the study. Cases referring to the feline species or whose sample was a blood smear (n=77) were excluded. Descriptive and inferential statistical analysis were performed.

Immunophenotype's classification was achieved in 92.8% of the cases, with 84.2% B-cell lymphomas and 15.8% T-cell lymphomas. Most of the dogs were mixed and large breeds, males and with an average age of 8,6 years. There was a statistically significant relationship between the T-cell immunophenotype and the Boxer breed.

Immunophenotyping through immunocytochemistry was possible in most of the cases. There was a relationship between immunophenotype and race. It was the first study in Portugal reporting the use of previously stained slides for immunocytochemical analysis, with a remarkable higher number of cases comparing to the few first reported in the world literature.

Keywords: canine lymphoma; cytology; immunocytochemistry.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%: Percentagem

®: Marca registada

Ac: Anticorpo

ACVP: *American College of Veterinary Pathologists*

ADH: Hormona anti-diurética

Ag: Antigénio

ALP: Fosfatase alcalina

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

CD: *Cluster of differentiation*

CF: Citometria de fluxo

CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina, vinscritina e prednisona

CK: Creatinina quinase

DLBCL: *Diffuse Large B-cell lymphoma*

DOX: Doxorubicina

ECVCP: *European College of Veterinary Clinical Pathology*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FA: Frequência absoluta

FeLV: Vírus da leucemia felina

FIV: Vírus da imunodeficiência felina

FR: Frequência relativa

GGT: Gama GT

ICC: Imunocitoquímica

Ig: Imunoglobulina

IHC: Imunohistoquímica

IPI: *International Prognostic Index*

LACH: Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia

LC: Linfoma canino

LCB: Linfoma de células B

LCT: Linfoma de células T

LDH: Lactato desidrogenase

LTc: Linfócitos T citotóxicos

LTh: Linfócitos T *helper*
LTr: Linfócitos T reguladores
LZM: Linfoma de zona marginal
MALT: *Mucosa-associated lymphoid tissue*
MDR1: *Multidrug resistance mutation 1*
MGG: May-Grünwald-Giemsa
MHC: *Major histocompatibility complex*
MRI: *Magnetic Resonance Imaging*
NK: *Natural Killer*
PAAF: Punção aspirativa por agulha fina
PAF: Punção por agulha fina
PARR: *PCR for Antigen Receptor Rearrangements*
PCR: *Polymerase chain reaction*
PD: Polidipsia
PET: *Positron emission tomography*
PIF: Peritonite infecciosa felina
PTCL-NOS: *Peripheral T-cell lymphomas not otherwise specified*
PTHrp: *Parathyroid hormone-related protein*
PU: Poliúria
RA: Recuperação antigénica
RC: Remissão completa
REAL: *Revised Classification of Lymphoid Neoplasms*
SMF: Sistema mononuclear fagocitário
SNC: Sistema nervosa central
SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*
SRD: Sem raça definida
T-LBL: *T-lymphoblastic lymphoma*
TAC: Tomografia computadorizada
™: Marca não registada
TZL: *T-zone lymphoma*
ULHT: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
UPC: rácio proteína/creatinina urinário
WHO: *World Health Organization*

$\gamma\delta$: Gamma delta

Índice

I. Descrição da Casuística do Estágio Curricular	12
1. Enquadramento.....	12
1.1. Casuística	13
1.1.1. Hematologia e Hemostase	13
1.1.2. Análises Bioquímicas	14
1.1.3. Urinálise.....	15
1.1.4. Citologia e Imunocitoquímica	16
1.1.5. Parasitologia	16
1.1.6. Serologia	17
1.1.7. Microbiologia	18
II. Revisão Bibliográfica.....	19
1. Anatomia e Fisiologia do Sistema Imunitário	19
1.1. Sistema Imunitário.....	19
1.2. Tipos de resposta imunitária.....	19
1.2.1. Células do sistema imunitário.....	20
1.2. Sistema Linfático	21
1.2.1. Linfonodos, Baço e Timo	21
2. Linfoma canino.....	24
2.1. Classificação	24
2.2. Etiologia e Fatores de risco.....	26
2.3. Apresentação clínica.....	28
2.4. Diagnóstico	30
2.4.1. Hematologia, Bioquímicas, Urinálise	31
2.4.2. Imagiologia	31
2.4.3. Citologia e Histologia	32
2.4.4. Imunofenotipagem.....	34
2.4.4.1. Imunocitoquímica	34
2.4.4.1.1. Definição.....	34
2.4.4.1.2. Anticorpo e Antigénio.....	35
2.4.4.1.3. Metodologia geral e Interpretação	36
2.4.4.1.3.1. Fase pré-analítica	36
2.4.4.1.3.2. Fase analítica.....	36
2.4.4.1.3.3. Fase pós-analítica	38
2.4.4.1.4. Vantagens, desvantagens e desafios.....	39
2.4.4.1.5. Outras aplicações além do Linfoma.....	40
2.4.5. Outras técnicas de diagnóstico.....	40

2.5. Estadiamento	40
2.6. Tratamento.....	42
2.7. Prognóstico	44
III. Material e Métodos	45
1. Recolha de dados.....	45
1.1. Critérios de inclusão e exclusão	45
2. Metodologia utilizada	45
2.1. Protocolo de Imunocitoquímica	45
2.2. Interpretação da Imunocitoquímica	46
2.3. Análise estatística	47
IV. Resultados	47
1. Determinação do imunofenótipo do LC.....	47
2. Caracterização da amostra de cães com linfoma	50
3. Relação entre variáveis (raça, porte, sexo e idade) com imunofenótipo	52
3.1. Raça e imunofenótipo.....	52
3.2. Porte e imunofenótipo.....	53
3.3. Sexo e imunofenótipo	53
3.4. Idade e imunofenótipo	54
V. Discussão.....	55
VI. Conclusão.....	61
VII. Referências Bibliográficas	62
VIII. Apêndices	I
Apêndice A - Informação complementar da amostra	I

Índice de tabelas

Tabela 1 - Frequência relativa de análises de hematologia e hemostase.....	13
Tabela 2 - Frequência relativas de análises bioquímicas.....	14
Tabela 3 - Análises serológicas realizadas - agentes detetados e frequência relativa.	17
Tabela 4 - Resumo da classificação de linfoma canino segundo o sistema de classificação WHO.	26
Tabela 5 - Diagnósticos diferenciais de Linfoma tendo em conta as diferentes formas.	30
Tabela 6 - Estadiamento clínico de linfoma em animais domésticos.....	41
Tabela 7 - Distribuição dos casos inconclusivos segundo a IR e variação da qualidade das amostras.....	49
Tabela 8 - Caracterização da amostra.....	51
Tabela 9 - Raças e imunofenótipo.	53
Tabela 10 - Idade e imunofenótipo.....	54

Índice de figuras

Figura 1 – Gráfico com frequência relativa das análises mais frequentes.	13
Figura 2 – Gráfico com frequência relativa das espécies animais sujeitas a análise laboratorial.	13
Figura 3 – Gráfico com frequência relativa de análises realizadas à urina.	15
Figura 4 – Gráfico com frequência relativa de análises de citologia de imunocitoquímica.	16
Figura 5 – Gráfico com frequência relativa de análises de parasitologia.	17
Figura 6 – Gráfico com frequência relativa das análises microbiológicas.	18
Figura 7 – Linfonodo reativo num cão.	23
Figura 8 – Linfonodo poplíteo de um cão com linfoma de alto grau.	33
Figura 9 - Linfonodo de um cão com linfoma de pequenas células.	33
Figura 10 - Estrutura do Anticorpo	36
Figura 11 - Sistema de deteção da ligação anticorpo e antigénio.	37
Figura 12 -Linfonodo de um cão com linfoma de células B.	39
Figura 13 – Linfonodo de um cão com linfoma de células T.	48
Figura 14 – Linfonodo de um cão com linfoma de células B.	48
Figura 15 - Exemplo de citologia com escassa celularidade enviada para o laboratório CEDIVET para realização de imunofenotipagem de linfoma.	50
Figura 16 - Gráfico com a distribuição da frequência relativa da idade (em anos) na população estudada.	52

I. Descrição da Casuística do Estágio Curricular

1. Enquadramento

O estágio curricular realizou-se presencialmente no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH), do Hospital Veterinário da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT), sob a orientação da Dr.^a Joana Fonseca, bem como por videoconferência, na plataforma ZOOM, sob a orientação da Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha, no período de 9 de Novembro de 2020 a 31 de Março de 2021.

Este estágio abrangeu a área de patologia clínica veterinária, englobando as áreas de hematologia e hemostase, análises bioquímicas, urianálise, citologia, imunocitoquímica para imunofenotipagem de linfomas, parasitologia, serologia e microbiologia.

Foram processadas um total de 7285 análises laboratoriais, 6742 das quais referentes a patologia clínica e 96 a anatomia patológica. As restantes 447 análises foram realizadas em laboratórios externos.

As funções exercidas incluíram processamento de amostras para sua análise interna e externa, bem como interpretação dos resultados e realização de relatórios, sempre com supervisão superior.

O hemograma (BC-5300Vet, Mindray Bio-Medical Electronics, Shenzhen, China) foi a análise mais frequente, seguindo-se as análises bioquímicas (SpotchemTM EZ SP-4430, Arkray Factory, Shiga, Japão) - concentração de albumina sérica e o grupo de análises que englobam o “Painel V” que inclui a fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), ureia, creatinina, proteínas totais e glucose (Figura 1). Ainda em relação à espécie, na Figura 2 encontra-se descrita a frequência relativa das espécies correspondentes às amostras processadas.

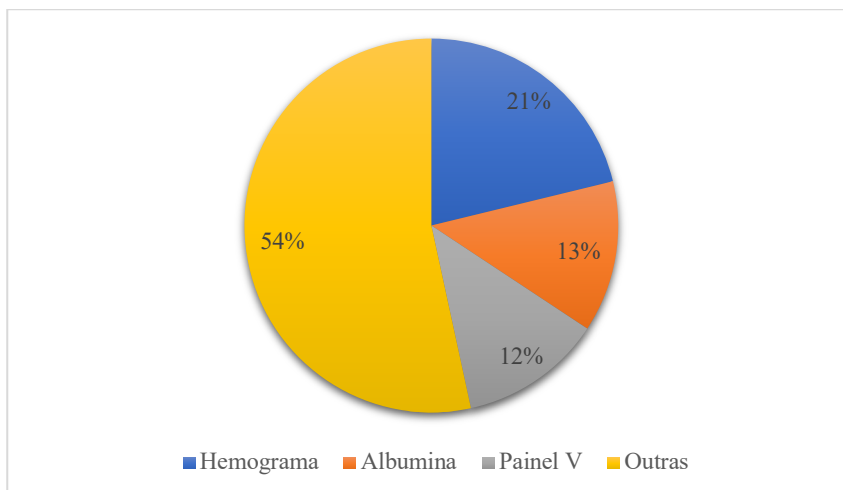


Figura 1 – Gráfico com frequência relativa das análises mais frequentes.

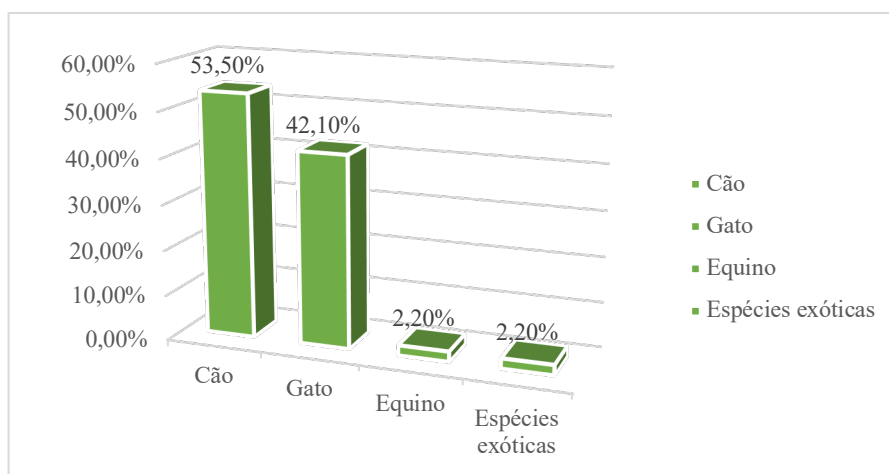


Figura 2 – Gráfico com frequência relativa das espécies animais sujeitas a análise laboratorial.

1.1. Casuística

1.1.1. Hematologia e Hemostase

Na área de hematologia a análise correspondente quase à totalidade dos casos foi o hemograma, estando as restantes listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Frequência relativa de análises de hematologia e hemostase.

Análise Hematológica	Frequência relativa
Hemograma	92,5%
Microhematócrito	2,5%

Provas de coagulação	2%
Contagem de reticulócitos	1,4%
Tipificação sanguínea	1,3%
Teste de <i>cross-matching</i>	0,3%
Total Geral	100%

1.1.2. Análises Bioquímicas

Foi realizada uma vasta quantidade de análises relativas a parâmetros bioquímicos (Tabela 2), sendo as três análises mais solicitadas, por ordem decrescente, a albumina, o “Painel V” e o ionograma (VetStat™, IDEXX Laboratories, Buckinghamshire, Reino Unido). Este último engloba a medição dos eletrólitos (sódio, potássio e cloro) e gasimetria (pressão parcial de dióxido de carbono, bicarbonato, diferencial aniônico e pH).

Tabela 2 - Frequência relativas de análises bioquímicas.

Análise Bioquímica	Frequência relativa
Albumina	22,3%
“Painel V” – ALP, ALT, ureia, creatinina, proteínas totais e glucose	21,0%
Ionograma	13,2%
Creatinina	8,2%
Ureia	6,4%
Fósforo	4,8%
Bilirrubina Total	3,6%
Glucose	3,4%
Colesterol	2,4%
Proteínas Totais	2,3%
Cálcio total	2,2%
Triglicéridos	1,9%
Gama GT (GGT)	1,8%
Alanina aminotransferase (ALT)	1,3%
Creatinina quinase (CK)	1,2%

Fosfatase alcalina (ALP)	1,0%
Aspartato aminotransferase (AST)	1,0%
Lactato	0,5%
T4 Total	0,5%
Lactato desidrogenase (LDH)	0,3%
Ácidos biliares	0,2%
Osmolaridade	0,1%
Corpos cetónicos	0,1%
Total Geral	100%

1.1.3. Urianálise

A análise de urina envolve a avaliação macroscópica - cor, cheiro, turbidez; avaliação dos seus componentes através da tira urinária; avaliação da densidade urinária através do refratómetro e avaliação do sedimento urinário. O conjunto destes vários parâmetros engloba a denominação de “urianálise tipo II”, que corresponde a 94,1% das análises solicitadas nesta área. As restantes análises dizem respeito aos parâmetros supracitados a nível individual, bem como o rácio proteína/creatinina urinário (UPC) (Figura 3).

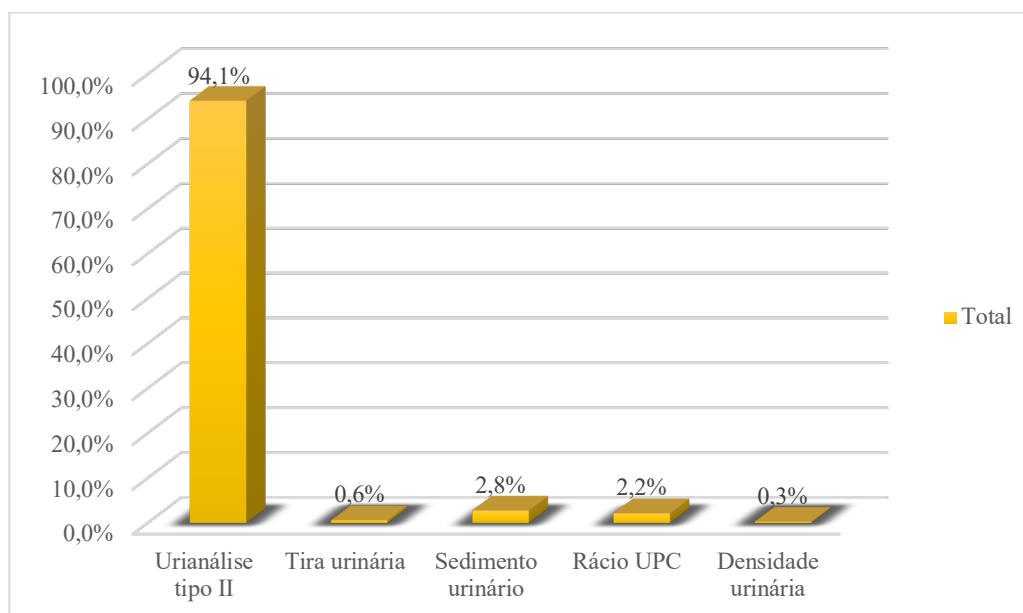


Figura 3 – Gráfico com frequência relativa de análises realizadas à urina.

1.1.4. Citologia e Imunocitoquímica

A área da citologia teve uma componente presencial no LACH e por videoconferência, tal como já referido. As análises citológicas englobaram citologias auriculares, cutâneas, vaginais, de sedimento urinário, de efusões cavitárias, massas/nódulos em localizações variadas, de medula óssea e de outros órgãos como fígado, baço, intestino, rim, linfonodos, entre outras localizações. A análise imunocitoquímica (ICC) teve como função a imunofenotipagem de linfomas e foi acompanhada por videoconferência. Na Figura 4 encontra-se representada a frequência relativa destas análises.

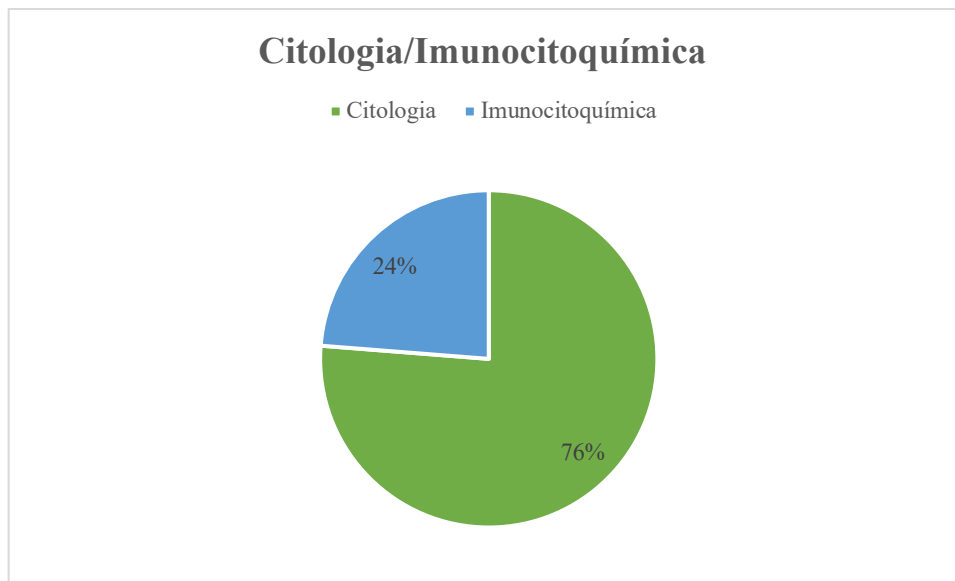


Figura 4 – Gráfico com frequência relativa de análises de citologia de imunocitoquímica.

1.1.5. Parasitologia

As análises de parasitologia incluíram as áreas de coprologia, com a pesquisa de parasitas pulmonares através do método de Baermann e de parasitas gastrointestinais através do método de Willis. Foi também realizada o teste de Knott para deteção de microfilárias (Figura 5).

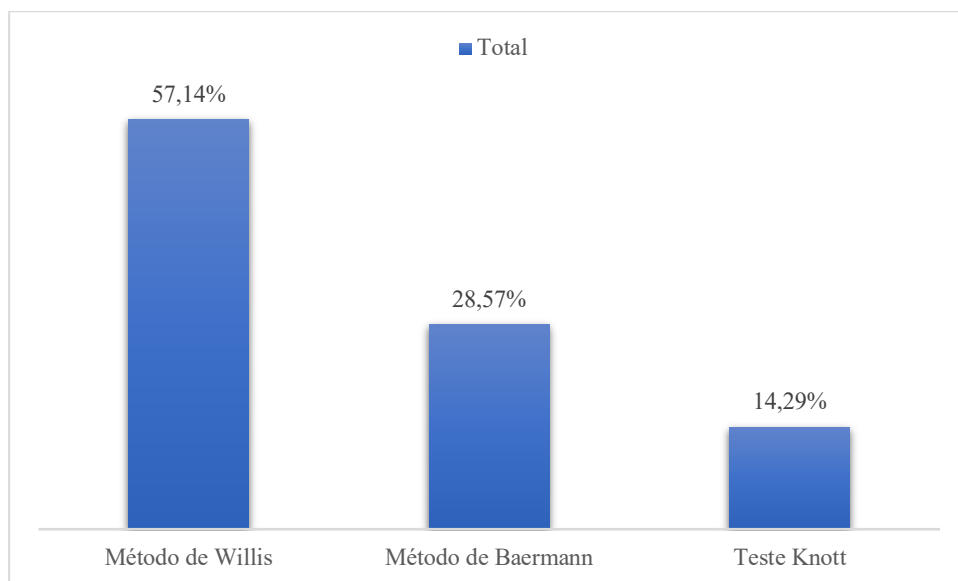


Figura 5 – Gráfico com frequência relativa de análises de parasitologia.

1.1.6. Serologia

Os testes serológicos realizados são testes rápidos de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) que permitem a deteção de anticorpos (Acs) contra variados agentes ou para a deteção de enzimas de interesse. Os vários testes SNAP realizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Análises serológicas realizadas - agentes detetados e frequência relativa.

Análise	Agente/Enzima detetada	Frequência relativa
SNAP FIV/FeLV	Vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou da leucemia felina (FeLV)	39,6%
SNAP cPLI/fPLI	Lipase pancreática canina ou felina	24,7%
Snap <i>Leishmania</i> spp.	<i>Leishmania infantum</i> ou <i>L. donovani</i>	18,7%
SNAP 4DX	<i>Dirofilaria immitis</i> ; <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ; <i>Anaplasma platys</i> ; <i>Borrelia burgdorferi</i> ; <i>Ehrlichia canis</i> ; <i>Ehrlichia ewingii</i>	14,3%
SNAP <i>Leptospira</i> spp.	<i>Leptospira</i> spp.	2,7%
Total Geral	-	100,0%

1.1.7. Microbiologia

As análises microbiológicas realizadas englobaram culturas bacterianas e culturas fúngicas (Figura 6). Dentro das culturas bacterianas, a urocultura foi a análise mais realizada, contando com 67,2% dos casos.

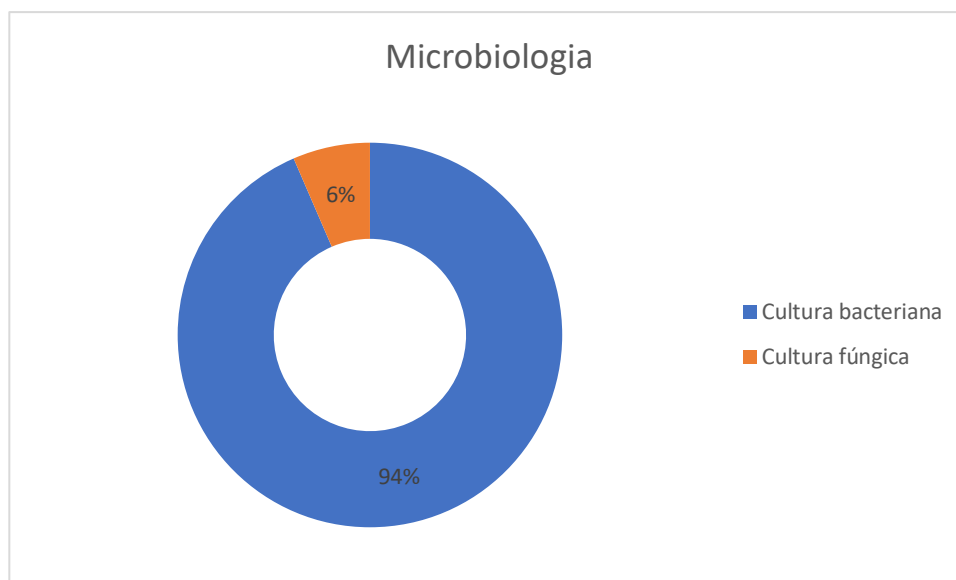


Figura 6 – Gráfico com frequência relativa das análises microbiológicas.

II. Revisão Bibliográfica

1. Anatomia e Fisiologia do Sistema Imunitário

1.1. Sistema Imunitário

O sistema imunitário engloba um conjunto de células isoladas e tecidos linfáticos, tendo como função a defesa do organismo, através da resposta imunitária, contra moléculas consideradas estranhas, tais como as presentes em agentes infecciosos ou nas toxinas por eles produzidas. Para além disso, apresenta um papel importante na resposta contra células neoplásicas e na reparação tecidual (Abbas et al., 2016; Nicholson, 2016). A sua função fisiológica mais importante é prevenção e erradicação da infeção. Contudo, poderão surgir efeitos indesejáveis, como reações inflamatórias exuberantes com elevada morbilidade, como nos casos de patologias autoimunes, em que a resposta imunitária se dá contra moléculas do próprio organismo (Abbas et al., 2016; Gama, 2017; Nicholson, 2016).

1.2. Tipos de resposta imunitária

A defesa do organismo agrupa-se em duas categorias: a imunidade inata, que providencia uma resposta imediata contra a presença de um antígeno, e a imunidade adquirida que, apesar de mais morosa a instalar-se, apresenta mais complexidade e eficácia (Abbas et al., 2016; Gama, 2017).

A imunidade inata ou inespecífica, evolucionariamente mais antiga, é considerada a primeira linha de defesa do organismo, estando presente nas barreiras epiteliais da pele e mucosas dos tratos gastrointestinal e respiratório. Os agentes externos que entrem no organismo são atacados por neutrófilos e monócitos/macrófagos, linfócitos *Natural Killer* (NK) e proteínas plasmáticas, inclusive proteínas do sistema complemento (Abbas et al., 2016; Gama, 2017; Medzhitov, 2007).

A imunidade adquirida ou específica tem por base a ação linfocitária e os seus produtos, tais como os anticorpos, sendo mais especificamente especializada na defesa contra agentes potencialmente patogénicos que possam revelar resistência à imunidade inata (Abbas et al., 2014). Têm um papel importante os linfócitos que, através de recetores específicos, possuem uma maior capacidade de reconhecer uma grande variedade antigénica. A imunidade específica subdivide-se ainda em imunidade humoral, mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B ou plasmócitos, e pela imunidade celular, que se traduz na atividade dos linfócitos T e das citocinas por si produzidas, com a cooperação das células apresentadoras de antígeno

(APCs, do inglês “*Antigen-presenting cells*”). Uma característica importante da imunidade adquirida é a capacidade de memória, na medida em que a capacidade de resposta a um antígeno anteriormente encontrado, é mais rápida e eficiente, ao passo que na imunidade inata a resposta ao mesmo antígeno processa-se sempre da mesma forma (Abbas et al., 2016; Gama, 2017; Nicholson, 2016).

1.2.1. Células do sistema imunitário

Os linfócitos são as células centrais da resposta imunitária. Estes, de uma forma simplista, dividem-se em linfócitos B, T e NK (Gama, 2017). Contudo, outras células constituintes do sistema imunitário são os leucócitos granulócitos, as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) e as APCs. Estas células encontram-se tanto em estruturas anatómicas individualizadas, os órgãos ou tecidos linfáticos, como sob a forma de células livres e migratórias que circulam através do sangue e da linfa (Abbas et al., 2014; Gama, 2017).

Os linfócitos circulam pelo organismo e reconhecem antígenos externos, dando início à resposta imunitária adquirida (Gama, 2017). Estas são as únicas células que produzem recetores distribuídos de forma clonal específicos para diversos antígenos. Ainda que semelhantes morfológicamente, apresentam heterogeneidade na sua linhagem, função e fenótipo, apresentando capacidades biológicas complexas. De uma forma geral, existem linfócitos B que têm como função a produção de anticorpos que reconhecerão diretamente os antígenos (resposta imunitária humoral). Por outro lado, os linfócitos T reconhecem fragmentos peptídicos de proteínas de antígeno que estão ligadas a moléculas denominadas de *major histocompatibility complex* (MHC). Estas, por sua vez, localizam-se na superfície de APCs. Dentro dos linfócitos T existem ainda os linfócitos T *helper* (LTh) que auxiliam os linfócitos B e T na sua ativação, proliferação e diferenciação e os neutrófilos e monócitos/macrófagos na destruição de microorganismos ingeridos; os linfócitos T citotóxicos (LTc) que eliminam células que contêm microorganismos intracelulares e os linfócitos T reguladores (LTr) que previnem ou limitam a resposta imunitária (Abbas et al., 2016; Gama, 2017; Nicholson, 2016). Os linfócitos NK não apresentam recetores de células B ou T, contrariamente aos linfócitos anteriormente descritos. Estas células expressam simultaneamente recetores de ativação e inibição que reconhecem as células-alvo através do equilíbrio de sinais de ativação ou inibição transmitidos (Medzhitov, 2007; Rezvani et al., 2017; Valipour et al., 2019). O seu nome advém da sua capacidade de reagir contra microorganismos, células neoplásicas ou células infetadas sem a necessidade de um estímulo antigénico prévio.

Estão maioritariamente envolvidos na resposta imunitária inata (Abbas et al., 2014; Gama, 2017).

As APCs encontram-se em locais estratégicos de entrada de microorganismos, mais concretamente no epitélio da pele e mucosa dos tratos gastrointestinal e respiratório, locais onde capturam os antígenos, transportando-os para o tecido linfático e, tal como o nome indica, apresentando-os aos linfócitos. São várias as células que poderão ter a ação de apresentação antígenica: macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans da epiderme e linfócitos B (Abbas et al., 2016; Gama, 2017).

1.2. Sistema Linfático

O sistema linfático é responsável pela drenagem tecidual e defesa do organismo, funcionando como um sistema de “filtragem” (Konig & Liebich, 2011). Divide-se em componente celular, composta por órgãos linfáticos estruturados encapsulados (timo, baço e linfonodos), folículos linfáticos isolados, agregados de tecido linfático (tonsilas) ou tecido linfático difuso não encapsulado associado à mucosa e submucosa do sistema digestivo, respiratório e urinário, denominado de tecido linfoide associado à mucosa (MALT, do inglês “*Mucosa-associated lymphoid tissue*”) e em componente vascular, incluindo os vasos e ductos linfáticos (Bezuidenhout, 2013; Abbas et al., 2016; Gama, 2017).

Os órgãos linfáticos podem ainda dividir-se em órgãos linfáticos primários ou secundários. Apesar da origem comum dos linfócitos - a medula óssea - apenas os linfócitos B completam a sua diferenciação na própria medula. Os linfócitos T, como o nome poderá indicar, completam a sua diferenciação no timo. Por este motivo, a medula óssea e o timo são considerados órgãos linfáticos primários. Após a sua diferenciação, os linfócitos B e T circulam até aos órgãos linfáticos secundários (baço, linfonodos, tonsilas e MALT), onde se estabelecem, completam a sua maturação, proliferam e atuam na resposta imunitária (Gama, 2017).

1.2.1. Linfonodos, Baço e Timo

Os linfonodos são agregados de nódulos linfáticos encapsulados, distribuídos ao longo do trajeto dos vasos linfáticos, pelo organismo. São órgãos providos de uma cápsula de tecido conjuntivo denso e dividem-se, internamente, em região cortical e medular. O córtex é constituído por folículos linfóides com centros germinativos onde existe proliferação contínua de linfócitos e a medula consiste em cordões de linfócitos em anastomose (Konig & Liebich, 2011; Bezuidenhout, 2013; Abbas et al., 2014; Gama, 2017). Estes linfócitos, B e T, dão início à resposta imunológica aquando do reconhecimento de antígenos apresentados pelas APCs.

Para além destas células, estão também presentes células do SMF, células dentríticas e plasmócitos (Abbas et al., 2016; Gama, 2017). A imagem citológica de um linfonodo normal traduz-se em diferentes proporções de vários tipos de células, sendo que 75-85% do total de células nucleadas se reflete em pequenos linfócitos bem diferenciados, com núcleo redondo de tamanho 1 a 1,5 vezes superior a um eritrócito e com um tamanho total celular inferior ao tamanho de um neutrófilo, cromatina densa, rácio núcleo-citoplasma (N:C) elevado e com escassa quantidade de citoplasma basófilo em forma de “rim”. Menos de 10 a 15% da população linfonodal é constituída por linfócitos de dimensão intermédia a grande (linfoblastos), com um núcleo cerca de 1,5 a 2 vezes superior a um eritrócito, com tamanho total celular desde o tamanho de um neutrófilo até 4 vezes o tamanho de um eritrócito (Figura 7). A cromatina é fina e poderão ter nucléolo visível ou múltiplos, proeminentes. Os plasmócitos correspondem a menos de 3% da população e possuem um núcleo pequeno, redondo, excêntrico com cromatina densa. O citoplasma é abundante, intensamente basófilo e com uma área pálida peri-nuclear correspondente ao complexo de Golgi (Figura 7). Um por cento da população diz respeito aos macrófagos, caracterizados por abundante quantidade de citoplasma, frequentemente vacuolizado e/ou com corpos tingíveis, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e eritrócitos. Estruturas redondas, basofílicas e homogéneas, do tamanho de plaquetas, são frequentes no tecido linfoide e correspondem a fragmentos citoplasmáticos denominados de corpos linfoglandulares (Blauvelt & Messick et al, 2020).

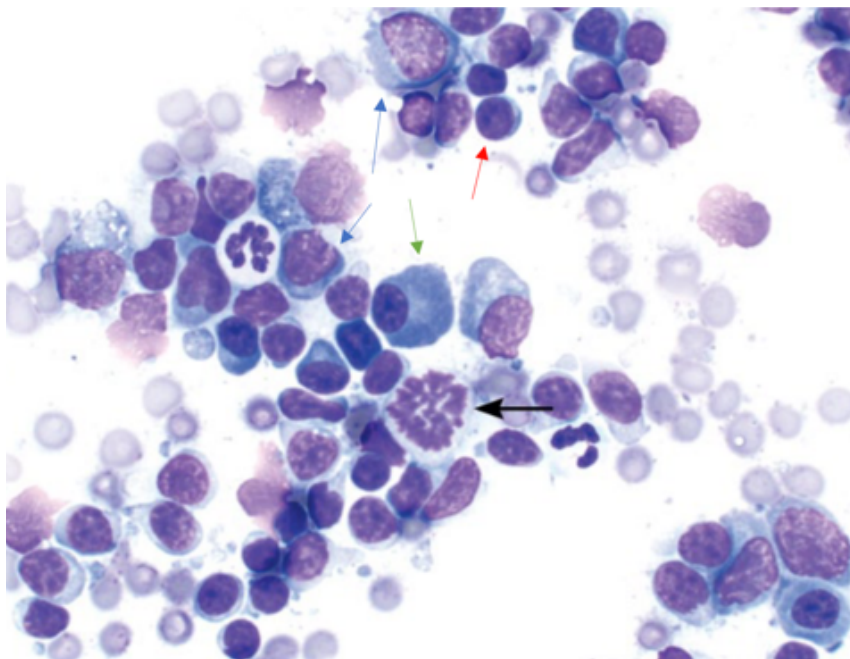


Figura 7 – Linfonodo reativo num cão. De notar a presença pequenos linfócitos (seta vermelha) com escassa quantidade de citoplasma, plasmócitos (seta verde) e células linfóides de dimensões intermédia e grande (seta azul). Mitose (seta preta). (x500, Romanowsky) (Burton, 2018)

O baço é um órgão de localização intra-abdominal que possui uma cápsula de tecido conjuntivo denso e fibras musculares lisas e, internamente, divide-se em polpa vermelha, formada pelos seios venosos, e pela polpa branca, constituída por tecido linfoide folicular. A polpa branca é essencialmente constituída por linfócitos B e T, macrófagos e APCs. Este órgão apresenta diversas funções como resposta imunitária a antígenos circulantes no sangue por parte dos linfócitos, fagocitose de agentes invasores através do SMF, filtração de eritrócitos senescentes e armazenamento de eritrócitos e plaquetas (Konig & Liebich, 2011; Bezuidenhout, 2013; Abbas et al., 2016; Gama, 2017). A imagem citológica da polpa branca de um baço normal é semelhante à observada nos linfonodos, contando com uma população heterogênea constituída predominantemente por linfócitos de pequenas (maioritariamente) a grandes dimensões e plasmócitos. Possui também células hematopoiéticas (precursores eritroides, mieloides e de plaquetas), macrófagos e mastócitos. Contudo, é frequente que as amostras citológicas apresentem escassa celularidade com abundante conteúdo hemático e células de estroma esplênico (Blauvelt & Messick et al, 2020).

O timo é um órgão lobular localizado no mediastino e, tal como os órgãos descritos anteriormente, dispõe de uma cápsula de tecido conjuntivo laxo. O parênquima consiste em vários lóbulos que se dividem internamente nas regiões cortical e medular. Atinge o seu desenvolvimento máximo antes da maturidade sexual, iniciando a sua involução aquando da alteração da dentição. Esta involução é rápida inicialmente, mas geralmente não se dá a sua

atrofia completa, mesmo em idades mais avançadas. Apresenta um papel importante no desenvolvimento da componente celular linfática, controlando o desenvolvimento dos órgãos linfáticos até que os animais atinjam a maturidade (Konig & Liebich, 2011; Bezuidenhout, 2013; Abbas et al., 2014; Gama, 2017). As células predominantes neste órgão são os linfócitos T em vários estádios de diferenciação e maturação, bem como células dentríticas, macrófagos, fibroblastos e focos de células epiteliais denominados de corpúsculos de Hassal (Blauvelt & Messick et al, 2020).

2. Linfoma canino

O linfoma canino (LC) é a terceira neoplasia mais diagnosticada no cão e consiste em 90% das neoplasias hematopoiéticas caninas (Ruple et al., 2017; Hartley et al., 2019). O cão, sendo uma companhia do Homem e estando exposto ao mesmo ambiente, tem vindo a ser considerado um modelo válido para o estudo da etiologia e tratamento do linfoma em medicina humana (Fournel-Fleury et al., 2002; Ito et al., 2014). Esta neoplasia pode surgir em qualquer tecido com células linfóides e consiste na expansão clonal dessas células, geralmente de origem B ou T (Correia, 2011).

A incidência anual de linfoma está entre 13-33 casos por 100 000 cães. A faixa etária afetada é ampla, sendo a média da idade de cães com linfoma 6,3 a 8,1 anos (Gavazza et al., 2001; Edwards et al., 2003; Sözmen et al., 2005; Pinello et al., 2017). Existem raças com uma prevalência mais elevada desta neoplasia, nomeadamente Boxer, Bulmastife e Buldogue inglês, mas também Doberman, Rottweiler, Boiadeiro de Berna, Dogue-de-bordéus, Labrador Retriever e Golden Retriever (Edwards et al., 2003; Jankowska et al., 2017; Comazzi et al., 2018; Van Rooyen et al., 2018).

2.1. Classificação

A literatura veterinária revela uma variedade de abordagens de classificação de LC. Atualmente, este classifica-se tendo em conta a localização anatómica, critérios histológicos/citológicos e imunofenótipo (Vail et al., 2020).

A classificação quanto à localização anatómica divide-se em linfoma multicêntrico, gastrointestinal ou alimentar, mediastínico e cutâneo. Existem, ainda, outras formas extranodais primárias que poderão ocorrer em qualquer local incluindo o baço, fígado, pulmões, olhos, sistema nervoso central (SNC), bexiga, coração ou cavidade nasal (Vail et al., 2020). As formas anatómicas de LC serão abordadas com maior detalhe no ponto 2.3.

São vários os sistemas de classificação morfológica de linfoma não Hodgkin que têm vindo a ser desenvolvidos em medicina humana e adaptados para medicina veterinária, para classificação do LC (Valli et al., 2011). Dentro destes sistemas incluem-se o de Rappaport, *Working Formulation*, a classificação atualizada de Kiel, a classificação de neoplasias linfóides revista (REAL, do inglês “*Revised Classification of Lymphoid Neoplasms*”) e, mais recentemente, a classificação de Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês “*World Health Organization*”) (Fournel-Fleury et al., 1997; Valli et al., 2011; Seelig et al., 2016). Os sistemas de classificação atualizado de Kiel e WHO são os mais utilizados em medicina veterinária para a classificação de LC mas, tendo em conta algumas limitações do primeiro, o sistema de classificação WHO é o globalmente mais utilizado. Contudo, o mais frequentemente utilizado na avaliação citológica é o sistema atualizado de Kiel pois baseia-se apenas na citomorfologia (dimensão celular e nuclear, forma do núcleo, densidade da cromatina, número e distribuição dos nucléolos e extensão e basofilia citoplasmática) e imunofenótipo. Por outro lado, o sistema de classificação WHO inclui ainda o padrão arquitetural de crescimento (nodular ou difuso), localização anatómica, comportamento biológico da neoplasia e características genéticas. Ambos os sistemas incluem ainda um sistema de gradação que classifica a neoplasia em graus baixo, intermédio (apenas no sistema de classificação WHO) ou alto grau, tendo em conta o tamanho celular (pequeno, médio ou grande) e o número de mitoses por campo (Valli et al., 2011; Seelig et al., 2016; Valli et al., 2017; Vail et al., 2020). Num estudo de Valli et al. (2011) um grupo de patologistas avaliou a concordância na classificação histológica de 300 casos de LC tendo em conta o sistema WHO, tendo-se observado uma concordância de 83% no diagnóstico do total dos casos e de 87% nos diagnósticos mais comuns (80% dos casos). Com isto, e apesar de existir um grande número de subtipos de linfoma segundo este sistema de classificação (Tabela 4), os cinco subtipos mais comuns são: Linfoma difuso de grandes células B (DLBCL, do inglês “*Diffuse Large B-cell lymphoma*”) (48%-52%), Linfoma periférico de células T não especificado de outra forma (PTCL-NOS, do inglês “*Peripheral T-cell lymphomas not otherwise specified*”) (15%), Linfoma zona T (TZL, do inglês “*T-zone lymphoma*”) (4%-12,7%), Linfoma T linfoblástico (T-LBL, do inglês “*T-lymphoblastic lymphoma*”) (3%-4%) e Linfoma de zona marginal (MZL, do inglês “*Marginal zone lymphoma*”) (3,7%-8%).

Existem certos subtipos de linfoma que estão associados a uma baixa taxa de progressão biológica e tempos de sobrevivência mais longos, denominando-se de linfomas indolentes ou de baixo grau (Tabela 4). Este grupo de linfomas tem uma prevalência de 14,9%-

28,3%, sendo que o TZL corresponde a 15,5% a 62% destes casos. Em contraste, os linfomas de alto grau correspondem a 71,7% - 86% dos casos de LC (Fournel-Fleury et al., 2002; Sözmen et al., 2005; Gavazza et al., 2008; Ponce et al., 2010; Sapierzyński, 2010; Flood-Knapik et al., 2013; Valli et al., 2013; Seelig et al., 2014).

Tabela 4 - Resumo da classificação de linfoma canino segundo o sistema de classificação WHO. (Adaptado de Seeling et al, 2016 e Valli et al, 2011)

Neoplasias de células B	Neoplasias de células T/NK
▪ Leucemia/linfoma linfoblástico de células B ▪ Leucemia linfocítica crónica de células B ▪ Linfoma linfoplasmocítico ▪ Linfoma de zona marginal de células B** (nodal, esplénico ou extra-nodal associado ao MALT) ▪ Plasmocitoma; mieloma ▪ Linfoma folicular** ▪ Linfoma de células do manto** ▪ Linfoma difuso de grandes células B* ▪ Linfoma de Burkitt	▪ Leucemia/linfoma linfoblástico de células T precursoras ▪ Leucemia linfocítica de células grandes granulares ▪ Linfoma hepatosplénico de células $\gamma\delta$T ▪ Linfoma intestinal de células T ▪ <i>Mycoses fungoides</i> ▪ Linfoma de células T não especificado de outra forma ▪ Linfoma de zona T**

*Inclui o subtipo Linfoma de grandes células B rico em células T; **Linfomas indolentes; A negrito os tipos de linfoma mais comuns.

2.2.Etiologia e Fatores de risco

A etiologia do LC, apesar de desconhecida, considera-se que seja multifatorial, embora não existam estudos que comprovem a existência de causas específicas associadas ao desenvolvimento desta neoplasia (Ito et al., 2014; Vail et al., 2020). Existem, por outro lado, estudos que reportam a existência de possíveis fatores de risco, onde se incluem fatores ambientais, genéticos e moleculares, infecciosos e imunológicos (Modiano et al., 2005; Schofield et al., 2019; Craun et al., 2020).

São diversos os estudos em medicina veterinária que procuram estudar a existência de fatores ambientais relacionados com desenvolvimento de linfoma em cães. Foi reportada a

existência de tal relação relativamente a fatores como a exposição a herbicidas e radiação eletromagnética (Reif et al., 1995; Schofield et al., 2019). Foi também encontrada relação com a utilização de tintas e solventes por parte dos tutores e viver em zonas industriais, mais concretamente perto de centrais nucleares, crematórios, indústrias de químicos, locais poluídos, estando estes quatro últimos associados a possível exposição a carcinogénicos através do ar, solo ou água (Gavazza et al., 2001; Pastor et al., 2009; Craun et al., 2020). A exposição ao fumo do tabaco foi também identificado como um fator relacionado com índices de proliferação de LC mais elevados (Pinello et al., 2017).

Ainda que não exista evidência científica suficientemente consistente para comprovar a existência de possíveis causas virais envolvidas no desenvolvimento de LC, existem teorias baseadas no conhecimento de medicina humana que reportam a possível associação entre retrovírus linfotrópicos e linfoma/leucemia em cães, bem como de uma possível relação entre o vírus *Epstein-Barr*, um gama-herpes-vírus, e o desenvolvimento de linfoma de células B (LCB) (Huang et al., 2012). Em Medicina Humana existe também evidência de que existe uma forte associação entre infeções por *Helicobacter* sp. e o desenvolvimento de linfoma gástrico, algo que ainda não está demonstrado em cães. Contudo, num estudo realizado com cães da raça Beagle demonstrou-se que a infeção com *Helicobacter* sp. resultou no desenvolvimento de folículos linfóides gástricos, que em medicina humana são considerados precursores de linfoma MALT (Rossi et al., 1999).

O comprometimento do sistema imunitário poderá ter um papel na linfomagenese. Existem alguns estudos neste campo em medicina veterinária que suportam esta teoria, tendo como exemplo os casos de trombocitopenia imuno-mediada e o tratamento com ciclosporina, que poderão ter uma associação com o desenvolvimento de linfoma em cães (Keller, 1992; Blackwood et al., 2004). Mais especificamente em relação ao linfoma cutâneo (*Mycosis fungoides*), foi reportado um risco mais elevado para este subtipo de linfoma em cães com dermatite atópica (Santoro et al., 2007). Também num estudo de Labadie et al. (2019) foi demonstrada que a estimulação imunológica crónica poderá ser um fator de risco para o desenvolvimento de TZL.

A nível genético, a heritabilidade aparenta ter um papel-chave no desenvolvimento de linfoma pelo facto de existirem certas raças com uma predisposição específica para linfoma, bem como para diversos subtipos, ao passo que outras aparecem sub-representadas. Já foram, também, identificadas variadas anormalidades citogenéticas em cães com patologia linfoproliferativa (Modiano et al., 2005; Van Rooyen et al., 2018).

Outros fatores incluem a esterilização que, nalguns estudos se encontra associada ao aumento do risco de desenvolvimento de linfoma cadelas (Villamil et al., 2009). Em relação ao sexo, ainda que existam conclusões ambíguas, a maioria dos estudos consultados refere uma maior prevalência linfoma em machos (56%-62%), comparativamente com fêmeas (38%-44%). À parte disso, a maioria dos estudos não reconhece este fator como fator de risco (Jagielski et al., 2002; Sapiernyński et al., 2010; Van Rooyen et al., 2018). Encontra-se ainda descrito, em gatos, o desenvolvimento de linfoma cutâneo em locais de injeção (Roccabianca et al., 2016).

2.3. Apresentação clínica

Os sinais clínicos em cães com linfoma são altamente variáveis e dependentes extensão e localização desta neoplasia. A forma mais comum de apresentação clínica em casos de LC é a forma multicêntrica que afeta os linfonodos periféricos. Contudo, existem também formas extra-nodais que incluem as formas mediastínica, abdominal (gastrointestinal/alimentar, hepática, esplénica e renal), cutânea, ocular, do sistema nervoso central e pulmonar (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020). Num estudo de Ponce et al. (2010) com 608 de casos de linfoma, 82,4% dos casos caracterizavam-se pelo envolvimento linfonodal com linfadenomegalia generalizada, ao passo que o envolvimento extra-nodal foi observado em 17,6% dos casos, 12,3% dos quais relacionados com o envolvimento cutâneo e os restantes 5,26% incluíram o trato gastro-intestinal (1,48%), baço (1,8%), tonsilas (1,48%) e olhos (0,33%).

A forma multicêntrica, que corresponde a cerca de 84% dos casos de LC, caracteriza-se essencialmente por linfadenomegalia generalizada, podendo ocasionalmente observar-se num único linfonodo ou em linfonodos regionais. Poderão surgir uma variedade de manifestações clínicas inespecíficas como anorexia, perda de peso, vômito, diarreia, emaciação, ascite, dispneia, polidipsia (PD), poliúria (PU) e pirexia (Dobson et al., 2001; Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020).

A forma mediastínica de linfoma ocorre em 22%-35,9% dos casos secundariamente a linfoma multicêntrico. É mais comum em cães jovens e quase exclusivamente de origem nas células T (96,6%) (Zandvliet, 2016; Moore et al., 2018; Vail et al., 2020). Num estudo de Moore et al. (2018) os sinais clínicos mais comuns apresentados nos cães com este tipo de linfoma foram letargia, anorexia, PU/PD, dispneia/taquipneia e vômito, sendo que em 42,5% dos casos se observou a presença de efusão pleural.

O linfoma alimentar, geralmente com o imunofenótipo T, restringe-se maioritariamente ao trato gastro-intestinal (72% dos casos) ou associado à forma multicêntrica (28% dos casos).

Os sinais clínicos são bastante inespecíficos e estão também relacionados com o envolvimento de estruturas anatómicas adjacentes: vômito, diarreia e perda de peso, hepato e/ou esplenomegalia (Gieger, 2011; Lane et al., 2018; Matsumoto et al., 2019; Vail et al., 2020).

O linfoma cutâneo, tipicamente de células T e epiteliotrópico, corresponde a cerca de 3-8% dos casos de LC. Reflete-se em lesões focais, multifocais ou generalizadas que poderão ser placas, úlceras, eritema, hipopigmentação, alopecia ou descamação (Day, 1995; Zandvliet, 2016; Chan et al., 2018).

Existem ainda formas mais raras de linfoma, como por exemplo o linfoma ocular, geralmente secundário à forma multicêntrica. As manifestações clínicas mais comuns são glaucoma, uveíte, hifema, hipópio e sinequias (Ota-Kuroki et al., 2014; Lanza et al., 2018). O linfoma associado ao SNC pode ser primário ou secundário e está geralmente mais associado ao imunofenótipo B, contando com manifestações clínicas como convulsões, paralisia ou paresia (Sisó et al., 2017). O linfoma hepático, uma forma relativamente rara, geralmente encontra-se associado ao imunofenótipo de células T, contando com duas formas primárias (hepatoesplênico e hepatotrópico), sendo as manifestações clínicas mais observadas hepato e/ou esplenomegalia (Cienava et al., 2004; Keller et al., 2013).

O LC poderá também estar associado a síndromes paraneoplásicas que terão impacto na apresentação clínica (Vail et al., 2020). A hipercalcemia, um síndrome neoplásico maioritariamente observado em linfoma de células T (LCT) (à exceção dos linfomas indolentes), está clinicamente associada a anorexia, perda de peso, fraqueza muscular, letargia, PU/PD e, mais raramente, depressão do SNC. Resulta frequentemente da produção do péptido relacionado com a paratormona (PTHrP, do inglês “*Parathyroid hormone-related protein*”) através das células neoplásicas. Esta hipercalcemia irá reduzir a resposta dos ductos coletores à hormona anti-diurética (ADH), culminando na diminuição da reabsorção de sódio na porção ascendente da ansa de Henle, contribuindo para a PU. Para além disso, a hipercalcemia leva a vasoconstrição da arteríola glomerular aferente, reduzindo a taxa de filtração glomerular e perfusão na medula, contribuindo para o aumento do risco de hipoxia dos tubulos renais bem como de doença renal aguda (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020). Outros síndromes paraneoplásicas incluem hipereosinofilia, anemia hemolítica e trombocitopenia imuno-mediadas, gamopatias monoclonais e neuropatias (Marchetti et al., 2005; Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020).

2.4.Diagnóstico

Após a recolha de dados para a anamnese, realização dum exame físico completo e do estabelecimento da lista de diagnósticos diferenciais (Tabela 5), na qual o linfoma estará incluído, deverá partir-se para uma abordagem diagnóstica que incluirá hemograma completo, painel de análises bioquímicas séricas completo, incluindo a concentração de cálcio ionizado, urianálise e, caso se aplique, métodos de diagnóstico imagiológico (Vail et al., 2020).

Tabela 5 - Diagnósticos diferenciais de Linfoma tendo em conta as diferentes formas. (Adaptado de Vail et al, 2020)

Linfoma (forma)	Diagnósticos diferenciais
Multicêntrico	▪ <u>Infeção disseminada</u>: bacteriana, viral, parasitária ou fúngica ▪ <u>Alterações imuno-mediadas</u>: dermatopatias, vasculite, poliartrite, lupus eritematoso ▪ <u>Metástases linfonodais</u>; ▪ <u>Outras neoplasias</u> hematopoiéticas: leucemia, mieloma múltiplo, histiocitose maligna ou sistémica
Mediastínico	▪ <u>Outras neoplasias</u>: timoma, quemodectoma, carcinoma da tiróide ectópico, carcinomatose pleural, entre outros ▪ <u>Do foro infeccioso</u>: patologia granulomatosa; piotórax ▪ <u>Outras</u>: insuficiência cardíaca congestiva, quilotórax, hemotórax
Alimentar	▪ Outras neoplasias do trato GI, corpo estranho, ulceração GI, linfagiectasia, enterite linfo-plasmocitária
Cutâneo	▪ Dermatite infecciosa: piodermatite avançada ▪ Dermatite imuno-mediada: pemphigus ▪ Outras neoplasias cutâneas: histiocitoma
Extra-nodal	▪ Extremamente variável; dependente da localização afetada

2.4.1. Hematologia, Bioquímicas, Urianálise

A alteração hematológica mais comum associada ao LC é a anemia, geralmente normocítica e normocrômica (não regenerativa), compatível com anemia associada a doença crónica. Por outro lado, também poderá estar presente anemia regenerativa em casos de hemorragia ou anemia hemolítica imunomediada, pelo que, idealmente, deverá estar adjacente uma contagem reticulocitária. Também se encontra descrita a presença de trombocitopenia (30,5%-43% dos casos de linfoma), leucocitose e leucopenia. A leucocitose geralmente advém de uma resposta inflamatória (neutrofilia, observada em 25% a 40% dos casos de linfoma). Linfocitose e linfopenia encontram-se geralmente descritas com igual frequência (Cienava et al., 2004; Zandvliet, 2016; Kliczkowska-Klarowicz et al., 2021). Poderá observar-se a circulação de linfócitos atípicos, sendo importante diferenciar nestes casos o envolvimento medular ou a presença de leucemia linfocítica primária (Vail et al., 2020).

Relativamente às proteínas totais (albumina e globulinas) e albumina séricas, poderá observar-se hipoproteinemia, geralmente associada a linfoma alimentar, ou hiperproteinemia, em casos de gamopatias monoclonais (Moore, 2016; Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020; Kliczkowska-Klarowicz et al., 2021). Mais especificamente, num estudo de Gieger (2011), 61-80% dos cães com linfoma alimentar apresentavam hipoalbuminemia, estando também descrita uma prevalência desta alteração em quase 100% dos casos de cães com linfoma T hepatoesplénico.

As alterações na concentração das bioquímicas séricas geralmente refletem o local anatómico afetado, bem como os síndromes paraneoplásicos, como é o caso da hipercalcemia já descrita anteriormente (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020). Num estudo de Moore et al. (2018) relativamente a cães com linfoma mediastínico, 96,6% dos casos apresentava o imunofenótipo T e 67,5% apresentavam hipercalcemia.

A urianálise faz parte da recolha de informação relevante para avaliação da função renal e do trato urinário (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020).

2.4.2. Imagiologia

Os métodos imagiológicos apresentam maior relevância no estadiamento de linfoma do que no diagnóstico propriamente dito (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020).

Radiografias torácicas ou abdominais de cães com linfoma multicêntrico geralmente relevam alterações, ainda que não sejam específicas e apenas poderão sugerir o linfoma como um diagnóstico diferencial (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020). É espectável que na radiografia torácica 70% dos casos de LC revelem alterações (Starrak et al., 1997).

A ultrassonografia abdominal e de linfonodos periféricos poderá ter utilidade na avaliação morfológica e arquitetural dos órgãos, auxiliando também na percepção de possível envolvimento hepático ou esplênico (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020). Aproximadamente 27% dos casos de linfoma alimentar não relevam achados anormais ecograficamente, pelo que este método não é adequado para diagnóstico ou exclusão de linfoma (Frances et al., 2013).

A tomografia computadorizada (TAC) é o método ideal para avaliar a extensão da neoplasia pelo excelente detalhe que apresenta, ainda que não seja o método ideal de diagnóstico. Por exemplo, no caso de uma massa mediastínica, a TAC terá bastante utilidade em avaliar a extensão da neoplasia, contudo não poderá realizar a distinção entre timoma ou linfoma mediastínico (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2020).

2.4.3. Citologia e Histologia

Uma vez que a principal manifestação clínica no LC é presença a linfadenomegalia regional ou generalizada, o primeiro passo nestes casos será a avaliação citológica do linfonodo que se encontra aumentado, através da colheita por punção aspirativa por agulha filha (PAAF) ou punção por agulha fina (PAF) não aspirativa e posterior processamento com colorações derivadas de Romanowsky (geralmente May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou Diff-Quik®). Além da avaliação linfonodal, no caso de suspeita de envolvimento de outros órgãos (por exemplo, fígado ou baço), a colheita de amostra eco-guiada e posterior avaliação citológica é recomendada. Alguns cuidados deverão ser levados a cabo, tais como: evitar a colheita de amostras de locais tipicamente reativos (linfonodos submandibulares); realizar esfregaços sem demasiada pressão, devido à fragilidade dos linfócitos (Vail et al., 2020). A citologia é um método de diagnóstico barato, fácil de realizar e seguro que apresenta concordância elevada a excelente com a histopatologia. Vários autores recomendam a citologia como um método de diagnóstico suficiente para diagnosticar linfoma. É uma excelente alternativa nos casos em que a colheita cirúrgica não possa ser realizada tanto por motivos monetários, ou outros relacionados com o procedimento em si (risco anestésico, por exemplo) ou temporais (Teske & van Heerde, 1996; Sözmen et al., 2005; Sapiernyński, 2010). Nos Estados Unidos, cerca de 90% dos Médicos Veterinários (incluindo diplomados) alegam utilizar a citologia para diagnóstico de linfoma multicêntrico de alto grau em cães, com ICC adicional utilizada em 75% dos casos. Menos de 30% recorrem ao diagnóstico histopatológico em linfonodos removidos cirurgicamente. A maioria inicia o tratamento com base no diagnóstico citológico e posterior imunofenotipagem (Regan et al., 2013). A imagem citológica de linfoma de alto grau (Figura 8) caracteriza-se pela presença de uma população homogénea de células linfóides intermédias

e/ou grandes com um índice mitótico superior ao que se pode observar em casos de linfadenopatia reactiva (>3 mitoses em 5 campos de ampliação x500), contando frequentemente com um número relativamente elevado de macrófagos com corpos tingíveis e corpos linfoglandulares. A presença de mais de 80% de células linfóides de médias e grandes dimensões suporta o diagnóstico de linfoma. Por outro lado, e de forma mais desafiante de diagnóstico citológico, o linfoma de baixo grau é caracterizado por uma população homogénea de células linfóides pequenas, o que torna difícil a sua distinção entre linfadenopatia reactiva. Em alguns casos, os linfócitos poderão ter a morfologia de “espelho de mão” (Figura 9), sugerindo um imunofenótipo T, sendo a presença de mitoses nestes casos extremamente rara (Valli et al., 2013; Monti & Cian, 2016; Blauvelt & Messick et al., 2020; Comazzi et al., 2021).

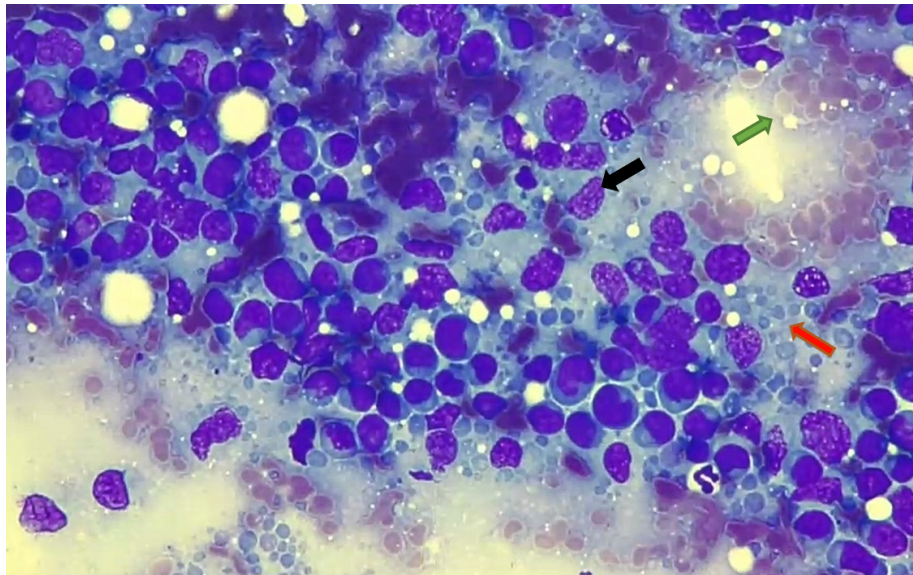


Figura 8 — Linfonodo poplíteo de um cão com linfoma de alto grau. Maioria das células linfóides são de tamanho intermédio a grande com núcleo indentado. Frequentes corpos linfoglandulares (seta vermelha) e alguns eritrócitos de fundo (seta verde). Algumas células lisadas (seta preta) (x400, May-Grünwald Giemsa). Original da autora.

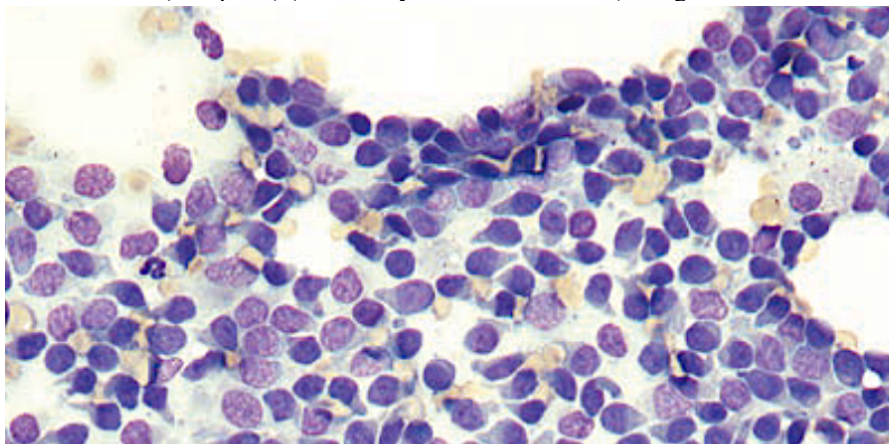


Figura 9 - Linfonodo de um cão com linfoma de baixo grau. As células linfóides são pequenas e com morfologia de "espelho de mão". (x500, May-Grünwald Giemsa) (Monti & Cian, 2016)

Contudo, o diagnóstico histopatológico continua a ser o *gold standard* para o diagnóstico de linfoma e a avaliação citológica poderá ser insuficiente nalguns casos, como nos linfomas de baixo grau ou em proliferações reativas de linfócitos de grandes dimensões. Nestes casos recomendável recorrer-se à biópsia ou excisão linfonodal (linfadenectomia) para análise histopatológica (Sapierzyński, 2010; Zandvliet, 2016; Marconato et al., 2017) .

2.4.4. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem tem como objetivo a subclassificar o linfoma (B, T ou não-B-não-T). Contudo, poderá também apresentar utilidade no estabelecimento do diagnóstico de linfoma, na medida em que, ao esperar-se a presença de uma população heterogénea de linfócitos no linfonodo, o achado de uma população homogénea caracterizada pelo mesmo imunofenótipo suporta a existência de um processo neoplásico (Vail et al., 2020). Esta técnica poderá ser realizada em amostras citológicas, através da imunocitoquímica, histológicas, através da imunohistoquímica (IHC, do inglês “*Immunohistochemistry*”) ou, também, utilizando a técnica de citometria de fluxo (CF) (Caniatti et al., 1996; Comazzi & Gelain, 2011; Zandvliet, 2016).

A determinação o imunofenótipo das células de linfoma é possível através da deteção de proteínas de superfície nas células, denominadas de *cluster of differentiation* (CD) (Sapierzyński, 2010; Abbas et al., 2016). Deste modo, recorre-se à utilização de anticorpos (Acs), sendo os mais comumente utilizados para identificação de células B o anti-CD20, anti-CD21, anti-CD79 α e o anti-PAX5, ao passo que para as células T é frequente a utilização dos Acs anti-CD3, anti-CD4 ou anti-CD8 (Caniatti et al., 1996; Feldman & Dogan, 2007; Willmann et al., 2009; Morgan et al., 2013; Priest et al., 2017; Pazdzior-Czapula et al., 2019; Ohno et al., 2020). A prevalência imunofenótipo B varia entre 61,4% - 82,6 % dos casos e a prevalência do imunofenótipo T ronda os 13%-38,6% (Fournel-Fleury et al., 1997; Dobson et al., 2001; Modiano et al., 2005; Guija de Arespacochaga et al., 2007; Sapierzyński et al., 2010; Comazzi et al., 2018)

2.4.4.1. Imunocitoquímica

2.4.4.1.1. Definição

A ICC é uma técnica de diagnóstico avançada que tem ganho popularidade em Medicina Veterinária nas últimas décadas e que consiste na ligação específica de Acs exógenos a antigénios (Ags) celulares. As células são incubadas com o anticorpo desenvolvido para reconhecer um Ag em particular que se localiza na membrana celular, citoplasma ou núcleo (Barger et al, 2017; Priest et al., 2017; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021). Esta técnica

é utilizada em amostras citológicas (esfregaços, citologias por aposição ou amostras obtidas por citocentrifugação), ao passo que a IHC requer a utilização de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, ou em tecidos congelados (Haines & West, 2005; Priest et al., 2017).

2.4.4.1.2. Anticorpo e Antigénio

Tal como descrito anteriormente, a ICC requer a utilização de Ac, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), sendo as IgG as mais utilizadas. Para melhor entender esta técnica, será necessária uma compreensão geral da estrutura dos anticorpos (Figura 10). Estes apresentam a forma de “Y” e são compostos por 4 polipéptidos – 2 pares idênticos de cadeias leves e pesadas que se dobras em regiões constantes e variáveis. Os braços do “Y” (regiões Fab) incluem as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas e ditam a especificidade da ligação antigénica. Existem 4 tipos de ligação Ag-Ac: hidrofóbicas, de hidrogénio, eletrostáticas e de forças de van der Waals. Os parâmetros e reagentes utilizados na técnica de ICC visam aumentar a força destas ligações, como por exemplo o aumento da temperatura fortalece as forças de van der Waals. Por outro lado, o “tronco” do “Y” (região Fc) consiste nas regiões variáveis das cadeias pesadas e serve como o local de conjugação de sistemas de deteção ou de ligação de anticorpos secundários (Ramos-Vara, 2005; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

Existem vários tipos de Ac disponíveis, produzidos através da imunização de um animal (rato, por exemplo) com um antigénio purificado, particularmente monoclonais ou policlonais. Os Ac monoclonais reconhecem um epítopo particular de um Ag, o que lhe confere uma elevada especificidade e mínima coloração de fundo. Por outro lado, os Ac policlonais, são os mais utilizados em medicina veterinária e reconhecem múltiplos epítomos de um antigénio em particular, sendo desta forma menos específicos, ainda que com maior sensibilidade (Ramos-Vara, 2005; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

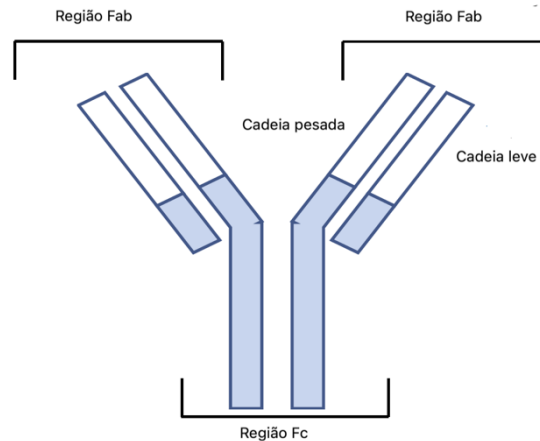


Figura 10 - Estrutura do Anticorpo. (Adaptado de Camus et al., 2020)

2.4.4.1.3. Metodologia geral e Interpretação

A técnica de ICC, de forma prática, pode-se dividir nas fases pré-analítica, analítica e pós analítica (Santangelo et al., 2021).

2.4.4.1.3.1. Fase pré-analítica

A fase pré-analítica diz respeito à colheita da amostra até ao seu armazenamento. A quantidade e qualidade celular presente nas amostras é crucial para ditar a utilidade diagnóstica da ICC, na medida em que elevada lise celular, necrose ou células pouco preservadas dificultarão a ligação Ac-Ag e resultarão em grandes quantidades de fundo imunorreativo. A fixação é uma etapa geralmente necessária de modo a prevenir os fenómenos de autólise e estabilizar o material celular, sendo os agentes fixadores mais utilizados a acetona, o formol e os fixadores de álcool (etanol ou metanol, por exemplo). Por fim, as amostras deverão ser refrigeradas ou congeladas caso não sejam processadas de imediato e não estejam fixadas, uma vez que apenas permanecem preservadas 1-2 semanas à temperatura ambiente (Ramos-Vara & Miller, 2014; Skoog & Tani, 2011; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

2.4.4.1.3.2. Fase analítica

A fase analítica diz respeito à metodologia relacionada com a técnica em si, nomeadamente se é utilizada uma técnica manual ou automática, se é necessária recuperação antigénica, qual o método utilizado (direto ou indireto) e ainda relativamente ao sistema de deteção. A realização de ICC manual ou automática está geralmente dependente da casuística do laboratório, na medida em que nos casos em que são recebidas muitas amostras será vantajosa a utilização de ICC automática. Outras vantagens incluem uma monitorização mais eficaz da técnica (alarmes de temperatura, por exemplo), a possibilidade de realizar ICC em massa de forma mais rápida e a possibilidade de os técnicos disporem de mais tempo para

atividades paralelas. Por outro lado, na ICC manual existe maior dificuldade em padronizar e monitorizar a técnica devido a variações individuais entre os técnicos (Haines & West, 2005; Valli et al., 2009; Prichard, 2014; Skoog & Tani, 2011; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

De modo a visualizar-se a reação de ICC, o Ac primário ou secundário deverá estar conjugado com um mecanismo de marcação, tal como um fluorocrómo, um metal ou, mais comumente na microscopia ótica, uma enzima (peroxidase, fosfatase alcalina ou glucose oxidase) que, ao reagir com um substrato, produz um precipitado colorido. Os precipitados utilizados, por exemplo, no caso da enzima peroxidase, poderão ser a 3,3'-diaminobenzidina (precipitado castanho) ou o 3-amino-9-etilcarbazol (precipitado azul). Os métodos de deteção (Figura 11) poderão ser diretos, no caso de se visualizar a ligação direta entre o Ac primário e o Ag, ao passo que o sistema indireto requer a ligação de um Ac secundário ao Ac primário. Este último é considerado superior relativamente ao método direto, nomeadamente por apresentar maior sensibilidade, apesar de apresentar maior probabilidade de coloração do fundo. Estão disponíveis vários *kits* comerciais com sistemas de deteção que ligam diretamente a molécula de marcação (fluorocrómo, metal ou enzima) ao Ac secundário num polímero. Para além disto, deverá realizar-se também uma contracoloração que permita avaliar a morfologia celular, utilizando-se geralmente a hematoxilina (Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara & Miller, 2014; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

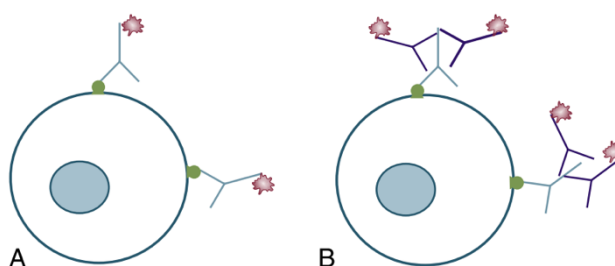


Figura 11 - Sistema de deteção da ligação anticorpo e antígeno. A - Método direto: ligação do Ac primário ("Y" azul) ao Ag (bola verde) com a partícula de deteção a vermelho; B - Sistema de deteção indireto: surge um Ac secundário ("Y" roxo) ligado ao Ac primário. (Adaptado de Camus et al., 2020)

A recuperação antigénica (RA) poderá ser necessária em casos de amostras fixadas ou para antígenos específicos (nucleares, por exemplo). A fixação pode alterar a estrutura tridimensional das proteínas alvo, deixando os epítomos indetetáveis pelos Acs. O método mais frequentemente utilizado é a RA pelo calor com a utilização de uma solução tampão a pH 6, sendo o método enzimático menos utilizado. A RA pelo calor pode ser realizada tanto num equipamento simples como um micro-ondas, como em câmaras especializadas (Valli et al.,

2009; Dupré & Courtade-Saidi, 2012; Ramos-Vara & Miller, 2014; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

É relevante a utilização de controlos positivos ou negativos devidamente validados para uma apropriada interpretação da ICC, de forma a garantir que todos os aspetos da técnica foram realizados corretamente e que não se levantam questões relativamente à marcação. O controlo positivo diz respeito a amostras nas quais se espera imunocoloração, enquanto no controlo negativo se espera o contrário. Estes últimos são geralmente controlos de amostra negativos (células cujo Ag de interesse não é expresso) ou controlos de Acs negativos (por exemplo, omissão do Ac na incubação da amostra). O controlo positivo requer a utilização de células que expressam o antígeno de interesse. É relevante que estes controlos sejam utilizados para cada Ac e que passem pelas mesmas etapas que a amostra principal (Camus et al., 2020; Burry, 2011; Santangelo et al., 2021).

2.4.4.1.3.3.Fase pós-analítica

A fase pós-analítica diz respeito à interpretação e realização do respetivo relatório. A ICC deverá ser interpretada em paralelo com a respetiva amostra citológica (Figura 12), tendo em conta conhecimentos relacionados com outros dados de patologia clínica. Não existe nenhum limiar que defina um resultado como positivo, na medida em que cada laboratório deverá quantificar o número de células positivas, a intensidade da coloração, bem como a localização (membranar, citoplasmática ou nuclear) (Barger et al., 2017; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

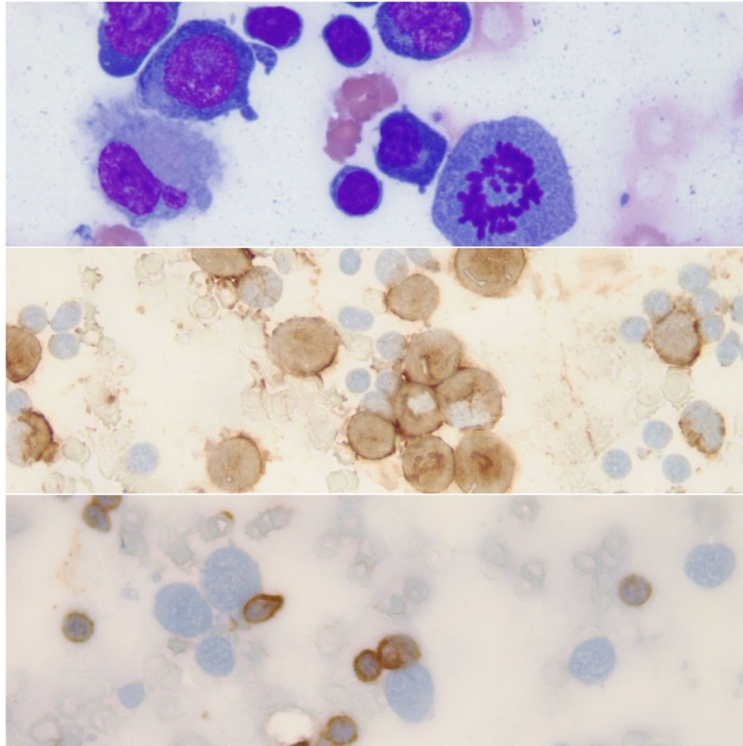


Figura 12 -Linfonodo de um cão com linfoma de células B. Cima - Linfócitos imaturos neoplásicos de grandes dimensões e linfócitos de pequenas dimensões. Mitose atípica à direita, em baixo; Centro - Marcação com CD20: Imunorreatividade na maioria dos linfócitos de grandes dimensões; Baixo - Marcação com CD3: Imunorreatividade apenas nos linfócitos de pequenas dimensões. (x1000, May-Grünwald Giemsa/CD20/CD3) (Fotografias gentilmente cedidas pela Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha).

2.4.4.1.4. Vantagens, desvantagens e desafios

A ICC, quando executada de forma adequada, poderá ser uma ferramenta extremamente valiosa, com várias vantagens em relação à IHC. A principal vantagem está relacionada com a rapidez, na medida em que as amostras citológicas poderão ser colhidas, tal como já mencionado anteriormente, de forma rápida, pouco invasiva e relativamente barata, sendo a ICC realizada de seguida. Isto traduz-se na obtenção de diagnóstico e, consequentemente, planeamento do tratamento mais rápidos. Ainda, uma técnica pouco invasiva de colheita está diretamente relacionada com diminuição do desconforto do animal e risco anestésico limitado (Sapierzyński et al., 2012; Ramos-Vara & Miller, 2014; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

As principais desvantagens e desafios estão relacionados com variações na qualidade da amostra e incapacidade de a avaliar antes da realização da ICC. Em casos de amostras com escassa celularidade, abundante lise celular ou necrose os resultados poderão ser inconclusivos e resultar em grandes quantidades de fundo imunorreativo (Skoog & Tani, 2011; Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021). Contudo, uma possível resolução deste ponto assenta na utilização de lâminas citológicas previamente coradas na técnica ICC, ainda que seja rara a sua

menção na bibliografia médico-veterinária (Cunha 2016, Dörfelt et al., 2019; Raskin et al., 2019; Cunha 2020). Outras desvantagens incluem dificuldade em aceder a amostras de controlo apropriadas e a quantidade diminuta de estudos comparativamente com a IHC (Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021).

2.4.4.1.5. Outras aplicações além do Linfoma

A ICC deverá ser aplicada após a análise citológica e determinação duma lista de diagnósticos diferenciais. Após isto, deverá aplicar-se um painel de anticorpos apropriado para confirmar um diagnóstico e/ou refutar outros. Como método de diagnóstico, estas técnicas são utilizadas para a identificação da linhagem celular de neoplasias (por exemplo, neoplasias de células redondas pouco diferenciadas poderão ser de difícil distinção morfológica), para obter informação prognóstica de determinada neoplasia (por exemplo, a padrões de expressão do c-Kit em mastocitomas) ou para a deteção de agentes infecciosos (por exemplo, a identificação do antígeno da peritonite infecciosa felina (PIF) (Fernandez et al., 2005; Priest et al., 2017; Valli et al., 2009; Felten et al., 2019). No caso particular de linfoma, a ICC permite não só observar a presença ou ausência de imunorreação, como também determinar a morfologia das células em que a expressão antigénica é ou não observada, possibilitando observar se as células são pequenos linfócitos maduros e parte da população normal do linfonodo, ou se se tratam das células neoplásicas (Figura 12) (Wilkerson et al., 2005; Sapierzyński, 2010).

2.4.5. Outras técnicas de diagnóstico

Existem outras técnicas moleculares que poderão ser utilizadas em caso de dúvida entre uma proliferação benigna ou maligna de linfócitos, como é o caso da técnica de *Polymerase Chain Reaction (PCR) for Antigen Receptor Rearrangements* (PARR). Uma vez que o linfoma advém da expansão clonal de um determinado tipo celular caracterizado por uma sequência de DNA específica e única desse tumor, esta técnica permite amplificar essas regiões, determinando assim a malignidade da neoplasia (Burnett et al., 2003; Zandvliet, 2016).

Está também descrita a possibilidade de utilização de biomarcadores (proteínas séricas) para diagnóstico e monitorização de LC ainda que não exista evidência científica suficiente que comprove sua aplicabilidade (Zandvliet, 2016; Vail et al, 2020).

2.5. Estadiamento

Após o estabelecimento do diagnóstico definitivo, deverá ser determinada e categorizada a extensão da patologia, de forma a determinar a presença ou ausência de metástases. O grau de implementação de um protocolo de estadiamento e importância do

mesmo estão relacionados com a capacidade de tomar decisões e prever o prognóstico, prevendo a sua resposta à terapia (Vail et al., 2020). O esquema de estadiamento mais utilizado no linfoma em animais domésticos foi estabelecido pela WHO e classifica os cães em estadios de I a V com base no local anatómico afetado e em subestadios “a” ou “b”, tendo em conta a apresentação clínica (Tabela 6) (Owen, 1980). Contudo, os testes de diagnóstico necessários antes de se atribuir um estadio não estão bem estabelecidos, ao contrário do que acontece em medicina humana, cujos critérios de abordagem diagnóstica inicial, bem como de tratamento, se encontram bem padronizados (Regan et al., 2013; Biller et al., 2016; Vail et al, 2020). As recomendações de Marconato et al. (2017) para estadiamento de linfoma multicêntrico passa pela realização de hemograma completo e avaliação do esfregaço sanguíneo, métodos imagiológicos para avaliação torácica e abdominal e a avaliação citológica de fígado, baço e medula óssea.

A ultrassonografia poderá também apresentar grande utilidade no que diz respeito à colheita guiada de amostras que assim o justifiquem. Métodos avançados de diagnóstico como a TAC, imagem por ressonância magnética (MRI, do inglês “*Magnetic Resonance Imaging*”) e tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês “*Positron emission tomography*”) estão a começar a ser utilizados de forma mais comum em Medicina Veterinária e a sua importância no de estadiamento de LC tem vindo a ser avaliado (Zandvliet, 2016; Vail et al, 2020).

Tabela 6 - Estadiamento clínico de linfoma em animais domésticos. (Adaptado de Owen, 1980)

Localização anatómica

A. Generalizado

B. Alimentar

C. Tímico

D. Pele

E. Leucemia*

F. Outros (SNC, ocular, entre outros)

Estadio	Extensão anatómica
I	Envolvimento de um único linfonodo e tecido linfóide num único órgão **
II	Envolvimento de vários linfonodos numa área regional
III	Envolvimento linfonodal generalizado

IV	Envolvimento hepático e/ou esplênico
V	Manifestação hematológicas e envolvimento da medula óssea e/ou outros órgãos
Subestadio	Sinais sistêmicos
a	Não
b	Sim

*Só envolvimento de sangue e medula óssea; ** Excluindo medula óssea

2.6. Tratamento

A abordagem terapêutica em relação a um cão com linfoma deverá ter em conta diversos fatores como o subtipo de linfoma, estadio e subestadio da doença, presença ou ausência de síndromes paraneoplásicas, o estado geral do animal, bem como fatores financeiros. A quimioterapia é o tratamento mais aplicado em casos de LC (Moore, 2016; Thamm, 2019).

Tendo em conta as manifestações sistêmicas de linfoma de graus intermédio e alto, a abordagem terapêutica com recurso a quimioterapia é a mais frequentemente utilizada. Para além disto, o linfoma é uma das neoplasias mais responsivas à quimioterapia em cães (Moore, 2016; Thamm, 2019).

Existem protocolos de quimioterapia com recurso a um único agente, como é o caso da doxorrubicina (DOX), mas os protocolos quimioterápicos que apresentam maior sucesso são os multimodais. Sem tratamento, os cães diagnosticados com linfoma de alto grau geralmente apresentam um tempo de sobrevivência de até 6 semanas. Este tempo de sobrevivência aumenta progressivamente com quimioterapia, sendo que 50% dos cães com linfoma de alto grau sujeitos a um tratamento com quimioterapia multimodal terão um tempo de remissão de aproximadamente 7-10 meses, apresentado um tempo de sobrevivência de aproximadamente 10-14 meses (Ito et al., 2014; Thamm, 2019). A maioria dos protocolos quimioterápicos de primeira linha para o tratamento de LC publicados incorporam ciclofosfamida, doxorrubicina, vinscritina e prednisona (CHOP), com durações variáveis entre 15 a 25 semanas. Contudo, estes protocolos poderão ou não incluir agentes terapêuticos adicionais (L-asparaginase, por exemplo), bem como variar na sua ordem, dosagem e duração. Estes protocolos contam com taxas de resposta completa (RC) de 85% a 95% e medianas de tempo de sobrevivência de 6 a 12 meses (Marconato et al., 2011; Regan et al., 2013; Thamm, 2019).

Nos casos de saída de remissão ou de falha na resposta aos protocolos de primeira linha, recorre-se aos protocolos de resgate que geralmente resultam em taxas de resposta mais baixas, com duração mais curta e que tendem a apresentar mais toxicidade. Os agentes utilizados com mais frequência em protocolos de resgate incluem rabacfosadina, actinomicina D, mitoxantrona, DOX (se não tiver sido utilizada anteriormente), dacarbazina, temozolomida, lomustina, L-asparaginase, mecloretamina, vincristina, vimblastina, procarbazina, prednisona e etoposido (Zandvliet, 2016; Vail et al, 2020).

Contudo, a resposta dos linfomas de alto grau à quimioterapia é divergente, como por exemplo nos casos de LCB que são mais quimiosensíveis aos protocolos convencionais de CHOP, que os LCT (Marconato et al., 2011). A título de exemplo, num estudo de Beaver et al. (2010) foi avaliada a resposta inicial de cães com LCB e LCT a uma dose única de DOX e foi encontrada uma taxa de resposta geral significativamente mais baixa nos LCT (50%), comparando com os LCB (100%). Deste modo, os casos de LCT refletem-se em tempos de remissão e de sobrevivência mais curtos, comparativamente com os casos de LCB. Parte da explicação da resposta mais baixa no caso dos LCT poderá residir no facto de que certos tipos de células T apresentam 40 vezes mais expressão genética de mutação genética de resistência a múltiplos fármacos 1 (MDR1, do inglês “*multidrug resistance mutation 1*”) que as células B. A MDR1 codifica a glicoproteína-P e os fármacos transportados por esta (doxorrubicina e vincristina) apresentam menos eficácia. Uma vez que os agentes alquilantes (por exemplo, lomustina, mecloretamina, procarbazina, entre outros também utilizados como agentes de resgate) não são afetados por MDR1, será pertinente considerar a sua utilização como tratamento de primeira-linha em LCT, existindo já alguns estudos neste âmbito, apesar de ainda não estar estabelecida qual a abordagem terapêutica a ter em casos de LCT de alto grau (Brodsky et al., 2009; Moore, 2016; Morgan et al., 2018). Num estudo de Regan et al. (2013) 31% dos clínicos utilizaram protocolos de primeira linha diferentes nos casos LCT, incluindo maioritariamente lomustina, mecloretamina e procarbazina.

Uma vez que a quimioterapia afeta predominantemente células ativamente em replicação, deverá ser utilizada de forma cautelosa em linfomas pouco proliferativos, como é o caso dos linfomas indolentes, salvo em estadios avançados. Devido ao seu comportamento indolente apresentam longos tempos de sobrevivência com baixas taxas de resposta aos protocolos de quimioterapia, sendo recomendável que cães com este tipo de linfoma, assintomáticos e sem impacto da neoplasia na qualidade de vida, apenas sejam monitorizados (Zandvliet, 2016; Vail et al, 2020). Num estudo de Valli et al. (2013) a mediana de sobrevida

em TZL foi superior em 9,2 meses nos casos não sujeitos a quimioterapia, comparando com os que receberam quimioterapia. Não existindo consenso na literatura na instituição de tratamento em cães com TZL, Moore (2016) sugere que em casos assintomáticos apenas se institua a monitorização dos linfonodos periféricos e dos parâmetros hematológicos; sendo apenas recomendado que se inicie tratamento tendo em conta alguns critérios tais como: presença de sinais clínicos (WHO, subestadio b), progressão rápida, disfunção orgânica devido a infiltração neoplásica, entre outros.

2.7. Prognóstico

São vários os fatores de prognóstico que têm vindo a ver avaliados no LC. Ainda que em Medicina Humana exista uma metodologia de estratificação do prognóstico através de sistemas de pontuação como por exemplo através do *International Prognostic Index* (IPI), em Medicina Veterinária não existem índices semelhantes para o LC (Zandvliet, 2016; Fontaine et al., 2017).

Os fatores que aparentam ter maior relação com o prognóstico são o imunofenótipo, a extensão da patologia (estadio WHO), a presença ou ausência de manifestações sistémicas (subestadio WHO), e a subclassificação de linfoma indolente. Um estadio mais elevado (por exemplo, estadio V), subestadio b e o imunofenótipo de células T (em linfomas de alto grau) têm vindo a ser associados a tempos de remissão e de sobrevivência mais curtos. Por outro lado, o linfoma indolente está associado a um melhor prognóstico, comparativamente com linfomas de graus intermédio e alto (Teske, 1994; Ponce et al., 2004; Wilkerson et al., 2005; Valli et al., 2011; Sapierzyński et al., 2012; Moore, 2016; Fontaine et al., 2017; Chan et al., 2018; Vail et al., 2020).

São exemplo de outros fatores que parecem ter relação negativa com o prognóstico a presença de linfadenopatia mediastínica cranial, o tratamento prévio com cortico-esteróides, os resultados da patologia clínica no momento do diagnóstico (anemia e hipercalcemia), a localização anatómica afetada (linfoma mediastínico, linfoma gastrointestinal difuso, linfoma hepatoesplénico e linfoma primário do SNC) e níveis elevados de expressão de Ki-67 (Zandvliet, 2016; Deravi et al., 2017; Morgan et al., 2018).

O presente trabalho teve por base o estudo de 307 casos de imunofenotipagem de LC, efetuada entre Abril de 2020 e Março de 2021, através da técnica de ICC em lâminas citológicas previamente coradas. Assim, os objetivos deste trabalho são:

- Determinação do imunofenótipo de 307 casos de LC através de ICC em lâminas

citológicas previamente coradas;

- Análise descritiva da amostra de cães com diagnóstico de linfoma tendo em conta a idade, sexo, porte, raça e distribuição pelo imunofenótipo.
- Estudo da relação entre a variável imunofenótipo com as variáveis raça, porte da raça, idade e sexo do animal.

III. Material e Métodos

1. Recolha de dados

Os dados recolhidos para a realização deste trabalho são referentes ao período de Abril de 2020 a Março de 2021, tendo estes resultados sido obtidos através da base de dados do laboratório CEDIVET, com o programa SisLab. Consultaram-se os relatórios de imunocitoquímica realizada em casos de linfoma previamente diagnosticado citologicamente e a ficha dos animais em questão, acedendo-se aos dados relativos à espécie, raça, sexo e idade. As raças foram ainda classificadas consoante o porte em grande, médio e pequeno.

1.1. Critérios de inclusão e exclusão

O presente trabalho baseou-se no estudo dos casos submetidos ao laboratório CEDIVET no período de Abril de 2020 a Março de 2021 para realização de ICC em lâminas citológicas previamente coradas para determinação do imunofenótipo (n=384).

Foram incluídos no estudo os casos de cães com diagnóstico citológico de linfoma cujas lâminas eram referentes a linfonodos, órgãos internos (baço, fígado e intestino), massas intra ou extra-cavitárias e fluídos cavitários (n=307), sendo excluídos os referentes à espécie felina ou os realizados em esfregaço sanguíneo (n=77).

2. Metodologia utilizada

2.1. Protocolo de Imunocitoquímica

O protocolo subjacente à técnica de imunocitoquímica para imunofetipagem de linfoma teve uma prévia validação interna, tendo-se utilizado como *gold standard* a imunohistoquímica.

A coloração imunocitoquímica foi realizada em lâminas citológicas previamente coradas com diagnóstico linfoma, no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP), laboratório integrante do mesmo grupo do CEDIVET (Unilabs), através do método automatizado. Esta

técnica realizou-se nas plataformas automáticas VENTANA® BenchMark XT para os anticorpos policlonal de coelho anti-CD20 (Policlonal, BIOCARE MEDICAL, LLC; diluição 1:50) e monoclonal de coelho anti-CD3 (2GV6, VENTANA®, *Roche Diagnostics; ready to use*) e VENTANA® BenchMark ULTRA para o anticorpo monoclonal de coelho anti-PAX5 (SP34, VENTANA®, *Roche Diagnostics; ready to use*). Foi realizada recuperação antigénica pelo calor com *Cell Conditioning 1 buffer* (CC1, VENTANA®) para CD3 e CD20 e/ou PAX5, antes da incubação com os anticorpos primários. Utilizou-se o sistema de deteção indireto *Kit OptiviewTM* com o cromogénio 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Foi realizado contraste com hematoxilina. Considerou-se como controlo positivo interno a marcação de células linfóides B e T residentes nas amostras analisadas.

2.2. Interpretação da Imunocitoquímica

O diagnóstico do imunofenótipo B ou T teve como base um sistema de gradação da percentagem de células imunorreativas para cada marcador utilizado, observado ao microscópio óptico:

- 1: <5% de células imunorreativas
- 2: 5-25% de células imunorreativas
- 3: 25-50% de células imunorreativas
- 4: 50-75% de células imunorreativas
- 5: >75% de células imunorreativas

A atribuição de um imunofenótipo dependeu da presença de >75% de células imunorreativas (imunorreatividade de grau 5) para um dos marcadores celulares, em paralelo com uma baixa imunorreatividade celular (imunorreatividade de grau 1 ou 2) para o(s) marcador(es) da linhagem contrária. Assim sendo, o linfoma foi caracterizado como B ou T consoante a positividade prevalente para CD20 e PAX5 ou CD3, respetivamente. Os casos que não se enquadravam nestes parâmetros foram dados como inconclusivos.

As amostras foram ainda classificadas quanto à qualidade da seguinte forma:

- Fraca qualidade: baixa celularidade e/ou abundante lise celular.
- Razoável qualidade: moderada celularidade e/ou ocasional lise celular
- Boa qualidade: elevada celularidade; sem lise celular ou rara lise celular

2.3. Análise estatística

Os dados recolhidos foram organizados sob a forma de uma base de dados no programa *Microsoft Office Excel*®. Posteriormente, a análise estatística envolveu medidas de estatística descritiva (frequências absolutas e relativas, médias e respetivos desvios-padrão) para a determinação do imunofenótipo do LC e caracterização da amostra e estatística inferencial para o estudo da relação entre as variáveis raça, porte, sexo e idade com a variável imunofenótipo. O nível de significância para rejeitar a hipótese nula foi fixado em $\alpha \leq .05$. Nesta, utilizou-se o teste de independência do Qui-quadrado, o teste do Qui-quadrado de ajustamento, o teste de Fisher e o teste t de Student para amostras independentes. A normalidade de distribuição foi analisada com o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de distribuição com o teste de Levene. O pressuposto do Qui-quadrado de que não devem haver mais do que 20% das células com frequências esperadas inferiores a 5 foi analisado. Nas situações em que este pressuposto não estava satisfeito usou-se o teste do Qui-quadrado por simulação de Monte Carlo. As diferenças foram analisadas com o apoio dos resíduos ajustados estandardizados. A análise estatística foi efectuada com o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 27.

IV. Resultados

1. Determinação do imunofenótipo do LC

A técnica de imunocitoquímica utilizada permitiu a imunofenotipagem de 92,8% dos casos (285/307), sendo 84,2% (240/285) classificados como LCB e 15,8% (45/285) como LCT. Nas figuras 13 e 14 encontram-se exemplos de casos de linfoma com imunofenótipo T e B, respetivamente.

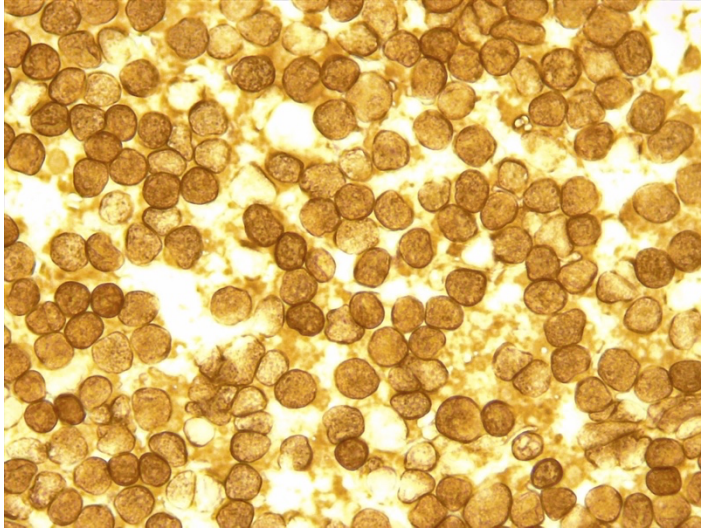


Figura 13 – Linfonodo de um cão com linfoma de células T. Maioria das células imunorreativas para CD3. (x630, CD3) (Fotografia gentilmente cedida pela Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha).

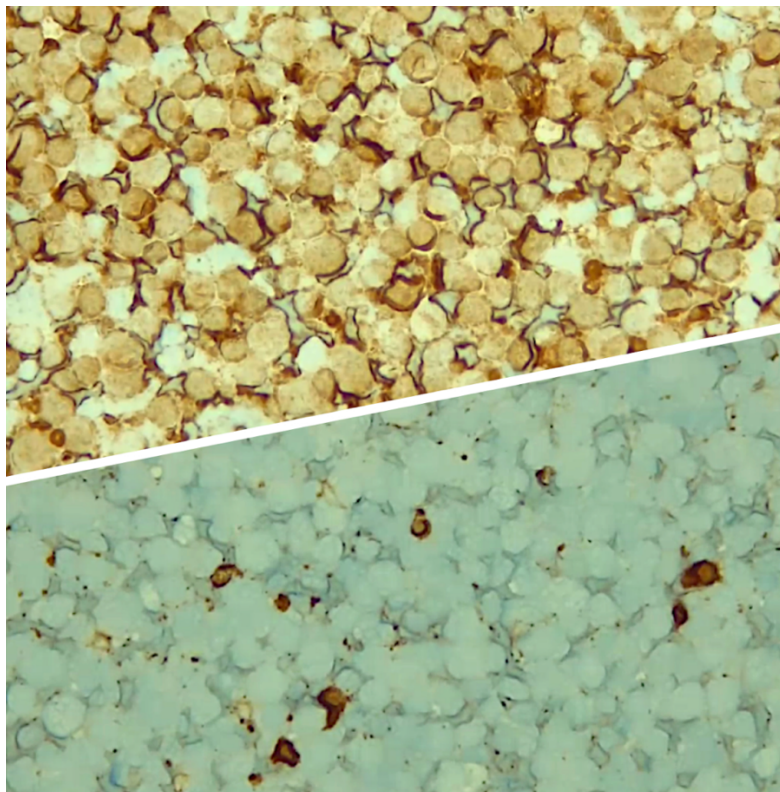


Figura 14 – Linfonodo de um cão com linfoma de células B. Cima - Maioria das células imunorreativas para CD20; Baixo – Raras células imunorreativas para CD3. (x630, CD20 e CD3) (Original da autora).

Os restantes 22 casos (7,2%) foram dados como inconclusivos. Relativamente a estes, observou-se que 50% das amostras eram de boa qualidade, sendo as restantes 27,3% e 22,7% de razoável e fraca qualidade (Figura 15), respetivamente. Na Tabela 7 encontra-se o estudo

pormenorizado dos casos inconclusivos, com a distribuição dos mesmos segundo a imunorreatividade celular para os anticorpos utilizados, bem como a respetiva variação da qualidade da amostra para cada grupo.

Tabela 7 - Distribuição dos casos inconclusivos segundo a IR e variação da qualidade das amostras.

Grupo	IR celular (CD3)	IR celular (CD20)	IR celular (PAX5)	Variação da qualidade da amostra	FA	FR
I	1, 2 ou 3	1 ou 2	1 ou 2	Fraca a boa	16	72,7%
II	3 ou 4	3 ou 4	Não aplicável nestes casos	Fraca a razoável	3	13,6 %
III	1	5 (quando aplicável)	5	Fraca	2	9,1%
IV	5	5	Não aplicável nestes casos	Boa	1	4,6%
Total					22	100%

Legenda: IR – Imunorreatividade; FA – frequência absoluta; FR – frequência relativa; 1: <5% de células imunorreativas; 2: 5-25% de células imunorreativas; 3: 25-50% de células imunorreativas; 4: 50-75% de células imunorreativas; 5: >75% de células imunorreativas.

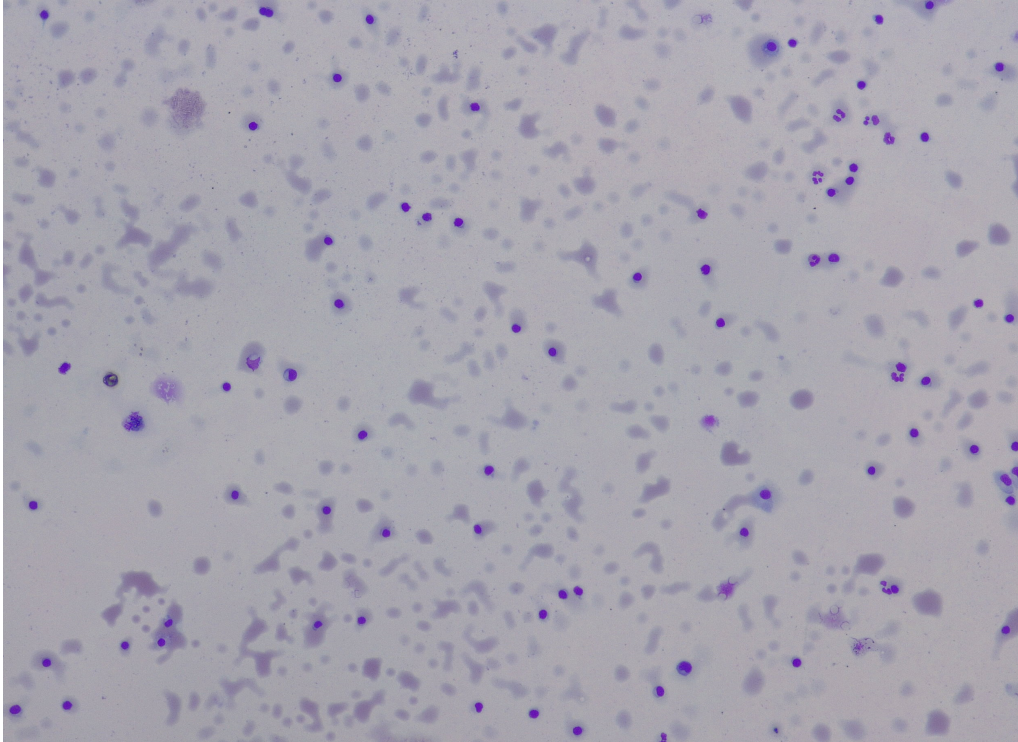


Figura 15 - Exemplo de citologia com escassa celularidade enviada para o laboratório CEDIVET para realização de imunofenotipagem de linfoma. De notar a presença de elevado conteúdo hemático. Pertence ao grupo II dos casos inconclusivos. (x100, May-Grünwald Giemsa) (Fotografia gentilmente cedida pela Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha)

2. Caracterização da amostra de cães com linfoma

Da população de 307 cães incluídos no estudo, obteve-se informação relativa à idade em 285 casos. A média de idade foi de 8,6 anos $\pm$ 3,1 anos e a mediana de 9 anos, variando entre um mínimo de 1 e um máximo de 17 anos (Figura 16). Existe uma maior percentagem de machos (63.5%) e de cães sem raça definida (SRD)/cruzados (50.5%). A restante caracterização da amostra, com a respetiva distribuição das variáveis pelo imunofenótipo, encontra-se representada na Tabela 8. Nesta, encontram-se descritas apenas as raças encontradas com maior frequência, e as restantes categorizadas como “Outras”. No Apêndice A encontram-se listadas todas as raças presentes na amostra.

Tabela 8 - Caracterização da amostra.

Variável	n (%)	B	T	Total
		n (%)	n (%)	
Sexo				
Macho	195 (63,52%)	154 (81,48%)	35 (18,52%)	189 (100%)
Fêmea	110 (35,83%)	85 (90,43%)	9 (9,57%)	94 (100%)
Sem info.	2 (0,65%)	nc	nc	nc
Total	307 (100%)	-		
Porte				
Pequeno	26 (8,47%)	23 (95,83%)	1 (4,17%)	24 (100%)
Médio	45(14,66%)	35 (81,40%)	8 (18,60%)	43 (100%)
Grande	81 (26,38%)	59 (83,10%)	12 (16,90%)	71 (100%)
Sem info.	155 (50,49%)	nc	nc	nc
Total	307 (100%)	-		
Raça				
SRD	155 (50,49%)	123 (83,67%)	24 (16,33%)	147 (100%)
Labrador r.	25 (8,14%)	16 (76,19%)	5 (23,81%)	21 (100%)
Golden r.	15 (4,89%)	11 (91,67%)	1 (8,33%)	12 (100%)
Staff. bull t.	8 (2,61%)	5 (62,50%)	3 (37,50%)	8 (100%)
Boxer	8 (2,61%)	4 (50%)	4 (50%)	8 (100%)
Outras	96 (31,27%)	81 (91,01%)	8 (8,99%)	89 (100%)
Total	307 (100%)	-		

Legenda - Células laranja: frequências relativas e absoluta da amostra total (n = 307). Células azuis: distribuição das variáveis relativamente ao imunofenótipo (B ou T, excluindo os inconclusivos), não contabilizando os casos sem informação; Abreviaturas: nc – não contabilizado; SRD – sem raça definida; Labrador r. – Labrador retriever; Golden r. – Golden retriever; Staff. Bull t. – Staffordshire Bull Terrier.

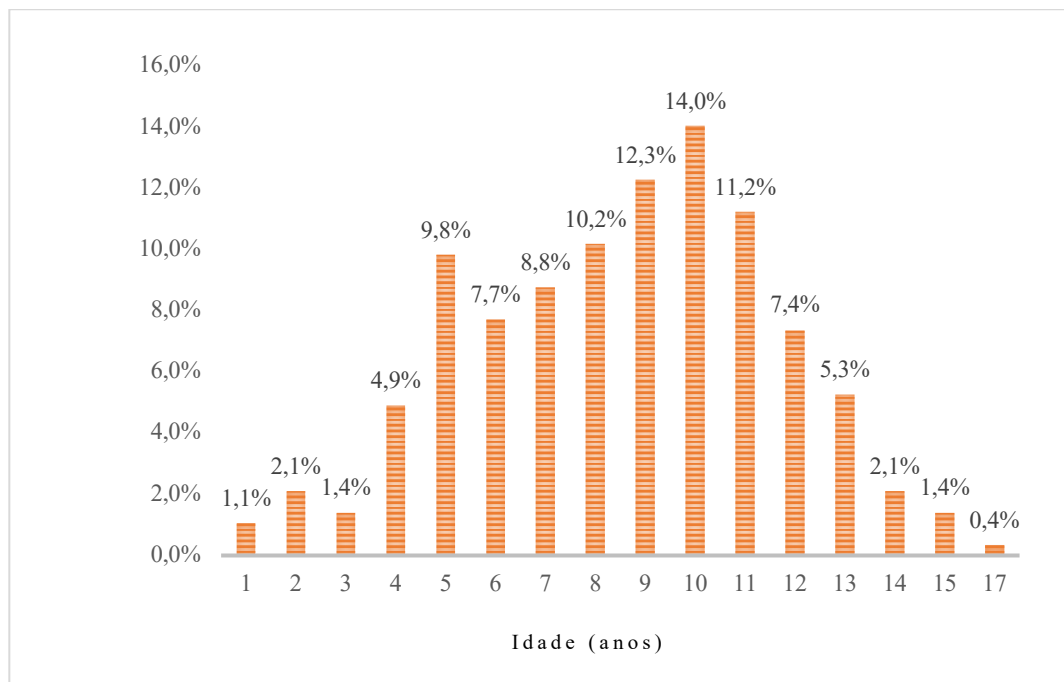


Figura 16 - Gráfico com a distribuição da frequência relativa da idade (em anos) na população estudada.

3. Relação entre variáveis raça, porte, sexo e idade com imunofenótipo

A determinação da relação entre as variáveis referidas com o imunofenótipo foi determinada apenas nos casos com diagnóstico de imunofenótipo (285/307).

3.1. Raça e imunofenótipo

Foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a raça e imunofenótipo ($p = .013$). Foi encontrada uma associação entre a raça Boxer com o imunofenótipo T (resíduos ajustados $> 1,96$) e entre “Outras raças” com o imunofenótipo de células B (resíduos ajustados $> 1,96$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Raças e imunofenótipo.

			Imunofenótipo	
			B	T
Raça	Boxer	Contagem	4	4
		Contagem Esperada	6,7	1,3
		Resíduos ajustados	-2,7	2,7*
	Golden retriever	Contagem	11	1
		Contagem Esperada	10,1	1,9
		Resíduos ajustados	,7	-,7
	Labrador retriever	Contagem	16	5
		Contagem Esperada	17,7	3,3
		Resíduos ajustados	-1,0	1,0
	Outras	Contagem	81	8
		Contagem Esperada	74,9	14,1
		Resíduos ajustados	2,1*	-2,1
	SRD/Cruzado	Contagem	123	24
		Contagem Esperada	123,8	23,2
		Resíduos ajustados	-,3	,3
	Staffordshire bull terrier	Contagem	5	3
		Contagem Esperada	6,7	1,3
		Resíduos ajustados	-1,7	1,7

Legenda: *valores que revelam a existência de associação entre as categorias (resíduos ajustados >1,96).

3.2. Porte e imunofenótipo

A relação entre porte e imunofenótipo foi determinada apenas nos 138 casos em que existia informação relativamente a este parâmetro. A relação encontrada não é estatisticamente significativa ($p = 0.245$).

3.3.Sexo e imunofenótipo

A relação entre o sexo e o imunofenótipo não é estatisticamente significativa ($p = .056$).

3.4. Idade e imunofenótipo

A diferença de idades entre os dois imunofenótipos não é estatisticamente significativa, ($p = 0.408$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Idade e imunofenótipo.

	Imunofenótipo de células B		Imunofenótipo de células T		Sig.
	M	DP	M	DP	
Idade	8.73	2.99	8.32	2.85	0.408

Legenda: M – Média; DP – Desvio padrão.

V. Discussão

Em primeiro lugar, o presente estudo permitiu a classificação de 92,8% dos casos submetidos a ICC em lâminas citológicas previamente coradas, o que revela uma boa eficácia deste exame e um futuro promissor quanto ao seu uso mais difundido.

Relativamente ao diagnóstico do imunofenótipo, a bibliografia consultada refere uma prevalência de 61,4% a 82,6% de LCB, ao passo que os LCT são menos frequentes (13% a 38,6%) (Fournel-Fleury et al., 1997; Dobson et al., 2001; Modiano et al., 2005; Guija de Arespacochaga et al., 2007; Sapierzyński et al., 2010; Comazzi et al., 2018). Neste trabalho, também se verificou uma frequência mais elevada para o imunofenótipo de células B (84,2%), ligeiramente superior à reportada. A frequência do imunofenótipo de células T (15,8%) encontra-se dentro dos valores previamente reportados. Contudo, a percentagem de LCT encontrada poderá ser mais baixa do que a real e, consequentemente, sobrevalorizar a frequência do imunofenótipo B. Tal facto poderá ser resultado de a entidade responsável pelo envio da maioria dos casos ter adotado outros métodos diagnósticos (PARR ou histopatologia/IHC) em certos casos com diagnóstico dubio de linfoma (geralmente linfoma de pequenas células), métodos esses que confirmaram o imunofenótipo T na maioria dos casos. Assim, uma vez que estes casos não foram sujeitos a uma análise ICC, não fizeram parte da presente amostra. Outra possível explicação poderá ser o facto de que os laboratórios poderão não enviar determinadas amostras para imunofenotipagem por deduzirem que, pelas características observadas citologicamente (Figura 9), se trata de um linfoma de células T, sem necessidade de outros exames confirmatórios.

Os casos com imunofenótipo inconclusivo corresponderam a 7,2% dos casos e foram divididos em 4 grupos, de forma a facilitar a sua interpretação (Tabela 7). Ainda que grande parte dos estudos não refira a presença de casos em que não foi possível diagnosticar-se o imunofenótipo, um estudo de Guija de Arespacochaga et al. (2007) referiu uma percentagem ainda maior de casos inconclusivos (19,5%).

O grupo I corresponde à maior parte dos casos sem diagnóstico de imunofenótipo e teve como causa subjacente o facto da imunorreatividade para ambas as linhagens celulares ser relativamente baixa (1, 2 ou 3) (Tabela 7), tendo também sido esta uma das causas subjacentes aos diagnósticos inconclusivos no estudo de Guija de Arespacochaga et al. (2007). Possíveis justificações para estes casos incluem: 1) linfomas não-B-não-T, tal como referido por outros autores (Caniatti et al., 1996; Ponce et al., 2010); 2) imunorreatividade celular diminuída

possivelmente devido à fraca qualidade da amostra, apenas nos casos em que isso se verifica 3) neoplasias não linfoides, cujo diagnóstico citológico prévio tenha sido equívoco. Neste caso, poderia estar presente apenas uma pequena população mista de linfócitos de fundo que justificaria a imunorreatividade.

O grupo II refere-se aos casos cuja percentagem de células imunorreativas para os marcadores (CD3 e CD20) de ambas as linhagens celulares é equivalente (Tabela 7), algo também observado no único caso do grupo IV, ainda que neste seja evidente uma grande percentagem de células imunorreativas e amostra de boa qualidade (Tabela 7). Estes factos podem ter como possíveis justificações: 1) apenas no grupo II, a qualidade da amostra que interfere com a interpretação da imunorreatividade celular; 2) no grupo IV, existência de co-expressão dos marcadores CD3 e CD20 tal como já reportado na literatura (Brachelente et al., 2016; Nakagun et al., 2018; Noland & Kiupel, 2018). Os motivos subjacentes a esta dupla expressão são desconhecidos. Todavia, uma das hipóteses assenta na possibilidade das células T neoplásicas adquirirem uma expressão aberrante do marcador CD20 no curso da sua transformação (Wilkerson et al., 2005; Nakagun et al., 2018). Nos estudos reportados (Brachelente et al., 2016; Nakagun et al., 2018; Noland & Kiupel, 2018), a imunorreatividade celular para PAX5 foi negativa, algo que não foi possível avaliar neste trabalho porque este marcador não foi utilizado nestes casos em específico. Nestes estudos foi ainda, relevante a realização de PARR para apoiar a clonalidade para células T, de forma a confirmar o imunofenótipo. Nos casos do presente estudo não existem informações relativamente à possível existência de técnicas de diagnóstico posteriormente realizadas; 3) possibilidade de se tratar do subtipo específico Linfoma de grandes células B rico em células T, uma condição de diagnóstico desafiante e raramente reportada em cães. Este subtipo de linfoma caracteriza-se por uma população mista constituída por células B neoplásicas e células T, geralmente pequenas, não neoplásicas. Este tipo de população dificulta o diagnóstico uma vez que irá ocorrer a expressão de ambas as linhas celulares (Aquino et al., 2000; Chung et al., 2014); 4) diagnóstico citológico equívoco, tratando-se antes de uma linfadenopatia reactiva; 5) presença de um linfoma composto, uma condição que apresenta uma incidência inferior a 1% de todas as patologias linfoides em Medicina Humana (Wang et al., 2014) e, do conhecimento da autora, apenas reportada uma vez em cães (Matsuyama et al., 2019). O linfoma composto define-se pela presença de duas ou mais formas morfológicas ou de imunofenótipo diferentes que ocorrem no mesmo tecido ou órgão e cujas etiologia e patofisiologia não se encontram ainda bem compreendidas (Demurtas et al., 2011; Wang et al., 2014).

Os casos referentes ao grupo III (Tabela 7) apenas enfatizam a importância de uma amostra de boa qualidade uma vez que nestes casos, apesar de existir uma imunorreatividade celular possivelmente compatível com o imunofenótipo de células B em determinadas áreas intactas da amostra, a abundante lise celular foi frequente na maioria dos campos, o que impossibilitou a emissão de um diagnóstico definitivo.

Relativamente à existência de casos inconclusivos, realça-se a importância da utilização de um painel de marcadores para ambas as linhagens celulares, de modo a aumentar a probabilidade de se obter diagnósticos precisos (Caniatti et al., 1996). Para além disto, estes casos teriam beneficiado de outros métodos de diagnóstico, tais como PARR, de forma a que pudesse existir um esclarecimento adicional quanto à origem celular das neoplasias em questão (Brachelente et al., 2016; Nakagun et al., 2018; Noland & Kiupel, 2018). Contudo, tais informações relativas ao seguimento dos casos são inexistentes.

Como segundo objetivo deste estudo pretendeu-se realizar uma caracterização da amostra dos 307 cães com linfoma (Tabela 8).

No que diz respeito à idade, o LC é diagnosticado em animais com idades variáveis, podendo ir desde animais muito jovens a geriátricos, com uma média de idade ao diagnóstico de 6,3 a 8,1 anos (Gavazza et al., 2001; Edwards et al., 2003; Sözmen et al., 2005; Pinello et al., 2017).. No presente estudo o valor é ligeiramente mais elevado (8,6 anos), com a maioria dos casos entre os 9 e os 11 anos (Figura 16), à semelhança do reportado por (Modiano et al., 2005).

Segundo a literatura veterinária em geral, parece não existir predisposição sexual para o desenvolvimento de LC, apesar desta temática ser ainda ambígua e alvo de alguma discussão (Jankowska et al., 2017). Contudo, grande parte dos estudos consultados referem uma maior prevalência linfoma em machos (56%-62%), comparativamente com fêmeas (38%-44%), à semelhança do que se observa no presente estudo (Tabela 8) (Jagielski et al., 2002; Sapiernyński et al., 2010; Van Rooyen et al., 2018). Isto poderá ir de encontro ao sugerido por Villamil et al., (2009) que, ao encontrar um maior risco para o desenvolvimento de linfoma em cadelas não esterilizadas, em paralelo com o conhecimento de que a incidência de linfoma em mulheres aumenta depois dos 50 anos, levanta a hipótese dos estrogénios endógenos apresentarem um papel protetor no desenvolvimento desta neoplasia. Porém, no presente estudo não houve informações relativas à esterilização ou não dos animais e, portanto, este fator não foi tido em consideração para o estudo.

Relativamente ao porte e à raça, cães sem raça definida (SRD) representam cerca de metade da amostra (Tabela 8), uma frequência mais elevada do que a reportada na literatura

(1% - 30,5%) (Sapierzyński et al., 2010; Vezzali et al., 2010; Valli et al., 2013; Ernst et al., 2016; Pinello et al., 2019), traduzindo-se em igual valor de animais sem informação relativamente ao porte, dado que a categorização relativamente a este último foi realizada tendo em conta a raça. A categorização secundária da raça foi realizada de forma a facilitar a análise estatística, uma vez que a amostra do presente estudo é constituída por uma grande variedade de raças (Apêndice A). Grande parte dos casos com informação relativamente ao porte foram raças de grande porte (Tabela 8) o que vai, de uma forma geral, de acordo com o reportado na literatura (Valli et al., 2013; Pinello et al., 2019). Na literatura veterinária existem diversos estudos que fazem referência à prevalência de linfoma segundo a raça, existindo resultados variáveis consoante a região geográfica (Ponce et al., 2010; Van Rooyen et al., 2018). Estas variações geográficas poderão estar relacionadas com a variável popularidade das raças consoante os locais, levando a que um número mais elevado de determinadas raças seja submetido a cuidados veterinários. Todavia, as raças identificadas de forma mais comum com elevada prevalência de linfoma na literatura são Boxer, Bulmastife e Buldogue inglês, mas também Doberman, Rottweiler, Boiadeiro de Berna, Dogue-de-bordéus, Labrador Retriever e Golden Retriever (Edwards et al., 2003; Jankowska et al., 2017; Comazzi et al., 2018; Van Rooyen et al., 2018). Num estudo recente de Pinello et al. (2019) a raça Labrador retriever aparece como a segunda raça com maior frequência de linfoma, logo a seguir aos cães SRD, à semelhança do observado no presente estudo. Também num estudo de Comazzi et al. (2018) esta raça foi a raça pura mais frequente na amostra. Neste trabalho seguem-se, ainda, por ordem decrescente de frequência, as raças Golden retriever, Staffordshire Bull Terrier e Boxer, algo que não vai totalmente de acordo com a literatura, uma vez que o Boxer geralmente surge como a raça com maior prevalência de linfoma, tendo já sido, inclusive, identificada como uma raça com maior risco de desenvolver esta neoplasia (Edwards et al., 2003).

Foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre o imunofenótipo e a raça, mais concretamente em relação aos Boxers, que apresentam uma associação com o LCT (Tabela 9), apesar de ambos os imunofenótipos apresentarem frequências semelhantes para esta raça (Tabela 8). Por outro lado, as restantes raças apresentam uma elevada frequência de imunofenótipo B (Tabela 8). A relação encontrada entre o Boxer e o LCT remete para a possibilidade desta raça ser predisposta para este imunofenótipo, como já reportado por outros autores (Modiano et al., 2005; Sözmen et al., 2005; Ponce et al., 2010; Comazzi et al., 2018). Particularmente num estudo de Lurie et al. (2008) com uma amostra constituída apenas por Boxers com linfoma multicêntrico, 85% dos casos apresentaram imunofenótipo de células T.

Para além disto, também o Labrador Retriever (Comazzi et al., 2018) e Dogue-de-bordéus (Jankowska et al., 2017) foram raças reportadas com predisposição para este imunofenótipo. A categorização realizada neste estudo impediu determinar qual ou quais as raças com possível predisposição para o imunofenótipo de células B. Todavia, estudos reportam a existência de relação entre este imunofenótipo e as raças Rottweiler e Pastor alemão (Comazzi et al., 2018; Pastor et al., 2009). A predisposição de determinadas raças para linfoma e para determinado subtipo de linfoma, reforça o facto de que heritabilidade terá um papel chave na etiologia desta neoplasia (Modiano et al., 2005; Van Rooyen et al., 2018). Por outro lado, não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre o porte do animal e imunofenótipo. Parte da explicação poderá residir no facto de que todos os cães SRD (mais de metade da amostra) não terem feito parte desta análise estatística em particular, uma vez que não existia informação relativamente ao seu porte. Tal como esperado, observa-se uma elevada frequência do imunofenótipo B em todos os portes (Tabela 8), devido à elevada percentagem de LCB na amostra. É de realçar que, no conhecimento da autora, são raros os estudos que procuraram determinar a relação entre cães categorizados pelo porte e o imunofenótipo. Contudo, num estudo de Pinello et al. (2019) foi encontrada uma relação estatística significativa entre raças de pequeno e médio porte com o imunofenótipo de células B.

Neste estudo, a proporção do imunofenótipo em machos e fêmeas assemelha-se ao observado nas restantes variáveis, com uma elevada frequência de LCB (Tabela 8) devido ao motivo já descrito. Contudo, não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre o sexo e o imunofenótipo, o que vai de encontro ao reportado por Pinello et al. (2019) e Ponce et al. (2010). Em contrapartida, Sözmen et al. (2005) reportou uma predisposição de machos para o imunofenótipo B e a ausência predisposição de sexo para o imunofenótipo de células T.

Relativamente à idade, ainda que para o imunofenótipo B a média de idades seja ligeiramente mais elevada (Tabela 10), não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa, o que vai de acordo com a literatura consultada (Modiano et al., 2005; Ponce et al., 2010).

A imunofenotipagem de linfoma é uma ferramenta essencial para a subclassificação de linfoma e, por sua vez, permite que, a nível clínico, seja feita uma previsão do prognóstico e do tratamento implementado, uma vez que o imunofenótipo de células T (à exceção dos linfomas indolentes), está associado a tempos de remissão mais curtos e a taxas de resposta ao tratamento mais baixas (Dobson et al., 2001; Moore, 2016). Neste caso, a imunofenotipagem realizada em lâminas citológicas previamente coradas numa plataforma automatizada permitiu

a implementação deste método de diagnóstico nas mesmas amostras em que o diagnóstico citológico inicial é efectuado, economizando tempo com novas colheitas realizadas exclusivamente para a análise ICC. Para além disto, permitiu prever a qualidade das amostras de forma a garantir que, sempre que possível, estas dispunham da qualidade necessária (boa celularidade com rara ou inexistente lise celular) para a realização da análise. Deste modo, é possível obter-se o diagnóstico de linfoma e posterior subclassificação relativamente ao imunofenótipo, com apenas uma colheita de amostra minimamente invasiva. Através desta técnica é possível obter-se resposta relativamente ao imunofenótipo num período de 1-3 dias, algo que tem vindo a ser vantajoso para as entidades laboratoriais que, a nível Europeu, solicitam este serviço.

Este trabalho conta com algumas limitações, existindo a falta de algumas informações que poderiam ter sido relevantes para o trabalho. Informação relativamente ao peso dos animais teria permitido uma categorização relativamente ao porte na totalidade dos casos, permitindo uma análise estatística mais fidedigna relativamente a este parâmetro. Por outro lado, conhecimento relativamente ao curso dos casos teria sido conveniente no esclarecimento do diagnóstico final dos casos sem imunofenótipo diagnosticado, determinando assim a causa subjacente a estes resultados inconclusivos. Por último, outra limitação deste estudo reside no facto de não terem sido realizados, em paralelo, outros métodos *gold standard* (histopatologia e IHC) para confirmação dos diagnósticos, particularmente para os inconclusivos. Contudo, a validação da técnica de ICC foi já efectuada por Raskin et al. (2019) e Dörfelt et al. (2019), e o protocolo realizado neste estudo foi validado internamente, previamente à realização deste estudo.

Este trabalho proporcionou o estudo de linfoma e respetivo imunofenótipo numa grande amostra populacional de 307 cães, tendo também procurado esclarecer a existência de determinadas características que possivelmente ditem a predisposição para determinado imunofenótipo. Do conhecimento da autora, este é um dos poucos estudos em medicina veterinária e o único em Portugal que refere a utilização de lâminas citológicas previamente coradas para análise ICC, apresentado uma casuística consideravelmente superior aos poucos previamente reportados na literatura.

VI. Conclusão

Em suma, o presente estudo avaliou 307 casos de LC classificados com ICC em lâminas citológicas previamente coradas, caracterizando-se ainda a amostra e a relação do imunofenótipo com as variáveis relacionadas com os animais (raça, porte, sexo e idade). Foi possível determinar-se o imunofenótipo em 92,8% dos casos e o linfoma mais frequentemente diagnosticado foi o de células B (84,2%). Procurou-se propor possíveis justificações para os 7,2% de casos inconclusivos. A amostra revelou uma elevada frequência de cães SRD diagnosticados com linfoma, maioritariamente machos, de porte grande e com uma idade média de 8,6 anos. Foi possível determinar-se uma relação estatisticamente significativa entre o imunofenótipo e a raça, verificando-se uma associação entre a raça Boxer com LCT. Os resultados foram, de uma forma geral, de acordo com a literatura consultada.

Os objetivos deste estudo, apesar das limitações já referidas, foram atingidos. Contudo, ressalva-se o facto de não ter sido possível obter-se conclusões definitivas em relação aos casos sem imunofenótipo diagnosticado.

Este estudo levanta a possibilidade a existência de possíveis fatores genéticos com impacto na etiologia de linfoma e respetivo subtipo, na medida em que determinadas raças parecem determinar a predisposição tanto para linfoma como para certos subtipos.

No futuro, seria interessante realizar um estudo semelhante complementado por um vasto painel de marcadores na análise ICC, em paralelo com análise histopatológica e IHC de forma a confirmar o diagnóstico e estudar a concordância entre ambos os métodos. Acrescentado a isto, do ponto de vista clínico, seria determinante a recolha de toda a informação clínica dos casos, de forma a estudar a relação dos subtipos de linfoma com a resposta ao tratamento e respetivo prognóstico. Por último, seria de valor a expansão do estudo com outras espécies animais, nomeadamente felinos, equinos ou espécies exóticas.

VII. Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). Introduction to the Immune System Nomenclature, General Properties, and Components. In *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* (5^a ed., pp. 1–25). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Aquino, S. M., Hamor, R. E., Valli, V. E., Kitchell, B. E., Tunev, S. S., Bailey, K. L., & Ehrhart, E. J. (2000). Progression of an orbital T-cell rich B-cell lymphoma to a B-cell lymphoma in a dog. *Veterinary Pathology*, 37(5), 465–469. <https://doi.org/10.1354/vp.37-5-465>
- Beaver, L. M., Strottner, G., & Klein, M. K. (2010). Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237(9), 1052–1055. <https://doi.org/10.2460/javma.237.9.1052>
- Bezuidenhout, A. J. (2013). The Lymphatic System. In Saunders (Ed.), *Miller's Anatomy of the Dog* (4^a ed., pp. 535–560). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Biller, B., Berg, J., Garrett, L., Ruslander, D., Wearing, R., Abbott, B., Patel, M., Smith, D., & Bryan, C. (2016). 2016 AAHA oncology guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 52(4), 181–204. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6570>
- Blackwood, L., German, A. J., Stell, A. J., & O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *Journal of Small Animal Practice*, 45(5), 259–262. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00233.x>
- Blauvelt, M., & Messick, J. B. (2020). The Lymph Nodes. In A. Valenciano (Ed.), *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (5^a ed., pp. 171–181). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Brachelente, C., Affolter, V. K., Fondati, A., Porcellato, I., Sforza, M., Lepri, E., Mechelli, L.,

- & Bongiovanni, L. (2016). CD3 and CD20 Coexpression in a Case of Canine Cutaneous Epitheliotropic T-Cell Lymphoma (Mycosis Fungoides). *Veterinary Pathology*, 53(3), 563–566. <https://doi.org/10.1177/0300985815604724>
- Brodsky, E. M., Maudlin, G. N., Lachowicz, J. L., & Post, G. S. (2009). Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 578–584. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0289.x>
- Burnett, R. C., Vernau, W., Modiano, J. F., Olver, C. S., Moore, P. F., & Avery, A. C. (2003). Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology*, 40(1), 32–41. <https://doi.org/10.1354/vp.40-1-32>
- Burry, R. W. (2011). Controls for immunocytochemistry: An update. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59(1), 6–12. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956920>
- Burton, A. G. (2018). Hemolymphatic. In *Clinical Atlas of Small Animal Cytology* (1^a ed., p. 109). Hoboken, NJ: WILEY Blackwell.
- Camus, M. S., Kelly, L. S., & Barger, A. M. (2020). Immunocytochemistry. In A. Valenciano (Ed.), *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (5^a ed., pp. 512–519). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S., & Moore, P. F. (1996). Canine lymphoma: Immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Veterinary Pathology*, 33(2), 204–212. <https://doi.org/10.1177/030098589603300210>
- Chan, C. M., Frimberger, A. E., & Moore, A. S. (2018). Clinical outcome and prognosis of dogs with histopathological features consistent with epitheliotropic lymphoma: a retrospective study of 148 cases (2003–2015). *Veterinary Dermatology*, 29(2), 154-e59. <https://doi.org/10.1111/vde.12504>
- Chung, T. H., Lamm, C., Choi, Y. C., Lee, J. W., Yu, D., & Choi, U. S. (2014). A rare case of hepatic T-cell rich B-cell lymphoma (TCRBCL) in a juvenile dog. *Journal of Veterinary*

- Medical Science*, 76(10), 1393–1397. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0088>
- Cienava, E. A., Barnhart, K. F., Brown, R., Mansell, J., Dunstan, R., & Credille, K. (2004). Morphologic, immunohistochemical, and molecular characterization of hepatosplenic T-cell lymphoma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(2), 105–110. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00357.x>
- Comazzi, S., Aresu, L., Burton, J. H., & Avery, P. R. (2021). Lymph Nodes. In L. C. Sharkey, M. J. Radin, & D. Seelig (Eds.), *Veterinary Cytology* (1a ed., pp. 319–331). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Comazzi, S., & Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Veterinary Journal*, 188(2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.011>
- Comazzi, Stefano, Marelli, S., Cozzi, M., Rizzi, R., Finotello, R., Henriques, J., Pastor, J., Ponce, F., Rohrer-Bley, C., Rütgen, B. C., & Teske, E. (2018). Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: An European canine lymphoma network study. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1557-2>
- Correia, J. (2011). Órgãos Linfóides. In Lidel (Ed.), *Atlas de Citologia Veterinária* (1ª ed., pp. 142–164). Lisboa: Lidel, LDA.
- Craun, K., Ekena, J., Sacco, J., Jiang, T., Motsinger-Reif, A., & Trepanier, L. A. (2020). Genetic and environmental risk for lymphoma in boxer dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(5), 2068–2077. <https://doi.org/10.1111/jvim.15849>
- Cunha, N. P. (2016) *Immunocytochemistry in diagnostic cytology* no 18th ESVCP annual congress and ESVONC annual congress, Nantes, França.
- Cunha, N. P. (2020) *Linfoma – diagnóstico e tipificação só com uma punção* no XVI Congresso Internacional Veterinário Montenegro, Santa Maria da Feira, Portugal

- Day, M. J. (1995). Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 112(1), 79–96. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80091-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80091-X)
- Demurtas, A., Aliberti, S., Bonello, L., Di Celle, P. F., Cavaliere, C., Barreca, A., Novero, D., & Stacchini, A. (2011). Usefulness of multiparametric flow cytometry in detecting composite lymphoma: Study of 17 cases in a 12-year period. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(4), 541–555. <https://doi.org/10.1309/AJCPQKE25ADCFZWN>
- Deravi, N., Berke, O., Woods, J. P., & Bienzle, D. (2017). Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191(July), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.008>
- Dobson, J. M., Blackwood, L. B., McInnes, E. F., Bostock, D. E., Nicholls, P., Hoather, T. M., & Tom, B. D. M. (2001). Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, 42(8), 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2001.tb02485.x>
- Dörfelt, S., Matiasek, L. A., Felten, S., Sangl, L., Hartmann, K., & Matiasek, K. (2019). Antigens under cover—The preservation and demasking of selected antigens for successful poststaining immunocytochemistry of effusion, brain smears, and lymph node aspirates. *Veterinary Clinical Pathology*, 48(S1), 98–107. <https://doi.org/10.1111/vcp.12702>
- Dupré, M. P., & Courtade-Saidi, M. (2012). Immunocytochemistry as an adjunct to diagnostic cytology. *Annales de Pathologie*, 32(6), e47–e51. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2012.09.205>
- Edwards, D. S., Henley, W. E., Harding, E. F., Dobson, J. M., & Wood, J. L. N. (2003). Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 1(4), 200–206. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2003.00025.x>

- Ernst, T., Kessler, M., Lautscham, E., Willimzig, L., & Neiger, R. (2016). Das multizentrische Lymphom bei 411 Hunden -eine epidemiologische Studie. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*, 44(4), 245–251. <https://doi.org/10.15654/TPK-150338>
- Feldman, A. L., & Dogan, A. (2007). Diagnostic uses of Pax5 immunohistochemistry. *Advances in Anatomic Pathology*, 14(5), 323–334. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3180ca8a49>
- Felten, S., Hartmann, K., Doerfelt, S., Sangl, L., Hirschberger, J., & Matiassek, K. (2019). Immunocytochemistry of mesenteric lymph node fine-needle aspirates in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(2), 210–216. <https://doi.org/10.1177/1040638718825280>
- Fernandez, N. J., West, K. H., Jackson, M. L., & Kidney, B. A. (2005). Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Veterinary Pathology*, 42(4), 437–445. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-437>
- Flood-Knapik, K. E., Durham, A. C., Gregor, T. P., Sánchez, M. D., Durney, M. E., & Sorenmo, K. U. (2013). Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 272–286. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00317.x>
- Fontaine, S. J., McCulloch, E., Eckersall, P. D., Haining, H., Patterson Kane, J. C., & Morris, J. S. (2017). Evaluation of the modified Glasgow Prognostic Score to predict outcome in dogs with newly diagnosed lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1513–1526. <https://doi.org/10.1111/vco.12296>
- Fournel-Fleury, C., Magnol, J. P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P. A., & Felman, P. (1997). Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: Comparison with human non-hodgkin's lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117(1), 35–59. <https://doi.org/10.1016/S0021->

9975(97)80065-5

- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J. L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I., & Magnol, J. P. (2002). Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. *Veterinary Pathology*, 39(1), 92–109. <https://doi.org/10.1354/vp.39-1-92>
- Frances, M., Lane, A. E., & Lenard, Z. M. (2013). Sonographic features of gastrointestinal lymphoma in 15 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 54(9), 468–474. <https://doi.org/10.1111/jsap.12117>
- Gama, P. (2017). Sistema Imunitário e Órgãos Linfáticos. In G. Koogan (Ed.), *Histologia Básica* (13^a ed., pp. 893–985). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA.
- Gavazza, A., Lubas, G., Valori, E., & Gugliucci, B. (2008). Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: Clinical, therapeutical and prognostic features. *Veterinary Research Communications*, 32(SUPPL. 1), 1991–1993. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9131-1>
- Gavazza, Alessandra, Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G., & Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(3), 190–195. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2001.tb02310.x>
- Gieger, T. (2011). Alimentary Lymphoma in Cats and Dogs. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(2), 419–432. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.02.001>
- Guija de Arespachochaga, A., Schwendenwein, I., & Weissenböck, H. (2007). Retrospective Study of 82 Cases of Canine Lymphoma in Austria based on the Working Formulation and Immunophenotyping. *Journal of Comparative Pathology*, 136(2–3), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.01.009>

- Haines, D. M., & West, K. H. (2005). Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1-2 SPEC. ISS.), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.007>
- Hartley, G., Elmslie, R., Murphy, B., Hopkins, L., Guth, A., & Dow, S. (2019). Cancer stem cell populations in lymphoma in dogs and impact of cytotoxic chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 17(1), 69–79. <https://doi.org/10.1111/vco.12447>
- Huang, S. H., Kozak, P. J., Kim, J., Habineza-Ndikuyeze, G., Meade, C., Gaurnier-Hausser, A., Patel, R., Robertson, E., & Mason, N. J. (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology*, 427(2), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.013>
- Ito, D., Frantz, A. M., & Modiano, J. F. (2014). Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: Recent progress and applications. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 159(3–4), 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.016>
- Jagielski, D., Lechowski, R., Hoffmann-Jagielska, M., & Winiarczyk, S. (2002). A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 49(8), 419–424. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00458.x>
- Jankowska, U., Jagielski, D., Czopowicz, M., & Sapiernyński, R. (2017). The animal-dependent risk factors in canine T-cell lymphomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 307–314. <https://doi.org/10.1111/vco.12164>
- Keller, E. T. (1992). Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. *Cancer*, 70(9), 2334–2337. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19921101\)70:9<2334::AID-CNCR2820700920>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19921101)70:9<2334::AID-CNCR2820700920>3.0.CO;2-7)
- Keller, S. M., Vernau, W., Hodges, J., Kass, P. H., Vilches-Moure, J. G., McElliot, V., &

- Moore, P. F. (2013). Hepatosplenic and Hepatocytotropic T-Cell Lymphoma: Two Distinct Types of T-Cell Lymphoma in Dogs. *Veterinary Pathology*, 50(2), 281–290. <https://doi.org/10.1177/0300985812451625>
- Kliczkowska-Klarowicz, K., Jagielski, D., Czopowicz, M., & Sapierzyński, R. A. (2021). Demographic and clinical characteristics of dogs with centroblastic lymphoma. *International Journal of One Health*, 14(1), 49–55. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.49-55>
- Konig, H. E., & Liebich, H. G. (2011). Sistema Imune e Órgãos Linfáticos. In L. A. Souza (Ed.), *Anatomia dos Animais Domésticos* (4ª ed., pp. 495–508). Porto Alegre: artmed.
- Labadie, J. D., Magzamen, S., Morley, P. S., Anderson, G. B., Yoshimoto, J., & Avery, A. C. (2019). Associations of environment, health history, T-zone lymphoma, and T-zone-like cells of undetermined significance: A case-control study of aged Golden Retrievers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 764–775. <https://doi.org/10.1111/jvim.15405>
- Lane, J., Price, J., Moore, A., Dandrieux, J. R. S., Clifford, C., Curran, K., Choy, K., & Cannon, C. (2018). Low-grade gastrointestinal lymphoma in dogs: 20 cases (2010 to 2016). *Journal of Small Animal Practice*, 59(3), 147–153. <https://doi.org/10.1111/jsap.12769>
- Lanza, M. R., Musciano, A. R., Dubielzig, R. D., & Durham, A. C. (2018). Clinical and pathological classification of canine intraocular lymphoma. *Veterinary Ophthalmology*, 21(2), 167–173. <https://doi.org/10.1111/vop.12492>
- Lurie, D. M., Milner, R. J., Suter, S. E., & Vernau, W. (2008). Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(1–2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.05.009>
- Marchetti, V., Benetti, C., Citi, S., & Taccini, V. (2005). Paraneoplastic hypereosinophilia in a

- dog with intestinal T-cell lymphoma. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(3), 259–263.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00051.x>
- Marconato, L., Polton, G. A., Sabattini, S., Dacasto, M., Garden, O. A., Grant, I., Hendrickx, T., Henriques, J., Lubas, G., Morello, E., Stefanello, D., & Comazzi, S. (2017). Conformity and controversies in the diagnosis, staging and follow-up evaluation of canine nodal lymphoma: a systematic review of the last 15 years of published literature. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 1029–1040. <https://doi.org/10.1111/vco.12244>
- Marconato, L., Stefanello, D., Valenti, P., Bonfanti, U., Comazzi, S., Roccabianca, P., Caniatti, M., Romanelli, G., Massari, F., & Zini, E. (2011). Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(4), 2–7.
- Matsumoto, I., Nakashima, K., Goto-Koshino, Y., Chambers, J. K., Tsujimoto, H., Nakayama, H., & Uchida, K. (2019). Immunohistochemical Profiling of Canine Intestinal T-Cell Lymphomas. *Veterinary Pathology*, 56(1), 50–60.
<https://doi.org/10.1177/0300985818800015>
- Matsuyama, A., Bienzle, D., Richardson, D., Deravi, N., Hwang, M. H., Darzentas, N., & Keller, S. M. (2019). Composite lymphoma of concurrent T zone lymphoma and large cell B cell lymphoma in a dog. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12917-019-2154-8>
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Modiano, J. F., Breen, M., Burnett, R. C., Parker, H. G., Inusah, S., Thomas, R., Avery, P. R., Lindblad-Toh, K., Ostrander, E. A., Cutter, G. C., & Avery, A. C. (2005). Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable

- risk. *Cancer Research*, 65(13), 5654–5661. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4613>
- Monti, P., & Cian, F. (2016). Diagnostic Cytology. In E. Villiers & J. Ristic (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology* (3^a ed., pp. 429–430). Gloucester: BSAVA.
- Moore, A. S. (2016). Treatment of T cell lymphoma in dogs. *Veterinary Record*, 179(11), 277–281. <https://doi.org/10.1136/vr.103456>
- Moore, E. L., Vernau, W., Rebhun, R. B., Skorupski, K. A., & Burton, J. H. (2018). Patient characteristics, prognostic factors and outcome of dogs with high-grade primary mediastinal lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(1), E45–E51. <https://doi.org/10.1111/vco.12331>
- Morgan, E. A., Pozdnyakova, O., Nascimento, A. F., & Hirsch, M. S. (2013). PAX8 and PAX5 are differentially expressed in B-cell and T-cell lymphomas. *Histopathology*, 62(3), 406–413. <https://doi.org/10.1111/his.12020>
- Morgan, E., O’Connell, K., Thomson, M., & Griffin, A. (2018). Canine T cell lymphoma treated with lomustine, vincristine, procarbazine, and prednisolone chemotherapy in 35 dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(4), 622–629. <https://doi.org/10.1111/vco.12430>
- Nakagun, S., Horiuchi, N., Watanabe, K., Matsumoto, K., Tagawa, M., Shimbo, G., & Kobayashi, Y. (2018). CD3 and CD20 co-expression in a case of canine peripheral T-cell lymphoma with prominent cardiac and peripheral nerve involvement. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30(5), 779–783. <https://doi.org/10.1177/1040638718794765>
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>

- Noland, E. L., & Kiupel, M. (2018). Coexpression of CD3 and CD20 in Canine Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 55(2), 241–244. <https://doi.org/10.1177/0300985817747326>
- Ohno, H., Nakagawa, M., Kishimori, C., Fukutsuka, K., Maekawa, F., Takeoka, K., Hayashida, M., Sakamoto, S., Akasaka, T., & Honjo, G. (2020). Diffuse large B-cell lymphoma carrying t(9;14)(p13;q32)/PAX5-immunoglobulin heavy chain gene is characterized by nuclear positivity of MUM1 and PAX5 by immunohistochemistry. *Hematological Oncology*, 38(2), 171–180. <https://doi.org/10.1002/hon.2716>
- Ota-Kuroki, J., Ragsdale, J. M., Bawa, B., Wakamatsu, N., & Kuroki, K. (2014). Intraocular and periocular lymphoma in dogs and cats: A retrospective review of 21 cases (2001–2012). *Veterinary Ophthalmology*, 17(6), 389–396. <https://doi.org/10.1111/vop.12106>
- Owen, L. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organisation*, 1–52. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19812266568.html>
- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J. P., Fournel-Fleury, C., & Ponce, F. (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: Breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(2), 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0255.x>
- Pazdzior-Czapula, K., Mikiewicz, M., Gesek, M., Zwolinski, C., & Otrocka-Domagala, I. (2019). Diagnostic immunohistochemistry for canine cutaneous round cell tumours — Retrospective analysis of 60 cases. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 57(3), 146–154. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2019.0016>
- Pinello, K. C., Niza-Ribeiro, J., Fonseca, L., & de Matos, A. J. (2019). Incidence, characteristics and geographical distributions of canine and human non-Hodgkin's lymphoma in the Porto region (North West Portugal). *Veterinary Journal*, 245, 70–76.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.003>

Pinello, K. C., Santos, M., Leite-Martins, L., Niza-Ribeiro, J., & de Matos, A. J. (2017).

Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke. *Veterinary World*, 10(11), 1307–1313.

<https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1307-1313>

Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M.,

Delignette, M. L., & Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Veterinary Pathology*, 47(3), 414–433.

<https://doi.org/10.1177/0300985810363902>

Ponce, F., Magnol, J. P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K., &

Fournel-Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Veterinary Journal*, 167(2), 158–166.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.10.009>

Prichard, J. W. (2014). Overview of automated immunohistochemistry. *Archives of Pathology*

and Laboratory Medicine, 138(12), 1578–1582. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0083-RA>

Priest, H. L., Hume, K. R., Killick, D., Kozicki, A., Rizzo, V. L., Seelig, D., Snyder, L. A.,

Springer, N. L., Wright, Z. M., & Robat, C. (2017). The use, publication and future directions of immunocytochemistry in veterinary medicine: a consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 868–880.

<https://doi.org/10.1111/vco.12228>

Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*,

42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along:

- Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87.
<https://doi.org/10.1177/0300985813505879>
- Raskin, R. E., Vickers, J., Ward, J. G., Toland, A., & Torrance, A. G. (2019). Optimized immunocytochemistry using leukocyte and tissue markers on Romanowsky-stained slides from dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 48(S1), 88–97.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12759>
- Regan, R. C., Kaplan, M. S. W., & Bailey, D. B. (2013). Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: Results of a survey of veterinarians. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 287–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00318.x>
- Reif, J. S., Lower, K. S., & Ogilvie, G. K. (1995). Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *American Journal of Epidemiology*, 141(4), 352–359.
<https://doi.org/10.1093/aje/141.4.352>
- Rezvani, K., Rouce, R., Liu, E., & Shpall, E. (2017). Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Molecular Therapy*, 25(8), 1769–1781.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.012>
- Roccabianca, P., Avallone, G., Rodriguez, A., Crippa, L., Lepri, E., Giudice, C., Caniatti, M., Moore, P. F., & Affolter, V. K. (2016). Cutaneous Lymphoma at Injection Sites: Pathological, Immunophenotypical, and Molecular Characterization in 17 Cats. *Veterinary Pathology*, 53(4), 823–832. <https://doi.org/10.1177/0300985815623620>
- Rossi, G., Rossi, M., Vitali, C. G., Fortuna, D., Burrioni, D., Pancotto, L., Capecchi, S., Sozzi, S., Renzoni, G., Braca, G., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Ghiara, P., & Taccini, E. (1999). A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 67(6), 3112–3120. <https://doi.org/10.1128/iai.67.6.3112->

3120.1999

- Ruple, A., Avery, A. C., & Morley, P. S. (2017). Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1590–1597. <https://doi.org/10.1111/vco.12258>
- Santangelo, K. S., Schaefer, D. M. W., Burton, S. E. L., & Priest, H. L. (2021). Special Staining Techniques: Application and Quality Assurance. In L. C. Sharkey, M. J. Radin, & D. Seelig (Eds.), *Veterinary Cytology* (1a ed., pp. 47–58). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Santoro, D., Marsella, R., & Hernandez, J. (2007). Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: A retrospective case-control study. *Veterinary Dermatology*, 18(2), 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2007.00582.x>
- Sapierzyński, R. (2010). Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(4), 661–668. <https://doi.org/10.2478/v10181-010-0016-1>
- Sapierzyński, R., Dolka, I., & Fabisiak, M. (2012). High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(2), 247–252. <https://doi.org/10.2478/V10181-011-0141-5>
- Sapierzyński, R., Micuń, J., Jagielski, D., & Jurka, P. (2010). Cytopathology of canine lymphomas (100 cases). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(4), 653–659. <https://doi.org/10.2478/v10181-010-0015-2>
- Schofield, I., Stevens, K. B., Pittaway, C., O'Neill, D. G., Fecht, D., Dobson, J. M., & Brodbelt, D. C. (2019). Geographic distribution and environmental risk factors of lymphoma in dogs under primary-care in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 60(12), 746–754. <https://doi.org/10.1111/jsap.13075>

- Seelig, D. M., Avery, P., Webb, T., Yoshimoto, J., Bromberek, J., Ehrhart, E. J., & Avery, A. C. (2014). Canine t-zone lymphoma: Unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(3), 878–886. <https://doi.org/10.1111/jvim.12343>
- Seelig, D. M., Avery, A. C., Ehrhart, E. J., & Linden, M. A. (2016). The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Veterinary Sciences*, 3(2). <https://doi.org/10.3390/vetsci3020011>
- Sisó, S., Marco-Salazar, P., Moore, P. F., Sturges, B. K., Vernau, W., Wisner, E. R., Bollen, A. W., Dickinson, P. J., & Higgins, R. J. (2017). Canine Nervous System Lymphoma Subtypes Display Characteristic Neuroanatomical Patterns. *Veterinary Pathology*, 54(1), 53–60. <https://doi.org/10.1177/0300985816658101>
- Skoog, L., & Tani, E. (2011). Immunocytochemistry: An indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*, 22(4), 215–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00887.x>
- Sözmen, M., Tasca, S., Carli, E., De Lorenzi, D., Furlanello, T., & Caldin, M. (2005). Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 323–330. <https://doi.org/10.1177/104063870501700404>
- Starrak, G. S., Berry, C. R., Page, R. L., Johnson, J. L., & Thrall, D. E. (1997). Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 38(6), 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1997.tb00863.x>
- Teske, E. (1994). Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: An update. *Veterinary Quarterly*, 16(SUPPL. 1), 2–5. <https://doi.org/10.1080/01652176.1994.9694472>
- Teske, E., & van Heerde, P. (1996). Diagnostic value and reproducibility of fine-needle

- aspiration cytology in canine malignant lymphoma. *Veterinary Quarterly*, 18(3), 112–115.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1996.9694630>
- Thamm, D. H. (2019). Novel Treatments for Lymphoma. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 49(5), 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.004>
- Vail, D. M., Pinkerton, M., & Young, K. M. (2020). Hematopoietic Tumores. In S. J. Withrow & D. M. Vail (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (6^a ed., pp. 688–712). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Valipour, B., Velaei, K., Abedelahi, A., Karimipour, M., Darabi, M., & Charoudeh, H. N. (2019). NK cells: An attractive candidate for cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19352–19365. <https://doi.org/10.1002/jcp.28657>
- Valli, V. E., Bienzle, D., & Meuten, D. J. (2017). Tumors of the Hemolymphatic System. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (5^a ed., pp. 203–2010). Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc.
- Valli, V. E., Kass, P. H., Myint, M. S., & Scott, F. (2013). Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Veterinary Pathology*, 50(5), 738–748.
<https://doi.org/10.1177/0300985813478210>
- Valli, V. E., Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E. J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., ... Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the world health organization criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198–211.
<https://doi.org/10.1177/0300985810379428>
- Valli, V., Peters, E., Williams, C., Shipp, L., Barger, A., Chladny, J., & Hoffmann, W. (2009). Optimizing methods in immunocytochemistry: One laboratory's experience. *Veterinary*

- Clinical Pathology*, 38(2), 261–269. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00119.x>
- Van Rooyen, L. J., Hooijberg, E., & Reyers, F. (2018). Breed prevalence of canine lymphoma in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 89, 1–11. <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1530>
- Vezzali, E., Parodi, A. L., Marcato, P. S., & Bettini, G. (2010). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(1), 38–49. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00201.x>
- Villamil, J. A., Henry, C. J., Hahn, A. W., Bryan, J. N., Tyler, J. W., & Caldwell, C. W. (2009). Hormonal and Sex Impact on the Epidemiology of Canine Lymphoma. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2009, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2009/591753>
- Wang, E., Papavassiliou, P., Wang, A. R., Louissaint, A., Wang, J., Hutchinson, C. B., Huang, Q., Reddi, D., Wei, Q., Sebastian, S., Rehder, C., Brynes, R., & Siddiqi, I. (2014). Composite lymphoid neoplasm of B-cell and T-cell origins: A pathologic study of 14 cases. *Human Pathology*, 45(4), 768–784. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.11.008>
- Wilkerson, M. J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Barber, L., & Avery, A. (2005). Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106(3–4), 179–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.02.020>
- Willmann, M., Müllauer, L., Guija de Arespacochaga, A., Reifinger, M., Mosberger, I., & Thalhammer, J. G. (2009). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(4), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.019>
- Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. Em *Veterinary Quarterly* (Vol. 36, Número

2, pp. 76–104). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1152633>

VIII. Apêndices

Apêndice A - Informação complementar da amostra

Tabela A1 – Frequências relativa e absoluta de todas as raças presentes na amostra.

Raça	Frequência Relativa	Frequência Absoluta
SRD/CRUZADO	50,5%	155
Labrador retriever	8,1%	25
Golden retriever	4,9%	15
Staffordshire bull terrier	2,6%	8
Boxer	2,6%	8
Galgo	2,3%	7
Border collie	2,0%	6
Cocker spaniel	2,0%	6
Bulldogue francês	1,6%	5
Bulmastife	1,6%	5
Beagle	1,6%	5
Cavalier king charles spaniel	1,3%	4
Rottweiler	1,3%	4
Shih-tzu	1,3%	4
Pastor alemão	1,0%	3
Shar-pei	1,0%	3
Chihuahua	1,0%	3
Dogue alemão	1,0%	3
Dobermann	1,0%	3
Springer spaniel inglês	0,7%	2
Serra da estrela	0,7%	2
Schnauzer	0,7%	2
West highland white terrier	0,7%	2
Lhasa apso	0,7%	2
Jack russel terrier	0,7%	2
Yorkshire terrier	0,7%	2
Teckel	0,3%	1
Whippet	0,3%	1
Boiadeiro de Berna	0,3%	1
Dogue de bordéus	0,3%	1
American Staffordshire Terrier	0,3%	1
Pinscher	0,3%	1

Weimaraner	0,3%	1
Pit bull	0,3%	1
Bull terrier	0,3%	1
Pointer inglês	0,3%	1
Bichon Frisé	0,3%	1
Poodle	0,3%	1
Malamute-do-alasca	0,3%	1
Border Terrier	0,3%	1
Terra-nova	0,3%	1
Bichon Maltês	0,3%	1
Parson russell terrier	0,3%	1
Scottish terrier	0,3%	1
Basset Hound	0,3%	1
Airedale Terrier	0,3%	1
Leão da Rodésia	0,3%	1
Total Geral	100,0%	307