



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**DUPLA MARCAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA EM LÂMINAS
PREVIAMENTE CORADAS: IMUNOFENOTIPAGEM DE
LINFOMA CANINO USANDO APENAS UMA LÂMINA
CITOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada pela Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha e co-orientada pela Professora Joana Fonseca

MARTIM MOREIRA DA CUNHA E CABRITA MATIAS, Nº 21702128

2024



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**DUPLA MARCAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA EM LÂMINAS
PREVIAMENTE CORADAS: IMUNOFENOTIPAGEM DE
LINFOMA CANINO USANDO APENAS UMA LÂMINA
CITOLÓGICA**

Data da Defesa: 26 de julho de 2024

Despacho Número: 886/2024

Presidente do Júri: Prof. Doutor Eduardo Marcelino

Orientadora: Prof. Doutora Maria Nazaré Pinto da Cunha

Arguente: Prof. Doutora Tânia Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada pela Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha e co-orientada pela Professora Joana Fonseca

MARTIM MOREIRA DA CUNHA E CABRITA MATIAS, Nº 21702128

2024

À minha avó Lucinda

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a todos os membros da unidade de patologia do Hospital Veterinário Universitário de Lodi da Universidade de Estudos de Milão. Aos professores Mario, Paola, Gabriele, Clarissa, Camilla, Valeria, Pietro, Andrea e Francesco, por me receberem na instituição durante o período de estágio e dispensarem tempo para impulsionar o meu conhecimento.

A toda a equipa do laboratório VEDIS pelo admirável apoio na realização deste trabalho, Catarina, Mariana, e em especial à minha orientadora, Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha, por toda a mentoria, confiança no meu trabalho e amizade.

Aos meus pais, por possibilitarem a minha instrução académica, por me darem a liberdade de aprender com a vida e por me chamarem à atenção nos momentos em que mais preciso.

Aos meus irmãos Miguel e Mafalda, pelo apoio incondicional que sempre me deram.

Aos meus amigos universitários, especialmente ao Tomás (Diatomácea), Vasco (Vascaridius Amaralis), Guga, Joaquim, Maria (Sherock), Jean, Bila e Inês (bechamel dionísio), por serem quem são e terem caracterizado esta fase da minha vida.

Aos meus amigos de sempre, Rafa, Mike e Fred, que me conhecem como eu à palma da minha mão, por estarem sempre presentes em todos os desafios, vitórias e derrotas.

Resumo

A imunocitoquímica (ICC) é uma técnica que pode ser usada para imunofenotipagem de linfoma canino. Contudo, a utilidade da ICC é limitada pela quantidade e qualidade do material citológico disponível para a mesma. Os métodos automatizados são mais precisos e tempo-eficientes, mas os protocolos tradicionais usam apenas um marcador por lâmina, obrigando ao uso de pelo menos duas lâminas citológicas por caso. A marcação *multiplex* imunoenzimática permite a localização de dois ou mais antigénios diferentes na mesma amostra com recurso ao uso de diferentes enzimas e cromogénios para cada marcador. O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o uso de uma técnica de ICC de dupla marcação sequencial numa lâmina citológica previamente corada com May – Grunwald – Giemsa (MGG) para imunofenotipagem de linfoma canino. Para tal, foram retrospectivamente selecionados 31 casos de linfoma canino com diagnóstico de imunofenótipo previamente estabelecido por ICC simples nos seis meses antecedentes, para os quais lâminas de sobra coradas com MGG estavam ainda disponíveis. Para cada caso, foi realizada ICC dupla para Pax5 e CD3 numa plataforma Leica Bond III e as reações desenvolvidas com os cromogénios *Fast Red* e DAB para visualização de cada marcador, respetivamente, e as lâminas digitalizadas com um sistema Leica Aperio GT 450. O diagnóstico, percentagem de células positivas e intensidade da coloração foram comparados entre a marcação dupla e a marcação simples. A funcionalidade de “desconvolução de cor” do software QuPath foi usada para facilitar interpretação da coloração. Em 87% dos casos (27/31) foi possível atribuir um imunofenótipo, aumentando para 93% (27/29) se as lâminas de fraca qualidade forem excluídas. Os restantes casos (2/29) foram definitivamente considerados inconclusivos devido a ausência de coloração do marcador Pax5. A percentagem de células positivas foi idêntica entre as duas técnicas para todos os casos, mas a intensidade da coloração ligeiramente menor para o marcador Pax5, sobretudo em casos de linfoma de células T. Os autores concluem que a dupla marcação ICC pode ser realizada em apenas uma lâmina citológica, providenciando excelente concordância com ICC simples em lâminas de boa qualidade. A avaliação simultânea de marcadores de células B e T é um procedimento simples, rápido e fiável que evita a necessidade de recolheita de amostras nos casos em que apenas uma lâmina citológica está disponível.

Palavras – Chave: marcação *multiplex* imunoenzimática, DAB, *Fast Red*, QuPath, desconvolução de cor

Abstract

Immunocytochemistry (ICC) can be used for canine lymphoma phenotyping. However, ICC utility is limited by the quantity and quality of cytological material available. Automated methods are more accurate and time efficient, but traditional protocols use one slide per marker, obliging the use of at least two slides per case. Immunoenzymatic multiplex labeling allows the localization of two or more different antigens in the same sample using different enzymes and chromogens for each marker. The present study was conducted with the objective to evaluate the use of an ICC double-staining technique with an automated stainer for lymphoma phenotyping using only one previously-stained cytology slide. Thirty-one canine lymphoma cases immunophenotyped with ICC within the previous 6 months, for which spare previously-stained cytology slides were still available, were retrospectively selected. For each case, double-ICC with CD3 and Pax5 was performed on a Leica Bond III, with DAB and Fast-RED chromogens, and the slides were digitalized using a Leica Aperio GT 450. Diagnosis, percentage and intensity of staining of both ICC techniques were compared. QuPath software color deconvolution functionality was used to ease interpretation of staining. The phenotype was achieved on 87% of the cases (27/31) but increased to 94% if poor quality slides were excluded. Two inconclusive cases were due to absence of Pax5 staining. Percentage of stained cells was similar, but intensity of staining was slightly lower for the Pax5 marker on the double-ICC, mainly in cases of T-cell lymphoma. Automated double-ICC can be performed in just 1 cytology smear, providing excellent agreement with conventional ICC technique in good-quality slides. This simultaneous assessment of B and T-cell markers is a simple and fast procedure that avoids the need for resampling when only one slide is available.

Key – words: immunoenzymatic multiplex labeling, DAB, Fast Red, QuPath, color deconvolution

Lista de Abreviaturas

AEC – 3 – amino – 9 – etilcarbazole

AP – Alkaline Phosphatase

ASVCP – American Society for Veterinary Clinical Pathology

DAB – 3, 3 – diaminobenzidine

DLBCL – Diffuse Large B Cell Lymphoma

ECVP – European College of Veterinary Pathologists

FC – Flow Cytometry

FFPE – Formaline Fixed Paraffin Embedded

FL – Follicular Lymphoma

HIER – Heat Induced Epitope Retrieval

HRP – Horseradish Peroxidase

ICC - Immunocytochemistry

Ig - Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

IHC - Immunohistochemistry

MGG – May – Grunwald - Giemsa

MZL – Marginal Zone Lymphoma

PAAF – Punção Aspirativa de Agulha Fina

PARR – Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements

PD – L1 – Programmed Cell Death Ligand 1

PNAAF – Punção Não Aspirativa de Agulha Fina

PTCL – NOS – Peripheral T Cell Lymphoma Not Otherwise Specified

REAL – Revised European – American Classification of Lymphoid Neoplasms

TBMs – Tingible Body Macrophages

T – LBL – T Cell Lymphoblastic Lymphoma

TZL – T Zone Lymphoma

WHO – World Health Organization

Índice Geral

Índice de tabelas	11
Índice de figuras	12
Descrição da Casuística de Estágio	13
 I Introdução.....	16
1. Linfoma Canino.....	16
1.1 Generalidades e Epidemiologia	16
1.2. Sistema de Classificação e Limitações Associadas	16
1.3 Diagnóstico Citológico	18
1.4 Prognóstico	20
2. Imunofenotipagem.....	21
2.1 Técnicas de Imunocoloração: Generalidades	21
2.1.1 Anticorpos.....	21
2.1.2 Natureza de Ligação Anticorpo-Antigénio	22
2.1.3 Método Direto VS Método Indireto.....	23
2.1.4 Método Manual VS Método Automático	24
2.2 Descrição da Técnica ICC	24
2.2.1 Fase Pré-Analítica: Tipo de Amostra, Transporte, Fixação e Armazenamento.....	25
2.2.1.1 Tipo de Amostra.....	25
2.2.1.2 Fixação das Amostras.....	25
2.2.1.3 Armazenamento das Amostras	26

2.2.2 Fase Analítica: Recuperação, Antigénica, Mecanismos de Marcação.....	26
2.2.2.1 Recuperação Antigénica.....	26
2.2.2.2 Mecanismos de Marcação	27
2.2.3 Fase Pós-Analítica: Interpretação e Relato dos Resultados Observados	29
2.3 Controlos, Otimização/ Padronização e Validação dum teste Imunocitoquímico	29
2.3.1 Padronização e Otimização dum Teste Imunocitoquímico.....	29
2.3.2 Validação dum teste Imunocitoquímico	30
2.4 Resultados Incorretos e Solução de Problemas	31
2.4.1 Fraca Intensidade de coloração	31
2.4.2 Excesso de Coloração de Fundo e Falsos-Positivos	31
2.4.3 Falsos-Negativos	32
2.5 Vantagens, Limitações e Potenciais Soluções dos Testes Imunoquímicos	32
2.6 ICC em lâminas previamente coradas	33
2.7 Uso da ICC para Imunofenotipagem de Linfoma Canino	34
3. Análise Multiplex: Aplicações e Utilidades	35
3.1 Generalidades	35
3.2 Aplicações	35
3.3 Técnicas Disponíveis.....	36
3.3.1 Anticorpos Primários Produzidos em Diferentes Espécies	37
3.3.2 Anticorpos Primários Produzidos na Mesma Espécie.....	38

3.4 Aspectos Relevantes Para o Uso Eficaz da Técnica de Dupla Marcação Imunoenzimática.....	40
3.4.1 Escolha dos Cromogéneos	40
3.4.2 Ferramentas de Análise de Imagem	41
3.5 Uso da Dupla Marcação em Lâminas Citológicas.....	41
II Materiais e Métodos.....	43
1. Recolha de Dados, Critérios de Inclusão, Critérios de Exclusão	43
2. Protocolo de Imunocitoquímica Dupla	43
3. Interpretação da Imunocitoquímica	44
3.1. Uso da Desconvolução de Cor no Software QuPath como Auxiliar na Interpretação	46
III Resultados.....	47
1. Resultados Gerais	47
2. Casos Problemáticos	48
2.1. Linfomas de Células T Desafiante e Desconvolução de cor	49
3. Comparação do Nível de Imunoreatividade	51
4. Comparação da Intensidade da coloração	52
IV Discussão.....	53
1. Generalidades	54
2. Casos Problemáticos.....	54
2.1.Reações Inespecíficas e Dupla Negatividade	54
2.2.Linfomas de Células T e Valor Auxiliar da Desconvolução de Cor	55
3. Nível de Imunoreatividade	57
4. Intensidade da Coloração.....	57
5. Comparação com Estudos Prévios	57
6. Limitações do Estudo	58
7. Estudos Futuros	58
8. Considerações Finais	59

V Conclusão	60
VI Referências Bibliográficas	61

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Sistema de gradação da percentagem de células imunoreativas.....	45
--	----

Índice de Figuras

Figura 1 - Gráfico com distribuição do total de amostras registadas quanto à sua origem	14
Figura 2 - Gráfico com distribuição das amostras registadas segundo o tipo de lesão	14
Figura 3 - Caraterização das amostras com diagnóstico de neoplasia.....	15
Figura 4 - Caracterização das lesões inflamatórias quanto ao tipo de leucócito predominante	15
Figura 5 - Estrutura do anticorpo/imunoglobulina	22
Figura 6 - Detecção da ligação anticorpo - antigénio.....	23
Figura 7 - Técnica de dupla marcação simultânea indireta/indireta.....	38
Figura 8 - Técnica de dupla marcação sequencial.....	39
Figura 9 - Imagens representativas dos casos em que a atribuição de um imunofenótipo é clara	47
Figura 10 - Casos em que se verificou imunoreatividade inespecífica	48
Figura 11 - Caso com elevada proporção de células duplamente negativas	49
Figura 12 - Exemplo de caso de linfoma de células T em que a desconvolução de cor facilita a identificação de células residentes.....	50
Figura 13 - Exemplo de caso de linfoma de células T em que a desconvolução de cor não é eficaz no auxílio da identificação de células residentes	51

Descrição da Casuística de Estágio

O estágio curricular realizou-se presencialmente no Departamento de Medicina Veterinária e Ciências Animais do Hospital Veterinário Universitário de Lodi da Universidade de Estudos de Milão, sob orientação do Professor Doutor Mario Caniatti, no período de 3 de Outubro de 2022 a 3 de Fevereiro de 2023.

Durante o período de estágio o autor treinou essencialmente em diagnóstico citopatológico, tendo sido possível acompanhar em menor extensão os serviços de autópsia da unidade, bem como reuniões semanais de discussão de casos de histopatologia, citopatologia e microscopia eletrónica, organizadas pelos residentes e supervisores do Colégio Europeu de Patologia Veterinária (ECVP, do inglês *European College of Veterinary Pathology*) da Universidade de Milão.

A rotina de atividade do autor caracterizou-se (com variações ocasionais) pela análise de amostras citológicas de casos arquivados, realização da coloração das amostras citológicas de rotina (May-Grunwald-Giemsa), posterior análise das mesmas, e interpretação conjunta com o supervisor do total de amostras (arquivadas e de rotina) analisadas nesse dia. Do total de amostras observadas, foram registadas 252 amostras citológicas: 103 amostras de casos arquivados e 149 amostras de rotina. No entanto, a elevada casuística da unidade e o fluxo de trabalho acelerado dos supervisores, associados à adaptação inicial do estagiário a essas mesmas circunstâncias, coletivamente resultaram na falha do registo inicial de amostras de rotina, fazendo com que o número total das mesmas esteja subrepresentado.

As amostras registadas foram agrupadas de acordo com a sua origem em um de sete grupos: (1) Lesões Cutâneas, Subcutâneas e das Mucosas; (2) Órgãos do Sistema Hemolinfático (medula óssea, baço e linfonodos); (3) Órgãos Internos/Viscerais; (4) Efusões, Líquido Cefalorraquidiano, Fluido Sinovial, Lavados Traqueal e Broncoalveolar; (5) Urina/Sedimento Urinário; (6) Sistema Músculo-esquelético (exceto fluido sinovial); e (7) Dados Não Disponíveis (Figura 1)

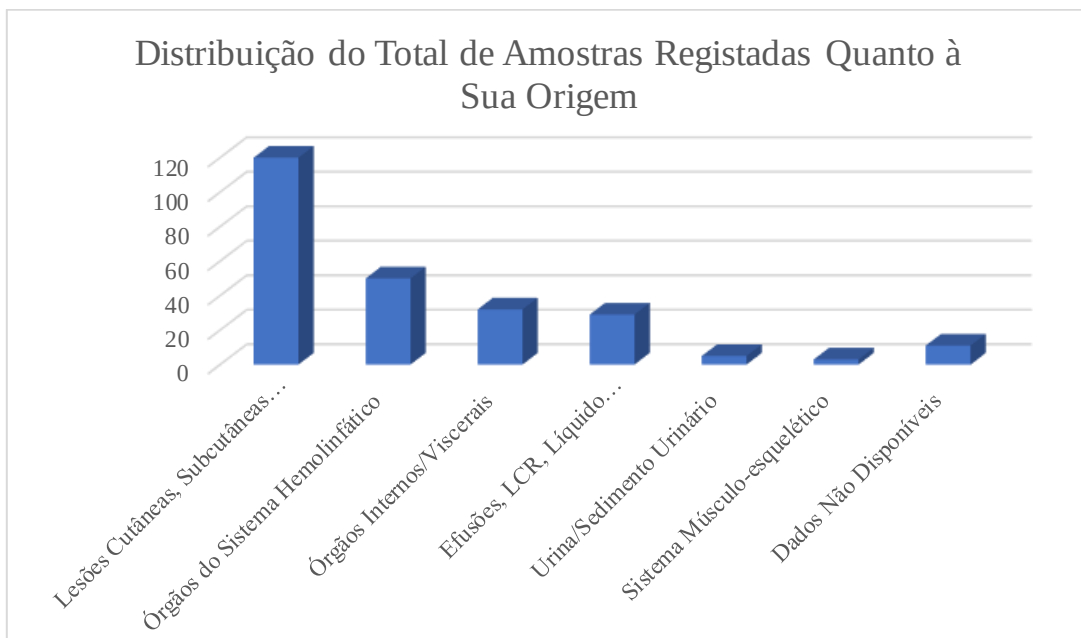


Figura 1. Gráfico com distribuição do total de amostras registradas quanto à sua origem

As amostras registradas foram ainda agrupadas morfolologicamente em (1) Neoplasias; (2) Inflamações; (3) Outras Lesões (quistos, hiperplasias, calcificações, etc); (4) Estadiamentos; e (5) Inconclusivos (Figura 2).

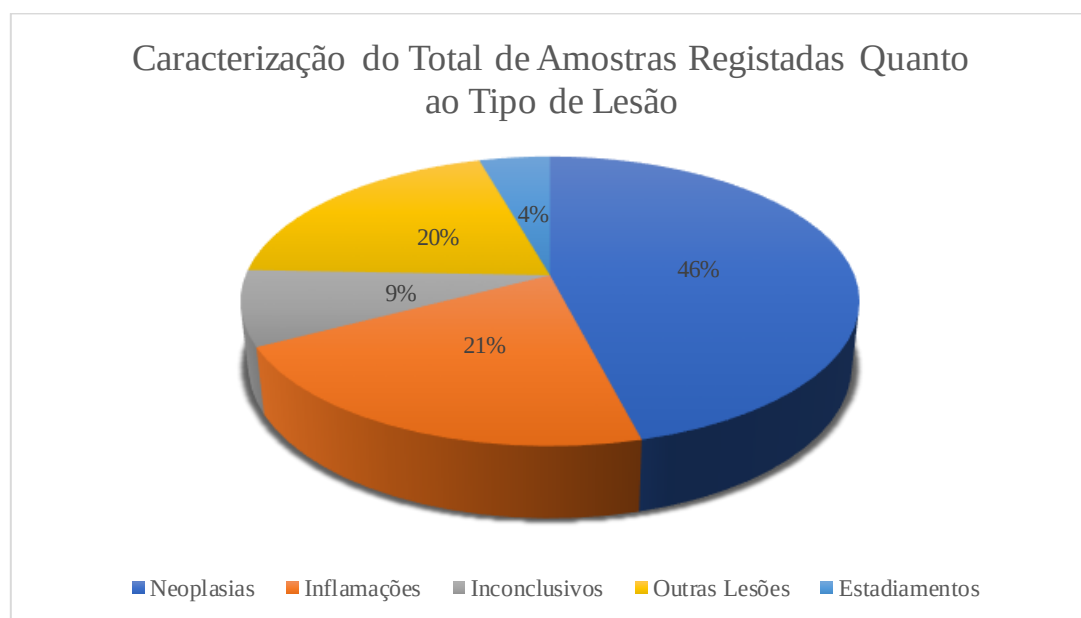


Figura 2: Gráfico com distribuição quantitativa das amostras registradas segundo o tipo de lesão.

As amostras alocadas ao grupo “Neoplasias” foram subdivididas quanto à origem celular (células redondas, epiteliais, mesenquimatosas ou indiferenciadas) e quanto à malignidade (benigna ou maligna) (Figura 3). As amostras alocadas ao grupo “Inflamações” foram subdivididas quanto ao tipo de leucócito predominante (neutrofílica, granulomatosa, piogranulomatosa, eosinofílica, linfocítica/linfoplasmocítica ou mista) (Figura 4).

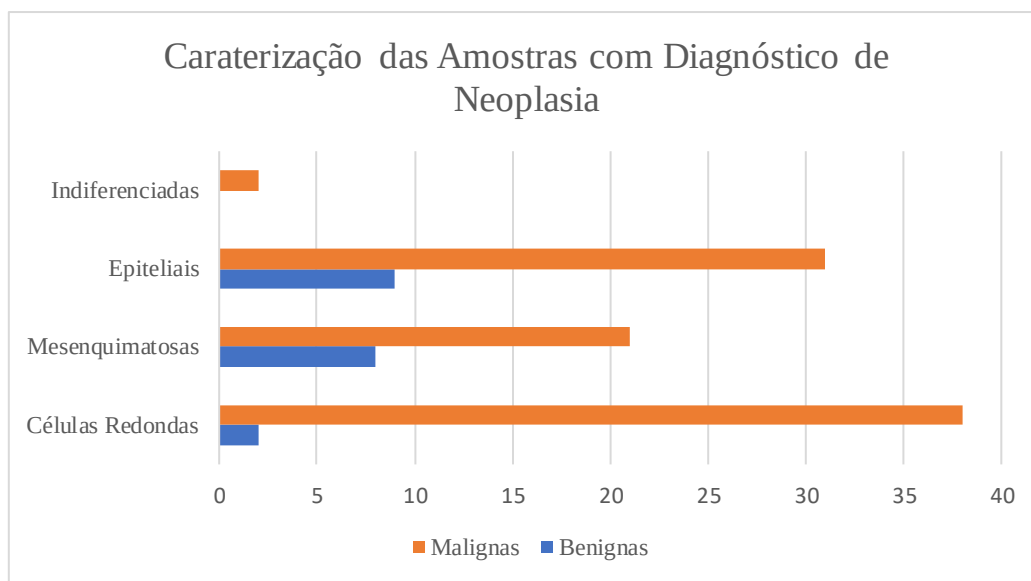


Figura 3: Caraterização das amostras com diagnóstico de neoplasia

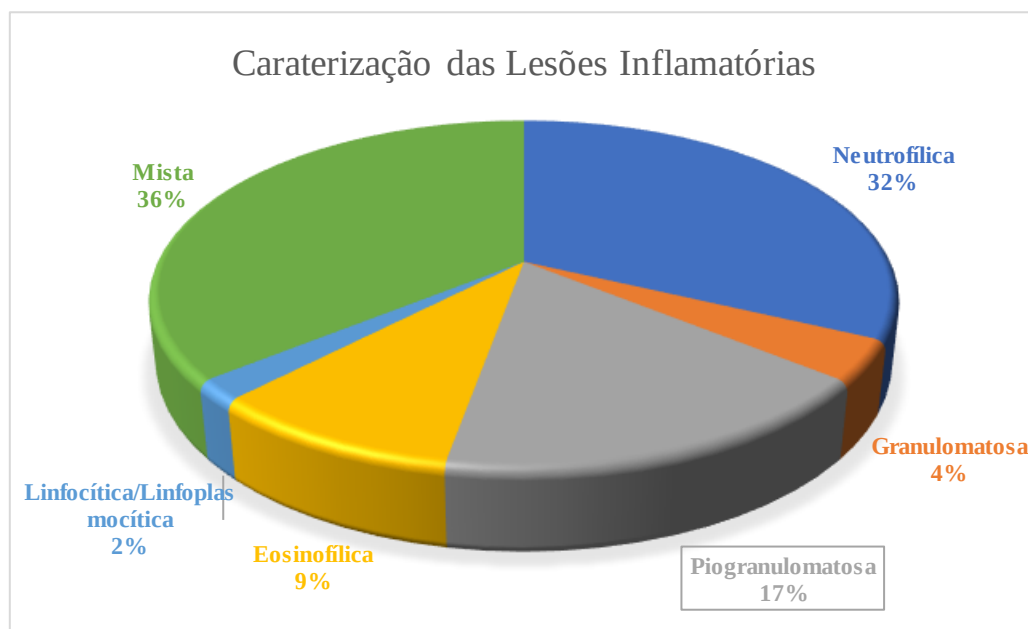


Figura 4: Caracterização das lesões inflamatórias quanto ao tipo de leucócito predominante

I Introdução

1. Linfoma Canino

1.1. Generalidades e Epidemiologia

Os tumores linfóides integram um grupo diverso de neoplasias com origem em células do tecido linfóide extramedular (linfomas) ou que surgem na medula óssea e baço (leucemias). Apesar dos linfomas geralmente aparecerem em tecido linfóide, tal pode acontecer em praticamente quaisquer tecidos do organismo (Vail et al., 2019; Valli et al., 2017).

O linfoma canino é a neoplasia de origem hematopoiética mais comum no cão e está entre as três neoplasias mais diagnosticadas nesta espécie (Dorn et al., 1966, 1968, 1970; Merlo et al., 2008), com uma incidência anual estimada de 1.5 por 100,000 cães com menos de 1 ano de idade e de 84 por 100,000 cães no grupo dos 10 aos 11 anos de idade (Vail et al., 2019). A maioria dos cães afetados tem entre 6 e 9 anos de idade (Vail et al., 2019) e fêmeas inteiras têm menor risco de desenvolver linfoma (Villamil et al., 2009).

Entre as raças sobre-representadas para o acometimento de linfoma canino no geral, incluíam-se os cães sem raça definida, de raça Boxer e Cocker Spaniel (Pastor et al., 2009), Boiadeiro Australiano, Doberman e Rottweiler (Yau et al., 2017), Boieiro de Berna, Bullmastiff e Terrier Escocês (Villamil et al., 2009). Algumas raças, como o Doberman e Boieiro de Berna estão altamente predispostas ao desenvolvimento de linfoma no geral (sem pré-disposição para nenhum subtipo em particular), e noutras, como o Rottweiler e o Boxer, observa-se uma maior prevalência de linfoma de células B e linfoma de células T, respetivamente (Comazzi et al., 2018). A etiologia do linfoma canino é provavelmente multifatorial e as investigações atuais debruçam-se nomeadamente sobre fatores genéticos e moleculares, fatores infecciosos, fatores ambientais e fatores imunológicos (Vail et al., 2019).

1.2. Sistema de Classificação e Limitações Associadas

A classificação de linfoma canino utilizada atualmente foi adaptada da classificação REAL (do inglês *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*) adotada pela WHO (do inglês *World Health Organization*) aplicada no linfoma humano após se observar a

sua aplicabilidade nesta espécie (Harris et al., 1999; Ponce et al., 2010; Swerdlow et al., 2008; Valli et al., 2011). Este sistema utiliza como critérios de classificação todas as informações relevantes para caracterizar cada entidade de doença isolada: topografia, citomorfologia, padrão histológico (difuso, nodular), imunofenótipo celular (linfoma de células B, linfoma de células T e NK), e comportamento biológico da neoplasia (agressivo, intermédio, indolente, resposta a tratamento)(Valli et al., 2011, 2017), com os objetivos de segregar doenças distintas (subtipos) seguindo guidelines reproduzíveis e clinicamente relevantes (Seelig et al., 2016).

Aproximadamente 85% dos linfomas caninos são representados (1) pelo Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL, do inglês *Diffuse Large B Cell Lymphoma*) que compreende cerca de 50% dos casos; (2) pelo Linfoma de Células T Não Especificado (PTCL-NOS, do inglês *Peripheral T Cell Lymphoma Not Otherwise Specified*) com frequência de cerca de 15%; (3) pelo Linfoma de Zona T (TZL, do inglês *T Zone Lymphoma*), que representa 5-10% dos casos; (4) pelo Linfoma de células T Linfoblástico (T-LBL, do inglês *T Cell Lymphoblastic Lymphoma*), que corresponde a 4% dos casos; e (5) pelo Linfoma da Zona Marginal (MZL, do inglês *Marginal Zone Lymphoma*), correspondendo a 5-10% dos casos (Ponce et al., 2010; Seelig et al., 2016; Valli et al., 2011, 2013, 2017; Vezzali et al., 2010). Os restantes 15% incluem linfomas incomuns como o Linfoma Folicular (FL, do inglês *Follicular Lymphoma*), entre outros. (Valli et al., 2011, 2013, 2017).

De notar que a habilidade de um sistema de classificação prever o comportamento biológico de um tumor e orientar as decisões clínicas é o principal objetivo do mesmo em medicina humana e veterinária (Valli et al., 2017). Isto torna-se particularmente difícil para o linfoma em animais por várias razões que de forma geral resultam num número reduzido de animais registados para cada diagnóstico (subtipo de linfoma), heterogeneidade dos dados registados entre casos (Marconato et al., 2017) e perda de *follow-up*, seja por restrições económicas dos tutores, pela decisão dos mesmos em pôr termo ao trabalho diagnóstico a meio do processo, pela prática da eutanásia em casos que o critério de decisão utilizado não é a extensão do tumor, por frequentemente não se realizar autópsia para determinar recorrência, metastização, quais os órgãos do sistema linfático envolvidos, entre outros (Valli et al., 2017).

Em adição, é uma realidade prática que através de análise citológica e imunofenotipagem se chegue a um diagnóstico que providencia importantes informações prognósticas, deixando

vários casos avaliados sem histopatologia e pesquisa detalhada da distribuição anatômica devido à dificuldade em justificar a realização de uma biópsia excisional, necessária para avaliar o padrão histológico, mas que requer anestesia geral. Consequentemente a classificação destes casos permanece incompleta (Valli et al., 2017).

Uma complicação adicional advém do facto de diferentes métodos de imunofenotipagem providenciarem resultados contrastantes. Thalheim e colaboradores (2013) avaliaram a determinação do imunofenótipo por imunohistoquímica (IHC, do inglês *immunohistochemistry*), citometria de fluxo (FC, do inglês, *Flow Cytometry*), e Reação em Cadeia de Polimerase para Rearranjo de Recetores Antigénio (PARR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangement*). A concordância entre os diferentes métodos foi de 94% entre IHC e a FC, de 70% entre IHC e PARR, de 63% entre FC e PARR e de 63% entre os três testes.

Em suma, para minimizar as limitações do atual sistema de classificação de linfomas em medicina veterinária seriam necessárias avaliações precisas da evolução clínica e achados de autópsia em número de animais suficiente por cada subtipo de linfoma, comparações entre grupos tratados e não tratados e padronização dos meios de diagnóstico utilizados para a classificação (Valli et al., 2017).

1.3. Diagnóstico Citológico

A classificação de Kiel atualizada, baseada em citomorfologia e atividade mitótica, considera-se adequada para efeitos de análise citológica (Raskin, 2023; Teske, 2014), uma vez demonstrada a aplicabilidade no linfoma canino e importância prognóstica (Kiupel et al., 1999; Teske et al., 1994). Alguns autores afirmam ser possível distinguir os subtipos de linfoma nodais mais comuns (segundo a classificação REAL/WHO) com base no tamanho das células observadas (Raskin, 2023). A descrição citológica de cada uma destas entidades está fora do alcance do pretendido pelos autores, mas pode ser encontrada na literatura (Raskin, 2023; Teske, 2014). Os critérios de avaliação citomorfológica encontram-se listados no Anexo 1.

Uma vez que a maioria dos linfomas em cães são de alto grau, a imagem citológica mais comum de ser observada é composta por população celular homogénea (diferenciando-se de uma população reativa que tipicamente demonstra polimorfismo celular), formada por células grandes imaturas com citoplasma basofílico, núcleos com cromatina finamente granular e diminuição do

rácio núcleo/citoplasma (Blauvelt & Messick, 2020; Raskin, 2023). O número de mitoses pode estar aumentado bem como o número de macrófagos de corpos tingíveis (TBMs, do inglês *Tingible Body Macrophages*) indicando elevado *turnover* celular e linfopoiese (Blauvelt & Messick, 2020; Raskin, 2023). Devido à fragilidade das células imaturas neoplásicas, também é frequente observarem-se núcleos lisados sob a forma de material amorfo eosinofílico e numerosos fragmentos citoplasmáticos basofílicos do tamanho de plaquetas denominados corpos linfoglandulares, resultantes da ruptura destas células (Blauvelt & Messick, 2020; Raskin, 2023).

Por outro lado, cerca de 20% dos linfomas são de células pequenas dificultando o diagnóstico, embora possam ser reconhecidos por patologistas mais experientes como população homogênea de linfócitos pequenos com raras mitoses (Blauvelt & Messick, 2020). Outros casos que representam diagnósticos citológicos desafiantes incluem aqueles cuja colheita da amostra foi realizada em estados precoces da doença não havendo ainda substituição total da população normal pela neoplásica (padrão difuso) e casos de linfomas nodulares que coletivamente resultam na aspiração tanto de elementos celulares neoplásicos como de elementos celulares não neoplásicos (Blauvelt & Messick, 2020; Raskin, 2023), ou ainda casos em que o subtipo de linfoma intrinsecamente possui mistura de elementos neoplásicos e reativos, como acontece no linfoma de grandes células B rico em células T (Blauvelt & Messick, 2020; Fournel-Fleury et al., 1997), por alguns autores citado como doença tipo-Hodgkin quando detetada em gatos (Steinberg & Keating, 2008).

Em casos de diagnóstico citológico inconclusivo, devem-se utilizar outras técnicas complementares de diagnóstico para efeitos de análise de clonalidade (PARR) e determinação da linhagem celular (imunocitoquímica, imunohistoquímica, citometria de fluxo) (Fournel-Fleury et al., 1997; Gabor et al., 1999; Valli et al., 2011), e a avaliação do hemograma e esfregaço sanguíneo deve ser sempre feita para excluir a hipótese de leucemia primária que infiltrou linfonodos (Blauvelt & Messick, 2020) ou linfoma de estadios V (Valli et al., 2017). Como resultado, a análise citológica frequentemente não permite dar um diagnóstico específico do subtipo de linfoma (segundo classificação REAL) (Caniatti et al., 1996; Carter & Valli, 1988; Martini et al., 2022), e como tal é reconhecida como um teste fundamental de identificação de doença neoplásica de origem linfóide, que pode ser usado como triagem para prever grau e imunofenótipo. No entanto, os resultados devem ser confirmados com outras técnicas complementares de diagnóstico,

permanecendo a histopatologia e imunofenotipagem os meios *gold standard* para classificação das várias entidades de linfoma canino (Martini et al., 2022; Valli et al., 2013). Deste modo, a aparência morfológica das células neoplásicas tem sido usada conjuntamente com a imunofenotipagem para melhor caracterizar os linfomas e providenciar assistência na previsão do prognóstico (Ponce et al., 2004).

1.4. Prognóstico

O prognóstico de linfoma canino é altamente variável e depende de vários fatores, sendo os identificados com maior consistência como tendo influência prognóstica em linfomas nodais periféricos: substadio clínico WHO, grau e imunofenótipo (Vail et al., 2019).

Cães com linfoma de grau intermédio ou alto grau tendem a responder a tratamento com quimioterapia mas a recidivar cedo, ao passo que cães com linfomas de baixo grau indolentes (linfoma de zona T, linfoma de células do manto, linfoma da zona marginal) tendem a ser pouco responsivos a quimioterapia mas experienciam tempos de sobrevida prolongados mesmo na ausência da mesma (Flood-Knapik et al., 2013; Stefanello et al., 2011; Vail et al., 2019; Valli et al., 2006).

Mais ainda, já vários estudos confirmaram que cães com linfomas não-indolentes, de grau intermédio ou alto grau, têm remissões e tempos de sobrevida significativamente mais curtos quando a doença é de células T do que cães com linfoma de grau intermédio ou alto grau de células B (Appelbaum et al., 1984; Greenlee et al., 1990; Marconato et al., 2011; Rao et al., 2011; Ruslander et al., 1997; Teske et al., 1994; Vail et al., 1996). A imunofenotipagem, utilizada para determinar se os linfomas diagnosticados têm origem em células B ou células T, tornou-se, portanto, uma componente central da classificação deste grupo heterogêneo de neoplasias após se observar que células com morfologia semelhante podem ter imunofenótipos e comportamento biológico distintos, influenciando as recomendações de tratamento para cada grupo de animais afetados (Regan et al., 2013; Valli et al., 2017). Por estas razões aproximadamente 75% dos oncologistas veterinários integram a imunofenotipagem no seu trabalho diagnóstico para orientar decisões clínicas (Regan et al., 2013). Aproximadamente 60-70% dos linfomas caninos são de células B, 30-40% são de células T e menos de 1% são nulos (marcação negativa tanto para marcadores de células B como para marcadores de células T), podendo representar células de

origem NK, células indiferenciadas, ou erros de processamento (Comazzi et al., 2018; Ponce et al., 2010; Valli et al., 2013).

2. Imunofenotipagem

2.1. Técnicas de Imunocoloração: Generalidades

Em medicina veterinária a IHC e a ICC são utilizadas com vários propósitos, mais frequentemente com objetivo diagnóstico, para caracterizar neoplasias pouco diferenciadas, diferenciar lesões primárias de metastáticas, determinar local de origem de lesões metastáticas, providenciar informações prognósticas avaliando proliferação celular e para identificar agentes infecciosos (Camus et al., 2020; Ramos-Vara & Gelain, 2023).

A IHC é tipicamente aplicada em amostras de tecidos congelados ou tecidos fixados em formol e embebidos em parafina, ao passo que a ICC é aplicada em amostras citológicas, podendo-se realizar em preparações de esfregaços, amostras de fluidos em monocamada, *cytospins*, citoblocos, aposições de biópsias, culturas celulares e lâminas previamente coradas com corantes de Romanowsky (Bratthauer, 2010; Dupré & Courtade-Saidi, 2012; Fetsch & Abati, 2010; Fowler & Lachar, 2008; Gong et al., 2003; Kirbis et al., 2011; Pinto da Cunha et al., 2021; Raskin et al., 2019; Skoog & Tani, 2011; Taylor et al., 2013; Zhang et al., 2012).

Estas técnicas utilizam anticorpos que são incubados com as células de forma a identificar péptidos, glicoproteínas ou lipoproteínas localizadas nas membranas celulares, citoplasma ou núcleo, reconhecidos pelo anticorpo como antígenos célula-específicos (Barger et al., 2017; Montero, 2003).

2.1.1. Anticorpos

Um anticorpo ou imunoglobulina (Ig) é composto por quatro polipéptidos que coletivamente conferem ao anticorpo a forma de “Y”: duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, que enroladas (*folding*), se organizam em regiões constantes e regiões variáveis (Camus et al., 2020). Os prolongamentos ou braços do anticorpo são conhecidos como segmento F(ab) e constituem o local de ligação ao antígeno de interesse; já o segmento Fc, contém sequências particulares da espécie animal em que o anticorpo é produzido, e constitui o local de ligação (1)

para um segundo anticorpo gerado numa outra espécie (anticorpo secundário) ou (2) para conjugação dos sistemas de detecção. O segmento F(ab) contém as regiões variáveis das cadeias leves e das cadeias pesadas determinando especificidade da ligação anticorpo-antígeno, e o segmento Fc contém as regiões constantes das cadeias pesadas (Figura 5)(Burry, 2010; Ramos-Vara, 2005).

Os anticorpos podem ser classificados de acordo com a habilidade em reconhecer diferentes epítopes do mesmo antígeno. Os anticorpos policlonais detetam vários epítopes do mesmo antígeno, enquanto os anticorpos monoclonais reconhecem apenas um epítopo. Do ponto de vista prático, o uso de anticorpos policlonais resulta em maior sensibilidade embora com maior frequência de ligações inespecíficas; o uso de anticorpos monoclonais resulta em maior especificidade das ligações e menor coloração de fundo (Burry, 2010).

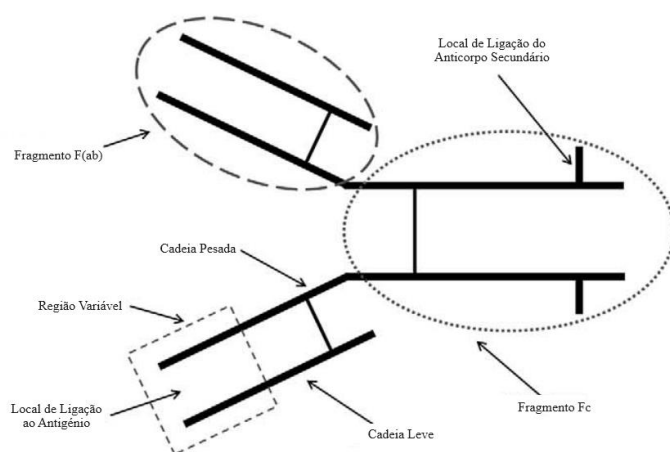


Figura 5. Estrutura do anticorpo/imunoglobulina (adaptado de Ramos-Vara & Miller, 2014)

2.1.2. Natureza da Ligação Anticorpo - Antígeno

A habilidade do anticorpo se anexar ao antígeno é determinada por quatro tipos de ligações não covalentes: ligações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, ligações iônicas/eletrostáticas e forças de van der Waals. Ainda assim, para a maioria dos antígenos polipeptídicos, glicoproteicos ou polissacáridos, a ligação anticorpo-antígeno resulta duma combinação de forças de van der Waals e interações eletrostáticas (Absolom & van Oss, 1986). A afinidade anticorpo-antígeno é uma expressão termodinâmica da energia de ligação entre o local de ligação do anticorpo (parátopo) e o local de ligação do antígeno (epítopo)(Ramos-Vara, 2005).

Por esta razão, os reagentes e configurações utilizados na IHC e ICC são escolhidos com o objetivo de otimizar a força de ligação total (Burry, 2011; Ramos-Vara, 2005).

2.1.3. Método Direto vs Método Indireto

As técnicas IHC e ICC podem ser empregues utilizando um método direto, em que a reação visualizada corresponde à ligação entre um único anticorpo (anticorpo primário) e o antígeno de interesse, ou um método indireto, que requer a adição de um segundo anticorpo (anticorpo secundário), sendo a reação visualizada correspondente à sua ligação com a região constante (Fc) do anticorpo primário (Figura 6). Os anticorpos primários detetam os antígenos celulares de interesse, e os anticorpos secundários detetam a região constante (Fc) do anticorpo primário (Camus et al., 2020). Uma vez que a região constante (Fc) dos anticorpos é espécie-específica, o mesmo anticorpo secundário, gerado por exemplo em coelhos, contra anticorpos de rato, poderá simultaneamente detetar anticorpos distintos deste último, produzidos para diferentes antígenos (Camus et al., 2020).

A escolha do método utilizado implica as suas vantagens e desvantagens. Por um lado, vários anticorpos secundários podem ligar-se a um único anticorpo primário aumentando a intensidade da reação. Por outro, a probabilidade de ocorrência de ligações inespecíficas é maior utilizando um método indireto, o que aumenta também a coloração de fundo (Burry, 2010).

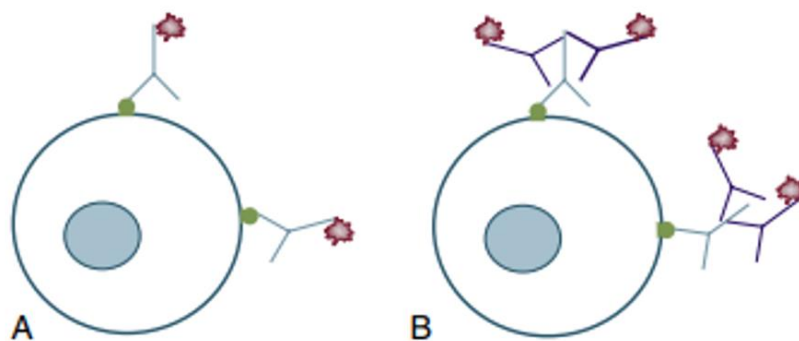


Figura 6. Deteção da ligação anticorpo - antígeno. A – Método direto. O mecanismo de marcação (vermelho) é conjugado com o anticorpo primário (azul-claro), que reconhece o antígeno celular (verde). B – Método indireto. O mecanismo de marcação é conjugado com o anticorpo secundário (azul-escuro), que reconhece a região constante espécie-específica do anticorpo primário (azul-claro). Adaptado de Camus et al., (2020).

2.1.4. Método Manual VS Método Automático

As técnicas de imunocoloração podem ser realizadas de forma manual ou em plataformas automáticas, estando a escolha entre uma opção e outra geralmente dependente da casuística do laboratório.

As principais vantagens em utilizar uma plataforma automática estão associadas à consistência dos processos de recuperação antigénica e coloração e resultados obtidos, bem como ao tempo disponível dos funcionários e técnicos (Prichard, 2014; Ramos-Vara & Miller, 2014). Por outro lado, a automação afasta os técnicos do processo de imunocoloração aumentando o risco de estes perderem capacidade de solucionar problemas quando a coloração obtida está abaixo do ideal por falta de conhecimento (Prichard, 2014).

A coloração manual permanece com a grande vantagem da flexibilidade de escolha dos reagentes, métodos de recuperação antigénica e habilidade em experimentar variações subtis da técnica para otimizar os protocolos de coloração (Prichard, 2014). Adicionalmente, a coloração manual permite um uso mais conservador dos reagentes e a divisão de uma única lâmina em várias áreas com uma caneta de barreira hidrofóbica, o que pode ser útil para aplicar um maior número de marcadores quando o número de amostras é reduzido/insuficiente (Koss and Melamed, 2006, conforme mencionado por Santangelo et al., 2021; Stone & Gan, 2014).

2.2. Descrição da Técnica ICC

Os componentes duma reação IHC ou ICC incluem (1) as células com o antígeno de interesse, (2) um anticorpo primário, (3) um anticorpo secundário (métodos indiretos), (4) um mecanismo de marcação e (5) soluções tampão (Barger et al., 2017). Apesar de não ser necessário, usar contracoloração nuclear melhora a visualização da reação oferecendo melhor perspetiva da conformação celular (Barger et al., 2017). Os procedimentos imunocitoquímicos são semelhantes aos imunohistoquímicos (Ramos-Vara & Gelain, 2023), no entanto, as duas técnicas apresentam diferenças importantes a considerar como o tipo de amostra utilizado, armazenamento das lâminas não coradas, tipo de fixação e controlos utilizados e padronização dos testes (Dupré & Courtade-Saidi, 2012). De seguida apresenta-se uma breve descrição da técnica ICC, com referência a

aspectos relevantes da IHC quando aplicável. Quando se mencionam aspectos comuns à IHC e à ICC, o termo “imunoquímica” é usado.

A técnica imunoquímica pode, de forma geral, ser dividida em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. A fase pré-analítica diz respeito à colheita da amostra, transporte, fixação e armazenamento da mesma; a fase analítica compreende os métodos utilizados para otimizar a localização visual dos antigénios de interesse; a fase pós-analítica é constituída por interpretação dos resultados e elaboração do relatório (Barger et al., 2017; Ramos-Vara & Gelain, 2023; Santangelo et al., 2021).

2.2.1. Fase Pré-Analítica: Tipo de Amostra, Fixação e Armazenamento

2.2.1.1. Tipo de Amostra

O tipo de amostras citológicas submetidas mais comumente para análise ICC são esfregaços de PAAFs e amostras de fluidos cavitários, quísticos ou articulares (Priest et al., 2017). Cada tipo de amostra apresenta as suas vantagens e desvantagens no que diz respeito à realização da ICC. De modo geral, os esfregaços são a opção mais económica e permitem uso das lâminas obtidas inicialmente sem necessidade de processamento adicional mas têm as desvantagens do potencial diagnóstico estar dependente da qualidade das preparações, podendo lidar com problemas como: elevada reatividade de fundo em amostras necróticas e mal preservadas, resultados falso-positivos e falso-negativos em amostras de celularidade excessivamente densa, e do número de testes imunocitoquímicos ser limitado pelo número de lâminas submetidas (Fowler & Lachar, 2008; Santangelo et al., 2021; Skoog & Tani, 2011).

2.2.1.2. Fixação das Amostras

A fixação é um processo requerido para prevenir autólise e estabilizar os constituintes celulares (Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara & Miller, 2014). Ao contrário da IHC em que o formol a 10% é o fixador de eleição universal, não há nenhum fixador de uso padronizado para amostras citológicas (Ramos-Vara & Gelain, 2023). Exemplos de fixadores comuns incluem acetona 100%, pré-arrefecida a 4 °C, formol 4 – 10%, fixadores de base alcoólica, entre outros, e a escolha do tipo de fixação depende de forma geral do antigénio de interesse (Santangelo et al., 2021; Skoog & Tani, 2011).

Raskin et al., (2019) propõem que as amostras sejam fixadas imediatamente antes do procedimento de ICC, e que para marcadores nucleares e marcadores de leucócitos se utilize etanol 95% durante 10 minutos, seguido de acetona arrefecida por 15 minutos e secagem ao ar previamente à realização de recuperação antigénica.

Para todos os efeitos as recomendações da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária são que se utilize o fixador mais adequado para o antigénio de interesse, tendo em conta que amostras fixadas em formol ou coradas com corantes de Romanowsky devem ser submetidas a processos de recuperação antigénica (Barger et al., 2017). Se objetivo final for a realização de ICC *multiplex* (abaixo descrita), deve-se considerar qual o fixador mais adequado para preservar todos os epítopes alvo (Santangelo et al., 2021).

2.2.1.3. Armazenamento das Amostras

Outro fator pré-analítico a ter em conta para melhor retenção de antigenicidade das amostras é o tipo de armazenamento das lâminas em estudo. Lâminas não fixadas, secas ao ar, retêm antigenicidade entre 1 a 4 semanas à temperatura ambiente, dependendo do antigénio de interesse e dos autores (Aoki et al., 1991; Skoog & Tani, 2011), e lâminas previamente coradas durante 5 meses após coloração (Raskin et al., 2019), período após o qual a antigenicidade diminui. Quando se esperam períodos superiores até realização de ICC, é aconselhado que as lâminas sejam armazenadas a -70°C retendo assim antigenicidade por períodos de um ano ou mais (Skoog & Tani, 2011).

2.2.2. Fase Analítica: Recuperação Antigénica, Mecanismos de Marcação

2.2.2.1. Recuperação Antigénica

A desvantagem da utilização de formol como agente fixador está relacionada com o facto deste composto formar ligações cruzadas entre constituintes celulares, alterando a estrutura tridimensional dos antigénios de interesse e consequentemente, a imunoreatividade observada (Ramos-Vara & Miller, 2014; Santangelo et al., 2021). Em adição, a fixação aparenta induzir mudanças na carga electrostática dos antigénios, que é essencial para a atração inicial entre o antigénio e o anticorpo (Ramos-Vara & Gelain, 2023). Para contornar os efeitos destas alterações, é necessário adicionar um passo de recuperação antigénica ao processamento das amostras. Embora os procedimentos de recuperação antigénica sejam utilizados para corrigir as alterações provocadas

pela fixação (Ramos-Vara & Miller, 2014; Valli et al., 2009), é importante ter em conta que podem aumentar a reatividade de fundo (Ramos-Vara & Miller, 2014). Os procedimentos de recuperação antigénica podem ser necessários mesmo quando as amostras não são fixadas em formol, especialmente quando se trata de lâminas previamente coradas com corantes Romanowsky (Dörfelt et al., 2019; Raskin et al., 2019). Os dois tipos de recuperação antigénica mais comuns são a recuperação antigénica enzimática e a recuperação antigénica induzida pelo calor (HIER, do inglês *Heat-induced Epitope Retrieval*), sendo a última a mais usada pois aparenta produzir bons resultados numa grande variedade de anticorpos (Denda et al., 2012; Ramos-Vara & Miller, 2014; Raskin et al., 2019; Zhang et al., 2012). Neste procedimento, as lâminas são imersas em soluções tampão a elevadas temperaturas, com recurso a um microondas ou a câmaras especializadas (Ramos-Vara & Gelain, 2023; Ramos-Vara & Miller, 2014; Skoog & Tani, 2011; Valli et al., 2009).

Segundo Raskin et al., (2019), uma solução tampão Tris (pH, 9.0) é adequada para os marcadores tissulares de rotina e uma solução tampão citrato (pH, 6.0) é mais adequada para a maioria dos marcadores de leucócitos. Os antígenos de localização citoplasmática ou membranar nem sempre requerem recuperação antigénica, mas está reportado que realça a imunopositividade (Denda et al., 2012).

Devido à vastidão de técnicas de fixação disponíveis e particularidades de cada interação antígeno-anticorpo, é difícil padronizar os procedimentos de recuperação antigénica e estes devem ser otimizados para cada protocolo de ICC (Ramos-Vara & Gelain, 2023; Santangelo et al., 2021).

2.2.2.2.Mecanismos de Marcação

A visualização da reação requer que os anticorpos sejam acoplados com uma “molécula repórter”, que se pode tratar dum composto fluorescente, duma enzima ou dum metal (Burry, 2010; Camus et al., 2020; Cartun et al., 2019; Santangelo et al., 2021). As reações com compostos fluorescentes ou metais requerem visualização com microscópios especializados, ao passo que os mecanismos enzimáticos produzem reações permanentes, visíveis ao microscópio de luz (Camus et al., 2020; Santangelo et al., 2021), e representam por isso a técnica de interesse para efeitos de interpretação do presente estudo.

As enzimas na presença de um substrato ou cromogéneo específicos produzem um precipitado colorido no local da reação anticorpo-antigénio (Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara & Miller, 2014; Santangelo et al., 2021). Exemplos de enzimas incluem glucose peroxidase, peroxidase de rábano (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*) e fosfatase alcalina (AP, do inglês *Alkaline Phosphatase*)(Ramos-Vara, 2013; Ramos-Vara & Miller, 2014), sendo as duas últimas as mais usadas em IHC (Ramos-Vara & Gelain, 2023). Alguns casos, como em amostras com elevada quantidade de pigmento ou ricas em peroxidase endógena (p.e. amostras com elevada hemodiluição, esfregaços sanguíneos ou esfregaços de aspirados de medula óssea), beneficiam do uso de AP em alternativa a HRP, reduzindo a reatividade de fundo (Dupré & Courtade-Saidi, 2012; Happerfield et al., 2008; Ramos-Vara & Gelain, 2023).

Exemplos de substratos aplicáveis à HRP incluem a 3,3-diaminobenzidina (DAB, precipitado de cor castanha), a 3-amino-9-etilcarbazole (AEC, precipitado de cor vermelha) e 4-cloro-1-naftol (precipitado de cor azul). Para a AP é comum usar *Vulcano Fast Red*, *Fast Blue* ou uma combinação de cloreto de nitrotetrazólio azul com 5-bromo-4-cloro-3-indolil (precipitado de cor preta a roxa a azul-escura)(Ramos-Vara & Gelain, 2023; Santangelo et al., 2021). Nos casos em que se pretende efetuar análises *multiplex*, a escolha dos cromogéneos deve ser particularmente cuidadosa para facilitar interpretação dos resultados (Santangelo et al., 2021; van der Loos, 2010).

Conforme previamente mencionado, as técnicas imunoquímicas podem ser classificadas em direta ou indireta (Cartun et al., 2019; Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Miller, 2014; Santangelo et al., 2021). Há numerosas variantes dos métodos indiretos relativamente ao sistema de deteção usado (Cartun et al., 2019; Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Borst, 2017; Ramos-Vara & Miller, 2014), que podem ser classificados em métodos de avidina-biotina e métodos não-avidina-biotina (Ramos-Vara & Gelain, 2023; Ramos-Vara & Miller, 2014). Alguns destes procedimentos envolvem apenas dois passos, como é o caso da marcação polimérica (um tipo de método não-avidina-biotina), enquanto outros envolvem múltiplos passos e reagentes adicionais, como é o caso dos métodos avidina-biotina e os métodos de amplificação de sinal à base de tiramida (Cartun et al., 2019; Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Miller, 2014).

O importante a considerar é que de um ponto de vista prático, a sensibilidade da reação imunoquímica é maioritariamente determinada pelo método de deteção utilizado, sendo de forma geral tanto mais sensível quanto maior a complexidade da técnica utilizada (Ramos-Vara, 2013;

Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Miller, 2014). Os métodos de base polimérica oferecem numerosas vantagens comparativamente aos métodos avidina-biotina e outros métodos complexos, pela capacidade de gerar resultados com elevada sensibilidade, poucos falsos-positivos e protocolos de fácil reprodutibilidade, especialmente em plataformas automáticas. Em adição, estes métodos também são aplicáveis a testes de dupla marcação e marcação multiplex (Cartun et al., 2019), discutidos em maior detalhe mais à frente.

2.2.3. Fase Pós-Analítica: Interpretação e Relato dos Resultados Observados

A interpretação dos testes imunocitoquímicos deve ser feita à luz dos resultados citológicos de rotina e em conjunto com outros dados clinicopatológicos (Priest et al., 2017; Ramos-Vara & Gelain, 2023; Ramos-Vara & Miller, 2014). Para poder interpretar um teste imunocitoquímico o uso de controlos positivo e negativo é um pré-requisito, e não havendo limiares que definam um resultado positivo ou negativo, cada laboratório deve documentar nos relatórios o que foi interpretado como sendo resultado positivo, quantificando o número de células positivas, intensidade e localização da coloração observadas (Priest et al., 2017; Ramos-Vara & Miller, 2014).

2.3. Controlos, Otimização/Padronização e Validação dum teste Imunocitoquímico

Para poder utilizar as técnicas de imunocoloração com o propósito diagnóstico, os testes imunoquímicos devem passar primeiramente por um processo de otimização do protocolo de coloração até que as lâminas dos controlos corem consistentemente com mínimo de reatividade de fundo, e posteriormente por um processo de validação para confirmar a precisão do seu uso na espécie de interesse (Barger et al., 2017; Priest et al., 2017; Ramos-Vara & Gelain, 2023; Santangelo et al., 2021; Skoog & Tani, 2011).

2.3.1. Padronização e Otimização dum Teste Imunocitoquímico

A padronização e otimização dum teste imunocitoquímico implica a determinação ótima dos tempos de incubação dos reagentes, temperatura de incubação, diluições dos anticorpos, abordagem à recuperação antigénica, soluções tampão utilizadas e mecanismos de marcação. O principal objetivo da padronização/otimização de um protocolo de coloração é atingir a produção

de resultados consistentes e reproduzíveis (Ramos-Vara & Gelain, 2023; Ramos-Vara & Miller, 2014; Skoog & Tani, 2011).

As lâminas dos controlos utilizados devem ser do mesmo tipo que as amostras em estudo: lâminas de controlo para ICC devem ser lâminas citológicas e não lâminas de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina (FFPE, do inglês *Formalin Fixed Paraffin Embedded*), e se as amostras forem fixadas e submetidas a processos de recuperação antigénica, o mesmo deve acontecer com os controlos (Barger et al., 2017; Fowler & Lachar, 2008). Um controlo positivo tem de ter origem em tecido da mesma espécie que o paciente, ter células que expressam o antígeno relevante e possuir áreas de imunoreatividade positivas e negativas (Barger et al., 2017; Camus et al., 2020). Os controlos negativos devem ser realizados em paralelo com cada amostra: devem ser provenientes do mesmo paciente, em que o anticorpo primário é retirado ou substituído pela mesma quantidade de soro da mesma espécie, e não se deve observar reações positivas, de forma a garantir que a positividade nas lâminas diagnósticas é atribuída à ligação do anticorpo secundário ao anticorpo primário e não à presença de ligações inespecíficas (Barger et al., 2017; Burry, 2010, 2011; Camus et al., 2020; Priest et al., 2017).

2.3.2. Validação de um Teste Imunocitoquímico

Após otimização do protocolo, segue-se a validação do teste imunocitoquímico. A validação visa confirmar a aplicabilidade do teste para a espécie em questão, avaliando o seu desempenho analítico e diagnóstico através da determinação da sensibilidade, especificidade, repetibilidade, reprodutibilidade, entre outros (Ramos-Vara & Miller, 2014; Skoog & Tani, 2011). Um teste imunoquímico validado deve ser reproduzível com elevada sensibilidade e especificidade (Cummings et al., 2010). Idealmente, para fins de validação, os resultados são comparados entre laboratórios que usem técnicas semelhantes e com uma ferramenta diagnóstica *gold standard* como a IHC (Santangelo et al., 2021), no entanto, em medicina veterinária é aceitável o uso de informação publicada na literatura para realizar a validação dum teste ICC, dado o reduzido número de laboratórios que realizam ICC e a grande quantidade de recursos necessária para realizar validação *in-house* (Ramos-Vara & Gelain, 2023).

As guidelines para a garantia de qualidade dos testes de ICC da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP, do inglês *American Society for Veterinary Clinical*

Pathology) indicam que, quando possível, os resultados devem ser comparados com resultados obtidos utilizando outras formas de detecção do mesmo antígeno (Barger et al., 2017).

2.4. Resultados Incorretos e Solução de Problemas

Problemas nos resultados que se devem ter em conta para a interpretação incluem falta de coloração generalizada, fraca intensidade na coloração, excesso de coloração de fundo, resultados falsos-positivos e resultados falsos-negativos (Ramos-Vara & Gelain, 2023; Ramos-Vara & Miller, 2014; Santangelo et al., 2021).

2.4.1. Fraca Intensidade de coloração

Quando a coloração apresenta fraca intensidade apenas na lâmina de teste, e coloração normal na lâmina de controlo positivo, pode ser atribuída a perda de epítopes, subfixação, sobrefixação, ou presença do antígeno na amostra em causa, mas em quantidade inferior ao limiar de detecção do método utilizado (Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Gelain, 2023). Nestes casos deve-se considerar utilizar um sistema de detecção de amplificação, ajustar os parâmetros do procedimento para concentrações maiores de anticorpo, tempo de incubação, temperatura de incubação ou alterar o protocolo de recuperação antigénica (Ramos-Vara, 2017). Se tanto a lâmina de controlo como a lâmina de teste apresentarem fraca intensidade de coloração, poderá ser resultado do uso excessivo de soluções-tampão, diluição excessiva dos anticorpos, recuperação antigénica desadequada, tempo de incubação insuficiente ou armazenamento inapropriado dos reagentes (Ramos-Vara & Gelain, 2023).

2.4.2. Excesso de Coloração de Fundo e Falsos-Positivos

A coloração de fundo excessiva e resultados falsos-positivos podem também ter numerosas origens. Causas pré-analíticas incluem amostras com abundante fundo necrótico, células lisadas, e fixação ineficaz; causas analíticas podem envolver procedimentos de bloqueio das proteínas séricas desadequado (especialmente relevante quando se usam anticorpos policlonais), bloqueio da peroxidase endógena ou biotina endógena incompleto, coloração equívoca de células que realizaram fagocitose das células que exibem o antígeno de interesse, concentração excessiva de reagentes e aprisionamento dos reagentes em amostras de celularidade demasiado densa (anticorpo primário, anticorpo secundário e cromogéneos)(Fowler & Lachar,

2008; Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Gelain, 2023; Ramos-Vara & Miller, 2014; Skoog & Tani, 2011). Pode ser particularmente difícil interpretar resultados dum teste imunocitoquímico em amostras inflamadas ou necróticas e nestes casos os controlos negativos são particularmente importantes (Santangelo et al., 2021). A reatividade cruzada entre anticorpos policlonais e epítopes de células que não exibem o antígeno de interesse é também uma causa de falsos-positivos e anticorpos específicos de determinados tipos celulares devem ser estudados para contornar esta limitação (Ramos-Vara & Miller, 2007; Santangelo et al., 2021).

2.4.3. Falsos-Negativos

Resultados falsos-negativos podem ser associados com fixação desapropriada, concentração insuficiente dos anticorpos, recuperação antigénica desadequada ou danos celulares com origem na preparação da amostra (Fowler & Lachar, 2008; Monaco & Dabbs, 2014; Santangelo et al., 2021; Skoog & Tani, 2011)

2.5. Vantagens, Limitações e Potenciais Soluções dos Testes Imunoquímicos

As técnicas imunoquímicas, comparativamente a outras técnicas de deteção antigénica, apresentam a vantagem única da habilidade de correlacionar a presença do antígeno em estudo com a sua localização tissular (IHC) e celular (ICC) (Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Gelain, 2023). Os principais desafios que ambas as técnicas enfrentam são a falta de padronização e controlo de qualidade entre laboratórios, nomeadamente no que toca a recuperação antigénica, a subjetividade e controvérsia na interpretação de resultados (percentagem de células positivas e intensidade da marcação, bem como limiares de deteção de positividade) e o facto de serem técnicas que não estão refinadas como em medicina humana, problema exacerbado pelas diferenças na expressão antigénica entre espécies (Ramos-Vara & Gelain, 2023).

Por sua vez a ICC, comparativamente à IHC, apresenta tempo de resposta mais curto o que pode facilitar a rotina clínica ao permitir realizar no mesmo dia da colheita da amostra citológica o planeamento do tratamento e caso necessário, novas colheitas (Aulbach et al., 2010; Caniatti et al., 1996; Fisher et al., 1995; Sapierzyński, 2010). Mais ainda, alguns anticorpos, como alguns marcadores de células T e histiócitos, são ativos apenas em amostras citológicas e não em

tecidos fixados em formol, mesmo quando se realizam processos de recuperação antigénica (Santangelo et al., 2021; Skoog & Tani, 2011; Valli et al., 2009). A ICC apresenta ainda as vantagens inerentes à citologia por aspiração de agulha fina tradicional, incluindo amostragem minimamente invasiva, baixo risco anestésico e reduzido desconforto dos pacientes (Santangelo et al., 2021).

Adicionalmente, a mesma lâmina pode ser corada sequencialmente com múltiplos anticorpos quando os testes prévios são negativos, no entanto é importante considerar que a exposição repetida a álcoois a diferentes concentrações pode resultar em perdas celulares e degradação antigénica afetando a imunoreatividade e os resultados (Ramos-Vara & Miller, 2014).

Por outro lado a ICC enfrenta desafios maioritariamente associados à fase pré-analítica que incluem variações na qualidade das amostras, dificuldade em obter um número suficiente de lâminas com qualidade diagnóstica para aplicar um painel de anticorpos completo, excesso de imunoreatividade de fundo em amostras com fundo necrótico e excesso de lise celular, falta de protocolos publicados para laboratórios que queiram implementar a ICC, entre outros (Fowler & Lachar, 2008; Priest et al., 2017; Ramos-Vara & Miller, 2014; Skoog & Tani, 2011). Nos casos em que o número de marcadores que se deseja aplicar é superior ao número de amostras disponíveis, podem-se utilizar técnicas de aumento do rendimento de cada lâmina como: divisão da lâmina por zonas, sendo cada marcador aplicado numa zona diferente, técnicas de transferência de tecido, ou recorrer a técnicas de ICC *multiplex* (descritas mais à frente) de forma a tirar máximo partido do material citológico disponível (Dupré & Courtade-Saidi, 2012; Marrinhas et al., 2022; Sherman et al., 1994).

2.6. ICC em lâminas previamente coradas

A ICC tem ainda a vantagem de poder ser realizada em lâminas previamente coradas com corantes tipo-Romanowsky ou Papanicolaou (Abendroth & Dabbs, 1995; Dörfelt et al., 2019; Miller & Kubier, 2002; Pinto da Cunha et al., 2021; Raskin et al., 2019; Shtilbans et al., 2005).

Utilizar lâminas previamente coradas permite selecionar as lâminas mais representativas e com melhor qualidade para a realização da ICC, ajudando a atenuar algumas das dificuldades pré-analíticas associadas a esta técnica (Marrinhas et al., 2022; Pinto da Cunha et al., 2021). Mais ainda, a utilização da ICC não requer nenhum passo adicional de descoloração uma vez que os corantes

de Romanowsky desaparecem durante a HIER (Raskin et al., 2019). Por outro lado, é importante ter em conta que usar lâminas previamente coradas para ICC inclui a possibilidade de haver perdas celulares, rutura de células, afetando essencialmente ICC de marcadores citoplasmáticos e de membrana, e ainda a redução de sinal para alguns marcadores (Raskin et al., 2019).

Deve-se ainda realçar que as lâminas previamente coradas estão sujeitas a autofluorescência tornando-as desadequadas para a ICC de fluorescência (Raskin et al., 2022; Santangelo et al., 2021).

2.7. Uso da ICC para Imunofenotipagem de Linfoma Canino

Segundo Priest et al., (2017), a imunofenotipagem de linfoma representa a mais comum aplicação da ICC em medicina veterinária. Conforme supramencionado, a diferenciação de linfoma de células T e linfoma de células B tem importância prognóstica e pode ainda ter implicação na modalidade de tratamento dos pacientes acometidos, à medida que terapias subtipo-específicas são desenvolvidas (Jain et al., 2016; Rue et al., 2015).

A concordância entre a IHC e a ICC é excelente, conforme demonstrado em vários estudos (Fisher et al., 1995; Sapierzyński, 2010; Vail et al., 1997). Os marcadores CD20, CD21, CD79a, Pax5 ou BLA.36 podem ser utilizados para determinar origem neoplásica em células B e o CD3, CD5 e no caso da ICC também o CD4 e o CD8 podem ser utilizados para determinar origem neoplásica em células T (Caniatti et al., 1996; Jubala et al., 2005; Ohno et al., 2020; Pazdzior-Czapula et al., 2015; Priest et al., 2017; Raskin, 2023; Sapierzyński, 2010; Turinelli et al., 2005).

O antígeno CD3 consiste em quatro glicoproteínas estruturalmente diferentes, com domínios extracelulares, transmembranares e intracelulares, que estão associadas com o complexo de recetores de células T (Dabbs, 2019; Hawse et al., 2012; Leong et al., 2003; Proust et al., 2012; Ramos-Vara & Borst, 2017). É expresso desde o estadio de pró-timócito até ao estadio de célula T madura (Leong et al., 2003), sendo utilizado em medicina veterinária e humana para confirmar origem de linfomas em células T (Dabbs, 2019; Ramos-Vara & Borst, 2017). O seu padrão de reatividade é membranoso ou citoplasmático e também pode ser expresso em células *Natural Killer* e células de Purkinje (Dabbs, 2019; Leong et al., 2003; Ramos-Vara & Borst, 2017).

O antígeno Pax5, também chamado proteína ativadora células-B-específica, é uma proteína nuclear com papel central no desenvolvimento de células B, ativando genes específicos de células B e suprimindo genes não associados à linhagem de células B (Cobaleda et al., 2007; Medvedovic et al., 2011; O'Brien et al., 2011). Em células B é detectável desde estadios de células pre-pro-B até estadios de célula B madura, com diminuição forte a repressão completa da sua expressão no estadios de plasmócito (Hagiwara et al., 2012; Holmes et al., 2008). O seu padrão de coloração é nuclear (Dabbs, 2019; Ramos-Vara & Borst, 2017) e é considerado um excelente marcador de células pan pre-B e B, com correlação forte com a reatividade a CD79a em linfomas (Dong et al., 2008). Também já foi usado inclusive em linfomas caninos que apresentam co-expressão de CD3 e CD79a, nos quais a ausência de reatividade ao Pax5 foi determinante para os considerar linfomas de células T (Dong et al., 2008). Para todos os efeitos, há também linfomas de células T que demonstram expressão do antígeno Pax5 (Nazaré Cunha, comunicação pessoal).

3. Análise Multiplex: Aplicações e Utilidades

3.1. Generalidades

A marcação múltipla (*multiplex*) é uma técnica utilizada para localizar simultaneamente diferentes antígenos na mesma amostra, possibilitada pela disponibilidade de diferentes enzimas, cromógenos e moléculas fluorescentes, podendo ser usada em microscopia de luz e em microscopia de fluorescência (Parra et al., 2017; Ramos-Vara & Miller, 2014; Santangelo et al., 2021; Sheng et al., 2023; van der Loos, 2010). A dupla marcação (marcação *multiplex* para dois antígenos de interesse) pode ser feita utilizando um método direto ou indireto (Santangelo et al., 2021), e de forma simultânea (em paralelo) ou sequencial (Cartun et al., 2019; Ramos-Vara & Miller, 2014; van der Loos, 1999, 2008).

3.2. Aplicações

A possibilidade de avaliar a expressão simultânea de diferentes antígenos torna esta técnica de especial interesse em situações em que se pretende avaliar e quantificar características espaciais da população celular e perfis de co-expressão, para as quais a análise com um só marcador (*singleplex*) é mais difícil e/ou menos informativa (Harms et al., 2023).

O seu uso está especialmente difundido para aplicação em estudos do microambiente tumoral, destacando-se o interesse em medicina humana e mais recentemente em medicina veterinária na expressão do Ligando da Morte Celular Programada 1 (PD-L1, do inglês *Programmed Cell Death Ligand 1*), nomeadamente para previsão da resposta tumoral à imunoterapia. Em medicina humana, trata-se de um teste aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como diagnóstico complementar em pacientes acometidos por cancro de pulmão de células não-pequenas, melanoma, cancro da bexiga urinária, gástrico e em carcinomas cervicais (Doroshov et al., 2021; Lu et al., 2019). Está também provada a utilidade da avaliação da expressão de PDL1 em amostras citológicas, sendo considerada uma técnica útil, eficiente, segura e fiável (Tejerina et al., 2021). Em medicina veterinária, estudos da expressão de marcadores relevantes em pacientes oncológicos candidatos a realizar imunoterapia já foram realizados em melanomas caninos (Stevenson et al., 2021), e mais recentemente, um estudo conduzido por Muscatello et al., (2023) validou o uso de anticorpos PDL1 disponíveis comercialmente e padronizou a sua avaliação em várias neoplasias caninas (melanomas, carcinomas de células renais, carcinomas de células escamosas, linfomas, carcinomas uroteliais, carcinomas pulmonares e carcinomas mamários).

Outros exemplos de aplicação da marcação *multiplex* incluem (1) identificação de células nos casos em que não é possível com apenas um marcador (p.e. ao observar células marcadas positivamente para Ki-67 pode ser difícil compreender qual o tipo celular que se encontra em proliferação, e a adição de um segundo marcador para identificar o tipo celular pode tornar esta tarefa mais clara) (Meijer-Jorna et al., 2007; van der Loos, 2010); e (2) avaliar co-expressão de marcadores celulares e marcadores de ativação (de Boer et al., 1997; Hosono et al., 2003).

A marcação *multiplex* pode ainda ajudar a ultrapassar desafios de rotina do patologista (Harms et al., 2023). Casos de tumores que requerem painel extenso de anticorpos para se atingir diagnóstico (tumores indiferenciados, sarcomas, neoplasias de origem hematopoiética) podem representar um desafio prático quando o número de amostras é reduzido ou as amostras são de reduzida celularidade, tornando o fluxo de trabalho diagnóstico obsoleto (Harms et al., 2023; Wharton et al., 2021). Utilizando mais marcadores por lâmina, aumenta-se por sua vez o rendimento das amostras disponíveis nestes casos (Harms et al., 2023; van der Loos, 2010).

3.3. Técnicas Disponíveis

Uma vez que os estudos de imunofenotipagem geralmente têm início com a seleção dos anticorpos marcadores relevantes para a questão científica, o delineamento dos protocolos de dupla marcação imunoquímica é frequentemente baseado nas características dos anticorpos primários comercialmente disponíveis para a questão de interesse, nomeadamente a espécie em que foram produzidos, isotipo de imunoglobulina, subclasse de IgG, entre outros (van der Loos, 1999, 2008). Na marcação simultânea, os anticorpos primários utilizados são produzidos em espécies diferentes, possibilitando a sua adição “em *cocktail*” com reduzido risco de ocorrência de reações cruzadas com os reagentes secundários. Se os anticorpos primários forem da mesma espécie, então é necessário recorrer à marcação sequencial de forma a evitar reações cruzadas (Cartun et al., 2019; Ramos-Vara & Miller, 2014; van der Loos, 2008; van der Loos & Teeling, 2008).

Historicamente, considerou-se que o desempenho adequado da dupla marcação imunoquímica exige (1) uso de dois sistemas de deteção que não demonstrem reatividade cruzada, preferencialmente comercializados; (2) uso de dois métodos de visualização da reação diferentes (cromogéneos), que demonstrem adequado contraste de cores entre si e com a cor observada nos casos de co-localização (van der Loos, 1999). Contudo, o aparecimento das lâminas digitalizadas e de ferramentas de análise de imagem que permitem a separação de cores tem vindo a minimizar as exigências da escolha dos cromogéneos (Cartun et al., 2019; van der Loos, 2008, 2010). Conforme mencionado, os protocolos de dupla marcação frequentemente têm de ser delineados consoante os anticorpos primários de interesse disponíveis comercialmente, de forma a garantir o requisito (1) e evitar falsas marcações. Por essa razão, as técnicas de dupla marcação abaixo descritas são expostas segundo os anticorpos primários utilizados.

3.3.1. Anticorpos Primários Produzidos em Diferentes Espécies

Quando os anticorpos primários são produzidos em espécies diferentes, duas combinações de anticorpos primários são mencionadas na literatura: rato-coelho e rato-cabra (van der Loos, 2008). Tecnicamente, a combinação dos anticorpos primários rato-coelho representa o procedimento de dupla marcação de mais fácil desempenho: a possibilidade de adicionar os anticorpos primários em *cocktail*, seguida da adição dos anticorpos secundários em *cocktail* e desenvolvimento das reações enzimáticas, torna este procedimento rápido e fácil de usar (van der

Loos, 1999, 2008). Van der Loos, (1999) refere-se a este procedimento como “técnica simultânea indireta/indireta” (Figura 7). O uso de polímeros conjugados com anticorpos secundários e com as enzimas de marcação elimina o problema de reatividade de fundo associado aos sistemas de avidina-biotina, e como a maioria dos polímeros anti-rato e anti-coelho comercializados são conjugados com anticorpos secundários de cabra, a probabilidade de ocorrência de reações cruzadas é reduzida (van der Loos, 1999, 2008). Como regra geral, o uso de reagentes secundários com anticorpos produzidos na mesma espécie é recomendado para a técnica simultânea indireta/indireta (van der Loos, 1999).

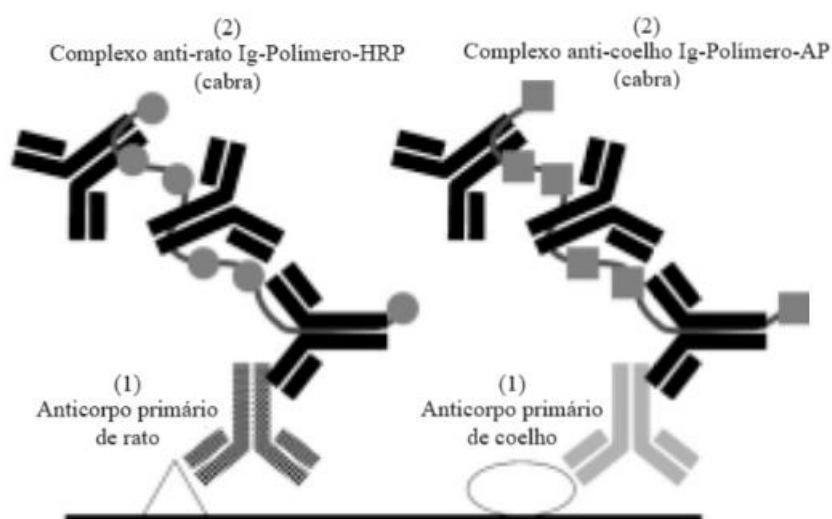


Figura 7: Técnica de dupla marcação simultânea indireta/indireta. (1) – os anticorpos primários são adicionados em cocktail; (2) – os reagentes de detecção secundários são adicionados em cocktail. Esta técnica é rápida e simples de usar. Reações enzimáticas não ilustradas. *HRP* – peroxidase de rábano; *AP* – fosfatase alcalina. Adaptado de van der Loos, (2008).

3.3.2. Anticorpos Primários Produzidos na Mesma Espécie

Vários anticorpos primários disponíveis comercialmente têm origem monoclonal de roedor, tornando a combinação de anticorpos primários rato-rato frequentemente necessária (van der Loos, 2008). Conforme mencionado, a combinação de anticorpos primários produzidos na mesma espécie frequentemente obriga a recorrer a uma técnica de marcação sequencial (Figura 8)(Cartun et al., 2019; Ramos-Vara & Miller, 2014; van der Loos, 1999, 2008).

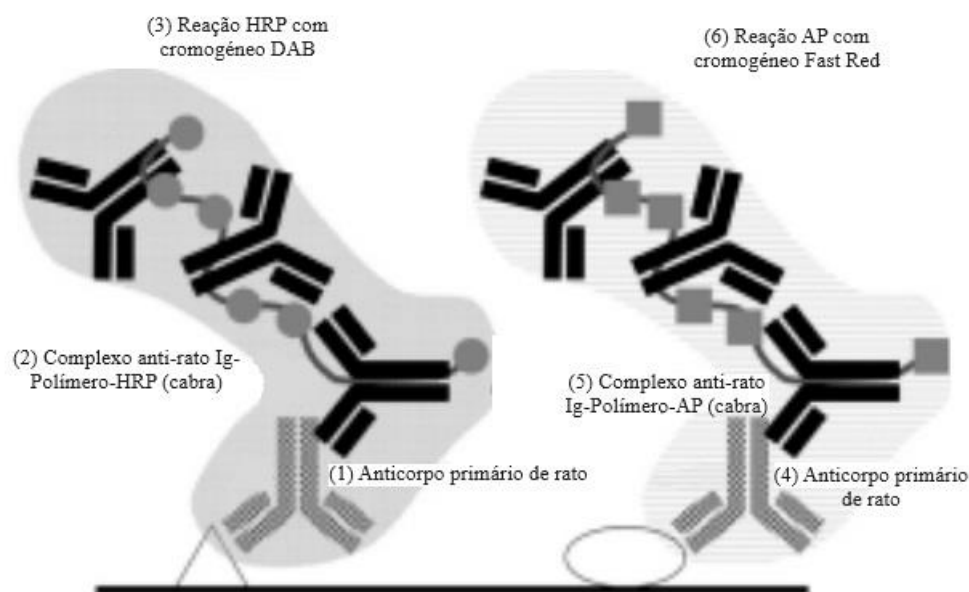


Figura 8: Técnica de dupla marcação sequencial. Nesta técnica, dois procedimentos completos de coloração imunoenzimática são realizados, um de cada vez. *HRP* – peroxidase de rábano; *AP* – fosfatase alcalina. Adaptado de van der Loos, (2008).

O principal problema associado a esta técnica de dupla marcação é a forte possibilidade de ocorrência de reações cruzadas dos reagentes de detecção secundários da segunda reação (projetados para detetar o segundo antígeno) com os anticorpos primários da primeira reação (Ramos-Vara & Miller, 2014; van der Loos, 1999, 2008). A necessidade de um passo intermediário de eluição dos anticorpos primários da primeira reação é debatível (Cartun et al., 2019), no entanto, aconselhada na maioria dos trabalhos publicados (Lan et al., 1995; Ramos-Vara & Miller, 2014; van der Loos, 1999, 2008; van der Loos & Teeling, 2008). Uma forma de prevenir a reação cruzada é usando o cromogênio DAB na primeira reação (Cartun et al., 2019; Lan et al., 1995; Ramos-Vara & Miller, 2014; van der Loos, 1999, 2008), pois o produto da reação com HRP exerce efeito protetor sobre os reagentes da primeira sequência da coloração, prevenindo reações cruzadas (Sternberger & Joseph, 1979). Ainda assim, deve ser tomado em conta que o efeito protetor do produto da reação gerado pode bloquear também o acesso ao segundo antígeno, especialmente se o primeiro e o segundo antígenos estiverem na proximidade um do outro (Valnes & Brandtzaeg, 1984). O DAB é o único cromogênio que se sabe ter este efeito protetor, sendo por isso o único eficaz na prevenção da ocorrência de reações cruzadas (Sternberger & Joseph, 1979). Em

alternativa, a adição de um passo intermédio de recuperação antigénica HIER (10 minutos; 98 °C), descrita por Lan e colaboradores (1995), representa um método simples e eficaz no bloqueio de reações cruzadas (Cartun et al., 2019; Lan et al., 1995; Ramos-Vara & Miller, 2014; van der Loos, 1999, 2008; van der Loos & Teeling, 2008). Outros métodos foram sugeridos com o propósito de remover reagentes da primeira imunocoloração, mas nenhum é eficaz na remoção de anticorpos primários de elevada afinidade (Tramu et al., 1978; van der Loos, 1999, 2008).

A dupla marcação sequencial tem sempre inerente o risco de reação cruzada e falsa positividade e de forma geral, não é aconselhada nos casos em que se espera co-localização dos antígenos de interesse. (Ramos-Vara & Miller, 2014; Santangelo et al., 2021; van der Loos, 1999).

3.4. Aspetos Relevantes Para o Uso Eficaz da Técnica de Dupla Marcação Imunoenzimática

3.4.1. Escolha dos Cromogéneos

Para a observação a olho nu, a escolha dos cromogéneos é um passo crítico para obter contraste visual adequado entre as duas cores usadas e a cor resultante da sobreposição das duas em locais de colocação antigénica (van der Loos, 1999, 2008, 2010). Em adição, é necessário ter em conta a sensibilidade das enzimas e cromogéneos usados (eficiência da deteção) (Scopsi & Larsson, 1985; van der Loos, 2010).

Até à data, apenas duas combinações mencionadas na literatura se consideram satisfazer o primeiro requisito: (1) vermelho-azul (cor intermédia castanho-arroxeadado), desenvolvidos com HRP e AP (Boorsma, 1984) ou alternativamente desenvolvidos com AP sequencialmente (van der Loos & Teeling, 2008); (2) turquesa-vermelho (cor intermédia azul-arroxeadado), desenvolvidos com beta-galactosidase e AP (van der Loos et al., 1993). No entanto, todas estas combinações enzimáticas partilham a desvantagem de que pelo menos um dos cromogéneos com os quais se desenvolvem os produtos de reação coloridos apresenta baixa sensibilidade/eficiência na deteção. O resultado são produtos da reação localizados de forma mais difusa, comprometendo a observação nítida de pequenas estruturas celulares como dendrites, membranas, fibrilas, etc (van der Loos, 2008, 2010).

Contrariamente, a combinação vermelho-castanho, desenvolvidos com HRP e AP, garante a visualização nítida dos produtos de reação, providenciada pela boa sensibilidade/eficiência de detecção dos reagentes. Contudo, esta combinação impossibilita a visualização de colocalização pois a mistura das duas cores é indistinguível do vermelho por si só e do castanho por si só (Boorsma, 1984; van der Loos, 1999, 2008, 2010).

3.4.2. Ferramentas de Análise de Imagem

Apesar dos esforços passados em otimizar a escolha dos cromogêneos para avaliação visual, na prática é atualmente reconhecido que a maioria dos testes de múltipla marcação requerem métodos de análise de imagem computacionais para que a interpretação da intensidade e localização dos produtos cromogénicos seja precisa (Cartun et al., 2019). Esta observação é particularmente relevante quando os antígenos estão colocalizados e a sobreposição de cores é indistinguível das cores sozinhas pelo olho humano. Nestes casos, o uso de lâminas digitalizadas e métodos de separação de cores torna os testes *multiplex* práticos e úteis (Cartun et al., 2019; van der Loos, 2008, 2010). Estes métodos são mencionados na literatura da patologia digital como “métodos de normalização de cores” pois são frequentemente usados para pré-processamento das imagens com o objetivo de reduzir variabilidade inter-amostras das colorações de forma a facilitar a aplicação de algoritmos de análise computacional a essas mesmas imagens com menor variabilidade nos resultados gerados (Aeffner et al., 2019). O método de análise de imagem espectral distingue-se entre outros por ser o mais frequentemente mencionado e de utilidade provada para efeitos de interpretação das múltiplas marcações imunoenzimáticas (van der Loos, 2008, 2010). Informação sobre os vários métodos de normalização de cores pode ser encontrada noutros locais (Aeffner et al., 2019; Hoque et al., 2024).

3.5. Uso da Dupla Marcação em Lâminas Citológicas

A dupla marcação ICC já foi previamente utilizada em amostras citológicas e mencionada em vários estudos, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, utilizando ambas abordagens cromogénica e de fluorescência (Conner et al., 2014; Marrinhas et al., 2022; Matsumoto et al., 2021; Moore et al., 2016; Sawa et al., 2015, 2018). Contudo, o estudo em medicina veterinária que relata a dupla marcação imunoenzimática apenas refere o uso desta técnica no modo manual, relatando o uso deste procedimento em efusões. Os restantes estudos em

medicina veterinária foram conduzidos com protocolos de fluorescência para imunofenotipagem de linfoma canino e felino (Matsumoto et al., 2021; Sawa et al., 2015). No entanto, conforme previamente mencionado, o uso da ICC de fluorescência tem implicações associadas: (1) requer a utilização de um microscópio de fluorescência, que poderá não estar disponível em todos os laboratórios diagnósticos (Burry, 2010); (2) as lâminas previamente coradas com corantes de rotina são sujeitas a autofluorescência, tornando a sua utilização desadequada para abordagens imunoquímicas de fluorescência (Raskin et al., 2022; Santangelo et al., 2021); (3) a coloração fluorescente desvanece com o tempo, dificultando o arquivamento das lâminas (Camus et al., 2020). Ainda que as duas últimas implicações possam ser contornadas com o advento das lâminas digitalizadas e o uso de ferramentas de análise digitais (Al-Janabi et al., 2012), os autores consideram que o desenvolvimento de uma técnica de dupla marcação imunocitoquímica cromogénica, aplicável a lâminas previamente coradas com corantes de rotina, capaz de produzir resultados diagnósticos com uso de menor número de lâminas por diagnóstico, e que seja visualizável ao microscópio de luz, tanto útil como prático para a rotina diagnóstica do patologista clínico veterinário. Dessa forma, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o desempenho diagnóstico de uma técnica automatizada de dupla marcação imunoenzimática em lâminas citológicas previamente coradas, para imunofenotipagem de linfoma canino.

II Materiais e Métodos

1. Recolha de Dados, Critérios de Inclusão, Critérios de Exclusão

Os dados recolhidos para realização do presente trabalho são referentes ao período de 2 de Maio a 16 de Outubro de 2023, tendo sido seleccionados a partir de um repositório em formato Excel, relativo às amostras de imunocitoquímica realizadas no laboratório VEDIS.

Foram seleccionados retrospectivamente, num período máximo de 5 meses, 40 casos de cães com diagnóstico citológico de linfoma, independentemente da localização da amostra, e imunofenótipo previamente conhecido, determinado por imunocitoquímica simples em lâminas previamente coradas: 20 casos de imunofenótipo B e 20 casos de imunofenótipo T. As lâminas dos casos seleccionados coradas com May-Grunwald-Giemsa foram avaliadas ao microscópio ótico pelos autores quanto à sua qualidade, de acordo com a percentagem de células viáveis e extensão da lise celular, sendo as lâminas de baixa percentagem de células viáveis e/ou elevada lise celular consideradas de fraca qualidade, e por isso excluídas do presente estudo.

Os restantes casos foram submetidos a dupla marcação imunocitoquímica com CD3 e Pax5 (n=31), correspondendo a lâminas de linfonodo não especificado (n=22), linfonodo periférico (n=3), baço (n=1), massa mediastínica (n=1) e localização desconhecida (n=4).

2. Protocolo de Imunocitoquímica Dupla

O protocolo subjacente à técnica de imunocitoquímica dupla foi previamente padronizado/standardizado, tendo-se recorrido ao método de incubação sequencial (Apêndice 1). A imunocoloração foi realizada em lâminas previamente coradas com May-Grunwald-Giemsa no laboratório VEDIS, na plataforma automática Leica BOND – III.

Para realização de recuperação antigénica (HIER) as lâminas foram tratadas com solução à base de EDTA (*BOND Epitope Retrieval Solution 2*, Leica Biosystems, pH = 9) durante 60 segundos, a 100°C. Seguiu-se incubação das mesmas por 60 minutos a temperatura ambiente com anticorpo primário monoclonal de ratinho anti-Pax5 (clone 1EW, *Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Pax5*, Leica Biosystems, *ready to use*), classe IgG1. Para remoção do anticorpo primário em excesso, as lâminas foram lavadas com tampão salino de Tris (*BOND Wash*

Solution 10X Concentrate, Leica Biosystems, pH 7.5, diluição 1:10). Para detecção do anticorpo primário, as lâminas foram incubadas por 8 minutos com IgG de coelho anti-ratinho, seguido de incubação com complexo polímero-AP-IgG anti-coelho por 8 minutos, e posterior incubação com cromogéneo *Fast Red* por 10 minutos (*BOND Polymer Refine Red Detection*, Leica Biosystems, *ready to use*). Para remoção dos reagentes em excesso, as lâminas foram lavadas entre cada etapa de incubação com tampão salino de Tris (*BOND Wash Solution 10X Concentrate*, Leica Biosystems, pH 7.5, diluição 1:10).

Para detecção do antígeno CD3, realizou-se uma nova etapa de recuperação antigénica por 20 segundos, em condições idênticas às usadas previamente. As lâminas foram posteriormente incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente com anticorpo primário monoclonal de ratinho anti-CD3 (clone LN10, *Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD3*, Leica Biosystems, *ready to use*), classe IgG2a, e submetidas a um processo de bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio 3% por 10 minutos (*Novocastra™ Peroxidase Block*, Leica Biosystems). Para remoção do anticorpo primário em excesso, as lâminas foram lavadas com tampão salino de Tris (*BOND Wash Solution 10X Concentrate*, Leica Biosystems, pH 7.5, diluição 1:10). Para detecção do anticorpo primário, as lâminas foram incubadas por 8 minutos com IgG de coelho anti-rato, seguido de incubação com complexo polímero-HRP-IgG anti-coelho durante 8 minutos, e posterior incubação com cromogéneo DAB durante 10 minutos, terminando o protocolo de coloração com contracoloração pela hematoxilina, durante 3 minutos (*Novolink Polymer Detection System*, Leica Biosystems, *ready to use*). Para remoção dos reagentes em excesso, as lâminas foram lavadas entre cada etapa de incubação com tampão salino de Tris (*BOND Wash Solution 10X Concentrate*, Leica Biosystems, pH 7.5, diluição 1:10).

3. Interpretação da Imunocitoquímica

Todas as lâminas foram digitalizadas com recurso a uma plataforma Leica Aperio GT 450, e a sua interpretação realizada de forma cega à classificação anterior. O software de código aberto QuPath foi utilizado como visualizador das imagens microscópicas digitalizadas.

A visualização da cor castanha (cromogéneo DAB) em localização membranar e citoplasmática foi interpretada como imunopositividade para CD3 e a visualização da cor vermelha (cromogéneo *Fast Red*) em localização nuclear interpretada como imunopositividade para Pax5.

Padrões de coloração alternativos foram considerados inespecíficos. Considerou-se como controlo interno positivo a marcação de células linfóides B e T residentes nas amostras analisadas. Os controlos negativos foram ausentes devido a falta de lâminas em número suficiente.

Para atribuir o diagnóstico do imunofenótipo foi usado um sistema de classificação da percentagem de células imunoreativas, para cada marcador (Tabela 1).

Tabela 1. Sistema de gradação da percentagem de células imunoreativas

Classificação da Percentagem de Células Imunoreactivas	Percentagem de Células Imunoreativas
Nível 1	<5%
Nível 2	5 – 25%
Nível 3	26 – 50%
Nível 4	51 – 75%
Nível 5	>75%

A atribuição de um imunofenótipo teve por base a demonstração de imunoreatividade em mais de 75% da população celular (imunoreatividade de nível 5) para um dos marcadores, em paralelo com uma baixa percentagem da população celular demonstrando positividade para o marcador da linhagem contrária (imunoreatividade de nível 1 ou 2), independentemente da intensidade da coloração. Dessa forma, os casos que demonstraram mais de 75% das células com cor castanha de localização membranar/citoplasmática, em paralelo com até 25% das células contendo coloração vermelha nuclear, foram considerados linfoma de células T. Igualmente, os casos em que mais de 75% das células demonstraram cor vermelha de localização nuclear em paralelo com até 25% das células contendo coloração castanha membranar/citoplasmática, foram considerados linfoma de células B. Em adição, a análise da imunoreatividade combinada com análise da morfologia celular pode ainda apoiar o diagnóstico de um imunofenótipo, na medida em que quando a imunoreatividade predominante se verifica em células morfológicamente consideradas neoplásicas, mesmo que estas não constituam >75% da população, e simultaneamente a imunoreatividade para o marcador contrário se verifica em células morfológicamente

consideradas residentes, a imagem citológica é altamente sugestiva de linfoma de imunofenótipo do marcador predominante.

A imunoreatividade celular foi ainda classificada quanto à intensidade da coloração em: (1) fraca intensidade; (2) intensidade moderada; (3) coloração intensa.

Para avaliar o desempenho da coloração, a percentagem de células positivas e a sua intensidade na dupla marcação de cada caso, foram comparadas com as observadas nas lâminas de imunocitoquímica simples de cada um dos marcadores individualmente (Apêndice 3).

3.1. Uso da Desconvolução de Cor no Software QuPath como Auxiliar na Interpretação

Sempre que considerado útil, recorreu-se à funcionalidade do software “desconvolução de cor” como auxiliar na visualização e interpretação dos resultados, com o objetivo de observar individualmente as cores castanha ou vermelha presentes na lâmina, bem como a sua localização. Todos os casos que levantaram dúvidas foram reavaliados ao microscópio para confirmação da interpretação inicial, independentemente do uso prévio desta funcionalidade.

III Resultados

1. Resultados Gerais

A amostra final dos casos incluídos no estudo (n=31) incluiu 16 linfomas de células T e 15 linfomas de células B, conforme determinado pela técnica de marcação imunocitoquímica simples. A técnica de dupla marcação imunocitoquímica utilizada permitiu a atribuição de um diagnóstico de imunofenótipo em 87,1% dos casos (27/31), correspondendo a 12 linfomas de células T (Figura 9A) e aos 15 linfomas de células B (Figura 9B), para os quais se observou concordância de 100% (27/27) com o diagnóstico atribuído pela imunocitoquímica simples. Em 12,9% dos casos, todos de células T, (4/31) o diagnóstico foi inconclusivo (Apêndice 2).

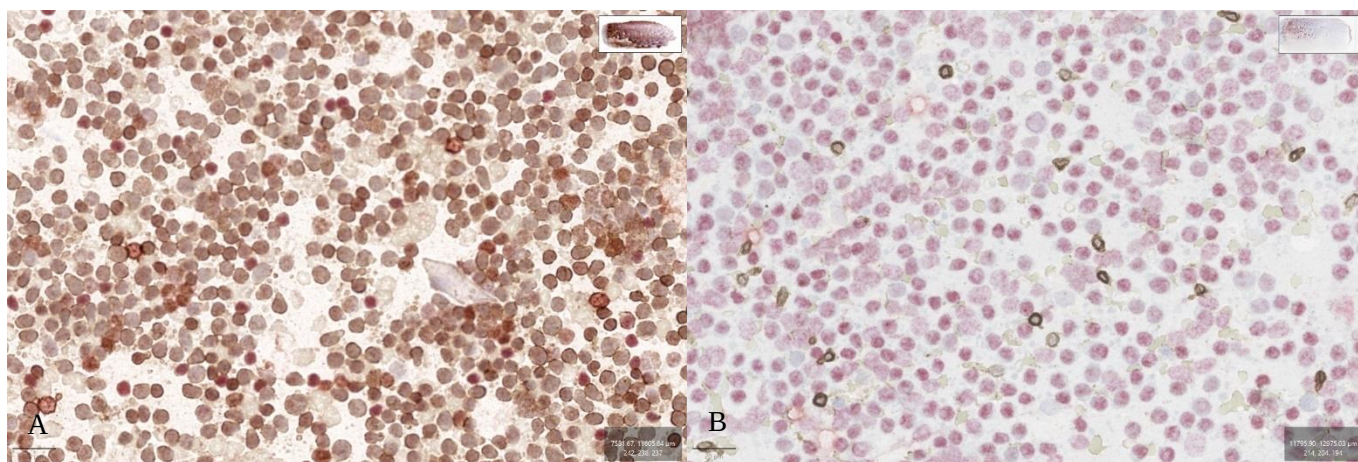


Figura 9: Imagens representativas dos casos em que a atribuição de um imunofenótipo é clara. Marcação CD3 desenvolvida com DAB e marcação a Pax5 desenvolvida com *Fast Red*. (A) – linfoma de células T: a população celular é composta por mais de 75% de células com marcação positiva para CD3 e 5 a 25% de células com marcação positiva para Pax5 (x100). (B) – linfoma de células B: a população celular é composta por mais de 75% de células com marcação positiva para Pax5 e menos de 5% de células com marcação positiva para CD3 (x100)

Todos os casos foram visualizados digitalmente através do software QuPath, sendo o imunofenótipo facilmente atribuído em 61,3% dos mesmos (19/31). Os restantes (9 linfomas de células T e 3 linfomas de células B), necessitaram de confirmação microscópica por se verificar uma ou mais das seguintes condições: (1) coloração heterogênea, variando de

membranar/citoplasmática a nuclear para o marcador CD3 (3/12); (2) coloração heterogênea, variando de nuclear a membranar/citoplasmática para o marcador Pax5 (1/12); (3) dupla negatividade na maioria das células presentes na lâmina (2/12); (4) a presença de células com imunopositividade para Pax5 ser aparentemente imperceptível (8/12)(Apêndice 2). Após confirmação ao microscópio, foi atribuído um imunofenótipo a oito desses casos, e quatro casos foram considerados definitivamente inconclusivos.

2. Casos Problemáticos

Dos casos com aparente reatividade nuclear ao marcador CD3 (n=3), um foi considerado definitivamente inconclusivo por fraca qualidade da lâmina (lise excessiva), presença de coloração heterogênea generalizada variando de membranar a nuclear, e ausência de células Pax5-positivas (Figura 10A, Apêndice 2). Nos restantes identificou-se ao microscópio numerosas células linfóides neoplásicas com reatividade membranar/citoplasmática, que inicialmente não tinham sido facilmente visualizadas nas lâminas digitalizadas, o que permitiu a atribuição de imunofenótipo T. O mesmo se verificou no caso em que tinha sido detetada marcação inespecífica com o marcador Pax5 em localização membranar/citoplasmática (Figura 10B, Apêndice 2): apesar da inicial observação nas amostras digitalizadas da presença de células com reatividade inespecífica, ao microscópio óptico a maioria da população celular demonstrou imunopositividade em localização nuclear, permitindo a atribuição de imunofenótipo B.

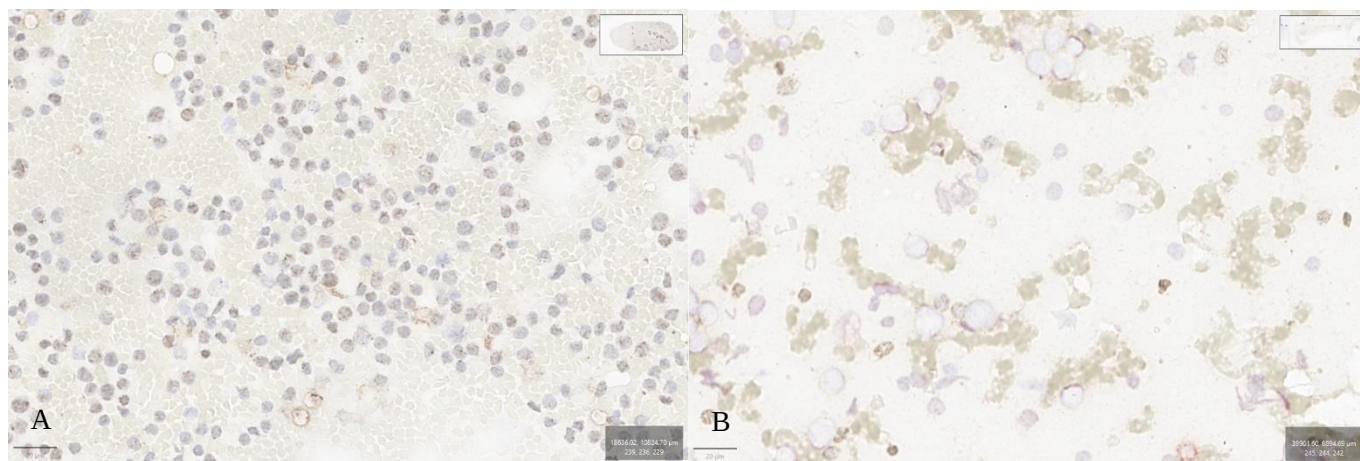


Figura 10: Casos em que se verificou imunoreatividade inespecífica. (A) – linfoma de células T: numerosas células linfóides demonstram reatividade ao marcador CD3 em localização nuclear (x100). (B) – linfoma de células B: ocasionais células linfóides neoplásicas demonstram marcação inespecífica com o marcador Pax5 em localização membranar (x100).

Todos os casos com elevada proporção de células de reatividade negativa tanto para CD3 como para Pax5 (n=2) tinham ambos lâminas consideradas de fraca qualidade quando observadas após a coloração. Em um destes casos foi possível encontrar regiões da lâmina em que o nível de imunoreatividade e a intensidade da coloração eram apreciáveis, sendo a maioria das células positivas para Pax5, com coloração de intensidade tênue, mas ainda permitindo a classificação como linfoma B (Apêndice 2; Figura 11A, 11B). O outro caso foi considerado definitivamente inconclusivo por fraca qualidade da amostra (lise excessiva) e por as células reativas presentes demonstrarem marcação inespecífica para ambos os anticorpos, variando de membranar a nuclear (Apêndice 2).

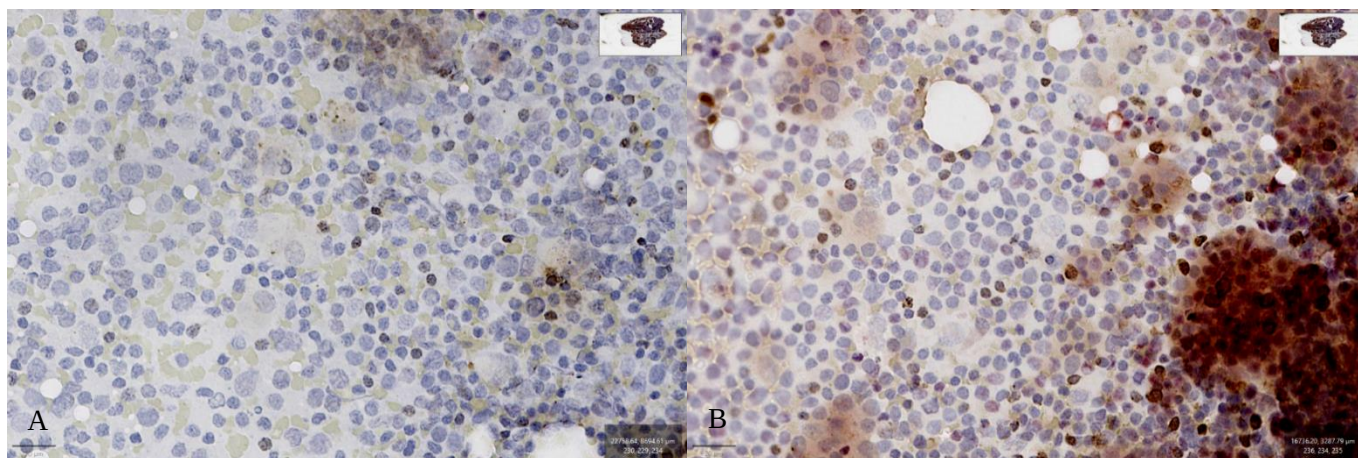


Figura 11: Caso com elevada proporção de células duplamente negativas. (A) – raras células apresentam marcação positiva para CD3 (x100). (B) – exame cuidadoso da lâmina permitiu encontrar campos em que a coloração era apreciável, com mais de 75% das células demonstrando marcação tênue com Pax5 (x100).

2.1.Linfomas de Células T Desafiante e Desconvolução de Cor

Por fim, dos casos de linfoma de células T em que a presença de células Pax5-positivas foi inicialmente impercetível (n=7), três foram definitivamente considerados inconclusivos por essa mesma razão, mas nos restantes quatro foram identificadas raras células imunoreativas para o marcador Pax5. Esta visualização foi inconsistentemente facilitada com a funcionalidade “desconvolução de cor” do software QuPath, e posteriormente confirmada com visualização ao microscópio ótico.

A funcionalidade de desconvolução de cor do software facilitou a interpretação destes casos quando a separação de cores foi bem sucedida, permitindo realçar as células coradas a vermelho (células residentes, Pax5-positivas), inicialmente indistinguíveis (Figura 12). No entanto, a separação de cores nem sempre foi eficaz pois em certos casos os vetores criados pelo software para cada corante sobrepõem-se e a distinção de cores permanece difícil (Figura 13).

Independentemente da utilidade do software na interpretação das colorações duvidosas, todos os 8 casos foram confirmados ao microscópio, e o registo diagnóstico final feito segundo os resultados observados (Apêndice 2).

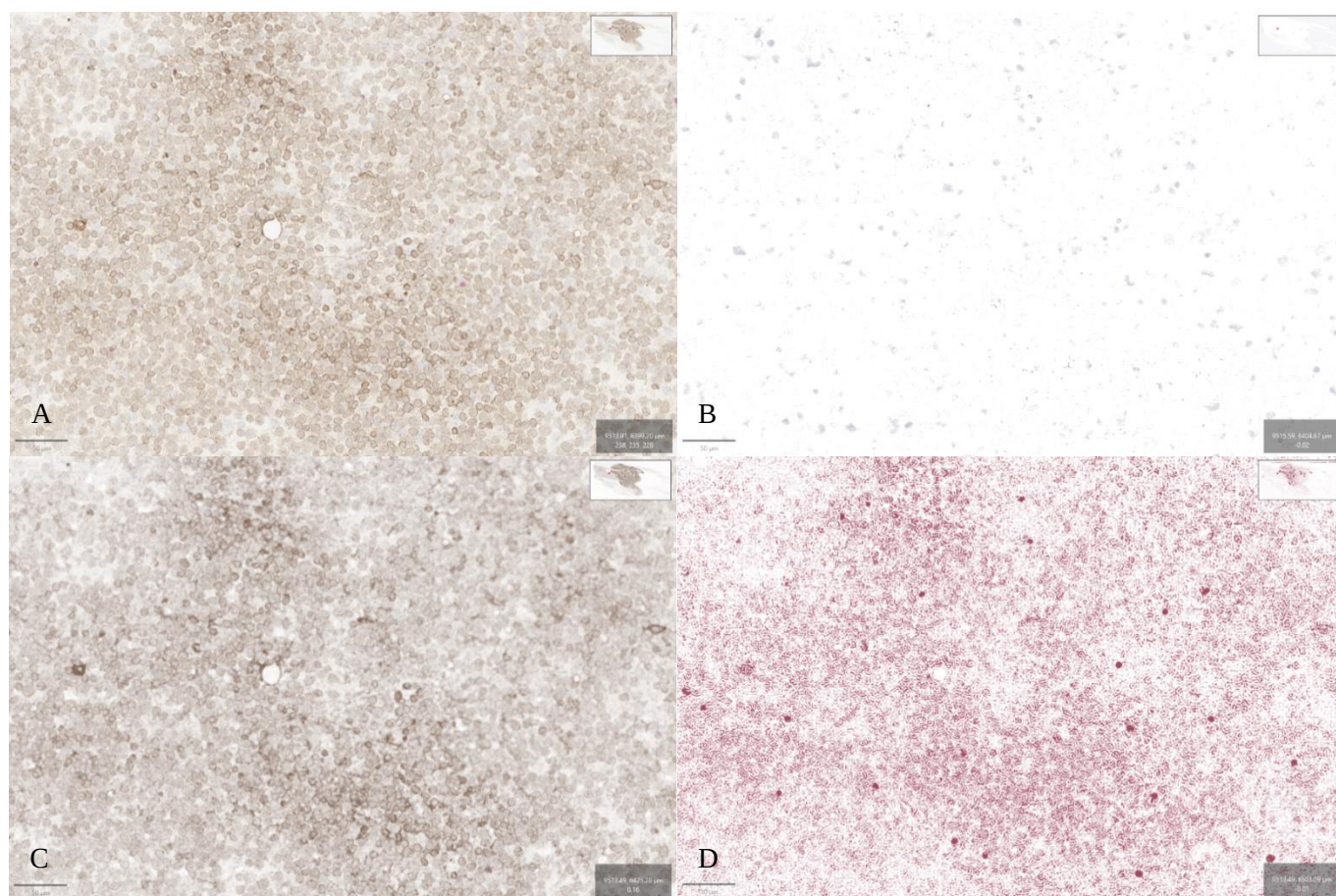


Figura 12: Exemplo de caso de linfoma de células T em que a desconvolução de cor facilita a identificação de células residentes (x50). (A) – Original. (B) – Hematoxilina. (C) – DAB. (D) – *Fast Red*

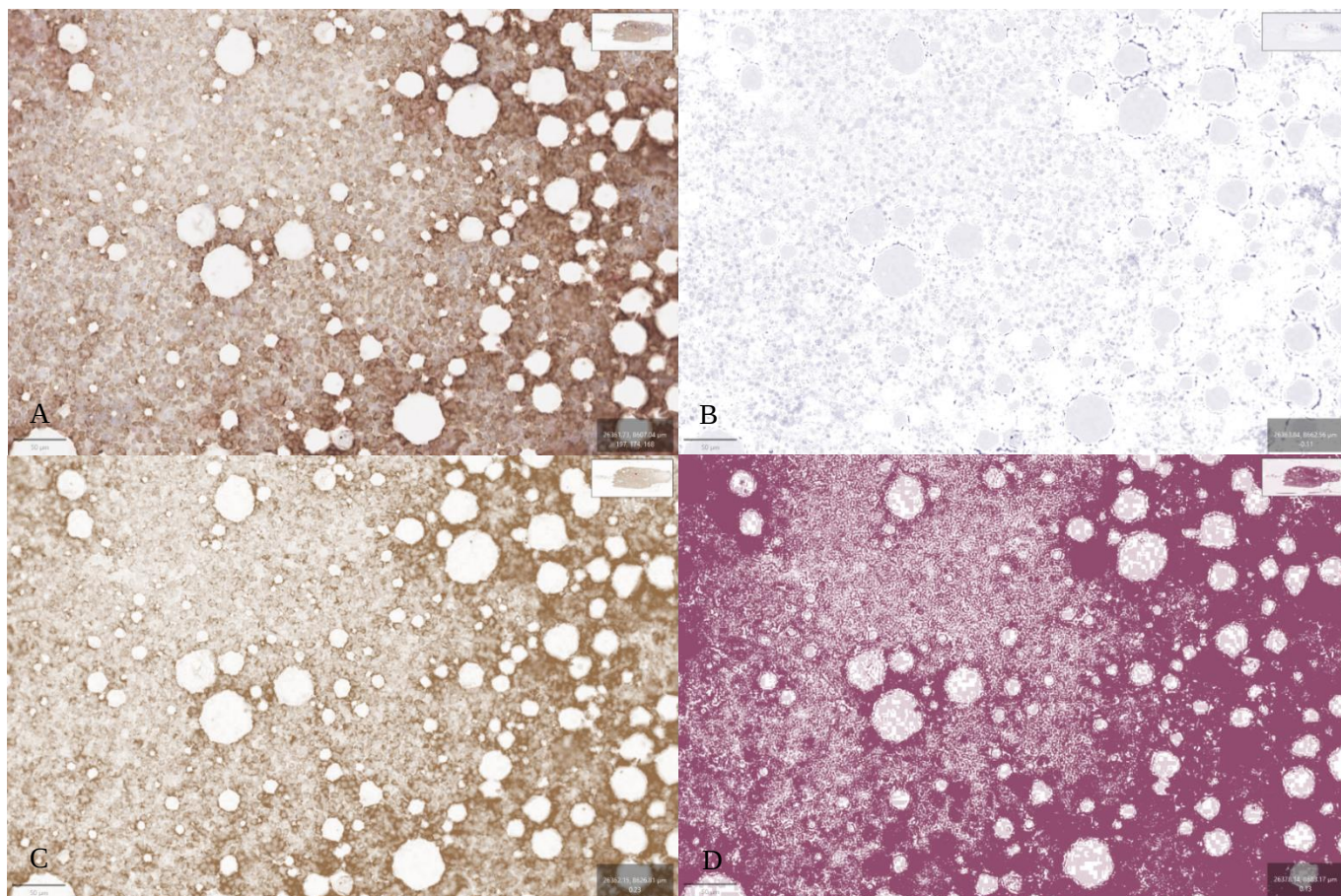


Figura 13: Exemplo de caso de linfoma de células T em que a desconvolução de cor não é eficaz no auxílio da identificação de células residentes. Os vetores atribuídos a cada cromogéneo caracterizam-se por valores de pixels comuns aos dois, realçando as mesmas estruturas (x50). (A) – Original. (B) – Hematoxilina. (C) – DAB. (D) – *Fast Red*

3. Comparação do Nível de Imunoreatividade

Quanto à percentagem de imunoreatividade celular, verificou-se para os linfomas de células T uma imunoreatividade ao marcador CD3 idêntica entre as duas técnicas para todos os casos (imunoreatividade de nível 5)(Apêndice 3). A imunoreatividade ao marcador Pax5 nos linfomas de células T foi menor na dupla marcação em 2 casos (imunoreatividade de nível 1 na dupla marcação e de nível 2 na marcação simples), idêntica entre as duas técnicas em 9 casos, e maior na dupla marcação em 1 caso (imunoreatividade de nível 2 na dupla marcação e de nível 1 na marcação simples). Para os linfomas de células B, registou-se uma imunoreatividade ao

marcador Pax5 idêntica entre as duas técnicas para todos os casos (imunoreatividade de nível 5) e uma imunoreatividade ao marcador CD3 menor na dupla marcação em 6 casos (imunoreatividade de nível 1 na dupla marcação e de nível 2 na marcação simples), idêntica entre as duas técnicas em 7 casos, e maior na dupla marcação em 2 casos (imunoreatividade de nível 2 na dupla marcação e de nível 1 na marcação simples). Não se verificou imunoreatividade de nível 3 ou 4 para nenhum dos marcadores em nenhum dos casos incluídos na amostra.

4. Comparação da Intensidade da coloração

Quanto à intensidade da coloração, verificou-se para os linfomas de células T, uma menor intensidade da coloração CD3 na dupla marcação em três casos, e coloração de intensidade idêntica entre dupla marcação e marcação simples nos restantes nove. A coloração Pax5 demonstrou menor intensidade na dupla marcação em sete casos, intensidade idêntica entre os dois métodos em dois casos, e intensidade superior na dupla marcação em 3 casos.

Nos linfomas de células B, observou-se em três casos uma coloração Pax5 de menor intensidade na dupla marcação, coloração de intensidade idêntica nos dois métodos em 11 casos, e coloração de intensidade superior na dupla marcação em um caso. Quanto à intensidade da coloração CD3, verificou-se coloração de intensidade idêntica entre os dois métodos em 13 casos, e coloração de intensidade superior na dupla marcação em dois casos.

IV Discussão

1. Generalidades

Em primeiro lugar, o presente estudo demonstra que a dupla marcação sequencial imunoenzimática em lâminas citológicas previamente coradas tem uma boa capacidade diagnóstica permitindo a atribuição de um imunofenótipo com uma só lâmina citológica na maioria dos casos, que revela a sua particular utilidade nos casos em que o material citológico disponível é limitado.

2. Casos Problemáticos

2.1. Reações Inespecíficas e Dupla Negatividade

Os casos em que se verificou marcação inespecífica para o marcador CD3 (localização nuclear) ou para o marcador Pax5 (localização membranar/citoplasmática) foram considerados inconclusivos. Conforme mencionado, casos inconclusivos (potenciais falsos positivos) podem ser devidos a causas pré-analíticas – amostras excessivamente lisadas, necróticas ou inadequadamente fixadas – e causas analíticas - procedimentos de bloqueio das proteínas séricas ou peroxidase endógena desadequados, concentração dos reagentes excessivamente alta e ocorrência de reações cruzadas (Fowler & Lachar, 2008; Ramos-Vara, 2017; Ramos-Vara & Gelain, 2023; Ramos-Vara & Miller, 2014; Santangelo et al., 2021; Skoog & Tani, 2011). De facto, tendo em conta que no nosso estudo se usou um protocolo de coloração sequencial, é possível a ocorrência de reações cruzadas dos reagentes de deteção do anticorpo primário anti-CD3 com os anticorpos primários anti-Pax5 remanescentes. Mais ainda, o nosso protocolo de coloração não usou o passo intermédio de HIER conforme descrito por Lan et al., (1995) nem desenvolveu a coloração DAB em primeiro lugar, ambas medidas mencionadas na literatura como sendo eficazes a evitar reações cruzadas indesejadas (Lan et al., 1995; Sternberger & Joseph, 1979; van der Loos, 1999, 2008; van der Loos & Teeling, 2008). Contudo, os quatro casos em que se observou reatividade nuclear ao marcador CD3 corresponderam a linfomas de células T, com raras células Pax5-positivas (residentes) presentes, e como tal, a presença de células neoplásicas com reatividade nuclear ao marcador CD3 não se justifica pela ocorrência de reações cruzadas por si só. Outra hipótese justificativa das colorações inespecíficas observadas são alterações de antigenicidade trazidas por fixação e/ou armazenamento desadequados. As lâminas citológicas coradas com corantes de Romanowsky

retêm antigenicidade durante aproximadamente cinco meses após a coloração (Raskin et al., 2019). Os casos incluídos no presente estudo foram todos corados com May – Grunwald – Giemsa nos cinco meses que precederam a dupla marcação ICC, e como tal, é pouco provável que a fixação dos mesmos represente a causa subjacente à reatividade inespecífica observada. Ainda assim, é importante notar que os corantes de Romanowsky incorporam fixação inicial com metanol, um agente fixador por coagulação que causa alterações na estrutura terciária das proteínas pois os domínios proteicos hidrofóbicos libertam-se da repulsão exercida pela água (*unfolding*), requerindo posterior recuperação antigénica (Ramos-Vara & Miller, 2014). A fixação por coagulação acarreta por isso o risco de “floculação” citoplasmática e fraca preservação de grânulos de secreção e mitocôndrias (Ramos-Vara, 2005). Mais ainda, Raskin et al., (2019) também mencionam que para otimizar a recuperação antigénica dos marcadores leucocitários, incluindo CD3 e Pax5, é recomendado o uso de soluções tampão à base de citrato, de baixo pH, ao contrário da maioria dos antigénios que requer soluções de recuperação de elevado pH. Esta poderá ter sido uma possível causa dos resultados subótimos observados, uma vez que a HIER do protocolo usado no presente estudo foi feita com solução à base de EDTA de pH = 9. Em adição, três dos quatro casos em que se observou reatividade inespecífica foram considerados de fraca qualidade após a coloração devido a lise excessiva (artefacto de realização do esfregaço). Para todos os efeitos, a predominância da reatividade para um dos marcadores em paralelo com reduzida reatividade ao marcador da linhagem contrária permitiu a atribuição de um imunofenótipo em três destes quatro casos, com o último sendo definitivamente considerado inconclusivo, para o qual a marcação ICC simples concorrente também produziu resultados inespecíficos.

Os casos em que se observou elevada proporção de células com dupla negatividade foram considerados falsos negativos e a causa atribuída para ambos foi fraca qualidade da amostra devido a lise excessiva.

2.2.Linfomas de Células T e Valor Auxiliar da Desconvolução de Cor

Nos casos com diagnóstico de linfoma de células T com presença impercetível de células Pax5-positivas colocaram-se duas hipóteses justificativas: (1) verdadeira ausência de reação devido a lise excessiva e/ou procedimentos ineficazes de recuperação antigénica; (2) falsa colocalização devido a reatividade cruzada dos reagentes de deteção do anticorpo primário anti-CD3 com anticorpos primários anti-Pax5 remanescentes, dado que conforme descrito, a mistura das cores

castanha e vermelha é de difícil distinção de cada uma dessas cores individualmente a olho nu (Boorsma, 1984; van der Loos, 1999, 2008, 2010). Vários autores mencionam a utilidade das ferramentas de análise de imagem digital que permitem a separação de cores nestas situações, particularmente o uso de ferramentas de análise de imagem espectral, que realizam a separação de cores com base nas características espectrais de cada produto de reação colorido (Cartun et al., 2019; Hoque et al., 2024; van der Loos, 2010). No nosso estudo, a separação de cores foi realizada com recurso ao software QuPath (Bankhead et al., 2017), que realiza esta tarefa segundo o método de desconvolução de cor descrito por Ruifrok & Johnston, (2001). Apesar de útil e o seu uso complementar ter ajudado ocasionalmente a identificar células Pax5-positivas inicialmente impercetíveis (Figura 13), houve casos em que a separação de cores através deste método não foi possível pois os vetores das cores criados para o DAB e para o *Fast Red* sobrepõem-se resultando em imagens em que as estruturas celulares são realçadas tanto pelo vetor vermelho como pelo vetor castanho, e permanecem indistintas (Figura 14). As diferenças técnicas entre os vários métodos de separação de cores estão além do conhecimento dos autores e podem ser encontradas noutras publicações (Hoque et al., 2024). Contudo, as limitações encontradas na tentativa de realizar a separação de cores no nosso estudo são ilustrativas da necessidade da presença de técnicos e analistas de bioimagem capazes de auxiliar o patologista nas tarefas de análise de imagem em patologia digital, enfatizada na literatura da patologia digital (Aeffner et al., 2016; Grunkin et al., 2011; Webster & Dunstan, 2014). Ainda assim, independentemente das limitações de separação de cores no QuPath, após confirmação ao microscópio ótico foi possível a atribuição de um imunofenótipo a seis dos oito casos em que a presença de células imunopositivas para o marcador Pax-5 foi inicialmente impercetível. O número de casos relativamente elevado para os quais se observou esta dificuldade reflete o desafio de imunofenotipagem nos casos de linfoma de células T quando se usa esta técnica. No entanto, a examinação e interpretação cuidadosas destes casos geralmente revela a presença de células residentes com coloração nuclear vermelha-escura. Mais ainda, apesar dos casos em que não foi possível a identificação de células residentes terem sido considerados definitivamente inconclusivos, é importante deixar a nota de que para todos os efeitos a maioria das células viáveis presentes nestas lâminas demonstravam imunoreatividade membranal/citoplasmática para o marcador CD3, indicando um diagnóstico de suspeita de linfoma de células T.

3. Nível de Imunoreatividade

Observou-se também que para qualquer imunofenótipo, o nível da imunoreatividade do marcador da população celular predominante foi sempre idêntico entre a dupla marcação e a marcação simples (imunoreatividade de nível 5)(Apêndice 3), indicando boa sensibilidade geral da técnica de dupla marcação. Para os marcadores da linhagem contrária (células residentes), o nível de imunoreatividade nunca variou por mais do que 1, de tal forma que não foram registados casos com imunoreatividade de nível 3 nem 4. Esta pequena variação pode representar variabilidade intra-observador, na medida em que os casos em que a percentagem de células positivas é *borderline* entre imunoreatividade de nível 1 e nível 2 podem ter sido inicialmente (ICC simples) atribuídos nível 1 e posteriormente (ICC dupla) nível 2, e vice-versa. Ainda assim, uma vez que seja garantida qualidade e preservação celular das lâminas, a proporção entre células neoplásicas e células residentes é mais facilmente avaliada numa só lâmina contendo os dois marcadores detetados com cromogénios diferentes do que na observação consecutiva de duas lâminas contendo um marcador cada uma. Para todos os efeitos, em nenhum caso as variações observadas afetaram o diagnóstico de imunofenótipo final.

4. Intensidade da Coloração

Quanto à intensidade da coloração, de forma geral, as intensidades observadas para ambos os marcadores entre a técnica de marcação simples e técnica de marcação dupla foram equiparáveis (Apêndice 3). Uma exceção verifica-se para os linfomas de células T, em que se observou que a coloração das células residentes (Pax5-positivas) de menor intensidade (comparativamente à observada na ICC simples) numa quantidade considerável de casos. De qualquer das formas as diferenças de intensidade da coloração não impediram a atribuição de um imunofenótipo em nenhum dos casos incluídos no estudo.

5. Comparação com Estudos Prévios

Na bibliografia consultada, foram encontrados dois estudos de imunofenotipagem de linfoma canino e felino recorrendo a uma técnica de dupla marcação ICC de fluorescência (Matsumoto et al., 2021; Sawa et al., 2015). Num destes estudos a técnica foi desenvolvida para os marcadores CD79a e CD3 (Sawa et al., 2015) e no outro para os marcadores CD20 e CD3

(Matsumoto et al., 2021). Em nenhum dos estudos foi mencionada a observação de reatividade inespecífica, possivelmente por em ambos ter sido usada uma técnica simultânea indireta/indireta, que ao contrário da técnica sequencial usada no presente estudo, tem reduzida probabilidade de ocorrência de reações inespecíficas (van der Loos, 1999, 2008). Adicionalmente, Sawa e colaboradores (2015) realizaram o protocolo de coloração também em lâminas previamente coradas com Giemsa, contudo a coloração não teve sucesso, tendo-se observado ausência de sinal nestas lâminas. As técnicas de imunofluorescência apresentam a vantagem comparativamente às técnicas imunoenzimáticas de que teoricamente não têm interferência de enzimas endógenas que produzem reatividade de fundo e colorações inespecíficas (Sawa et al., 2018). Contudo, a técnica de dupla marcação imunoenzimática apresenta as vantagens de que (1) não requer microscópio de fluorescência para ser observada e interpretada; (2) pode ser efetuada numa lâmina seletivamente escolhida antes do procedimento pois os corantes de romanowsky não interferem com o seu desempenho diagnóstico.

6. Limitações do Estudo

A principal limitação do presente estudo foi que o protocolo de coloração usado foi desenvolvido sob as restrições impostas pelos reagentes comercialmente disponíveis, sendo os anticorpos primários ambos monoclonais de ratinho. O facto de os anticorpos primários serem ambos desenvolvidos na mesma espécie obrigou ao uso de uma técnica sequencial, que acarreta os riscos da ocorrência de reações cruzadas e consequentemente falsas colorações. Esta poderá ser uma potencial causa da dificuldade em identificar células residentes Pax5-positivas em linfomas de células T.

7. Estudos Futuros

Futuramente seria interessante replicar o presente estudo com aplicação a outras espécies animais, nomeadamente para imunofenotipagem de linfoma felino. Também seria importante desenvolver protocolos de dupla marcação recorrendo a uma técnica simultânea e realizar avaliação estatística do grau de correlação dos resultados obtidos usando ambos os protocolos (simultâneo e sequencial) com os resultados obtidos pela marcação simples.

Os trabalhos recentemente publicados sobre a expressão de PDL1 em neoplasias caninas (Muscatello et al., 2023; Stevenson et al., 2021) e sobre a utilidade de avaliar a expressão deste

marcador em lâminas citológicas em medicina humana (Tejerina et al., 2021) levantam a hipótese de que a aplicação desta técnica no estudo do microambiente tumoral em lâminas citológicas de neoplasias caninas seja igualmente informativa.

Mais ainda, continuar o estudo da aplicabilidade da dupla marcação em lâminas citológicas previamente coradas para diagnóstico de tumores de diferentes origens celulares poderá ser útil dado o valor da técnica em contornar as limitações pré-analíticas da imunocitoquímica.

8. Considerações Finais

O presente estudo demonstrou a possibilidade de imunofenotipagem de linfoma canino usando uma só lâmina citológica previamente corada e selecionada, com recurso ao microscópio ótico, aumentando o rendimento do material citológico disponível para estes efeitos. Embora excluídos do nosso estudo, os autores acreditam que esta técnica poderá também ser útil no estudo de casos de linfoma que demonstram co-expressão de marcadores de células B (Pax5) e de células T (CD3), dado que estes marcadores são de antígenos presentes em compartimentos celulares diferentes, permitindo a sua simultânea avaliação visualmente.

Ao melhor do conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho em que se avalia a aplicabilidade da técnica de dupla marcação imunoenzimática em lâminas citológicas previamente coradas para efeitos de imunofenotipagem de linfoma em medicina veterinária.

V Conclusão

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a utilidade da dupla marcação imunoenzimática em lâminas citológicas previamente coradas para imunofenotipagem de linfoma canino, tendo sido possível a atribuição de um imunofenótipo em 87,1% dos casos, os quais demonstraram excelente concordância com a marcação imunocitoquímica simples (100%). A maioria dos casos desafiantes eram linfomas de células T em que a identificação de células linfóides residentes a olho nu é mais difícil quando a densidade celular é elevada pois a distinção entre castanho (desenvolvido com DAB) ou vermelho (desenvolvido com *Fast Red*) e a mistura das duas cores é visualmente desafiante, no entanto, a examinação e interpretação cuidadosas destes casos frequentemente permite atingir um diagnóstico de imunofenótipo. As ferramentas de análise de imagem digital que permitem a separação de cores podem ser úteis nestes casos, especialmente se o patologista contar com o apoio de técnicos e analistas de bioimagem. Os casos considerados definitivamente inconclusivos corresponderam a lâminas de fraca qualidade e com ausência de células residentes pois lise excessiva produz colorações inespecíficas, contudo, a interpretação cuidadosa destes casos permite a atribuição de um diagnóstico “sugestivo” de um imunofenótipo com base na predominância de imunoreatividade para um dos marcadores. O uso de um passo intermédio de eluição do primeiro anticorpo primário e de solução tampão de recuperação antigénica de baixo pH poderão otimizar os resultados obtidos com a dupla marcação sequencial. Os autores concluem que a dupla marcação imunocitoquímica cromogénica em lâminas citológicas previamente coradas é uma técnica útil, prática e fiável na rotina do patologista clínico pois pode ser realizada numa lâmina previamente escolhida, visualizada ao microscópio ótico e permite a imunofenotipagem de linfoma com recurso a uma única lâmina citológica, tirando máximo partido do material citológico disponível.

VI Referências Bibliográficas

- Abendroth, C. S., & Dabbs, D. J. (1995). Immunocytochemical staining of unstained versus previously stained cytologic preparations. *Acta Cytologica*, 39(3), 379–386.
- Absolom, D. R., & van Oss, C. J. (1986). The nature of the antigen-antibody bond and the factors affecting its association and dissociation. *CRC Critical Reviews in Immunology*, 6(1), 1–46.
- Aeffner, F., Wilson, K., Bolon, B., Kanaly, S., Mahrt, C. R., Rudmann, D., Charles, E., & Young, G. D. (2016). Commentary: Roles for Pathologists in a High-throughput Image Analysis Team. *Toxicologic Pathology*, 44(6), 825–834.
<https://doi.org/10.1177/0192623316653492>
- Aeffner, F., Zarella, M. D., Buchbinder, N., Bui, M. M., Goodman, M. R., Hartman, D. J., Lujan, G. M., Molani, M. A., Parwani, A. V., Lillard, K., Turner, O. C., Vemuri, V. N. P., Yuil-Valdes, A. G., & Bowman, D. (2019). Introduction to Digital Image Analysis in Whole-slide Imaging: A White Paper from the Digital Pathology Association. *Journal of Pathology Informatics*, 10(1), 9.
https://doi.org/10.4103/jpi.jpi_82_18
- Al-Janabi, S., Huisman, A., & Van Diest, P. J. (2012). Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*, 61(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03814.x>
- Aoki, J., Sasaki, N., Hino, N., & Nanba, K. (1991). A study on the appropriate fixation for the procedures for the better preservation of cellular antigenicity and morphology of the blood smear in immunocytochemistry: an improvement of the immunostain technique using alkaline-phosphatase (ALP) as a labeling enzyme. *[Rinsho Ketsueki] The Japanese Journal of Clinical Hematology*, 32(1), 11–18.
- Appelbaum, F. R., Sale, G. E., Storb, R., Charrier, K., Deeg, H. J., Graham, T., & Wulff, J. C. (1984). Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: Classification, morphology, clinical presentation

- and response to chemotherapy. *Hematological Oncology*, 2(2), 151–168.
<https://doi.org/10.1002/hon.2900020205>
- Armitage, J. O. (1997). A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 89(11), 3909–3918.
<https://doi.org/10.1182/blood.V89.11.3909>
- Aulbach, A. D., Swenson, C. L., & Kiupel, M. (2010). Optimized Processing of Fine-Needle Lymph Node Biopsies for Automated Immunostaining. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(3), 383–388.
<https://doi.org/10.1177/104063871002200306>
- Bae, H., Kim, S.-K., & Yu, D. (2023). Comparative analysis of the aberrant immunophenotype and clinical characteristics in dogs with lymphoma: a study of 27 cases. *Frontiers in Veterinary Science*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1254458>
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 16878.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Barger, A., Raskin, R., Flatland, B., Freidrichs, K., Walton, R., & Camus, M. (2017). *ASVCP quality assurance guidelines: veterinary immunocytochemistry (ICC)* (pp. 1–5).
- Blauvelt, M., & Messick, J. B. (2020). The Lymph Nodes. In A. C. Valenciano & R. L. Cowell (Eds.), *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (5th ed., pp. 171–185). Elsevier.
- Boorsma, D. M. (1984). Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 80(2), 103–106.
<https://doi.org/10.1007/BF00679982>

- Bratthauer, G. L. (2010). Processing of Tissue Culture Cells. In C. Oliver & M. Jamur (Eds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* (Vol. 588, pp. 85–92). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_12
- Burky, R. W. (2010). *Immunocytochemistry: A practical guide for biomedical research*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1304-3>
- Burky, R. W. (2011). Controls for Immunocytochemistry: An update. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(1), 6–12. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956920>
- Dorn, C. R., Taylor, D. O. N., Schneider, R., Hibbard, H. H., & Klauber, M. R. (1968). Survey of Animal Neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer Morbidity in Dogs and Cats From Alameda County. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 40(2), 307–318. <https://doi.org/10.1093/jnci/40.2.307>
- Camus, M. S., Kelly, L. S., & Barger, A. M. (2020). Immunocytochemistry. In A. C. Valenciano & R. L. Cowell (Eds.), *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (5th ed., pp. 512–520). Elsevier Inc.
- 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>
- Carter, R. F., & Valli, V. E. (1988). Advances in the cytologic diagnosis of canine lymphoma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, 3(2), 167–175.
- Cartun, R. W., Taylor, C. R., & Dabbs, D. J. (2019). Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In D. J. Dabbs (Ed.), *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications* (5th ed., pp. 1-46.e5). Saunders, Elsevier Inc.

- Chan, J. K. C., Banks, P. M., Cleary, M. L., Delsol, G., Wolf-Peters, C. DE, Falini, B., Gatter, K. C., Grogan, T. M., Harris, N. L., Isaacson, P. G., Jaffe, E. S., Knowles, D. M., Mason, D. Y., Muller-Hermelink, H.-K., Pileri, S. A., Piris, M. A., Ralfkiaer, E., Stein, H., & Warnke, R. A. (1994). A proposal for classification of lymphoid neoplasms (by the International Lymphoma Study Group). *Histopathology*, 25(6), 517–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1994.tb01371.x>
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., & Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology*, 8(5), 463–470. <https://doi.org/10.1038/ni1454>
- 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* (1st ed., pp. 319–341). Wiley Blackwell.
- Comazzi, S., & Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal*, 188(2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.011>
- Comazzi, S., Gelain, M. E., Martini, V., Riondato, F., Miniscalco, B., Marconato, L., Stefanello, D., & Mortarino, M. (2011). Immunophenotype Predicts Survival Time in Dogs with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 100–106. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0640.x>
- Comazzi, S., 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), 232. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1557-2>
- Conner, J. R., Cibas, E. S., Hornick, J. L., & Qian, X. (2014). Wilms tumor 1/cytokeratin dual-color immunostaining reveals distinctive staining patterns in metastatic melanoma, metastatic carcinoma, and mesothelial cells in pleural fluids:

- An effective first-line test for the workup of malignant effusions. *Cancer Cytopathology*, 122(8), 586–595. <https://doi.org/10.1002/cncy.21439>
- Cozzi, M., Marconato, L., Martini, V., Aresu, L., Riondato, F., Rossi, F., Stefanello, D., & Comazzi, S. (2018). Canine nodal marginal zone lymphoma: Descriptive insight into the biological behaviour. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(2), 246–252. <https://doi.org/10.1111/vco.12374>
- Cummings, J., Raynaud, F., Jones, L., Sugar, R., & Dive, C. (2010). Fit-for-purpose biomarker method validation for application in clinical trials of anticancer drugs. *British Journal of Cancer*, 103(9), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605910>
- Dabbs, D. J. (2019). Immunohistology of Lymph Node and Lymph Node Neoplasms. In *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications* (5th ed., p. 164). Elsevier.
- Dabbs, D. J., & Wang, X. (1998). Immunocytochemistry on cytologic specimens of limited quantity. *Diagnostic Cytopathology*, 18(2), 166–169.
- de Boer, O. J., Hirsch, F., van der Wal, A. C., van der Loos, C. M., Das, P. K., & Becker, A. E. (1997). Costimulatory molecules in human atherosclerotic plaques: an indication of antigen specific T lymphocyte activation. *Atherosclerosis*, 133(2), 227–234. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(97\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(97)00135-4)
- Denda, T., Kamoshida, S., Kawamura, J., Harada, K., Kawai, K., & Kuwano, S. (2012). Optimal antigen retrieval for ethanol-fixed cytologic smears. *Cancer Cytopathology*, 120(3), 167–176. <https://doi.org/10.1002/cncy.21192>
- 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, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.008>

- Dong, H. Y., Browne, P., Liu, Z., & Gangi, M. (2008). PAX-5 is invariably expressed in B-cell lymphomas without plasma cell differentiation. *Histopathology*, 53(3), 278–287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03091.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>
- Dorn, C. R., Taylor, D. O. N., Chaulk, L. E., & Hibbard, H. H. (1966). The Prevalence of Spontaneous Neoplasms in a Defined Canine Population. *A. J. P. H.*, 56(2), 254–265.
- Dorn, C. R., Taylor, D. O. N., & Schneider, R. (1970). The Epidemiology of Canine Leukemia and Lymphoma. *Comparative Leukemia Research*, 36, 403–415. <https://doi.org/10.1159/000391733>
- Doroshov, D. B., Bhalla, S., Beasley, M. B., Sholl, L. M., Kerr, K. M., Gnjjatic, S., Wistuba, I. I., Rimm, D. L., Tsao, M. S., & Hirsch, F. R. (2021). PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(6), 345–362. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00473-5>
- 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>
- Fetsch, P. A., & Abati, A. (2010). The Clinical Immunohistochemistry Laboratory: Regulations and Troubleshooting Guidelines. In C. Oliver & M. Jamur (Eds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* (Vol. 588, pp. 399–412). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_43
- Fisher, D. J., Naydan, D., Werner, L. L., & Moore, P. F. (1995). Immunophenotyping Lymphomas in Dogs: A Comparison of Results From Fine Needle Aspirate and

- Needle Biopsy Samples. *Veterinary Clinical Pathology*, 24(4), 118–123.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1995.tb00951.x>
- 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>
- 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](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80065-5)
- Fowler, L. J., & Lachar, W. A. (2008). Application of Immunohistochemistry to Cytology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 132(3), 373–383.
<https://doi.org/10.5858/2008-132-373-AOITC>
- Gabor, L., Canfield, P., & Malik, R. (1999). Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma. *Australian Veterinary Journal*, 77(7), 436–441. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1999.tb12085.x>
- Gong, Y., Sun, X., Michael, C. W., Attal, S., Williamson, B. A., & Bedrossian, C. W. M. (2003). Immunocytochemistry of serous effusion specimens: A comparison of ThinPrep vs. cell block. *Diagnostic Cytopathology*, 28(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1002/dc.10219>
- Greenlee, P. G., Filippa, D. A., Quimby, F. W., Patnaik, A. K., Calvano, S. E., Matus, R. E., Kimmel, M., Hurvitz, A. I., & Lieberman, P. H. (1990). Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer*, 66(3), 480–490.
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900801\)66:3<480::aid-cncr2820660314>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900801)66:3<480::aid-cncr2820660314>3.0.co;2-x)
- Grunkin, M., Raundahl, J., & Foged, N. T. (2011). Practical Considerations of Image Analysis and Quantification of Signal Transduction IHC Staining. In A.

Kalyuzhny (Ed.), *Signal Transduction Immunohistochemistry. Methods in Molecular Biology* (Vol. 717, pp. 143–154). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-024-9_8

Hagiwara, M., Tomita, A., Takata, K., Shimoyama, Y., Yoshino, T., Tomita, Y., & Nakamura, S. (2012). Primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders with aberrant expression of PAX5: Report of three cases. *Pathology International*, 62(4), 264–270. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2011.02784.x>

Happerfield, L. C., Saward, R., Grimwade, L., Bloxham, D., & Erber, W. N. (2008). Automated immunostaining of cell smears: an alternative to flow cytometry. *Journal of Clinical Pathology*, 61(6), 740–743.
<https://doi.org/10.1136/jcp.2007.054601>

Harms, P. W., Frankel, T. L., Moutafi, M., Rao, A., Rimm, D. L., Taube, J. M., Thomas, D., Chan, M. P., & Pantanowitz, L. (2023). Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. *Modern Pathology*, 36(7), 100197.
<https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100197>

Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., & Bloomfield, C. D. (1999). The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Annals of Oncology*, 10(12), 1419–1432.
<https://doi.org/10.1023/A:1008375931236>

Hawse, W. F., Champion, M. M., Joyce, M. V., Hellman, L. M., Hossain, M., Ryan, V., Pierce, B. G., Weng, Z., & Baker, B. M. (2012). Cutting Edge: Evidence for a Dynamically Driven T Cell Signaling Mechanism. *The Journal of Immunology*, 188(12), 5819–5823. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200952>

- Holmes, M. L., Pridans, C., & Nutt, S. L. (2008). The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunology & Cell Biology*, 86(1), 47–53. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100134>
- Hoque, Md. Z., Keskinarkaus, A., Nyberg, P., & Seppänen, T. (2024). Stain normalization methods for histopathology image analysis: A comprehensive review and experimental comparison. *Information Fusion*, 102, 101997. <https://doi.org/10.1016/j.inffus.2023.101997>
- Hosono, M., de Boer, O. J., van der Wal, A. C., van der Loos, C. M., Teeling, P., Piek, J. J., Ueda, M., & Becker, A. E. (2003). Increased expression of T cell activation markers (CD25, CD26, CD40L and CD69) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 168(1), 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(03\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00024-8)
- Ikeda, K., Tate, G., Suzuki, T., & Mitsuya, T. (2011). Comparison of Immunocytochemical Sensitivity Between Formalin-Fixed and Alcohol-Fixed Specimens Reveals the Diagnostic Value of Alcohol-Fixed Cytocentrifuged Preparations in Malignant Effusion Cytology. *American Journal of Clinical Pathology*, 136(6), 934–942. <https://doi.org/10.1309/AJCPAH5WR2LFTUSI>
- Jain, S., Aresu, L., Comazzi, S., Shi, J., Worrall, E., Clayton, J., Humphries, W., Hemmington, S., Davis, P., Murray, E., Limeneh, A. A., Ball, K., Ruckova, E., Muller, P., Vojtesek, B., Fahraeus, R., Argyle, D., & Hupp, T. R. (2016). The Development of a Recombinant scFv Monoclonal Antibody Targeting Canine CD20 for Use in Comparative Medicine. *PLOS ONE*, 11(2), e0148366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148366>
- Jubala, C. M., Wojcieszyn, J. W., Valli, V. E. O., Getzy, D. M., Fosmire, S. P., Coffey, D., Bellgrau, D., & Modiano, J. F. (2005). CD20 Expression in Normal Canine B Cells and in Canine non-Hodgkin Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 42(4), 468–476. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-468>
- Kirbis, I. S., Maxwell, P., Fležar, M. S., Miller, K., & Ibrahim, M. (2011). External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK

- NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathology*, 22(4), 230–237.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00867.x>
- Kiupel, M., Teske, E., & Bostock, D. (1999). Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 36(4), 292–300.
<https://doi.org/10.1354/vp.36-4-292>
- Lan, H. Y., Mu, W., Nikolic-Paterson, D. J., & Atkins, R. C. (1995). A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 43(1), 97–102.
<https://doi.org/10.1177/43.1.7822770>
- Lennert, K., & Feller, A. C. (1992). *Histopathology of Non-Hodgkin Lymphomas: (Based on the Updated Kiel Classification)* (2nd ed.). Springer-Verlag.
- Lennert, K., & Mohri, N. (1978). Malignant Lymphomas Other Than Hodgkin's Disease: Histopathology and Diagnosis of Non-Hodgkin's Lymphomas. In *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie* (Vol. 1, pp. 111–469). Springer.
- Leong, A. S.-Y., Cooper, K., & Leong, F. J. W.-M. (2003). CD3. In *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology* (2nd ed., pp. 63–64). Greenwich Medical Media.
- Lu, S., Stein, J. E., Rimm, D. L., Wang, D. W., Bell, J. M., Johnson, D. B., Sosman, J. A., Schalper, K. A., Anders, R. A., Wang, H., Hoyt, C., Pardoll, D. M., Danilova, L., & Taube, J. M. (2019). Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Oncology*, 5(8), 1195–1204.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1549>
- Lukes, R. J., & Collins, R. D. (1974). Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 34(S8), 1488–1503.

- Marconato, L., Gelain, M. E., & Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematological Oncology*, 31(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/hon.2017>
- 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. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(4), 480–485. <https://doi.org/10.2460/javma.238.4.480>
- Marrinhas, C., Lopes, C., Santos, M., & Marcos, R. (2022). Mesothelial cells: The messed-up cells that make a confusion out of an effusion. *Veterinary Clinical Pathology*, 51(2), 194–195. <https://doi.org/10.1111/vcp.13146>
- Marrinhas, C., Malhão, F., Lopes, C., Sampaio, F., Moreira, R., Caniatti, M., Santos, M., & Marcos, R. (2022). Doing more with less: multiple uses of a single slide in veterinary cytology. A practical approach. *Veterinary Research Communications*, 46(3), 641–654. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09953-0>
- Martini, V., Marano, G., Aresu, L., Bonfanti, U., Boracchi, P., Caniatti, M., Cian, F., Gambini, M., Marconato, L., Masserdotti, C., Nicoletti, A., Riondato, F., Roccabianca, P., Stefanello, D., Teske, E., & Comazzi, S. (2022). Performance of lymph node cytopathology in diagnosis and characterization of lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(1), 204–214. <https://doi.org/10.1111/jvim.16326>
- Martini, V., Poggi, A., Riondato, F., Gelain, M. E., Aresu, L., & Comazzi, S. (2015). Flow-cytometric detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell

- lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(3), 281–287.
<https://doi.org/10.1111/vco.12043>
- Matsumoto, F., Shima-sawa, M., Furusawa, Y., Yamato, O., & Yabuki, A. (2021). A rapid multiple immunofluorescence method for the simultaneous detection of CD20 and CD3 in canine and feline cytological samples. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(5), 832–836. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0597>
- Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., & Busslinger, M. (2011). *Pax5: A Master Regulator of B Cell Development and Leukemogenesis* (pp. 179–206).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00005-2>
- Meijer-Jorna, L. B., van der Loos, C. M., de Boer, O. J., van der Horst, C. M. A. M., & van der Wal, A. C. (2007). Microvascular proliferation in congenital vascular malformations of skin and soft tissue. *Journal of Clinical Pathology*, 60(7), 798–803. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.038885>
- Merlo, D. F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P. L., Sestito, V., Tanara, G., & Bocchini, V. (2008). Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 976–984.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x>
- Miller, R. T., & Kubier, P. (2002). Immunohistochemistry on Cytologic Specimens and Previously Stained Slides (When No Paraffin Block Is Available). *Journal of Histotechnology*, 25(4), 251–257. <https://doi.org/10.1179/his.2002.25.4.251>
- Monaco, S. E., & Dabbs, D. J. (2014). Immunocytochemistry. In D. J. Dabbs (Ed.), *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications* (4th ed., pp. 829–853). Saunders, Elsevier Inc.
- Montero, C. (2003). The Antigen-Antibody Reaction in Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(1), 1–4.
<https://doi.org/10.1177/002215540305100101>

- Moore, A. R., Coffey, E., Leavell, S. E., Krafus, G., Duncan, C., Dowers, K., & Santangelo, K. S. (2016). Canine bicavitary carcinomatosis with transient needle tract metastasis diagnosed by multiplex immunocytochemistry. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(3), 495–500. <https://doi.org/10.1111/vcp.12394>
- Muscatello, L. V., Gobbo, F., Avallone, G., Innao, M., Benazzi, C., D'Annunzio, G., Romaniello, D., Orioles, M., Lauriola, M., & Sarli, G. (2023). PDL1 immunohistochemistry in canine neoplasms: Validation of commercial antibodies, standardization of evaluation, and scoring systems. *Veterinary Pathology*. <https://doi.org/10.1177/03009858231209410>
- National Cancer Institute. (1982). National cancer institute sponsored study of classifications of non-hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer*, 49(10), 2112–2135.
- O'Brien, P., Morin, P., Ouellette, R. J., & Robichaud, G. A. (2011). The Pax-5 Gene: A Pluripotent Regulator of B-cell Differentiation and Cancer Disease. *Cancer Research*, 71(24), 7345–7350. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1874>
- 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>
- Parra, E. R., Uraoka, N., Jiang, M., Cook, P., Gibbons, D., Forget, M.-A., Bernatchez, C., Haymaker, C., Wistuba, I. I., & Rodriguez-Canales, J. (2017). Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Scientific Reports*, 7(1), 13380. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13942-8>
- 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. (2015). 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>
- Pinto da Cunha, N., Barroca, I., Carvalho, H., Esteves, S., Levey, A., Caniatti, M., & Michal, M. (2021). Automated immunocytochemistry on previously-stained cytology samples for lymphoma immunophenotyping – a preliminary study of 307 cases. *Book of Abstracts of the 2021 European Society of Veterinary Clinical Pathology – European Colleague of Veterinary Clinical Pathology Meeting*, 45.
- 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. *The Veterinary Journal*, 167(2), 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.10.009>
- 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>
- Prichard, J. W. (2014). Overview of Automated Immunohistochemistry. *Archives of Pathology & 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>
- Proust, R., Bertoglio, J., & Gesbert, F. (2012). The Adaptor Protein SAP Directly Associates with CD3 ζ Chain and Regulates T Cell Receptor Signaling. *PLoS ONE*, 7(8), e43200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043200>
- Ramos-Vara, J. (2013). Immunohistochemical Methods. In G. C. Howard & M. R. Kaser (Eds.), *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* (2nd ed., pp. 303–341). CRC Press.
- 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. (2017). Principles and Methods of Immunohistochemistry. In J.-C. Gautier (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Drug Safety Evaluation* (Vol. 1641, pp. 115–128). Springer Science. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5
- Ramos-Vara, J. A., & Borst, L. B. (2017). Immunohistochemistry: Fundamentals and Applications in Oncology. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (5th ed., pp. 44–87). John Wiley & Sons, Inc.
- Ramos-Vara, J. A., & Gelain, M. E. (2023). Advanced Diagnostic Techniques. In R. E. Raskin, D. J. Meyer, & K. M. Boes (Eds.), *Canine and Feline Cytopathology: A Color Atlas and Interpretation Guide* (4th ed.). Elsevier, Inc.
- Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2007). Immunohistochemical Detection of Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) in Canine Epitheliotropic T-Cell Lymphoma (Mycosis Fungoides). *Veterinary Pathology*, 44(1), 74–79. <https://doi.org/10.1354/vp.44-1-74>
- 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>

- Ramos-Vara, J., Avery, P., & Avery, A. (2016). Advanced diagnostic techniques. In R. Raskin & D. Meyer (Eds.), *Canine and Feline Cytology A Color Atlas and Interpretation Guide* (3rd ed., pp. 453–494). Elsevier.
- Rao, S., Lana, S., Eickhoff, J., Marcus, E., Avery, P. R., Morley, P. S., & Avery, A. C. (2011). Class II Major Histocompatibility Complex Expression and Cell Size Independently Predict Survival in Canine B-Cell Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(5), 1097–1105. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0767.x>
- Raskin, R. E. (2023). Hemolymphatic System. In R. E. Raskin, D. J. Meyer, & K. M. Boes (Eds.), *Canine and Feline Cytopathology: A Color Atlas and Interpretation Guide* (4th ed.). Elsevier.
- Raskin, R. E., Santangelo, K., & Polak, K. (2022). Cytochemical Staining and Immunocytochemistry. In M. B. Brooks, K. E. Harr, D. M. Seelig, K. J. Wardrop, & D. J. Weiss (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (7th ed., pp. 478–499). John Wiley & Sons, Inc.
- 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>
- Rue, S. M., Eckelman, B. P., Efe, J. A., Bloink, K., Deveraux, Q. L., Lowery, D., & Nasoff, M. (2015). Identification of a candidate therapeutic antibody for treatment of canine B-cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164(3–4), 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.02.004>

- Ruifrok, A., & Johnston, D. (2001). Quantification of histological staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*, 23, 291–299.
- Ruslander, D. A., Gebhard, D. H., Tompkins, M. B., Grindem, C. B., & Page, R. L. (1997). Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo (Athens, Greece)*, 11(2), 169–172.
- Santangelo, K. S., Schaefer, D. M. W., Leavell, S. E., & Priest, H. L. (2021). Special Staining Techniques: Application and Quality Assurance. In L. C. Sharkey, M. J. Radin, & D. Seelig (Eds.), *Veterinary Cytology* (pp. 47–72). John Wiley & Sons, Inc.
- 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>
- Sawa, M., Yabuki, A., Kohyama, M., Miyoshi, N., & Yamato, O. (2018). Rapid multiple immunofluorescent staining for the simultaneous detection of cytokeratin and vimentin in the cytology of canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 47(2), 326–332. <https://doi.org/10.1111/vcp.12598>
- Sawa, M., Yabuki, A., Setoguchi, A., & Yamato, O. (2015). Development and application of multiple immunofluorescence staining for diagnostic cytology of canine and feline lymphoma. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(4), 580–585.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12300>
- Scopsi, L., & Larsson, L.-I. (1985). Increased sensitivity in immunocytochemistry. *Histochemistry*, 82(4), 321–329. <https://doi.org/10.1007/BF00494060>
- Seelig, D., Avery, A., Ehrhart, E., & Linden, M. (2016). The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Veterinary Sciences*, 3(2).
<https://doi.org/10.3390/vetsci3020011>
- 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>
- Sheng, W., Zhang, C., Mohiuddin, T. M., Al-Rawe, M., Zeppernick, F., Falcone, F. H., Meinhold-Heerlein, I., & Hussain, A. F. (2023). Multiplex Immunofluorescence: A Powerful Tool in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3086. <https://doi.org/10.3390/ijms24043086>
- Sherman, M. E., Jimenez-Joseph, D., Gangi, M. D., & Rojas-Corona, R. R. (1994). Immunostaining of small cytologic specimens. Facilitation with cell transfer. *Acta Cytologica*, 38(1), 18–22.
- Shtilbans, V., Szporn, A. H., Wu, M., & Burstein, D. E. (2005). p63 immunostaining in destained bronchoscopic cytological specimens. *Diagnostic Cytopathology*, 32(4), 198–203. <https://doi.org/10.1002/dc.20217>
- 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>
- Stefanello, D., Valenti, P., Zini, E., Comazzi, S., Gelain, M. E., Roccabianca, P., Avallone, G., Caniatti, M., & Marconato, L. (2011). Splenic Marginal Zone Lymphoma in 5 Dogs (2001–2008). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 90–93. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0639.x>
- Steinberg, J. D., & Keating, J. H. (2008). What is your diagnosis? Cervical mass in a cat. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(3), 323–327. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00033.x>
- Sternberger, L. A., & Joseph, S. A. (1979). The unlabeled antibody method. Contrasting color staining of paired pituitary hormones without antibody removal. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27(11), 1424–1429. <https://doi.org/10.1177/27.11.92498>
- Stevenson, V. B., Perry, S. N., Todd, M., Huckle, W. R., & LeRoith, T. (2021). PD-1, PD-L1, and PD-L2 Gene Expression and Tumor Infiltrating Lymphocytes in

- Canine Melanoma. *Veterinary Pathology*, 58(4), 692–698.
<https://doi.org/10.1177/03009858211011939>
- Stone, B. M., & Gan, D. (2014). Application of the tissue transfer technique in veterinary cytopathology. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(2), 295–302.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12138>
- Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. (2008). *WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues* (4th ed.). WHO Press.
- Taylor, B. E., Leibman, N. F., Luong, R., Loar, A. S., & Craft, D. M. (2013). Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(1), 85–91. <https://doi.org/10.1111/vcp.12011>
- Tejerina, E., García Tobar, L., Echeveste, J. I., de Andrea, C. E., Vigliar, E., & Lozano, M. D. (2021). PD-L1 in Cytological Samples: A Review and a Practical Approach. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.668612>
- Teske, E. (2014). Cytology of the Lymphoid Tissues. In J. Dunn (Ed.), *Manual of Diagnostic Cytology of the Dog and Cat* (1st ed., pp. 33–55). John Wiley & Sons, Ltd.
- Teske, E., Wisman, P., Moore, P. F., & van Heerde, P. (1994). Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Experimental Hematology*, 22(12), 1179–1187.
- Thalheim, L., Williams, L. E., Borst, L. B., Fogle, J. E., & Suter, S. E. (2013). Lymphoma Immunophenotype of Dogs Determined by Immunohistochemistry, Flow Cytometry, and Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1509–1516.
<https://doi.org/10.1111/jvim.12185>

- Tramu, G., Pillez, A., & Leonardelli, J. (1978). An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 26(4), 322–324. <https://doi.org/10.1177/26.4.207771>
- Turinelli, V., Marchal, T., Ponce, F., Bonnefont-Rebeix, C., & Fournel-Fleury, C. (2005). Aggressive large granular lymphocyte lymphomas in five dogs: a clinical cytohistological and immunological study. *Comparative Clinical Pathology*, 13(3), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s00580-004-0531-5>
- Vail, D. M., Kisseberth, W. C., Obradovich, J. E., Moore, F. M., London, C. A., MacEwen, E. G., & Ritter, M. A. (1996). Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Experimental Hematology*, 24(7), 807–815.
- Vail, D. M., Kravis, L. D., Kisseberth, W. C., Ogilvie, G. K., & Volk, L. M. (1997). Application of Rapid CD3 Immunophenotype Analysis and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) Frequency to Fine Needle Aspirate Specimens From Dogs With Lymphoma. *Veterinary Clinical Pathology*, 26(2), 66–70. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1997.tb00711.x>
- Vail, D. M., Pinkerton, M. E., & Young, K. M. (2019). Hematopoietic Tumors. In S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (6th ed., pp. 688–772). Elsevier.
- Valli, V., Bienzle, D., & J. Meuten, D. (2017). Tumors of the Hemolymphatic System. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (Fifth Edition, pp. 203–321). John Wiley & Sons, Inc.
- Valli, V., 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., Myint, M. S., 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., Vernau, W., de Lorimier, L.-P., Graham, P. S., & Moore, P. F. (2006). Canine Indolent Nodular Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 43(3), 241–256. <https://doi.org/10.1354/vp.43-3-241>
- 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>
- Valnes, K., & Brandtzaeg, P. (1984). Paired indirect immunoenzyme staining with primary antibodies from the same species. Application of horseradish peroxidase and alkaline phosphatase as sequential labels. *The Histochemical Journal*, 16(5), 477–487. <https://doi.org/10.1007/BF01041348>
- van der Loos, C. M. (1999). *Immunoenzyme Multiple Staining Methods*. Bios Scientific Publishers Ltd.
- van der Loos, C. M. (2008). Multiple Immunoenzyme Staining: Methods and Visualizations for the Observation With Spectral Imaging. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(4), 313–328. <https://doi.org/10.1369/jhc.2007.950170>
- van der Loos, C. M. (2010). Chromogens in Multiple Immunohistochemical Staining Used for Visual Assessment and Spectral Imaging: The Colorful Future. *Journal of Histotechnology*, 33(1), 31–40. <https://doi.org/10.1179/his.2010.33.1.31>

- van der Loos, C. M., Becker, A. E., & van den Oord, J. J. (1993). Practical suggestions for successful immunoenzyme double-staining experiments. *The Histochemical Journal*, 25(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/BF00161039>
- van der Loos, C. M., & Teeling, P. (2008). A Generally Applicable Sequential Alkaline Phosphatase Immunohistochemical Double Staining. *Journal of Histotechnology*, 31(3), 119–127. <https://doi.org/10.1179/his.2008.31.3.119>
- Vernau, W., & Moore, P. F. (1999). An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69(2–4), 145–164. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00051-3)
- 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>
- Webster, J. D., & Dunstan, R. W. (2014). Whole-Slide Imaging and Automated Image Analysis: Considerations and Opportunities in the Practice of Pathology. *Veterinary Pathology*, 51(1), 211–223. <https://doi.org/10.1177/0300985813503570>
- Wharton, K. A., Wood, D., Manesse, M., Maclean, K. H., Leiss, F., & Zuraw, A. (2021). Tissue Multiplex Analyte Detection in Anatomic Pathology – Pathways to Clinical Implementation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.672531>
- Williams, M. J., Avery, A. C., Lana, S. E., Hillers, K. R., Bachand, A. M., & Avery, P. R. (2008). Canine Lymphoproliferative Disease Characterized by Lymphocytosis:

Immunophenotypic Markers of Prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(3), 596–601. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0041.x>

Yau, P., Dhand, N., Thomson, P., & Taylor, R. (2017). Retrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2001–2009). *Australian Veterinary Journal*, 95(5), 149–155. <https://doi.org/10.1111/avj.12576>

Zhang, Z., Zhao, L., Guo, H., Pan, Q., & Sun, Y. (2012). Diagnostic significance of immunocytochemistry on fine needle aspiration biopsies processed by thin-layer cytology. *Diagnostic Cytopathology*, 40(12), 1071–1076. <https://doi.org/10.1002/dc.21736>

Anexos e Apêndices

Anexo 1. Critérios, parâmetros e terminologia utilizados na avaliação citológica de casos de linfoma (adaptado de Raskin, 2023).

Critérios	Parâmetros	
Tamanho Celular (por comparação do diâmetro nuclear com o diâmetro de um eritrócito)	Células Pequenas	1-1,5x diâmetro de um eritrócito
	Células Médias	2-2,5x diâmetro de um eritrócito
	Células Grandes	≥3x diâmetro de um eritrócito
Nucleares	Forma	Redondo (superfície lisa)
		Redondo Irregular (indentações leves)
		Convoluído (várias indentações profundas)
		Indentado (uma única indentação profunda)
	Posição	Central
		Excêntrica
Nucleolares	Visibilidade	Proeminentes
		Discretos
	Número	1 Único nucléolo
		Múltiplos nucléolos
	Tamanho	Pequenos
		Grandes
Posição	Central	
	Marginal/Periféricos	
Citoplasmáticos	Quantidade	Escasso
		Moderado
		Abundante
	Cor	Pálido
Basofilia Moderada		
Fortemente Basofílico		
Contagem de mitoses (número total de figuras de mitose em 10 campos de elevada celularidade em ampliação 400x)	Baixa	0-2 figuras de mitose
	Moderada	3-5 figuras de mitose
	Elevada	>6 figuras de mitose
Grau (morfologicamente baseado no tamanho celular e contagem de mitoses)	Baixo Grau	Linfoma de células pequenas + baixa contagem de mitoses
	Alto Grau	Linfoma de células médias ou grandes +

moderada ou elevada
contagem de mitoses

Apêndice 1. Protocolo para dupla marcação imunocitoquímica enzimática usado no presente estudo

Passo	Procedimento	Parâmetros
1	HIER	60 segundos
2	Anticorpo primário anti-Pax5	60 minutos; temperatura ambiente
3	Lavagem com tampão salino de Tris	2 minutos
4	IgG de coelho anti-ratinho	8 minutos; temperatura ambiente
5	Complexo polímero-AP-IgG anti-coelho	8 minutos; temperatura ambiente
6	<i>Fast Red</i>	10 minutos, temperatura ambiente
7	Lavagem com tampão salino de Tris	2 minutos
8	HIER	20 segundos
9	Anticorpo primário anti-CD3	15 minutos; temperatura ambiente
10	Bloqueio Peroxidase Endógena	Peróxido de Hidrogénio 3%; 10 minutos
11	Lavagem com tampão salino de Tris	2 minutos
12	IgG de coelho anti-ratinho	8 minutos; temperatura ambiente
13	Complexo polímero-HRP-IgG anti-coelho	8 minutos; temperatura ambiente

14	DAB	10 minutos; temperatura ambiente
15	Hematoxilina	3 minutos
16	Lavagem com tampão salino de Tris	2 minutos

Apêndice 2. Imunofenótipo de linfomas caninos conforme determinado por dupla marcação imunocitoquímica e marcação imunocitoquímica simples

Caso	Localização	Imunofenótipo	
		ICC Dupla	ICC Simples
1	Linfonodo Não Especificado	T	T
2 ^a	Linfonodo Periférico	T	T
3	Linfonodo Periférico	T	T
4 ^{a, d}	Baço	Inconclusivo	T
5	Linfonodo Não Especificado	T	T
6	Massa Medistínica	T	T
7	Linfonodo Não Especificado	T	T
8	Linfonodo Periférico	T	T
9 ^c	Linfonodo Não Especificado	B	B
10	Linfonodo Não Especificado	B	B
11	Linfonodo Não Especificado	B	B
12	Linfonodo Não Especificado	B	B
13	Linfonodo Não Especificado	B	B
14	Indefinida	B	B
15 ^d	Linfonodo Não Especificado	T	T
16 ^{a, d}	Linfonodo Não Especificado	T	T
17	Linfonodo Não Especificado	T	T
18 ^d	Linfonodo Não Especificado	Inconclusivo	T
19 ^d	Indefinida	T	T
20 ^c	Linfonodo Não Especificado	Inconclusivo	T
21 ^d	Linfonodo Não Especificado	T	T
22	Linfonodo Não Especificado	B	B
23	Linfonodo Não Especificado	B	B
24	Indefinida	B	B
25 ^d	Linfonodo Não Especificado	Inconclusivo	T

26	Linfonodo Não Especificado	B	B
27	Linfonodo Não Especificado	B	B
28	Linfonodo Não Especificado	B	B
29 ^b	Linfonodo Não Especificado	B	B
30	Linfonodo Não Especificado	B	B
31 ^d	Indefinida	B	B

ICC – Imunocitoquímica; ^a – amostras em que inicialmente se verificou reatividade nuclear (inespecífica) para CD3; ^b – amostras em que inicialmente se verificou reatividade membranar/citoplasmática (inespecífica) para Pax5; ^c – amostras em que a maioria das células presentes foram duplamente negativas; ^d – amostras em que a presença de células com imunopositividade para Pax5 foi inicialmente imperceptível.

Apêndice 3. Comparação dos resultados da imunofenotipização de linfomas caninos por dupla marcação imunocitoquímica e por marcação imunocitoquímica simples

Marcação Dupla					Marcação Simples			
CD3			Pax5		CD3		Pax5	
Caso	Nível	Intensidade	Nível	Intensidade	Nível	Intensidade	Nível	Intensidade
	IR		IR		IR		IR	
1	5	++	1	++	5	++	1	+++
2	5	+	1	++	5	+/++	2	++
3	5	+++	1	+++	5	++/+++	1	++
4	NA	NA	NA	NA	5	++	1	++
5	5	++	1	+	5	+++	1	+++
6	5	+++	1	+++	5	++/+++	1	++
7	5	+++	1	++	5	++/+++	1	++
8	5	+++	2	+++	5	+++	1	++
9	2	++	5	+	2	++/+++	5	++
10	2	+++	5	++/+++	1	++	5	++
11	1	+++	5	+++	2	+++	5	++
12	1	++/+++	5	++/+++	2	++	5	++
13	1	+++	5	++/+++	2	+++	5	++
14	2	+++	5	+/++	2	+++	5	++
15	5	++	1	+	5	++/+++	1	++
16	5	++	1	+	5	+++	1	++
17	5	+++	2	+	5	++/+++	2	++
18	5	++	NI	NI	5	+++	2	+++
19	5	++	1	+	5	+++	2	+++
20	NA	NA	NA	NA	5	++	2	++
21	5	++	1	+	5	++/+++	1	++
22	1	+++	5	+/++	1	+++	5	+/++
23	1	+++	5	+/++	1	++	5	++

24	1	+++	5	++/+++	2	+++	5	++
25	5	++/+++	NI	NI	5	++	1	+++
26	2	+++	5	++	2	+++	5	++
27	2	+++	5	++	1	+++	5	++
28	2	+++	5	+ / ++	2	+++	5	+ / ++
29	2	+++	5	+	2	+++	5	+++
30	1	+++	5	+ / ++	2	+++	5	+ / ++
31	1	+++	5	+	2	+++	5	++

IR – imunoreatividade; NA – não aplicável; NI – não identificável; + - coloração leve; ++ - coloração moderada; +++ - coloração intensa