UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PCR PARA REARRANJO DOS RECETORES DE ANTIGÉNIO (PARR): REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, PANORAMA GERAL DO USO NO LABORATÓRIO CEDIVET E CONCORDÂNCIA COM EXAMES MORFOLÓGICOS

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientado por Professor Doutor Joaquim Henriques e Professor Doutor Pedro Faísca.

Alexandre Sardinha de Brito

n.º a22108062

2024

www.ulusofona.pt

UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PCR PARA REARRANJO DOS RECETORES DE ANTIGÉNIO (PARR): REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, PANORAMA GERAL DO USO NO LABORATÓRIO CEDIVET E CONCORDÂNCIA COM EXAMES MORFOLÓGICOS

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 26/07/2024, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 880/2024, de 24 de junho, com a seguinte composição:
Presidente: Prof. Doutor Eduardo Marcelino
Arguente: Prof. Doutora Maria Nazaré Cunha (FMV-ULHT)
Orientador: Prof. Doutor Joaquim Henriques
Este trabalho também foi orientado por Prof. Doutor Pedro Faísca e Médico Veterinário Hugo Carvalho

Alexandre Sardinha de Brito

n.º a22108062

2024

www.ulusofona.pt

RESUMO

O linfoma é a neoplasia linfoide mais comum em cães e gatos e representa uma doença heterogénea, com sinais clínicos e resposta à terapêutica variáveis. O diagnóstico pode ser realizado por citologia e/ou histologia. No entanto, em algumas situações específicas pode representar um verdadeiro desafio diagnóstico. Dessa forma, é cada vez mais frequente a utilização de exames complementares que auxiliam e refinam o diagnóstico, incluindo PCR para clonalidade linfoide (PCR para rearranjo dos recetores de antigénio - PARR). Esta dissertação tem início com o relatório e casuística do estágio realizado no Laboratório Veterinário Cedivet (Porto, Portugal), com foco em hematologia e citologia. Além disso, esse trabalho conta com uma revisão bibliográfica do linfoma, com especial ênfase no seu diagnóstico, e sobre o ensaio de clonalidade linfoide (PARR), incluindo o conceito básico da técnica, particularidades analíticas e interpretação. Por fim, o trabalho conta com um estudo retrospetivo realizado no Laboratório Cedivet com os objetivos de construir um panorama geral do uso da PARR neste laboratório e analisar a concordância dos resultados da PARR com os exames morfológicos que precederam a análise. A concordância com exames morfológicos foi baixa (k = 0,05 e concordância global de 53%). Apesar das limitações do estudo, esse modelo eventualmente poderá ser replicado em outros laboratórios, proporcionando uma compreensão ampla da utilização da PARR na rotina e identificando possíveis pontos de melhoria. Como os ensaios de clonalidade tornam-se cada vez mais acessíveis e populares em medicina veterinária, é necessário um maior entendimento das particularidades intrínsecas da técnica, assim como suas nuances, armadilhas interpretativas e possíveis causas de resultados falso-positivos e falso-negativos, proporcionando uma melhor utilização da técnica e identificando situações em que seu potencial pode ser explorado ao máximo.

Palavras-chave: Clonalidade, PARR, rearranjo dos recetores de antigénio, linfoma.

ABSTRACT

Lymphoma is the most common hematopoeitic neoplasia in dogs and cats. It is a heterogeneous disease with variable clinical signs and responses to therapy. The diagnosis is typically made by cytology and/ or histology. Oftentimes it is considered straightforward; however, in specific cases, diagnosing lymphoma poses a true diagnostic challenge. In order to improve and refine the diagnosis, complementary tests like polymerase chain reaction (PCR) for antigen receptor rearrangements (PARR) have become increasingly popular. The first part of the dissertation provides a report of the internship at Cedivet Veterinary Laboratory (Porto, Portugal), which focused on hematology and cytology. The second part presents a literature review on lymphoma and lymphoid clonality assay (PARR). Finally, in the third part a retrospective study conducted at Cedivet is presented and discussed. The study aimed to provide a comprehensive overview of the use of PARR in this laboratory and analyze the concordance of PARR results with the morphological tests that preceded the analysis (cytology or histology). The concordance with morphological examinations was low (k = 0.05 and overall concordance of 53%). Despite the limitations of the study, this model could potentially be replicated in other laboratories, providing a broad understanding of the use of PARR in routine practices and identifying possible areas for improvement. As clonality assays become increasingly accessible and popular in veterinary medicine, it is necessary to have a greater understanding of the intrinsic particularities of the technique, as well as its interpretive pitfalls, and possible causes of false-positive and false-negative results, leading to a better utilization of the technique and identifying contexts in which the use of this diagnostic method reaches its fullest potential.

Keywords: Clonality, PARR, antigen receptor rearrangement, lymphoma.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

% - Percentagem.

(…) - Símbolo utilizado como sinónimo de continuação. Nos índices, demonstra que o texto completo apresenta-se no corpo do trabalho.

=; <; >; ≤ - Igual; menor que; maior que; menor ou igual a.

α - Nível de significância estatística, neste trabalho corresponde a 5% (0,05).

3' - Extremidade portadora do grupo hidroxilo da molécula de DNA.

CD - Cluster de diferenciação, do inglês *"cluster of differentiation"*.

CDR - Região determinante de complementaridade, do inglês *"complementarity determining region"*.

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *"deoxyribonucleic acid"*.

et al. - E outros, da locução em latim *"et alli"*.

etc. - Denota continuação lógica de uma sequência de descrições, da locução em latim *"Et cetera"*.

ex. - Exemplo; por exemplo.

FC - Citometria de fluxo, do inglês *"flow cytometry"*.

FeLV - Vírus da Leucemia Felina, do inglês *"Feline Leukemia Virus"*.

FFPE - Fixado em formalina e incluído em parafina, do inglês *"formalin-fixed paraffin-embedded"*.

ICC - Imunocitoquímica, do inglês *"immunocytochemistry"*.

IG - Recetor de imunoglobulina (recetor de células B), do inglês *"IG – immunoglobulin".*

IGH - *Locus* de imunoglobulina de cadeia pesada, do inglês *"immunoglobulin heavy chain locus"*.

IGK - *Locus* de imunoglobulina de cadeia leve kappa, do inglês *"immunoglobulin kappa light chain locus"*.

IGKde - *Locus* de imunoglobulina do elemento de deleção kappa, do inglês *"immunoglobulin kappa deleting element locus"*.

IGL - *Locus* de imunoglobulina de cadeia leve lambda, do inglês *"immunoglobulin lambda light chain locus"*.

IHQ - Imunohistoquímica, do inglês *"immunohistochemistry"*.

k - Coeficiente Kapa de Cohen, do inglês *"Cohen's Kappa Coefficient"*.

LGL - Linfócito granular, do inglês *"large granular lymphocyte"*.

LLC - Leucemia linfocítica crónica, do inglês *"chronic lymphocytic leukemia - CLL"*.

LMA - Leucemia mieloide aguda, do inglês *"acute myeloid leukemia - AML"*.

n - Número de amostras.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês *"polyacrylamide gel electrophoresis"*.

PARR - reação em cadeia da polimerase para o rearranjo dos recetores de antigénio, do inglês *"polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangement"*.

pb - Pares de bases.

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês *"Polymerase Chain Reaction"*.

RAG - Gene ativador da recombinação, do inglês *"recombination activation gene"*.

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês *"ribonucleic acid"*.

RSS - Sequências de sinal de recombinação, do inglês *"recombination signal sequences"*.

spp. - Espécies, da locução em latim *"species pluralis"*.

SRD - Sem raça definida.

TCR - Recetor de células T, do inglês *"T cell receptor"*.

TRA - *Locus* do recetor de células T alfa, do inglês *"T cell receptor alpha locus"*.

TRB - *Locus* do recetor de células T beta, do inglês *"T cell receptor beta locus"*.

TRD - *Locus* do recetor de células T delta, do inglês *"T cell receptor delta locus"*.

TRG - *Locus* do recetor de células T gama, do inglês *"T cell receptor gamma locus"*.

V; D; J - Genes variáveis (V - *"variable"*); genes de diversidade (D - *"diversity"*); genes de junção (J - *"joining"*).

vs. - Versus, "em oposição a", "em contraste com".

Índice Geral

RESUMO 1

ABSTRACT 2

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos 3

Índice Geral 5

Índice de Gráficos 7

Índice de Tabelas 7

Índice de Figuras 7

Índice de Quadros 8

1. RELATÓRIO DE ESTÁGIO E CASUÍSTICA 9

2. INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13

2.1. Aspetos gerais do linfoma 13

2.2. Diagnóstico dos linfomas 14

2.3. Biologia molecular na oncologia e ensaios de clonalidade 20

2.4. Conceito básico do ensaio de clonalidade linfoide 21

2.5. Recombinação somática (VDJ) e desenho do ensaio 24

2.6. Particularidades analíticas da PARR 28

2.7. Interpretação dos resultados 32

2.8. Usos e contraindicações da PARR 35

2.9. Determinação do fenótipo através da PARR 37

2.10. Perspetivas futuras e considerações finais 39

3. OBJETIVOS 43

4. MATERIAIS E MÉTODOS 44

4.1. Recolha dos dados 44

4.2. PARR e Exames Morfológicos 44

4.3. Análise estatística 44

5. RESULTADOS 46

5.1. Panorama geral da PARR no Laboratório Cedivet 46

5.1.1. Exames e relação temporal 46

5.1.2. Espécie, sexo, idade e raça 46

5.1.3. Tipos de amostras e localização. 48

5.1.4. Resultados da PARR 49

5.1.5. Resultados dos exames morfológicos 51

5.2. Concordância PARR x Exame Morfológico 52

6. DISCUSSÃO 53

7. CONCLUSÃO 65

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

9. APÊNDICES I

Índice de Gráficos

Gráfico nº 1 - *Levantamento realizado de forma retrospetiva com auxílio do sistema laboratorial do Cedivet no período do estágio. De 900 casos analisados, foram categorizadas 1119 localizações diferentes. Para melhor visualização no gráfico (…)*..... 12
Gráfico nº 2 - *Representação gráfica da relação temporal de pedidos da análise PARR no laboratório Cedivet do ano de 2016 até fevereiro de 2023.*.....46
Gráficos nº 3 - A) *Representação gráfica das espécies e sexo dos pacientes. Na cor verde estão representados todos os pacientes felinos e na cor laranja estão representados todos os pacientes caninos (…)* ***B)*** *Representação gráfica da idade dos pacientes caninos (superior em cor laranja) e felinos (inferior em cor verde).* ***C)*** *Representação gráfica da distribuição das raças caninas (esquerda) e felinas (direita) utilizando diagramas de Sankey (…)*.....47
Gráfico nº 4 - *Representações gráficas das amostras de citologia e histopatologia utilizadas para a realização da PARR, subdivididas por espécie.* 49
Gráficos nº 5 - A) *Representação gráfica dos resultados gerais da PARR (…)* ***B)*** *Representação gráfica dos resultados da PARR subdivididos por espécie. As cores seguem a mesma sequência do gráfico A para melhor visualização (…)* ***C)*** *Representação gráfica dos fenótipos obtidos pela PARR nos casos em que o resultado foi clonal (…)* ***D)*** *Representação gráfica dos fenótipos obtidos pela PARR nos casos em que o resultado foi clonal subdivididos por espécie (…)* 50
Gráficos nº 6 - A) *Representação gráfica dos resultados gerais dos exames morfológicos (citologia e histologia) (…)* ***B)*** *Representação gráfica dos resultados dos exames morfológicos subdivididos por espécie (…)*.....51

Índice de Tabelas

Tabelas nº 1 - *Compilado de dados referentes às informações relevantes recolhidas dos relatórios finais dos exames morfológicos.*.....52
Tabela nº 2 *- Tabela de frequências para a avaliação dos testes de concordância. Nessa tabela estão assinalados os resultados da PARR e dos exames morfológicos (…)* 52

Índice de Figuras

Figura nº 1 - A) *Foto do microscópio com câmara conectada ao monitor, ferramenta que potencializou o processo de aprendizagem e fomentou inúmeras discussões produtivas.* ***B)*** *Exemplo de neoplasia mesenquimatosa maligna (…)* ***D)*** *Estrutura larvar compatível com microfilária observada em lesão cutânea lateral ao pénis em um canino, American*

Staffordshire e com 7 anos de idade. ***E)*** *Presença de variadas estruturas compatíveis com amastigotas de Leishmania spp. (…)* ***F)*** *Exemplo de neoplasia de células redondas no baço de um felino de 8 anos de idade (…)* 10
Figura nº 2 - *Algoritmo diagnóstico para abordagem da linfadenopatia periférica em cães traduzido e adaptado de Vail et al. (2019) (…)* 16
Figura nº 3 - *Exemplos de amostras citológicas provenientes de linfonodos aumentados de tamanho em dois cães diferentes (…). Em* ***A****, observa-se um padrão homogêneo e de células grandes, compatível com linfoma (…). Já em* ***B****, observa-se um padrão heterogéneo com predomínio de células pequenas, mais sugestivo de uma população linfoide normal ou hiperplásica (reativa) (…)* 18
Figura nº 4 - *Imagem esquemática do princípio do teste de clonalidade (PARR). Em amostras reativas, representadas por diversos linfócitos diferentes (círculos com cores variadas), a PCR resultará em uma curva com base ampla na eletroforese (…).* 23
Figura nº 5 - A) *Imagem esquemática representando o desenvolvimento dos genes dos recetores de células T e B devido à recombinação somática (…).* ***B)*** *Imagem esquemática representando combinações VDJ hipotéticas em respostas policlonais e clonais (…)* 24
Figura nº 6 - *Imagens das lâminas e perfis eletroforéticos de um dos casos abordados no estudo de* Radtanakatikanon *et al*. (2021*)(…)* 27
Figura nº 7 - A) *Exemplo da importância da identificação de amostras que requerem extração seletiva de DNA, adaptado e traduzido de Keller et al. (2016) (…).* ***B)*** *Imagem esquemática de duas situações hipotéticas de diluição de DNA clonal (neoplásico) em DNA policlonal (não neoplásico) simulando possíveis cenários reais (…)* 29
Figura nº 8 - *Exemplos de perfis eletroforéticos utilizando eletroforese capilar com traçados interpretados como clonais (quatro exemplos à esquerda) e policlonais (quatro exemplos à direita) em amostras de felino, adaptado de Rout et al. (2019) (…)* 33

Índice de Quadros

Quadro nº 1 - *Representação esquemática dos perfis eletroforéticos típicos, suas descrições técnicas, interpretações mais prováveis e possíveis considerações alternativas aos resultados levando em consideração as principais armadilhas interpretativas da PARR. Adaptados e traduzidos de Keller et al. (2016)*..... 34

1. RELATÓRIO DE ESTÁGIO E CASUÍSTICA

O estágio curricular para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e que deu origem a esta dissertação foi realizado no Laboratório Clínico Veterinário Cedivet, localizado no Porto, Portugal. O estágio curricular aconteceu sob supervisão do médico veterinário Hugo Carvalho e também teve auxílio de toda a equipa do Cedivet, incluindo outros patologistas, profissionais técnicos e também estafetas. O estágio teve início no dia 01/09/2022 e foi concluído a 01/02/2023.

O Cedivet é um laboratório de diagnóstico clínico veterinário que oferece uma gama ampla de análises em várias áreas, incluindo hematologia, bioquímica clínica, endocrinologia, urinálise, coprologia, citologia, histologia, microbiologia, serologia e biologia molecular. Algumas análises específicas são realizadas em laboratórios externos, como por exemplo a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o rearranjo dos recetores de antigénio (PARR), que é realizada no laboratório Laboklin (Madrid - Espanha).

O estágio curricular teve foco principalmente nas áreas de hematologia e citologia, que serão descritas com mais detalhe nesta secção. As outras áreas foram acompanhadas de forma menos direta, mas foi possível ter contacto com elas a partir da validação dos resultados.

Dentro da área de hematologia no Cedivet, incluem-se análises como hemograma, avaliações de esfregaço, pesquisa de hemoparasitas, realização de microhematócrito (capilar), teste de aglutinação em solução salina (diferenciação entre *rouleaux* e aglutinação verdadeira), teste de Coombs, avaliação de *buffy coat* (capa leucocitária), teste de Knott modificado (pesquisa de microfilárias), tipagem sanguínea de cães e gatos, entre outros. Os mais frequentemente solicitados são os hemogramas e avaliações de esfregaço.

Para a realização dos hemogramas, é utilizado na rotina o Sysmex XN-1000V, um contador automatizado com software específico para veterinária. Esse aparelho utiliza citometria de fluxo por fluorescência, impedância e espetrofotometria para realizar as contagens celulares e mensuração da hemoglobina. O Sysmex XN-1000V apresenta diversas vantagens que aumentam a produtividade e agilidade da rotina, além de produzir resultados precisos e de fácil manipulação pelo utilizador.

Outro foco importante do estágio curricular foi o acompanhamento dos exames citológicos. Essa parte foi bastante relevante a nível pessoal e profissional, motivando assim o restante da dissertação na área. O Cedivet tem uma casuística grande e diversificada. Na área da citologia estão incluídos a avaliação de amostra citológicas de lesões sólidas, lesões

quísticas, órgãos internos, efusões cavitárias, líquido cefalorraquidiano, citologia auricular, citologia vaginal para determinação do ciclo éstrico, avaliações de medula óssea, entre outras.

Um dos microscópios disponíveis no Cedivet tem como ferramenta adicional uma câmara conectada a um monitor. Essa ferramenta foi essencial para um bom aproveitamento no acompanhamento das citologias, já que foi possível acompanhar em tempo real a avaliação das lâminas. A avaliação citológica tem critérios que seguem princípios relativamente padronizados, passando pela avaliação da celularidade, adequação da amostra, reconhecimento das populações (ex. inflamatório *vs.* neoplásico), características morfológicas (ex. distribuição, arranjos citológicos, coesividade, critérios de atipias, *etc*.) e, por fim, obtenção de um diagnóstico e sugestão de possíveis diferenciais. Acompanhar esse processo em diferentes casos e tipos de amostras foi essencial para um processo de aprendizagem rico e diversificado.

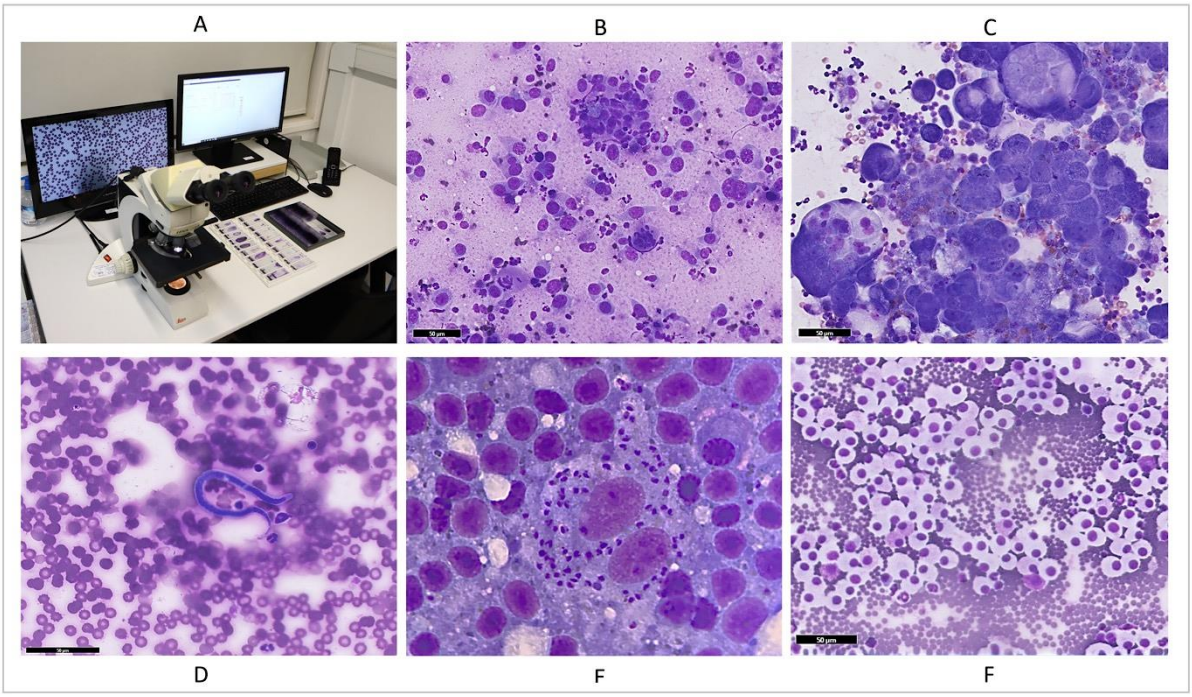


Figura nº 1 - A) *Foto do microscópio com câmara conectada ao monitor, ferramenta que potencializou o processo de aprendizagem e fomentou inúmeras discussões produtivas.* ***B)*** *Exemplo de neoplasia mesenquimatosa maligna. Lesão cutânea localizada na parede costal de um felino macho, Europeu Comum e com 11 anos de idade.* ***C)*** *Exemplo de uma efusão pleural em um Labrador Retriever, macho e com 8 anos de idade. O diagnóstico citológico foi de efusão neoplásica epitelial.* ***D)*** *Estrutura larvar compatível com microfilária observada em lesão cutânea lateral ao pénis em um canino, American Staffordshire e com 7 anos de idade.* ***E)*** *Presença de variadas estruturas compatíveis com amastigotas de Leishmania spp. fagocitadas por macrófago e livres no fundo de lâmina. Amostra de linfonodo poplíteo de uma cadela, Labrador Retriever e com 9 anos de idade.* ***F)*** *Exemplo de neoplasia de células redondas no baço de um felino de 8 anos de idade. A presença de granulação citoplasmática típica de mastócitos, embora presente em apenas algumas das células, permite um diagnóstico de mastocitoma. Fonte: Original do autor. Nota: Todas as lâminas foram coradas com May-Grünwald Giemsa (MGG).*

Durante o estágio, a grande variedade de casos foi considerada um dos pontos principais para o crescimento profissional na área da citologia. Foi possível acompanhar exames citológicos de diferentes sítios anatómicos (ex. pele, baço, fígado, intestino, pulmão, entre outros), e com diagnósticos também variados, envolvendo neoplasias (benignas e malignas), processos inflamatórios e agentes infeciosos. A figura nº 1 exemplifica alguns dos casos abordados durante o estágio considerados interessantes.

No final do estágio, foi realizado um levantamento retrospetivo dos casos de citologia realizados no Cedivet no período entre 01/09/2022 e 01/02/2023, representado pelo gráfico nº 1. Através do auxílio do sistema laboratorial, foram agrupados todos os exames de citologia em uma planilha eletrónica, contendo as informações relativas aos relatórios, espécie e outras informações associadas aos casos. Foram realizados um total de 3415 exames citológicos nesse período, onde alguns continham mais de uma localização. Dentro desses casos, foram analisados de forma manual os 900 primeiros casos da tabela fornecida pelo sistema laboratorial (os casos foram ordenados de forma aleatória), com o objetivo de classificar as localizações ou tipos de amostras enviadas ao laboratório. Foram analisadas todas as localizações dentro do mesmo pedido (ex. nódulo de pele e linfonodo, mais de um linfonodo, baço e fígado), resultando em 1119 localizações dentro dos 900 exames citológicos analisados. Salienta-se que não foram avaliados todos os casos devido à natureza manual e laboriosa da tarefa, além de não ser o foco principal do trabalho.

Indo de acordo com a perceção subjetiva durante o estágio, a maior quantidade de amostras envolvia lesões de pele (cutâneas e subcutâneas) e linfonodos (diversos tipos de linfonodos), que representaram respetivamente 48,6% e 12,4% das amostras. As restantes localizações apresentaram uma grande diversidade de sítios anatómicos e de tipos de amostra, o que reforça a grande oportunidade de aprendizagem durante o estágio. Em relação às espécies, a grande maioria correspondeu a amostras de caninos (77,5% - 2646/3415) e felinos (21,9% - 750/3415), sendo as restantes amostras correspondendo a equinos (0,1% - 5/3415), coelhos (0,1% - 3/3415), furões (0,1% - 2/3415) e outras espécies exóticas (0,3% - 9/3415). É importante ressaltar que os casos não foram acompanhados na totalidade durante o estágio devido à carga horária e o acompanhamento de outras áreas além da citologia. O levantamento de dados e análise teve como propósito apenas demonstrar a grande gama de diferentes exames citológicos realizados no Cedivet e ressaltar o grande potencial educacional.

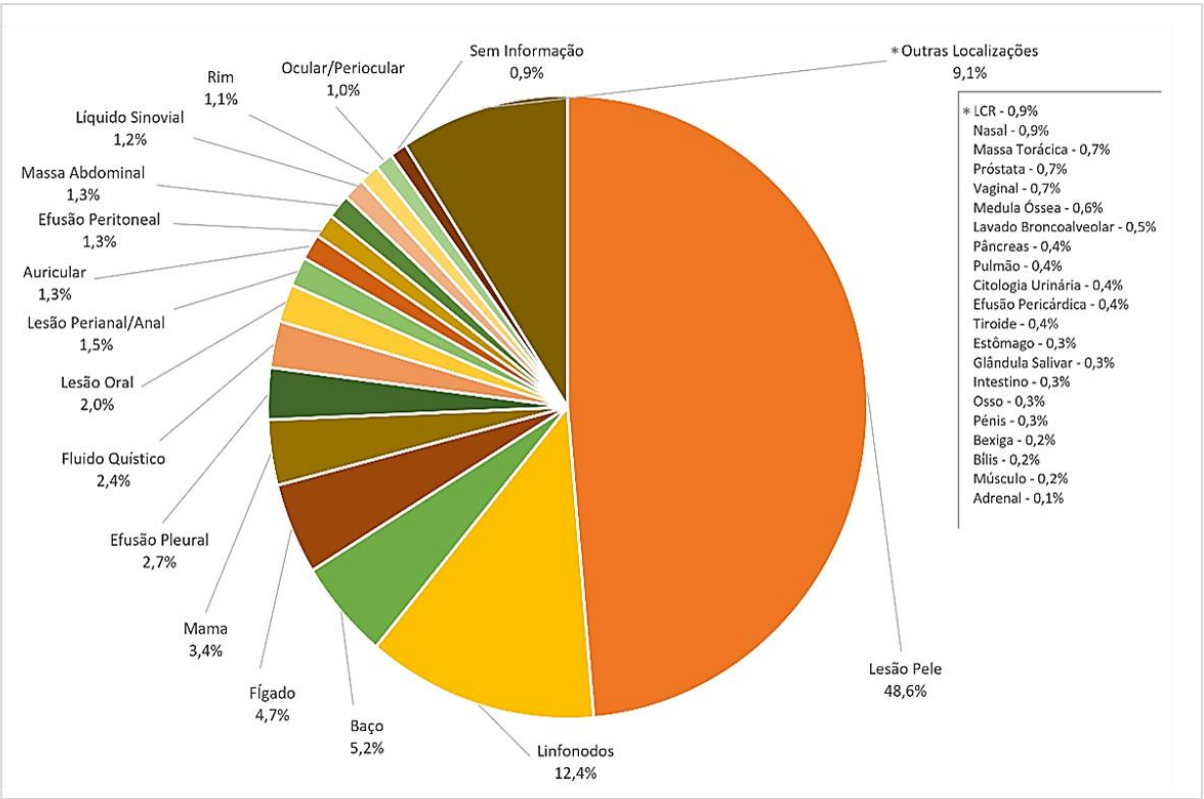


Gráfico nº 1 - *Levantamento realizado de forma retrospetiva com auxílio do sistema laboratorial do Cedivet no período do estágio. De 900 casos analisados, foram categorizadas 1119 localizações diferentes. Para melhor visualização no gráfico, foram agrupadas diversas localizações e tipos de amostras que representavam menos de 1% do total dentro da categoria "Outras localizações", sendo descritas individualmente na chave à direita (*).*

Como considerações finais, o tempo de estágio no Cedivet foi extremamente produtivo e correspondeu a todas as expetativas propostas. Foi possível apreciar a complexidade de uma rotina laboratorial e todos os pontos críticos envolvidos para um trabalho harmónico e produtivo. Além disso, o estágio foi muito importante para solidificar conhecimentos a respeito das áreas da patologia clínica, especialmente com foco na hematologia e citopatologia. A disponibilidade dos profissionais, grande variedade de casos e a oportunidade de presenciar o impacto positivo das análises laboratoriais no cuidado dos pacientes veterinários, fomentaram um verdadeiro anseio em continuar a aprender e aprofundar os conhecimentos na patologia clínica. Consequentemente, esses fatores também serviram de inspiração e motivação para a escolha do tema desta dissertação, que tem como foco principal o diagnóstico do linfoma e a utilização da PARR.

2. INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspetos gerais do linfoma

O linfoma, previamente chamado de linfoma maligno ou linfossarcoma, é uma neoplasia maligna de linfócitos e que afeta quase qualquer órgão ou tecido sólido. Podem surgir a partir de linfócitos localizados nos gânglios linfáticos ou em centros linfoides fora dos gânglios linfáticos, incluindo o baço, amígdalas, trato gastrointestinal, timo, pele, nariz e outros tecidos (Vail *et al*., 2019; Valli, Bienzle & Meuten, 2016; Marconato, Gelain & Comazzi, 2013).

O facto de originarem em tecidos sólidos, diferem os linfomas das leucemias linfoides que, apesar de também serem neoplasias de linfócitos, por sua vez, tem origem principalmente na medula óssea (Vail, Pinkerton & Young, 2019; Couto, 2019). Exceções à essa regra existem, como por exemplo as leucemias de linfócitos granulares (LGL), em que há fortes evidências que sugerem que estas neoplasias têm origem na polpa vermelha do baço (McDonough & Moore, 2000; Vernau & Moore, 1999). É importante salientar que, por vezes, a diferenciação entre linfomas e leucemias pode ser complicada e arbitrária, exigindo correlação com aspetos clínicos (ausência de linfadenomegálias, grau de envolvimento do sangue periférico e medula óssea) e exames complementares (imunofenotipagem) (Vail *et al*., 2019).

O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comum em cães e gatos e representa o tumor mais frequentemente tratado por quimioterapia na oncologia veterinária (Burkhard & Bienzle, 2015; Zandvliet, 2016; Valli, Kass, Myint & Scott, 2013). Embora o termo "linfoma" seja frequentemente usado para descrever uma doença única, ele na realidade abrange uma ampla variedade de subtipos de entidades, cada uma resultante da expansão clonal de linfócitos com características morfológicas, moleculares e imunofenotípicas distintas. Dessa forma, é considerada uma doença heterogénea, com sinais clínicos e resposta à terapêutica variáveis (Zandvliet, 2016; Vail *et al*., 2019).

Os sinais clínicos associados ao linfoma são diversos e dependem da extensão e da localização da neoplasia. A distribuição anatómica do linfoma tem um padrão diferente entre cães e gatos. O linfoma multicêntrico, a forma mais comum em cães, distingue-se pela presença de linfadenomegália generalizada. Já nos gatos, a forma alimentar é atualmente considerada a mais prevalente e normalmente acompanhada de sinais clínicos relacionados com o trato gastrointestinal, tais como anorexia, vómitos, diarreia ou perda de peso (Vail *et al*., 2019; Couto, 2019).

2.2. Diagnóstico dos linfomas

A obtenção de um diagnóstico preciso é um requisito primordial para otimizar o tratamento de cada paciente oncológico e também para fornecer ao tutor uma avaliação do provável comportamento da neoplasia e do seu prognóstico. Constitui um ponto de partida racional para a seleção da melhor abordagem ao paciente, evitando que o médico veterinário se fundamente em factos empíricos para decidir a melhor forma de conduzir o caso (Scase & Dobson, 2011).

O diagnóstico do linfoma é realizado através de características morfológicas identificadas por citologia e/ou histopatologia dos tecidos ou órgãos afetados. Nos últimos anos, para além da morfologia celular têm sido cada vez mais utilizados exames complementares como a imunocitoquímica (ICC), a imunohistoquímica (IHC), a citometria de fluxo (FC) e a reação em cadeia da polimerase para o rearranjo dos recetores de antigénio (PARR) no auxílio do diagnóstico e classificação dos linfomas. Os testes de diagnóstico não são cem por cento sensíveis ou específicos e, desta forma, são frequentemente utilizados vários ensaios em conjunto ou em sequência para aumentar a precisão do diagnóstico (Burkhard & Bienzle, 2015). (Villiers, 2020; Scase & Dobson, 2011).

Diferentemente da medicina humana, em veterinária nem sempre existem recursos financeiros que permitem explorar todas as vias de diagnósticos e testes complementares disponíveis. No entanto, é importante salientar que o diagnóstico realizado por citologia pode fornecer informações suficientes para os veterinário e tutores planearem e definirem estratégias terapêuticas para o caso (Valli *et al*., 2016).

Embora existam restrições tecnológicas e realidades económicas que muitas vezes não permitem a replicação direta dos algoritmos de diagnóstico humanos nos animais, os patologistas humanos e veterinários geralmente seguem uma abordagem ou algoritmo baseado em etapas. Por exemplo, no contexto das neoplasias linfoides, quando estão a avaliar uma amostra proveniente de um linfonodo periférico aumentado, o principal objetivo é refinar a lista de diagnósticos diferenciais, que inclui hiperplasia reativa, linfadenite, linfoma e neoplasia metastática (Seelig, Avery, Ehrhart & Linden, 2016; Ku, Kass & Christopher, 2017). O exame citológico é normalmente considerado adequado para investigações iniciais principalmente pelas suas características intrínsecas como simplicidade, rapidez, baixo custo, segurança, amostragem minimamente invasiva e sem necessidade de recursos avançados para a execução (Marconato *et al.*, 2013; Sapierzynski, Kliczkowska-Klarowicz, Jankowska & Jagielski, 2016; Gambini *et al.*, 2021).

Outro ponto importante é que a os resultados da citologia podem e são frequentemente utilizados como ponto de partida para desencadear uma série de análises complementares mais específicas que auxiliam e refinam o diagnóstico (citometria de fluxo, imunocitoquímica, ensaios de clonalidade, *etc*.) (Seelig *et al*., 2016).

Assim sendo, o exame citológico tem grande importância na medicina veterinária e é frequentemente utilizado no diagnóstico de linfoma em várias espécies (Burkhard & Bienzle, 2015; Amores-Fuster, Cripps, Graham, Marrington & Blackwood, 2015; Scase & Dobson, 2011). Uma interpretação adequada requer uma amostra representativa da lesão, além de lâminas bem preparadas, com um número adequado de células intactas, bem espalhadas (monocamada) e adequadamente coradas. Um importante fator a considerar é que os linfócitos são células bastante frágeis e, portanto, a preparação das lâminas deve ser feita aplicando apenas uma ligeira pressão. Realizar as lâminas de forma delicada tem como objetivo evitar a lise celular excessiva, o que pode prejudicar drasticamente o diagnóstico final. A interpretação final deve ser sempre efetuada no contexto da história, dos sinais clínicos e de quaisquer dados adicionais disponíveis do paciente (Vail *et al*., 2019; Villiers, 2020; Thrall, Meuten, Bohn & Meichner, 2022).

Uma caraterística da medicina veterinária é o facto da necessidade de instrumentos de diagnóstico e prognóstico que possam ser utilizados com os procedimentos menos invasivos e menos dispendiosos. Nesse aspeto, a citologia é um instrumento prático e com vantagens evidentes, mas, no caso dos linfomas nodulares/foliculares e dos tumores que não se encontram difusos num linfonodo ou órgão, a possibilidade de obter amostras não representativas constituem uma questão problemática (Valli *et al*., 2016).

O diagnóstico citológico do linfoma é mais simples quando o tumor é difuso e todo o linfonodo é substituído por uma população uniforme de grandes linfócitos neoplásicos. A maioria dos linfomas difusos resulta em uma amostra citológica que consiste total ou predominantemente células neoplásicas médias a grandes (Burkhard & Bienzle, 2015). Uma vez que a grande maioria (>80%) dos casos de linfomas nodais caninos se apresenta com um padrão difuso, a citologia é amplamente aceite como um diagnóstico de primeira linha altamente sensível e específico do linfoma nesta espécie (Seelig *et al*., 2016; Regan, Kaplan & Bailey, 2013; Martini *et al*., 2022).

A figura nº 2 apresenta um algoritmo diagnóstico simples e didático para a avaliação da linfadenopatia periférica em cães traduzido e adaptado de Vail *et al*., 2019.

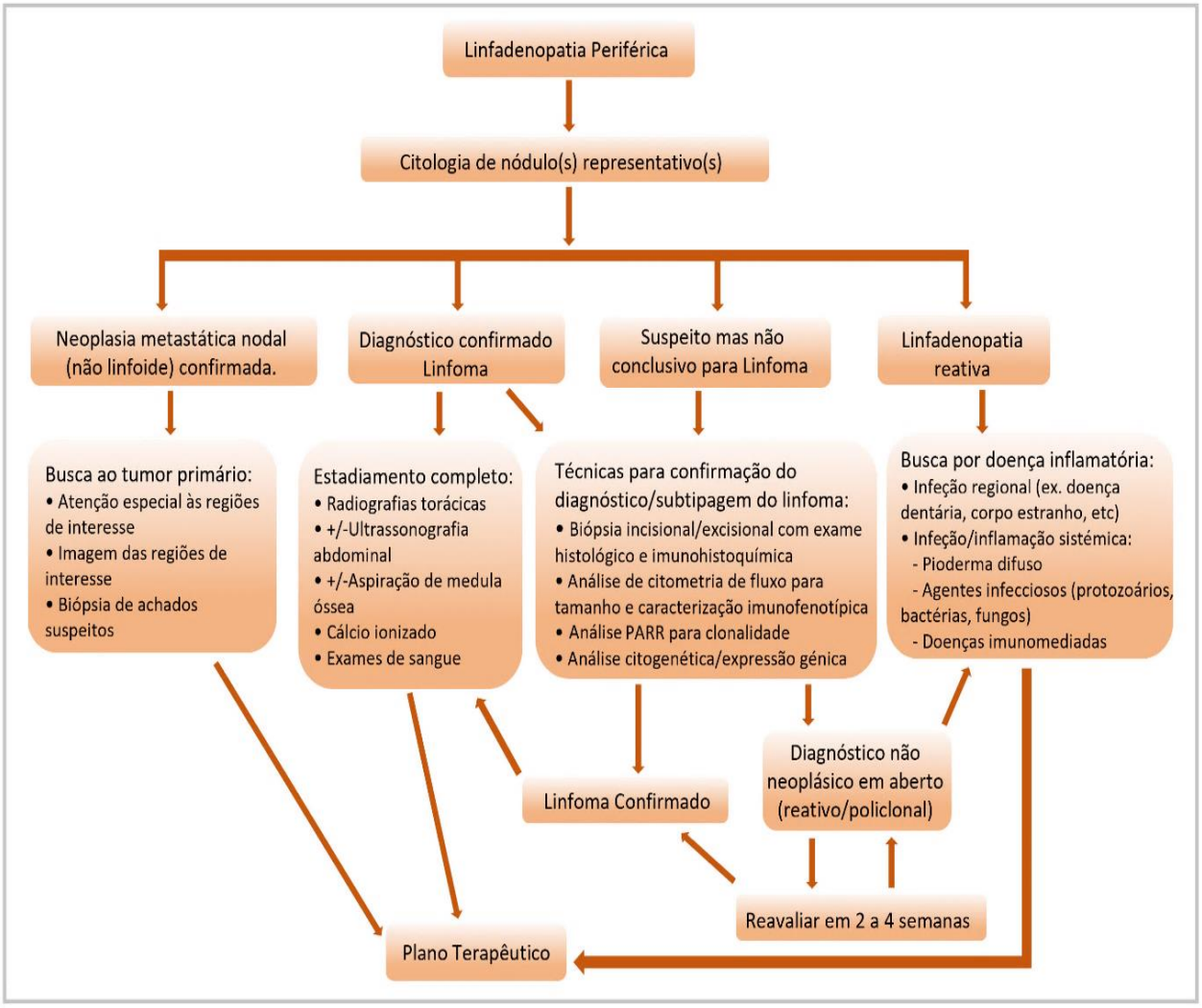


Figura nº 2 - *Algoritmo diagnóstico para abordagem da linfadenopatia periférica em cães traduzido e adaptado de Vail et al. (2019). Esse algoritmo é simples, didático e, apesar de ter sido elaborado para avaliação da linfadenopatia periférica em cães, os conceitos básicos e maioria dos passos também pode ser aplicado em gatos ou em outras localizações anatómicas para avaliação de populações linfoides.*

Já nos gatos, o diagnóstico citológico dos linfomas é considerado mais difícil e complexo que na espécie canina. Nos felinos, os linfomas afetam menos frequentemente os gânglios linfáticos e mais comumente outros órgãos como intestino, cavidade nasal, rim, fígado, estômago, por vezes tornando a colheita citológica mais difícil. Além disso, os linfomas no gato tendem a apresentar mais frequentemente células pequenas a médias ou uma população heterogénea de linfócitos, bem como de plasmócitos e macrófagos (Burkhard & Bienzle, 2015; Twomey & Compendium, 2005; Gambini *et al.*, 2021). No entanto, estes fatores

e desafios não impedem que a citologia também seja amplamente utilizada para o diagnóstico de linfoma nesta espécie (Blackwood, 2013; Hayes, 2006; Ku *et al.*, 2017).

Independentemente da espécie, os linfomas compostos por células pequenas a médias ou com padrões heterogéneos representam um grande desafio para os citologistas, uma vez que as células e o padrão citológico podem se assemelhar a uma população de linfócitos também encontrada em situações benignas (ex. hiperplasia reativa). Nesses casos, o diagnóstico final pode exigir elementos clínicos de apoio (ex. presença de linfadenopatia generalizada, identificação de células com características citológicas semelhantes em vários tecidos e ausência de agentes infeciosos) e exames adicionais (Burkhard & Bienzle, 2015; Thrall *et al*., 2022).

Outra situação que também pode gerar alguma confusão na interpretação do padrão citológico é uma hiperplasia reativa acentuada. Em casos reativos, mas que há um significativo aumento do número de linfócitos médios e grandes, pode ser difícil a distinção entre um processo benigno e um linfoma, principalmente para citopatologistas menos experientes (Vail *et al*., 2019).

O diagnóstico diferencial das linfadenopatias depende do historial do animal (ex. doenças infeciosas, *etc*.), além do tamanho, consistência e localização dos linfonodos afetados. Além do linfoma, outras causas de linfadenopatia incluem infeções causadas por bactérias, vírus, protozoários (ex. *Leishmania* spp., *Toxoplasma* spp.), rickettsias (ex. *Ehrlichia* spp.) e agentes fúngicos (*Blastomyces* spp. e *Histoplasma* spp.). Além disso, doenças imunomediadas (ex. pênfigo, lúpus eritematoso sistémico e poliartrite imunomediada) e neoplasias metastáticas também podem resultar em linfonodos ligeira a moderadamente aumentados (Vail *et al*., 2019). Desta forma, ao se depararem com uma linfadenopatia (figura nº 5), os clínicos e os patologistas devem ter sempre em mente que os linfomas são considerados “grandes imitadores”, podendo mimetizar apresentações clínicas de numerosas doenças neoplásicas e não neoplásicas (Couto, 2019).

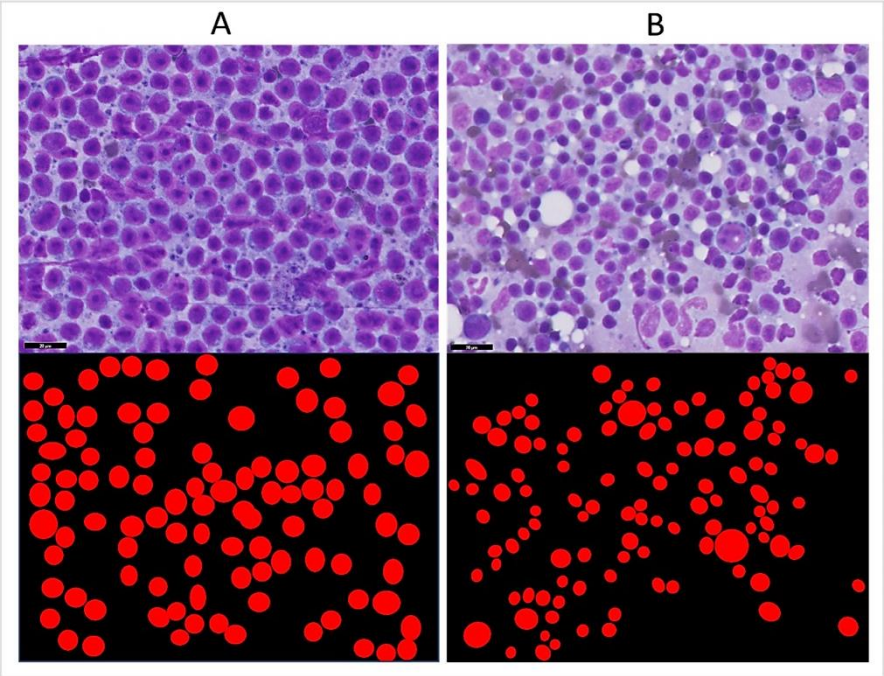


Figura nº 3 - *Exemplos de amostras citológicas provenientes de linfonodos aumentados de tamanho em dois cães diferentes, sendo observados padrões distintos (homogéneo e heterogéneo). Embora os exemplos compreendam animais diferentes, ambas as fotos foram realizadas utilizando o mesmo aumento (objetiva de 63x), o que permite uma comparação mais adequada do tamanho dos linfócitos entre os casos. As imagens inferiores representam o contorno nuclear de algumas células intactas das amostras, sendo apresentadas em um fundo preto para evidenciar os padrões citológicos. Em* ***A****, observa-se um padrão homogêneo e de células grandes, compatível com linfoma (caso confirmado por imunocitoquímica – linfoma de células B). Já em* ***B****, observa-se um padrão heterogéneo com predomínio de células pequenas, mais sugestivo de uma população linfoide normal ou hiperplásica (reativa). Fonte: Original do autor. Nota: Lâminas coradas com May-Grünwald Giemsa (MGG).*

Em medicina veterinária, deve-se evitar colher amostras de linfonodos de áreas normalmente reativas (ex. linfonodos submandibulares), pois podem resultar em amostras heterogéneas e tornar a interpretação do padrão citológico uma tarefa complicada. Esses linfonodos ou regiões devem ser puncionados preferencialmente apenas quando são os únicos órgãos ou áreas acometidas. Caso outros linfonodos também estejam envolvidos no processo patológico, como por exemplo os pré-escapulares ou poplíteos, a colheita de material destas áreas é o recomendado (Vail ***et al***., 2019; Raskin, 2022).

Embora o diagnóstico possa ser realizado a partir do exame citológico, neste tipo de exame a arquitetura do tecido não é preservada nas amostras e características como a perda da arquitetura normal do linfonodo ou a rutura da cápsula não podem ser detetadas. Dessa forma, a histologia é necessária para diagnósticos e situações que requerem uma avaliação estrutural da arquitetura nodal, como por exemplo no linfoma folicular, no linfoma de células B rico em células T, no linfoma marginal e no linfoma de células do manto (Vail ***et al***., 2019; Marconato *et al.*, 2013).

Além disso, para a classificação completa nos diferentes subtipos de linfoma de acordo com a OMS, é necessário a realização de histopatologia e imunofenotipagem. Segundo Valli *et al.* (2016), embora a citologia seja um meio excelente para diagnosticar o linfoma, devido à suas limitações intrínsecas, os patologistas devem resistir ao impulso de interpretar excessivamente material diagnóstico limitado. Tendo em vista esse panorama, os patologistas devem sempre trabalhar em conjunto com os oncologistas de forma que estejam disponíveis as informações necessárias para conduzir o caso, sempre levando em consideração e respeitando as limitações impostas por diferentes tipos de amostras, diferentes metodologias e custo-benefício dos testes.

No estudo de Martini *et al*. (2022), ao avaliarem o desempenho diagnóstico da citologia no diagnóstico de linfoma em cães, verificou-se que os patologistas diagnosticaram com precisão o linfoma, mas o desempenho e o nível de concordância diminuíram significativamente quando se tentou uma caracterização mais aprofundada deste tipo de tumor, incluindo grau, fenótipo e classificação de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Dessa forma, os autores também enfatizam que, embora a citologia tenha um papel fundamental, os resultados devem ser confirmados e refinados por outras técnicas complementares.

Tendo em vista esse cenário, se a investigação diagnóstica se limitar à citologia, o linfoma não pode ser totalmente classificado pelos parâmetros da OMS, sistema que está amplamente a substituir os antigos sistemas de classificação (Raskin, 2022). Na prática, a aplicação do algoritmo de classificação da OMS requer enquadramento clínico, histopatologia, Imunofenotipagem e, por vezes, biologia molecular. Portanto, os cortes histológicos dos tecidos e de gânglios linfáticos completamente excisados são considerados o mais indicado para o diagnóstico e a classificação completa do linfoma (Seelig *et al*., 2016; Valli *et al.*, 2016).

Embora a maioria dos casos de linfoma não exija a realização em conjunto de imunocito/histoquímica, citometria fluxo e PARR para obter um diagnóstico, há situações específicas em que cada teste se destaca e fornece informações adicionais ao caso. Portanto, é importante ter conhecimento de quando solicitar cada teste no contexto adequado, tirando proveito máximo das qualidades e minimizando pontos negativos das modalidades diagnósticas. Um exemplo para esse cenário são os linfomas indolentes ou em fases iniciais. Esses processos tendem a conter um número variável de linfócitos residentes não neoplásicos, logo a imunocitoquímica e a citometria de fluxo podem ser inconclusivas em padrões tão heterogéneos. Nesses casos, a avaliação da clonalidade através da PARR poderia ser muito útil no diagnóstico (Thalheim, Williams, Borst, Fogle & Suter, 2013).

O teste de clonalidade linfoide (PARR) será descrito detalhadamente nas secções seguintes, onde serão abordados conceitos básicos do ensaio, vantagens e limitações, interpretação dos resultados e as perspetivas futuras para essa modalidade diagnóstica em medicina veterinária.

2.3. Biologia molecular na oncologia e ensaios de clonalidade

Nas últimas décadas, os patologistas e oncologistas humanos tornaram-se cada vez mais dependentes dos testes moleculares e genéticos para diagnosticar, avaliar prognósticos e escolher tratamentos para os mais diversos tipos de cancro. Com a popularização destes testes em veterinária, pode-se cada vez mais oferecer aos pacientes diagnósticos mais precisos, económicos, menos invasivos e com informação prognóstica mais fiável (Avery, 2012; Gentilini, Turba & Calzolari, 2012).

Os testes de diagnóstico de base molecular em neoplasias podem ser classificados em 3 grandes categorias: 1) Deteção de mutações individuais em oncogenes; 2) Ensaios de clonalidade; 3) Deteção de translocações, deleções e duplicações cromossómicas. Os testes de clonalidade linfoide e a deteção da mutação no oncogene c-kit nos mastocitomas são atualmente utilizados na rotina e estão relativamente disponíveis de forma ampla para os profissionais (Avery, 2012).

Qualquer teste de diagnóstico que demonstre que um grupo de células é derivado de um único clone pode ser considerado um ensaio de clonalidade. Esse termo é normalmente utilizado para se referir à deteção dos genes únicos encontrados em células linfoides B ou T, designada PARR (PCR para rearranjo dos recetores de antigénio) (Avery, 2009; Avery, 2012; Keller & Moore, 2012a). No entanto, menos comumente, células não linfoides também podem ser alvo de testes de clonalidade, mas como não dispõem de sequências de DNA bem caracterizadas e específicas que possam ser analisadas, é necessária uma abordagem alternativa. Um exemplo é a inativação do cromossoma X, análise que explora o processo normal de inativação desse cromossoma e o rácio entre cromossomas ativos de origem materna e paterna numa população celular (Seelig & Avery, 2020; Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022). Neste trabalho, os termos “testes de clonalidade” e “ensaios de clonalidade” serão utilizados como sinónimos de clonalidade linfoide e PARR.

Um aspeto importante a ressaltar é que o termo PARR é apenas utilizado em medicina veterinária e não se aplica ao ensaio de clonalidade linfoide humana, mesmo esse tendo os mesmos princípios e objetivos (Seelig & Avery, 2020; Avery, 2012). Na medicina humana, esse tipo de ensaio encontra-se mais avançado e bem mais padronizado, principalmente após as

diretrizes da EuroClonality/BIOMED-2, uma fundação europeia independente que tem como objetivo promover a inovação contínua e a normalização do diagnóstico laboratorial em hemato-oncologia, com especial ênfase nos testes de clonalidade. Essas diretrizes tornaram-se referência mundial para esse tipo de ensaio (Van Dongen *et al*., 2003; Van Krieken *et al*., 2007; Langerak *et al*., 2012).

A viabilidade dos testes de clonalidade com base em PCR em veterinária foi primeiramente reportada por Vernau & Moore (1999), sendo o protocolo aprimorado e validado por Burnett *et al*. (2003). Com o passar dos anos e evolução da técnica, diversas variações do protocolo original já foram reportadas e são utilizadas em laboratórios académicos e comerciais (Ehrhart *et al*., 2019). Entre os laboratórios veterinários existe uma grande variação de como a técnica é realizada, especialmente em relação aos conjuntos de *primers* utilizados (Burkhard & Bienzle, 2015).

Embora os testes de clonalidade forneçam informações valiosas numa variedade de situações, as complexidades e armadilhas interpretativas desse método, bem como a sua dependência da experiência do intérprete, são frequentemente subestimadas. Além disso, a falta de terminologia padronizada, de práticas laboratoriais e de diretrizes de interpretação dificulta a reprodutibilidade dos testes em medicina veterinária (Keller, Vernau & Moore, 2016).

A literatura gerada ao longo de décadas a respeito dos testes de clonalidade linfoide em medicina humana e veterinária destacou os princípios gerais do ensaio que podem ser aplicar a todas as espécies. Esses princípios incluem o reconhecimento de padrões de eletroforese típicos e os seus significados, medidas básicas de controlo de qualidade laboratorial e também armadilhas de interpretação (Keller *et al.*, 2016).

2.4. Conceito básico do ensaio de clonalidade linfoide

Os linfócitos B desenvolvem-se na medula óssea e as células T finalizam o seu desenvolvimento no timo. A função destas células é identificar milhões de diferentes antigénios transportados por potenciais agentes patogénicos (Rout & Avery, 2022). A imunidade adaptativa depende do reconhecimento de antigénios específicos pelos linfócitos, facilitado por 2 tipos de recetores, o recetor de células B (IG – imunoglobulinas) e o recetor de células T (TCR). Os recetores de antigénios são compostos por cadeias de recetores, cada uma das quais codificada em um *locus* (Keller *et al.*, 2016). A produção de um enorme repertório para identificação de uma vasta quantidade de antigénios é possível devido a um processo denominado recombinação somática ou recombinação VDJ (Villiers, 2020). Esse processo será explicado de forma detalhada na secção seguinte.

Ao contrário de outros genes, os genes dos recetores de antigénios dos linfócitos não apresentam uma sequência de nucleotídeos constante. Em vez disso, um novo gene recetor de antigénio com especificidade de ligação e sequência única é criado em cada linfócito através do rearranjo de vários genes menores (anteriormente referidos como segmentos de genes) (Keller *et al.*, 2016).

Dessa forma, os linfócitos são considerados únicos no organismo, na medida em que os linfócitos normais possuem uma impressão digital genética específica de cada célula. A natureza aleatória do processo de recombinação somática significa que cada célula B e T terá um recetor de antigénio geneticamente distinto, tanto em comprimento como em sequência. Além disso, nucleotídeos são cortados ou adicionados nas junções entre os genes, aumentando ainda mais a diversidade. Quando essas células se dividem, resultantes de estimulação antigénica ou da transformação neoplásica, as células filhas herdam os genes dos recetores de antigénio (Rout & Avery, 2022; Seelig & Avery, 2020; Burkhard & Bienzle, 2015; Avery, 2012; Rout, Burnett, Yoshimoto, Avery & Avery, 2019).

As inúmeras diferentes combinações dos genes possíveis representam o chamado "repertório combinatório" (Gentilini *et al*., 2012; Gentilini, Calzolari, Turba, Bettini & Famigli-Bergamini, 2009). Essa diversidade é tão significativa que em humanos estima-se que a quantidade de diferentes moléculas IG e TCR seja maior que 10^{12} (Van Dongen *et al*., 2003). Dessa forma, a possibilidade de dois linfócitos diferentes possuírem coincidentemente o mesmo recetor é quase negligenciável (Langerak *et al*., 2012).

Uma resposta a um agente patogénico envolverá centenas a milhares de células B e T molecularmente diferentes. Isso acontece porque mesmo o agente patogénico mais simples é composto por múltiplas proteínas, que podem ser reconhecidas pelos recetores de antigénio de muitos linfócitos diferentes. Até mesmo uma única proteína pode ter muitas estruturas antigénicas diferentes e pode estimular a divisão de múltiplos linfócitos (Rout & Avery, 2022).

Já o desenvolvimento do cancro é um processo multifactorial, sendo um destes factores mutações genéticas associadas que tornam uma célula resistente aos controlos de crescimento. A célula divide-se sem controlo, dando origem a uma massa tumoral derivada dessa única célula original e que contém as mutações e sequências de DNA únicas dessa mesma célula (Rout & Avery, 2022). Tendo em vista esse conceito, a clonalidade é considerada uma característica distintiva ("*hallmark*") das proliferações neoplásicas (Vail *et al*., 2019).

Portanto, de forma simplificada, em um estímulo de caráter reativo, os linfócitos reagem de forma diversificada a um espetro de antigénios que resulta na ativação e proliferação de linfócitos heterogéneos no que diz respeito aos seus genes recetores, sendo denominado uma expansão policlonal. Numa perspetiva oposta, uma população neoplásica pode ser caracterizada pela proliferação descontrolada de um único linfócito apresentando as mesmas características no que diz respeito aos seus genes recetores, sendo essa denominada uma expansão clonal. Explorar essas diferenças e avaliar a natureza homogénea ou heterogénea dos rearranjos constitui o princípio básico da PARR (Seelig & Avery, 2020; Keller *et al.*, 2016; Villiers, 2020; Langerak *et al.*, 2012).

Na metodologia PARR é realizada a extração DNA de células suspeitas de serem neoplásicas e, por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utiliza-se conjuntos de *primers* dirigidos aos genes dos recetores de antigénio com o objetivo de amplificar as suas regiões variáveis (figura nº 4). Os produtos de PCR então são separados por tamanho utilizando uma variedade de métodos possíveis (eletroforese). Após a separação dos *amplicons*, a visualização de um padrão com produto de tamanho único dá suporte a uma alteração neoplásica (clonal), enquanto a presença de múltiplos *amplicons* de tamanhos distintos suporta um processo reativo (policlonal) (Avery, 2012).

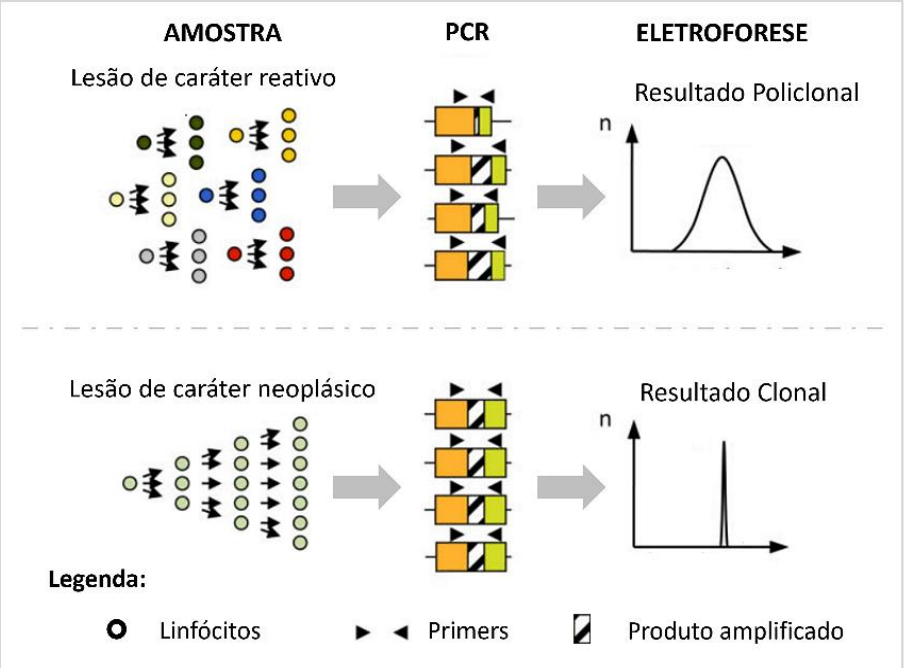


Figura nº 4 - *Imagem esquemática do princípio do teste de clonalidade (PARR). Em amostras reativas, representadas por diversos linfócitos diferentes (círculos com cores variadas), a PCR resultará em uma curva com base ampla na eletroforese, demonstrando a amplificação de produtos de diferentes tamanhos. No cenário oposto, em amostras provenientes de uma lesão neoplásica, com vários linfócitos derivados de uma mesma célula precursora (círculos com cores iguais), a PCR resultará em um pico de base estreita na eletroforese, demonstrando a amplificação de produtos do mesmo tamanho. Adaptado de Keller et al.(2016).*

2.5. Recombinação somática (VDJ) e desenho do ensaio

Os genes dos recetores de antigénios são classificados em genes variáveis (V), de diversidade (D) e de junção (J). Durante o rearranjo dos recetores de antigénios, um de cada um dos múltiplos genes V, D e J é unido pela remoção do DNA interveniente e os nucleotídeos são adicionados ou eliminados das extremidades desses genes (Villiers, 2020), como representado na figura nº 5. A combinação hipervariável resultante é designada por região determinante de complementaridade 3 (CDR3) e é única para cada linfócito, sendo o principal determinante da especificidade do recetor de antigénio (Keller *et al.*, 2016).

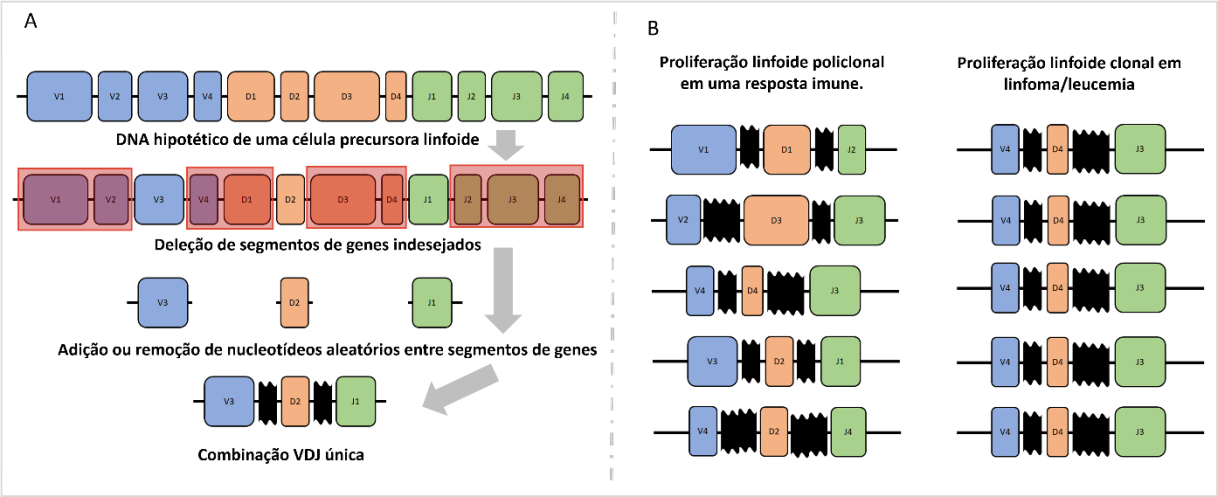


Figura nº 5 - A) *Imagem esquemática representando o desenvolvimento dos genes dos recetores de células T e B devido à recombinação somática. Um único gene variável (V), diversidade (D) e junção (J) são unidos de forma aleatória. O resultado final é uma combinação VDJ única e com comprimento específico, codificando um recetor de imunoglobulina ou recetor de células T distinto de todos os outros.* ***B)*** *Imagem esquemática representando combinações VDJ hipotéticas em respostas policlonais e clonais. Em uma resposta imune normal, muitos linfócitos diferentes estarão presentes com diferentes combinações VDJ. Já em um processo neoplásico, linfoma ou leucemia, estão presentes clones da mesma célula apresentando a mesma combinação VDJ. Adaptado e modificado de* Villiers, 2020.

Esse processo é facilitado pelas enzimas do gene ativador da recombinação RAG-1 e RAG-2. Essas enzimas desempenham um papel fundamental, reconhecendo e cortando o DNA nas sequências de sinal de recombinação (RSS), que estão localizadas a jusante dos segmentos do gene V, em ambos os lados dos segmentos do gene D e a montante dos segmentos do gene J. Essa sequência de sinal de recombinação consiste em um heptâmero semi-conservado e um nonâmero, além de um espaçador pouco conservado de aproximadamente 12 ou 23 nucleotídeos. O rearranjo só pode ocorrer entre um gene com um espaçador de 12 nucleotídeos e um gene com um espaçador de 23 nucleotídeos, uma restrição conhecida como a regra 12/23. As RSS inadequadas (mutadas ou deficientes)

reduzem ou até impedem completamente o rearranjo (Keller & Moore, 2012b; Van Dongen *et al*., 2003; Radtanakatikanon *et al*., 2020).

O rearranjo dos *loci* dos recetores de antigénios depende da linhagem do linfócito e segue uma sequência definida ou hierárquica (Van Dongen *et al*., 2003). As células T reorganizam primeiro o seu *locus* do recetor de células T delta (TRD) seguido do seu *locus* TR gama (TRG). Um linfócito T assume então um fenótipo γδ ou procede ao rearranjo dos seus *loci* TR beta (TRB) e TR alfa (TRA), resultando em um fenótipo αβ. O *locus* TRG rearranjado é mantido em células T αβ e γδ, o que torna este *locus* o alvo principal para ensaios de clonalidade de células T (Keller *et al.*, 2016).

As células B reorganizam primeiro o seu *locus* de imunoglobulina de cadeia pesada (IGH), seguido do *locus* de cadeia leve kapa (IGK). O linfócito expressa então um recetor de células B com cadeias leves kapa ou procede com o rearranjo do seu *locus* de imunoglobulina de cadeia leve lambda (IGL). Nesse caso, o *locus* IGK é eliminado por rearranjo do elemento de deleção kapa (IGKde). Uma vez que o *locus* IGH é rearranjado nas células B independentemente da utilização da cadeia leve, é considerado o principal alvo dos testes de clonalidade das células B. No entanto, este *locus* pode sofrer hipermutação somática durante as respostas imunitárias. A hipermutação somática faz parte de uma resposta imunitária normal, onde as células B aumentam a afinidade dos anticorpos através da mutação dos nucleotídeos dos genes dos recetores de antigénios dos *loci* das células B, levando a uma sensibilidade reduzida nos ensaios de clonalidade que utilizam IGH (Keller *et al.*, 2016).

Embora os rearranjos dos genes dos recetores de antigénios linfocitários estejam normalmente associados às linhagens específicas, em alguns casos, as células B rearranjam os *loci* das células T e vice-versa. Esse fenómeno é designado rearranjo cruzado entre linhagens (*cross-lineage rearrangement*) (Keller *et al.*, 2016; Langerak *et al*., 2012; (Seelig & Avery, 2020).

Para amplificar a região CDR3, os *primers forward* são desenhados no interior da região V, enquanto os *primers reverse* são desenhados no interior da região J, tanto no *locus* IGH como no TRG (Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022). Embora tenham sido publicados muitos conjuntos de *primers* para os ensaios de clonalidade, a sensibilidade de cada conjunto de *primers* é diferente. A seleção de *primers* adequados para os testes de clonalidade específicos é de suma importância, já que a sensibilidade global desses ensaios depende diretamente dos conjuntos utilizados (Takanosu & Kagawa, 2015).

O desenho e o desempenho dos ensaios de clonalidade dependem fundamentalmente de informações precisas sobre a estrutura do *locus*, a frequência de uso dos genes e os padrões de combinação dos genes rearranjados. Os genes que não são rearranjados não precisam ser considerados em um ensaio. Já em contrapartida, todo gene rearranjado em teoria deveria ser coberto pelo ensaio para evitar resultados falso-negativos (Keller & Moore, 2012b). O conhecimento da estrutura do *locus* e do repertório expresso facilita o desenho dos *primers* e ajuda na interpretação dos resultados de clonalidade. Em virtude do grande número de genes recetores de antigénios em alguns *loci*, o conhecimento do uso de V/J (taxa de rearranjo) ajuda a limitar o desenho dos *primers* aos genes que são rearranjados em uma taxa apreciável, o que, por sua vez, minimiza a complexidade da mistura de PCR e torna o ensaio mais robusto (Radtanakatikanon, Moore, Keller, & Vernau, 2021).

Existem basicamente duas estratégias para identificar os genes rearranjados de um *locus* e guiar o desenho dos *primers*. Pode-se a partir do conhecimento do genoma buscar a sequência de nucleotídeos de todos os genes e sua localização física (topologia). Nessa abordagem, não se pode obter informações sobre a taxa de rearranjo (uso V/J) e, portanto, o ensaio tem de abranger todos os genes identificados. A outra abordagem consiste em avaliar o repertório dos genes expressos através de sequenciamento. Essa alternativa permite obter informações sobre o uso V/J, mas limita o desenho dos *primers* apenas aos genes que são rearranjados de forma frequente, dificultando a interpretação dos resultados. Em um cenário ideal, ambas as estratégias deveriam ser combinadas para basear o desenho do ensaio, utilizando informações relativas à topologia e ao uso V/J (Keller *et al.*, 2016).

No início da utilização dos ensaios de clonalidade em medicina veterinária prevaleciam testes com uma cobertura inadequada dos *primers*, uma vez que os conjuntos do genoma completo não estavam frequentemente disponíveis quando os ensaios foram desenvolvidos e a sequenciação de clones individuais apenas permitiu uma avaliação limitada do uso V/J. No entanto, os genomas para várias espécies de interesse já estão disponíveis e o sequenciamento de alto rendimento facilita a avaliação em larga escala do uso V/J, o que proporciona as bases para a criação de novos de conjuntos de *primers* com maior sensibilidade (Keller *et al.*, 2016; Radtanakatikanon *et al*., 2020).

Um exemplo para este cenário é o estudo de Radtanakatikanon *et al*. (2021), onde os autores se basearam no repertório expresso e na topologia para desenvolver conjuntos de *primers* aprimorados para o TRG e outros *loci* adicionais (TRB e TRD). Ao comparar com um antigo ensaio com alvo no TRG, o novo ensaio TRG apresentou um aumento na sensibilidade (de 88,8% para 95,5%) e permitiu identificar como clonal alguns casos em que o antigo TGR

havia classificado como policlonal. A figura nº 6 apresenta um desses casos abordados no estudo.

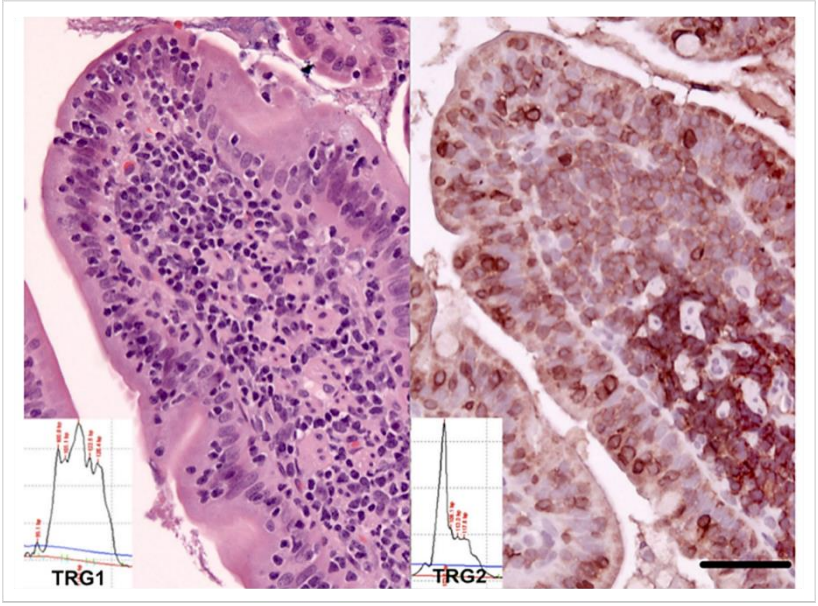


Figura nº 6 - *Imagens das lâminas e perfis eletroforéticos de um dos casos abordados no estudo de* Radtanakatikanon *et al*. (2021*). Esse é um caso de linfoma intestinal de células T pequenas, confirmado por imunohistoquímica para CD3 (Coloração de HE na foto da esquerda e marcação imunohistoquímica na foto da direita). Nos cantos inferiores esquerdos de cada foto, está evidenciado os perfis eletroforéticos utilizando um conjunto de primer antigo (denominado TGR1) e um novo conjunto de primers otimizado (denominado TRG2). No ensaio com o TRG1 o padrão é policlonal, mas já com o novo ensaio multiplex TRG2 o padrão é claramente clonal. (Barra = 50 µm)*

Também no estudo de Radtanakatikanon *et al*. (2021), foi descrito detalhadamente as características utilizadas de guia para o desenho dos *primers* utilizado no estudo, sendo consideradas como um requerimento mínimo para que sejam considerados adequados para os testes de clonalidade. Estas características incluem: 1) *primers* com menor que duas incompatibilidades de nucleotídeos com qualquer um dos genes alvo; 2) qualquer incompatibilidades sempre deve estar localizadas a pelo menos cinco nucleotídeos de distância da extremidade 3' do *primer*; 3) os *primers* devem ser colocados a pelo menos 12 nucleotídeos de distância da região de junção para evitar o reanelamento inadequado devido à exclusão ou adição de nucleotídeos; 4) os tamanhos de produto esperados devem ser mantidos em <200pb, com o objetivo de permitir o uso de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE), que geralmente apresentam algum grau de comprometimento na integridade de DNA em comparação com outros tipos de amostra.

2.6. Particularidades analíticas da PARR

Ao considerar fatores pré-analíticos e analíticos da PARR, vários aspetos são de suma importância para obter resultados ótimos nessa metodologia. Estes incluem o contexto clínico, a seleção de material representativo, a preservação e o manuseamento da amostra, a extração do ácido nucleico (rendimento, pureza e integridade) e a seleção de rearranjos IG/TCR como alvos da PCR (Langerak *et al*., 2012).

O DNA para PCR pode ser obtido a partir de sangue, amostras de fluidos, lâminas citológicas secas ao ar (coradas ou não) e cortes histológicos. Os testes de clonalidade são geralmente efetuados com DNA genómico, uma vez que o DNA é mais robusto do que o RNA e pode ser obtido a partir de fontes de qualidade inferior, como tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE) (Keller *et al*., 2016; Burkhard & Bienzle, 2015; Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022; Villiers, 2020).

O desempenho dos ensaios de clonalidade IG/TCR é mais elevado com material celular fresco ou congelado, no entanto, a utilização de tecidos fixados é uma opção realista, desde que o DNA não esteja demasiado degradado. Embora a maioria dos procedimentos de isolamento de ácidos nucleicos (métodos e/ou *kits* tradicionais) resulte geralmente em um bom rendimento e pureza, poderá ser interessante purificar ainda mais o DNA isolado de blocos de parafina para remover eventuais inibidores da PCR (Langerak *et al*., 2012; Lenze, Müller & Hummel, 2012).

Uma característica única desta modalidade de diagnóstico é que as lâminas podem ser examinadas e depois submetidas a remoção de células, extração de DNA e análise de PCR. Esse processo facilita o diagnóstico pois visa garantir que as células alvo de interesse estejam presentes na lâmina em número adequado. O número mínimo de células necessárias para o ensaio é de aproximadamente 50.000 (Burkhard & Bienzle, 2015).

Os limites inferiores de deteção de neoplasia com a PARR dependem também do tecido do qual a amostra foi colhida. Em tecido não linfoide, o ensaio é muito sensível e permite a deteção de uma célula neoplásica em 1.000. No tecido linfoide, a deteção é considerada menos sensível. Uma explicação provável para este fenómeno é que as sequências rearranjadas dos linfócitos normais podem competir com a amplificação do DNA neoplásico (Burnett *et al*., 2003).

Um exemplo prático para esse panorama é que a sensibilidade da PARR no diagnóstico de linfoma alimentar canino foi reportada como tendo uma menor sensibilidade do que para outras neoplasias linfoides nessa espécie. Uma das principais explicações para este facto é a frequente infiltração de linfócitos inflamatórios concomitante ao linfoma

alimentar. A infiltração significativa de linfócitos inflamatórios pode levar a uma diminuição relativa do número de células tumorais, aumentando as chances do número de células neoplásicas apresentar-se abaixo do limite de deteção da técnica (Fukushima *et al.*, 2009).

Em alguns casos, pode ser indicado selecionar partes de uma amostra para extração de DNA e excluir outras possíveis fontes de contaminação ou fatores de confusão, como demonstrado na figura nº 7. Um cenário possível é a exclusão de regiões específicas de uma lâmina que contenham um grande número de linfócitos normais, que podem eventualmente obscurecer o sinal da população linfoide alvo possivelmente neoplásica. Outro cenário é a exclusão de componentes de tecido que não contêm linfócitos e que estão incluídos na mesma lâmina que o tecido de interesse, podendo interferir na análise por reduzir a abundância relativa de DNA linfoide e, consequentemente, também diminui a sensibilidade do ensaio (Keller *et al.*, 2016).

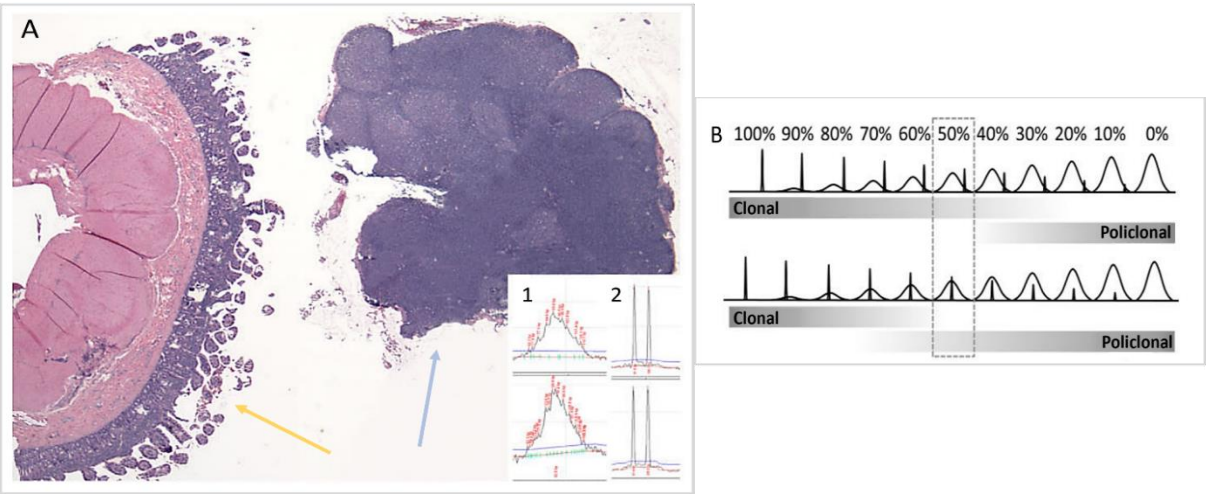


Figura nº 7 - A) *Exemplo da importância da identificação de amostras que requerem extração seletiva de DNA, adaptado e traduzido de Keller et al. (2016). Nessa imagem observa-se uma lâmina histológica de um paciente felino, onde foi incluído intestino delgado (material histológico à esquerda, seta amarela) e linfonodo (material histológico à direita, seta azul). Quando o DNA foi extraído de todo o corte histológico (intestino e linfonodo), foi obtido um resultado policlonal na PARR para recetor de células T gama (TRG), representado pelos perfis eletroforéticos "1". Quando extraído material apenas do intestino, o resultado da PARR revelou dois picos distintos, representados pelos perfis eletroforéticos "2", sugerindo um padrão clonal e que a lesão intestinal é na realidade um linfoma.* ***B)*** *Imagem esquemática de duas situações hipotéticas de diluição de DNA clonal (neoplásico) em DNA policlonal (não neoplásico) simulando possíveis cenários reais, adaptado e traduzido de Keller et al. (2016). A altura relativa do pico de um clone é determinada pelo grau de fundo policlonal e pela localização (tamanho) do pico em relação ao fundo policlonal. Caso o pico esteja claramente deslocado em relação ao fundo policlonal (situação superior), ele poderá ser mais facilmente detetado. Já quando o pico coincide com o ponto mais alto da curva policlonal (situação inferior), a deteção do pico pode ser bem mais difícil.*

Uma vez que a qualidade e a integridade do DNA extraído da fixação em formalina podem provocar uma série de artefactos de confusão, incluindo manchas e ruídos de fundo, diminuição do rendimento do DNA e DNA fragmentado, é importante que os laboratórios estejam atentos a estes aspetos e também comuniquem o seu desempenho de diagnóstico ao utilizador final. Embora todas as potenciais variáveis tenham ainda de ser investigadas, a qualidade do DNA extraído é, no mínimo, inversamente proporcional ao tempo de armazenamento, sendo que as amostras mais antigas apresentam mais anomalias do que as amostras recolhidas mais recentemente (Seelig & Avery, 2020).

A avaliação do rendimento e da pureza do DNA é geralmente efetuada por espetrofotometria. Esse método é suficientemente preciso, uma vez que a PCR de clonalidade linfoide é robusta no que diz respeito a pequenas variações no DNA inicial. O recomendado para a técnica de é 100 nanogramas por 50 microlitros de reação. A quantidade insuficiente de DNA é observada principalmente em aspirados de baixa celularidade, em amostras histopatológicas pequenas ou como consequência de erros técnicos durante a extração de DNA (Keller *et al.*, 2016).

Como a avaliação da integridade do DNA é dispendiosa se for efetuada para cada amostra, essa avaliação é normalmente apenas efetuada nos diagnósticos de rotina quando os resultados da eletroforese forem suspeitos de uma baixa integridade do DNA. Suspeita-se desse cenário quando a amplificação for fraca apesar de um grande número de células de interesse. A integridade do DNA comprometida é observada principalmente em amostras FFPE após fixação prolongada em formalina (Keller *et al.*, 2016).

O ensaio PARR difere dos ensaios PCR mais comuns, por exemplo aqueles que são utilizados para detetar DNA de agentes infeciosos, em que o resultado é interpretado como "positivo" ou "negativo". Na PARR a qualidade dos resultados é muito dependente da fonte do DNA, dos *primers* utilizados, do protocolo de ciclo PCR e, particularmente, da resolução da técnica de separação do produto PCR (Avery, 2012).

A separação do tamanho dos fragmentos amplificados é efetuada por eletroforese em gel ou por eletroforese capilar, uma variante de alta resolução da eletroforese em gel tradicional, com maior rendimento e maior facilidade de execução. Historicamente, a PARR era realizada utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), mas esse método está cada vez mais a ser substituído pela eletroforese capilar. Um processo de eletroforese de alta resolução é especialmente útil quando se utilizam ensaios que visam *loci* multi-cassete, devido à ocorrência frequente de múltiplos picos clonais, muitas vezes com espaçamento estreito entre si (Seelig & Avery, 2020; Keller *et al.*, 2016; Beaubier, Hart, Bartolo, Willman & Viswanatha, 2000).

A resolução dos produtos de PCR representa um aspeto analítico importante. Em alguns casos, caso não sejam separados com uma resolução suficiente, podem parecer falsamente clonais se houver muito pouco DNA ou se o DNA for de má qualidade. Idealmente, devem ser utilizadas técnicas de separação que permitam uma resolução de base única, como a eletroforese capilar, mas é necessária uma resolução mínima de três pares de bases. Os géis de agarose, habitualmente utilizados em muito dos ensaios convencionais de PCR, não permitem esse tipo de resolução e não devem ser utilizados para PARR (Avery, 2012).

Segundo as orientações da EuroClonality/BIOMED-2, as amostras para clonalidade devem ser realizadas sempre em duplicata ou triplicata. Essa recomendação tem como objetivo principalmente identificar casos de pseudoclonalidade, o que pode ser um padrão difícil de reconhecer em ensaios de clonalidade baseados em PCR. O termo pseudoclonalidade refere-se a picos de tamanho inconsistente ou não reprodutíveis em amostras replicadas. Entre outras causas, a alta sensibilidade da PCR pode causar a amplificação de poucos rearranjos de genes de IG ou TCR derivados de um número limitado de células B ou T na amostra analisada, gerando produtos que podem mimetizar picos clonais. Desta forma, repetir o teste em paralelo mais de uma vez pode ajudar a esclarecer se os produtos de PCR observado são ou não verdadeiramente clonais (Van Dongen *et al*., 2003; Keller *et al.*, 2016).

Tendo em vista todas essas particularidades analíticas da PARR, sugerir valores globais de sensibilidade e especificidade para este ensaio em medicina veterinária é uma tarefa complicada. Esse facto é ainda agravado quando se considera a falta de padronização entre laboratórios, diferentes conjuntos de *primers* utilizados, as diferenças entre tipos específicos de malignidade e as características biológicas associadas ao teste (ex. hipermutação somática) (Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022). Mesmo a utilização de protocolos semelhantes conduzidos em laboratórios diferentes podem resultar em desempenhos divergentes, principalmente devido às variabilidades do usuário e a pequenas diferenças no protocolo, incluindo condições de PCR e leitura do ensaio (Ehrhart *et al*., 2019).

Além disso, o desempenho de testes de diagnóstico geralmente é determinado em relação a uma análise de referência. Atualmente, a histopatologia é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de processos linfoproliferativos, mas o diagnóstico pode ser prejudicado por uma variedade de situações biológicas e inerentes da técnica (tanto no próprio diagnóstico morfológico quanto na determinação do imunofenótipo em casos em populações mistas de linfócitos B e T). Por esse motivo, normalmente apenas linfomas com diagnósticos inequívocos (ex. sem um componente inflamatório acentuado ou sem um padrão morfológico duvidoso) são selecionados para representar verdadeiros positivos nos estudos

(Radtanakatikanon *et al*., 2021; Rout *et al*., 2019). A avaliação de uma técnica utilizando situações "ideais" pode criar uma elevada expetativa em relação à sensibilidade e especificidade do teste, que pode se comportar de forma diferente em amostras "não ideais" frequentemente observadas na rotina clínica (menor qualidade, heterogéneas, padrões duvidosos). O desempenho da PARR nesses tipos de condições não ideais ainda está por ser determinado (Waugh *et al*., 2016).

De uma forma geral aproximada, de acordo com os dados da literatura, a sensibilidade global da análise PARR para a deteção de tumores linfoides situa-se entre 60-100% em cães e 30-90% em gatos. Já a especificidade é considerada elevada, frequentemente sendo reportada como superior a 90% tanto em cães como em gatos (Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022).

2.7. Interpretação dos resultados

Em uma visão simplificada, os resultados clonais indicam a proliferação de um determinado clone de linfócitos e são sugestivos de uma doença neoplásica como linfoma, leucemia linfoide ou neoplasias de plasmócitos (plasmocitoma, mieloma múltiplo). Já quando não é detetado um padrão clonal, a população de células linfoides na amostra é geralmente considerada normal ou gerada por uma proliferação de caráter reativo (Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022).

Em resultados policlonais, com amostras contendo numerosos linfócitos reativos, é de esperar um perfil IG/TCR com uma distribuição "gaussiana" mais ou menos completa ou, no caso de uma resposta imunitária dominante, um padrão com múltiplos picos reprodutíveis em amostras duplicadas. Em contrapartida, em resultados clonais, como esperado em neoplasias linfoides, espera-se a presença de um ou mais picos bem distintos e reprodutíveis, por vezes ocorrendo concomitantemente com um padrão policlonal de fundo (Langerak *et al*., 2012).

Em humanos, os *loci* dos recetores de antigénios normalmente têm um único cassete (organização em grupos dos genes dos recetores de antigénio), que pode produzir no máximo um rearranjo por cromossoma ou dois rearranjos por linfócito no caso de rearranjos bialélicos. Consequentemente, a interpretação como clonal é baseada na presença de 1 ou 2 picos distintos para *loci* de cassete único, de acordo com a EuroClonality/BIOMED-2. Embora tenham sido demonstrados vários rearranjos por cromossoma para o *locus* TRB ou IGK humano, eles são considerados a exceção e não a regra. Já em veterinária, em contrapartida, devido à organização em vários cassetes do *locus* TRG em algumas espécies, é possível a presença de mais de dois rearranjos por célula, na realidade sendo demonstrado que vários

rearranjos TRG são a regra e não a exceção. Esse aspeto é bastante relevante em medicina veterinária pois antes das descrições mais detalhada dos *loci*, mais de dois rearranjos clonais por amostra eram atribuídos a mais de uma expansão clonal (denominada de oligoclonalidade). Desta forma, Keller *et al.* (2016) propuseram uma modificação nas descrições técnicas para uso em veterinária, onde a interpretação como clonal inclui também a presença de mais de dois picos distintos.

Estudos revelaram que um *locus* TRG canino inclui 7 cassetes completos (8 cassetes no total, mas um sem o gene V) que permitem rearranjos múltiplos em cada alelo, em contraste com os genomas humano e murino (Keller & Moore, 2012b; Massari *et al*., 2009). O *locus* TRG felino é mais parecido com o do cão, também apresentando organização em vários cassetes (5 completos e 1 incompleto) (Radtanakatikanon *et al*., 2020). A presença de vários cassetes proporciona uma maior sensibilidade aos ensaios de clonalidade multiplex que têm como alvo o *locus* TRG, pois há uma certa redundância caso um dos rearranjos não seja detetado por um determinado conjunto de *primers*. No entanto, é impossível saber se os rearranjos clonais múltiplos em um determinado linfoma são causados pelo rearranjo simultâneo de vários cassetes em um único clone neoplásico (hipótese mais provável) ou pela presença real de vários clones neoplásicos (Radtanakatikanon *et al*., 2021).

A figura nº 8, exemplifica de forma esquemática padrões eletroforéticos observados em proliferações clonais e policlonais.

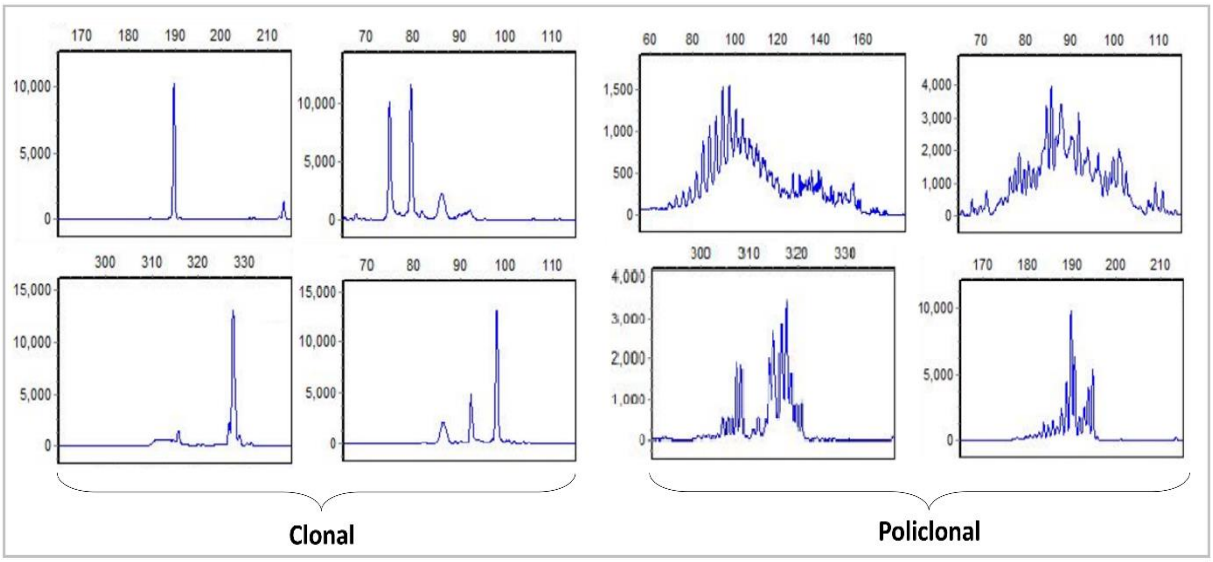
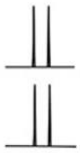


Figura nº 8 - *Exemplos de perfis eletroforéticos utilizando eletroforese capilar com traçados interpretados como clonais (quatro exemplos à esquerda) e policlonais (quatro exemplos à direita) em amostras de felino, adaptado de Rout et al. (2019). Os perfis eletroforéticos exemplificados representam diferentes conjuntos de primers (não especificados na imagem), tendo como objetivo apenas a demonstração de traçados interpretados como clonais e policlonais.*

Um aspeto muito importante é que os perfis de eletroforese, por si só, não são patognomónicos de um processo reativo ou neoplásico e têm de ser interpretados no contexto dos dados clínicos, morfológicos e imunofenotípicos. A interpretação integrada de todos os dados é essencial principalmente para minimizar a possibilidade de erros de diagnóstico. Dessa forma, os testes de clonalidade quando analisados de forma isolada, não são tão definitivos como muitas vezes é afirmado e dependem da formação, experiência e esforços de integração do profissional que está a validar os resultados (Keller *et al.*, 2016). A interpretação e a comunicação exatas dos resultados dos testes de clonalidade também dependem de um conhecimento pormenorizado da estrutura dos genes IG/TCR, dos seus padrões de rearranjo e do conhecimento a respeito de possíveis amplificações inespecíficas ou rearranjos entre linhagens (Langerak *et al.*, 2012).

O quadro nº 1 sumariza os principais padrões eletroforéticos tipicamente observados na PARR abordados por Keller *et al.* (2016), juntamente com as suas descrições técnicas, interpretações mais prováveis e também possíveis considerações alternativas.

Descrição técnica	Padrão eletroforético (em duplicata)	Interpretação mais provável	Considerações alternativas
Clonal - Um ou mais picos distintos reprodutíveis		Processo neoplásico	Clone benigno • Estimulação antigénica • Rearranjos canónicos • Amplificação inespecífica
Policlonal - Curva "gaussiana"		Processo reativo	Falso negativo • Cobertura insuficiente do primer • Mutação no local de ligação do primer • Pico clonal obscurecido por fundo policlonal • Aberrações cromossómicas
Pseudoclonal - um ou mais picos distintos não reprodutíveis **Sem produto específico**- Ausência de picos distintos ou curva "gaussiana"		DNA alvo insuficiente ou com mutação	Desfecho Variável N = Neoplásico R = Reativo • Cobertura insuficiente de primer (N) • Mutação no local de ligação do primer (N) • Quantidade insuficiente de DNA (N ou R) • Integridade insuficiente de DNA (N ou R)

Quadro nº 1 - *Representação esquemática dos perfis eletroforéticos típicos, suas descrições técnicas, interpretações mais prováveis e possíveis considerações alternativas aos resultados levando em consideração as principais armadilhas interpretativas da PARR. Adaptados e traduzidos de Keller et al. (2016).*

Para além das questões técnicas, também múltiplos aspetos biológicos podem colocar dificuldades na interpretação dos resultados dos testes de clonalidade. As dificuldades não se limitam exclusivamente aos aspetos imunobiológicos, mas também incluem particularidades intrínsecas aos *loci* (Langerak *et al*., 2012).

Apesar do conceito básico do ensaio de clonalidade ser simples (padrão policlonal igual a população normal ou reativa *vs.* padrão clonal igual a população neoplásica), por diversos motivos, na rotina diagnóstica podem ser obtidos resultados policlonais na presença de neoplasia e resultados clonais na ausência de neoplasia (Van Dongen *et al*., 2003). Entender os resultados possíveis da PARR, suas armadilhas interpretativas e considerar as causas de resultados variados é importante para minimizar equívocos e interpretações erróneas dos resultados dos exames de clonalidade linfoide. Resultados falso-negativos e falso-positivos devem ser sempre suspeitados quando os resultados de clonalidade entram em conflito com dados clínicos, morfológicos e imunofenotípicos (Keller *et al.*, 2016).

O quadro disponibilizado no apêndice A contém informações a respeito das principais armadilhas interpretativas da PARR abordadas por Keller *et al.* (2016), referentes aos resultados falso-negativos, falso-positivos, picos de significado incerto e perfis pseudoclonais ou sem produtos específicos. Conhecer e entender as armadilhas interpretativas dos testes de clonalidade é essencial para uma adequada utilização dessa modalidade diagnóstica, tanto para patologistas quanto para os veterinários clínicos e oncologistas.

2.8. Usos e contraindicações da PARR

O diagnóstico das neoplasias linfoides primordialmente tem como base a avaliação morfológica por citologia ou histologia. O diagnóstico por vezes é simples, mas há situações e padrões morfológicos que constituem um grande desafio para os patologistas. Essas situações incluem as fases iniciais do linfoma (que podem ser difíceis de distinguir da hiperplasia linfoide), fluidos cavitários que contêm um grande número de linfócitos pequenos, casos com linfocitose crónica ou ligeira, casos em que a biopsia não representa totalmente a lesão e o achado de um pequeno número de linfócitos atípicos em um aspirado por agulha fina ou fluido cavitário. Assim sendo, a grande valia do ensaio PARR é a sua utilização quando existe suspeita de uma neoplasia linfoide por citologia ou histologia, mas não um diagnóstico definitivo (Burnett *et al*., 2003; Avery, 2012; Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022; Rout & Avery, 2022; Ehrhart *et al*., 2019; Gentilini *et al*., 2012).

Nem todos os casos de linfoma e leucemia podem ser detetados pela PARR. O principal motivo para isso é o fato de que, até mesmo com mais novos e otimizados conjuntos de *primers*, provavelmente existam rearranjos em que as sequências diferem suficientemente dos *primers* utilizados, impedindo a sua ligação. Se a neoplasia alvo utilizar algum gene V ou J não contemplado pelos *primers* do ensaio, não será observada qualquer amplificação do DNA das células neoplásicas. Portanto, de uma forma bastante simplificada, o ensaio PARR não deve ser utilizado para excluir uma neoplasia, mas principalmente para apoiar a suspeita de um processo neoplásico através de um resultado clonal (Rout & Avery, 2022; Raskin, 2022).

Tendo em vista esse panorama, o teste PARR é menos útil e pode ser até mesmo contraindicado para casos confirmados de linfoma ou leucemia. Quando o diagnóstico não é ambíguo através dos exames convencionais (citologia e histologia), a realização de outras técnicas complementares como a imunocitoquímica/histoquímica e citometria de fluxo são mais indicados, uma vez que podem ser obtidas mais informações úteis que auxiliem em uma melhor compreensão do processo patológico, por exemplo determinação mais fiável do fenótipo, distribuição de um determinado tipo de células no tecido, tamanho das células e expressões aberrantes de marcadores. Além disso, é importante ressaltar que a PARR também não se destina a ser utilizada como testes de triagem em animais saudáveis, uma vez que não foram avaliados para esse efeito (Avery, 2012).

Outra situação em que a PARR é contraindicada é na diferenciação de neoplasias de origem linfoide ou mieloide, em casos citologicamente ambíguos. Leucemias mieloides apresentando rearranjos clonais já foram reportados em medicina humana e veterinária (Avery, 2012). Stokol, Nickerson, Shuman & Belcher (2017) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a frequência de rearranjos clonais dos recetores de células T e B em cães com leucemia mieloide aguda (LMA). Foram encontrados rearranjos clonais e biclonais nos recetores de células B ou T em 16 dos 25 cães testados, representando 64%. Esses achados indicam que uma elevada proporção de cães com LMA podem expressar regiões CDR3 com rearranjos clonais, corroborando fortemente com a ideia de que a PARR não deve ser utilizada para a diferenciação entre leucemias mieloides agudas e leucemias linfoides ou linfomas em estádio V.

No apêndice B está disponibilizado um quadro que contém alguns exemplos e cenários para a utilização da PARR disponíveis na literatura, em conjunto com uma breve descrição do objetivo, informações adicionais e também as referências bibliográficas dos respetivos estudos. No entanto, com a familiaridade da técnica pelos patologistas, clínicos e oncologistas, é possível que a utilização em novos cenários venha a aparecer. A utilização da

PARR em novas situações depende das limitações técnicas inerentes aos ensaios de clonalidade e se o tipo de resposta obtida atende as necessidades clínicas em situações específicas.

2.9. Determinação do fenótipo através da PARR

Seguindo pressupostos técnicos, o fenótipo de um linfoma ou leucemia baseia-se na expressão de moléculas da superfície celular chamadas de Cluster de Diferenciação (CD), determinado por imunohistoquímica, imunocitoquímica ou citometria de fluxo (Andrews, Operacz, Maes & Kiupel, 2016). No entanto, em teoria, os resultados da PARR podem refletir o fenótipo celular e determinar a linhagem linfoide (Keller *et al.*, 2016).

A PARR é normalmente realizada utilizando vários conjuntos de *primers* de PCR, alguns dos quais detetam rearranjos do gene da imunoglobulina e outros detetam rearranjos do gene do recetor de células T. Portanto, os linfomas de células B serão caracterizados por produtos de PCR de tamanho único quando são utilizados os *primers* de imunoglobulina, mas por produtos múltiplos ou nenhum produto quando são utilizados *primers* de recetores de células T. Já os linfomas de células T, pelo contrário, serão caracterizados por produtos de tamanho único quando são utilizados *primers* de recetores de células T e múltiplos ou nenhum produto quando são utilizados *primers* de imunoglobulinas. Desse modo, de acordo com a natureza do produto de PCR clonal, obtém-se uma indicação da linhagem da neoplasia (Rout & Avery, 2022).

No entanto, na prática, ocorrem situações em que os resultados de clonalidade não refletem o verdadeiro fenótipo de uma célula. Para além das limitações técnicas intrínsecas da PARR que poderiam resultar nesse cenário (ex. falta de cobertura dos *primers*), uma causa biológica para isto é um fenómeno chamado de rearranjo cruzado entre linhagens (***cross-lineage rearrangement***) (Keller *et al.*, 2016; Van Krieken *et al.*, 2007). Basicamente esse fenómeno é definido pelo rearranjo dos *loci* de células T por células B ou dos *loci* de células B por células T (Seelig & Avery, 2020).

O mecanismo exato da ocorrência do rearranjo cruzado entre linhagens ainda não foi completamente estabelecido. Foi especulado que o rearranjo cruzado poderia ser um efeito da transformação maligna, mas a observação desse fenómeno em linfócitos humanos e murinos normais sugere que, se a transformação maligna tiver o potencial de produzir estes rearranjos, este não é o único mecanismo envolvido. Para além disso, os efeitos que os rearranjos de linhagem cruzada podem ter no comportamento biológico das neoplasias

linfoides e a sua resposta ao tratamento ainda permanecem por ser estudados e compreendidos (Andrews *et al*., 2016).

Andrews *et al*. (2016) realizaram um estudo com o objetivo específico de determinar a incidência de rearranjo cruzado no linfoma de células T associado à enteropatia tipo II em gatos. O fenómeno foi identificado em 8,7% (8/92) dos casos testados, apresentando rearranjo cruzado do gene IGH. Segundo os autores, as características histológicas de todos os oito casos eram fortemente sugestivas de linfoma de células T associado à enteropatia tipo II, incluindo a infiltração da lâmina própria do intestino delgado por uma população monomórfica de linfócitos pequenos, que foram identificados como células T por imunohistoquímica (CD3). Para além desse estudo que teve foco principal os rearranjos cruzados entre linhagens, o fenómeno é reportado frequentemente em outros estudos que utilizam a PARR, tanto em gatos como cães e em diferentes taxas e representatividade (Weiss, Klopfleisch & Gruber, 2011; Valli, Vernau, De Lorimier, Graham & Moore, 2006; Waugh *et al*., 2016).

Outro estudo avaliou retrospetivamente a capacidade da citometria de fluxo e da PARR para identificar corretamente o imunofenótipo, utilizando a imunohistoquímica como padrão-ouro e determinando o nível de concordância entre os três testes diagnósticos. Em 63 cães avaliados, a sensibilidade da citometria de fluxo em obter o correto imunofenótipo foi significativamente superior à da PARR para linfoma de células B (91% e 67%, respetivamente) e de células T (100% e 75%, respetivamente). A percentagem de concordância global entre a citometria de fluxo e a imunohistoquímica foi de 94%, e já entre a PARR e a imunohistoquímica foi de 69%. Portanto, os autores concluíram que a citometria de fluxo é superior à PARR na determinação correta do imunofenótipo em cães (Thalheim *et al*., 2013). Além disso, como mencionado anteriormente, em casos onde o diagnóstico de linfoma ou leucemia não for ambíguo na citologia ou histologia, a citometria de fluxo ou a imunocito/histoquímica podem ser considerados testes mais úteis para obtenção do fenótipo uma vez que pode-se obter mais informações relevantes através destas técnicas (Avery, 2012).

Assim sendo, tendo em conta principalmente as preocupações relativas ao rearranjo cruzado entre linhagens, a maioria dos estudos sugerem que o ensaio PARR não deve ser utilizado como ferramenta única para a obtenção do fenótipo e determinação da linhagem celular. No entanto, há importantes ressalvas a esta consideração, incluindo a falta de critérios objetivos para a definição de clonalidade, a falta de acompanhamento clínico (para excluir a existência de múltiplas neoplasias) e a ocorrência conhecida de linfomas concomitantes de células B e T (particularmente linfoma indolente da zona T em cães com linfoma de células

B). Todos estes fatores podem superestimar o impacto de verdadeiros rearranjos cruzados entre linhagens (Seelig & Avery, 2020).

Um estudo mais recente utilizando conjuntos de *primers* aprimorados teve uma conclusão um pouco diferente sobre a perspetiva de utilizar a PARR para definição da linhagem celular. Waugh *et al*. (2016) obtiveram concordância entre a PARR e o imunofenótipo obtido por citometria de fluxo ou imunohistoquímica de 97% (109/112 casos), sendo considerada excelente. Os autores argumentam que o uso dos novos conjuntos de *primers* poderia ter influenciado positivamente a concordância, diferentemente dos estudos passados que utilizavam conjuntos limitados. Outro ponto levantado é que, principalmente quando os antigénios de superfície apresentam expressão reduzida ou a população de células malignas não é a mais prevalente na amostra (ex. linfoma de células B rico em células T), a PARR terá uma maior precisão do que a citometria de fluxo na definição do fenótipo por conta da limitação da técnica nesses cenários específicos. Dessa forma, baseados na elevada concordância e a baixa incidência de rearranjos cruzados entre linhagens observados no estudo, os autores sugerem que a PARR poderia ser uma ferramenta adequada para a determinação da linhagem quando outras modalidades de imunofenotipagem não estiverem disponíveis.

Até que mais estudos determinem com precisão o papel da PARR na determinação do fenótipo, os ensaios de clonalidade ainda continuam a não ser uma ferramenta recomendada para esse propósito, principalmente quando utilizado de forma isolada. Além disso, embora determinar o fenótipo das células seja certamente um passo importante no processo de classificação dos linfomas, é importante salientar que quando esse dado é utilizado de forma desvinculada do panorama geral do paciente, sem a restante classificação morfológica, histológica, localização e estadiamento (informações que não são avaliadas pela PARR), podem ser obtidas informações prognósticas potencialmente enganosas. Embora existam dados que apoiem a ideia de que os linfomas de células T têm, em geral, um pior prognóstico e pior resposta a quimioterapia do que os linfomas de células B, existem muitas exceções a essa regra, como por exemplo os linfomas de zona T em cães que são considerados indolentes (Vail *et al*., 2019; Seelig & Avery, 2020; Burkhard & Bienzle, 2015; Avery, 2012).

2.10. Perspetivas futuras e considerações finais

Atualmente, os testes de clonalidade em medicina veterinária são, em muitos aspetos, comparáveis à situação da medicina humana no início da década de 1990. Nessa altura, os ensaios de clonalidade estavam rotineiramente disponíveis para os *loci* IGH e TRG, mas os resultados falsos negativos principalmente devido a uma cobertura inadequada dos *primers*

eram comuns. Além disso, não existia padronização dos conjuntos de *primers*, das normas laboratoriais e da interpretação dos resultados (Keller *et al.*, 2016; Van Krieken *et al*., 2007).

Tendo em consideração as significativas diferenças atuais entre os laboratórios veterinários com relação às práticas laboratoriais e às diretrizes gerais em relação à PARR, a padronização dos protocolos, dos critérios de interpretação e a harmonização da terminologia seriam o melhor o caminho para otimizar a precisão e utilidade dos ensaios de clonalidade em veterinária (Langerak, 2016).

Uma conquista importante na medicina humana nesta área foi a padronização dos testes de clonalidade entre instituições. Esse cenário é atribuído em grande parte à iniciativa EuroClonality/BIOMED-2, que reuniu 47 instituições de 7 países (Holanda, Bélgica, Espanha, Portugal, Reino Unido, Alemanha e França) para estabelecer conjuntos de *primers* e diretrizes padronizadas para todos os passos do teste de clonalidade. A partir desse ponto, os testes de clonalidade em medicina humana evoluíram para uma ferramenta eficaz, uniformizada e amplamente aceita para a avaliação de proliferações linfoides (Keller *et al.*, 2016; Van Dongen *et al*., 2003; Van Krieken *et al*., 2007; Langerak *et al*., 2012).

Uma consequência importante da normalização técnica em medicina humana é o facto dos ensaios de clonalidade poderem ser facilmente realizados em laboratórios de rotina, mesmo em laboratórios menores que apenas esporadicamente recebem pedidos de testes de clonalidade e que, por isso, têm uma experiência limitada. Em veterinária os conhecimentos básicos e a ampla experiência se tornam cada vez mais necessários para a escolha do alvo IG/TCR e para a correta interpretação dos resultados dos testes de clonalidade (Langerak *et al*., 2012).

Langerak (2016), em um artigo que visa discutir a padronização dos testes de clonalidade na medicina veterinária, defende que a comunidade veterinária beneficiaria enormemente de um grande salto em busca de um panorama uniformizado. A padronização vai além da harmonização e implicaria em uma otimização dos ensaios baseada em evidências concretas, visando oferecer uma abordagem que seja suficientemente robusta. Segundo o autor, a primeira etapa seria criar um consórcio que comparasse diretamente os ensaios de IG/TCR existentes em vários laboratórios veterinários, selecionando os melhores como padrão-ouro (a menos que fique claro que nenhum ensaio isolado teria uma sensibilidade clínica aceitável). A segunda etapa seria a elaboração de um esquema de controle de qualidade para testes paralelos em diferentes laboratórios utilizando amostras selecionadas, visando avaliar e melhorar o desempenho das instituições, eventualmente acompanhado algum tipo de "*feedback*" educacional. E por fim, investir em novos alvos dos

testes de clonalidade para aumentar a taxa de deteção das neoplasias, com por exemplo IGKde (menos sensível a hipermutações) e rearranjos incompletos de IGHDJ.

Segundo Keller *et al.* (2016), uma iniciativa com esses moldes em medicina veterinária, apesar de bastante desejável, enfrentaria vários desafios. Em primeiro lugar, as sequências genéticas dos recetores de antigénios diferem entre espécies, necessitado de *primers* específicos para cada espécie de interesse. Nesta perspetiva, o esforço associado à padronização dos conjuntos de *primers* seria consideravelmente maior do que na medicina humana. Outro ponto limitante é que existe uma grande variedade de práticas laboratoriais e equipamento técnico sendo utilizados nas diversas instituições laboratoriais veterinárias. Finalmente, uma iniciativa abrangente e multi-institucional semelhante à iniciativa EuroClonality/BIOMED-2 exigiria um financiamento significativo. Tendo em conta estas considerações, qualquer estudo multi-institucional em medicina veterinária será de menor escala, exigindo um planeamento cuidadoso e muito possivelmente levará anos até a sua conclusão.

O desenvolvimento de conjuntos de *primers* multiplex sofisticados, mais sensíveis e que abrangessem todos os genes rearranjados possíveis, constituiu um dos pilares para a melhoria dos testes de clonalidade em medicina humana (Van Dongen *et al*., 2003; Van Krieken *et al*., 2007). Com o avanço da área na veterinária e publicação de mais estudos em relação ao tópico, é esperado que novas tecnologias e abordagens sejam desenvolvidas. Essas novas abordagens terão um impacto positivo principalmente na prevalência de resultados falso-negativos devido à cobertura inadequada de *primers*, que eventualmente serão substituídos por conjuntos multiplex mais abrangentes (Keller *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, variadas publicações reportaram a utilização de novos e otimizados conjuntos de *primers*, tanto para cães quanto para gatos (Radtanakatikanon *et al*., 2021; Yamazaki *et al*., 2008; Ehrhart *et al*., 2019; Waugh *et al*., 2016; Takanosu, Nakano & Kagawa, 2019; Rout *et al.*, 2019). É importante salientar que a maioria destes trabalhos são oriundos de grupos de pesquisa e instituições diferentes, representando trabalhos isolados e não um esforço em conjunto em algum tipo de consórcio.

Exemplos importante dessas novas abordagens são os recentes artigos de Radtanakatikanon *et al*. (2021) e Rout *et al.* (2019), ambos com foco na espécie felina. Os autores utilizaram os mais atualizados conhecimentos sobre os testes de clonalidade e sobre os princípios genéticos envolvidos nos rearranjos (incluindo a topologia dos *loci*) para desenhar novos e aprimorados conjuntos de *primers* multiplex com diferentes alvos além do IGH e TRG, normalmente utilizados em veterinária. A combinação de vários alvos genéticos aumenta significativamente a sensibilidade geral do diagnóstico (Van Krieken *et al*., 2007).

No primeiro estudo, Radtanakatikanon *et al*. (2021) desenvolveram novos ensaios multiplex visando os *loci* TRG (aprimorando um ensaio antigo), TRB e TRD para o diagnóstico de neoplasias linfoides de células T em gatos. A utilização do conjunto de *primers* aprimorado para o *loci* TRG em combinação com o conjunto de *primers* para TRB ou TRD obtiveram sensibilidade de 99,1% e 98,3%, respetivamente. Já no estudo de Rout *et al.* 2019, foram utilizados conjuntos de *primers* visando rearranjos completos IGHVDJ, rearranjos incompletos IGHDJ, elemento de deleção kapa (IGKde) e cadeia leve de imunoglobulina lambda (IGL). Ao utilizar concomitantemente os quatro conjuntos *primers*, a sensibilidade foi de 87% (33/38 casos), bastante superior quando comparado com a sensibilidade de 50% (19/38) do IGHVDJ completo sozinho. Esses resultados foram tão relevantes que os autores agora utilizam como rotina no laboratório sempre os quatro conjuntos de *primers* para todo ensaio PARR para deteção de neoplasias de células B em felinos.

Outro ponto extremamente importante para uma evolução na qualidade dos diagnósticos em clonalidade é a formação contínua dos profissionais. A revisão de conceitos, abordagens das novas tecnologias e manutenção das boas práticas não é válida apenas para profissionais iniciantes, mas também para os utilizadores e laboratórios experientes (Langerak *et al*., 2012). A discussão detalhada das armadilhas de interpretação e de todos os aspetos analíticos da PARR é muito útil para conscientizar os patologistas e também os clínicos das possíveis limitações dos exames de clonalidade, proporcionando assim uma utilização mais adequada da técnica.

É necessário afirmar o conceito de que os ensaios de clonalidade não são testes isolados. O contexto clínico e morfológico no qual esses testes são aplicados é extremamente importante para uma interpretação final adequada, podendo ser observados resultados clonais na ausência de neoplasia e resultados policlonais na presença de neoplasia. Portanto, a interpretação acurada e precisa da PARR exige sempre a integração com todos os dados clínicos disponíveis, aspetos morfológicos completos e informação a respeito do imunofenótipo (Keller *et al.*, 2016; Radtanakatikanon *et al*., 2021). Os ensaios de clonalidade, quando utilizados de forma consciente e adequada, tornam-se uma ferramenta com enorme potencial de melhorar o diagnóstico em medicina veterinária e proporcionar um melhor cuidado aos pacientes com processos linfoproliferativos (Moore, Woo, Vernau, Kosten & Graham, 2005).

3. OBJETIVOS

Neste trabalho foram recolhidos e avaliados dados a respeito da PARR no Laboratório Veterinário Cedivet, com os objetivos de criar um panorama geral da utilização da análise neste laboratório e comparar a concordância dos resultados da PARR com os resultados prévios dos exames morfológicos que antecederam o ensaio de clonalidade (exames citológicos e histológicos), proporcionando um melhor entendimento dos cenários onde a técnica é utilizada e identificando possíveis pontos negativos e positivos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Recolha dos dados

Este estudo retrospetivo foi realizado no Laboratório Veterinário Cedivet, Porto, Portugal. Foi realizado um levantamento de todos os casos em que foram solicitados a análise PARR entre a data 21/11/2016 e a data 14/02/2023. Os dados correspondentes às análises e aos pacientes foram registados e analisados com auxílio de uma planilha eletrónica.

Em relação a PARR foram analisados os resultados gerais (“clonal” ou “não clonal”) e também o fenótipo obtido pela técnica. Já nos exames morfológicos, os resultados foram classificados em “Linfoma”, “Reativo” ou “Não pode diferenciar” (quando não foi possível realizar uma distinção morfológica entre os dois processos). Posteriormente, os resultados foram separados de acordo com os termos modificadores “Suspeito”, “Sugestivo” e “Compatível”. Quando os relatórios não continham especificamente estas palavras, foram incluídos em uma das categorias de acordo com a mensagem geral do relatório.

Outras informações relevantes recolhidas incluíram idade, sexo, espécie, raça, localização da amostra e tamanho dos linfócitos predominantes na amostra.

4.2. PARR e Exames Morfológicos

A análise PARR atualmente não é realizada internamente no Cedivet e é feita em parceria com um laboratório externo (Laboklin, Madrid, Espanha). Neste estudo não foram obtidas informações a respeito do protocolo, *primers* utilizados, sensibilidade e especificidade do ensaio de clonalidade.

Os exames morfológicos, nomeadamente citologia e histologia, seguem os procedimentos padrões convencionais. Por rotina, as citologias são coradas com May-Grunwald-Giemsa (MGG) e as histopatologias com Hematoxilina e Eosina (HE).

4.3. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva e inferencial, utilizando os *softwares* DATAtab (DATAtab Statistics Calculator, E.U., Graz, Áustria) e Jamovi (The Jamovi Project 2023, Sidney, Austrália). Para realização da análise descritiva foram utilizados diversos parâmetros para a distribuição das variáveis, nomeadamente a frequência, percentagem, média e valores mínimo e máximo.

Para avaliar a concordância entre a PARR e os exames morfológicos foi utilizado o coeficiente de concordância Kapa de Cohen (Cohen's Kappa), que mede o grau de concordância das avaliações nominais feitas pelos "avaliadores" (neste caso, as técnicas de diagnóstico) ao avaliar as mesmas amostras. Foi calculado também o percentual global de concordância, obtido utilizando a fórmula "% de concordância global = (a + d) / (a + b + c + d)" de acordo com os valores das células da tabela 2x2 (tabela nº 2).

Para avaliação da concordância dos resultados obtidos nas técnicas PARR e os exames morfológicos foram utilizados apenas os resultados da citologia ou histologia em que o patologista responsável estava inclinado para um dos diferenciais (linfoma ou reativo – 40/58 casos), não sendo incluídos casos com informações incompletas ou casos morfológicos onde não foi possível diferenciar morfologicamente entre os processos patológicos. Para a confeção da tabela de frequências 2x2 e uniformização dos termos, os resultados dos relatórios finais em ambas as análises foram simplificados em duas categorias: Não neoplásico; Neoplásico.

5. RESULTADOS

5.1. Panorama geral da PARR no Laboratório Cedivet

5.1.1. Exames e relação temporal

No levantamento de dados realizado foram obtidos um total 58 casos em que a análise PARR foi realizada. O gráfico nº 2 representa a relação temporal dos pedidos da PARR no Cedivet desde 2016 até fevereiro de 2023.

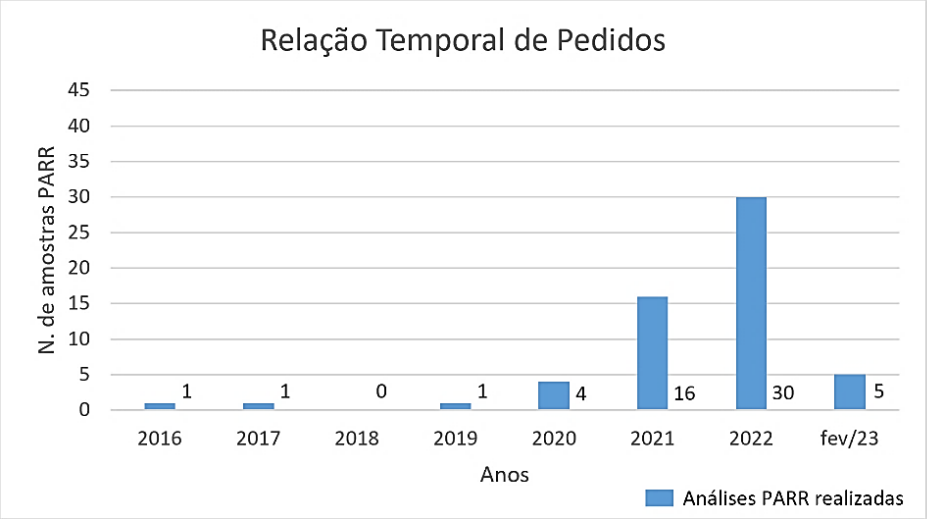


Gráfico nº 2 - *Representação gráfica da relação temporal de pedidos da análise PARR no laboratório Cedivet do ano de 2016 até fevereiro de 2023.*

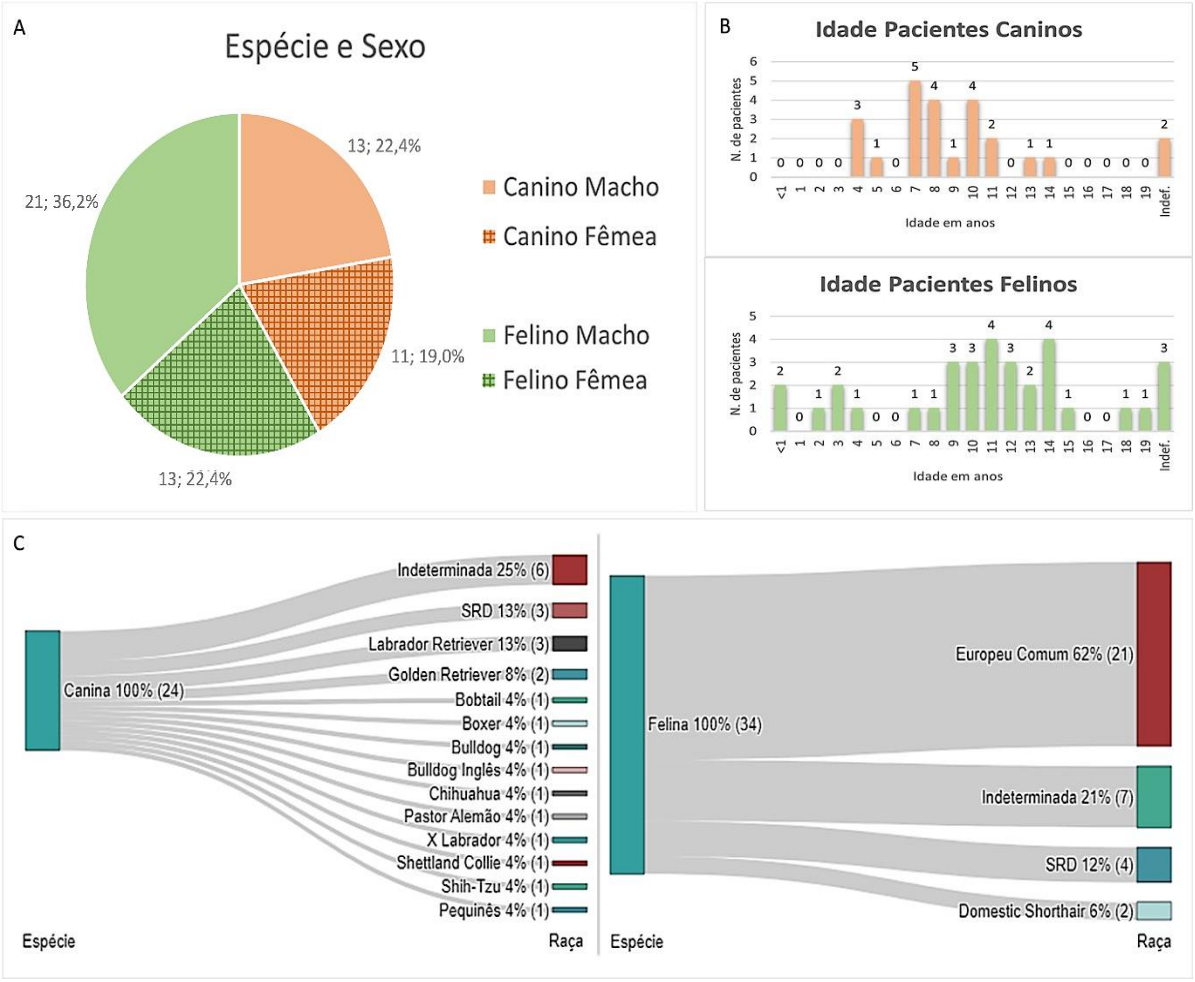
5.1.2. Espécie, sexo, idade e raça

Das amostras analisadas, 58,6% (34/58) eram de pacientes felinos, enquanto 41,4 % (24/34) eram de pacientes caninos (gráfico nº3-A). Foram 24 fêmeas no total, representando 41,4% dos casos (11 caninos, 19,0%; 13 felinos, 22,4%). Já os machos, representavam 58,6% das amostras, com 34 casos (13 caninos, 22,4%; 21 felinos, 36,2%).

A média de idade para os pacientes felinos é de 9,97 anos (idade mínima de 0,5 ano e idade máxima de 19,0 anos). Já nos pacientes caninos, a idade média é de 8,3 anos (idade mínima de 4,0 anos e idade máxima de 14,0). Amostras sem informação quanto à idade corresponderam a 8,8% (3/34) nos gatos e 8,3% nos cães (2/24). Estes resultados estão apresentados nos gráficos nº3-B.

Como demonstrado pelos gráficos nº3-C, nos cães, as raças com maior prevalência foram SRD – sem raça definida (13%; 3/24), Labrador (13%; 3/24) e Golden Retriever (8%; 2/24). Nos gatos, de acordo com os dados do sistema laboratorial, foram observadas apenas

Europeu Comum (62,2%; 21/34), SRD – sem raça definida (12%, 4/34) e Domestic Short Hair (6%, 2/34). Em ambas as espécies, a classificação Indeterminada é relativa aos casos em que o pedido de exame (requisição) não continha a informação relativa à raça, representando 25% (6/24) nos cães e 21% (7/34) nos gatos.



Gráficos nº 3 - A) *Representação gráfica das espécies e sexo dos pacientes. Na cor verde estão representados todos os pacientes felinos e na cor laranja estão representados todos os pacientes caninos. Já a presença da textura quadriculada refere-se às fêmeas e a ausência da textura quadriculada refere-se aos machos.* ***B)*** *Representação gráfica da idade dos pacientes caninos (superior em cor laranja) e felinos (inferior em cor verde).* ***C)*** *Representação gráfica da distribuição das raças caninas (esquerda) e felinas (direita) utilizando diagramas de Sankey. Embora não seja a utilização mais comum para esse tipo de diagrama, ficou simples a visualização da representatividade em que as respetivas raças (dados à direita) têm em relação ao total (dado único à esquerda).*

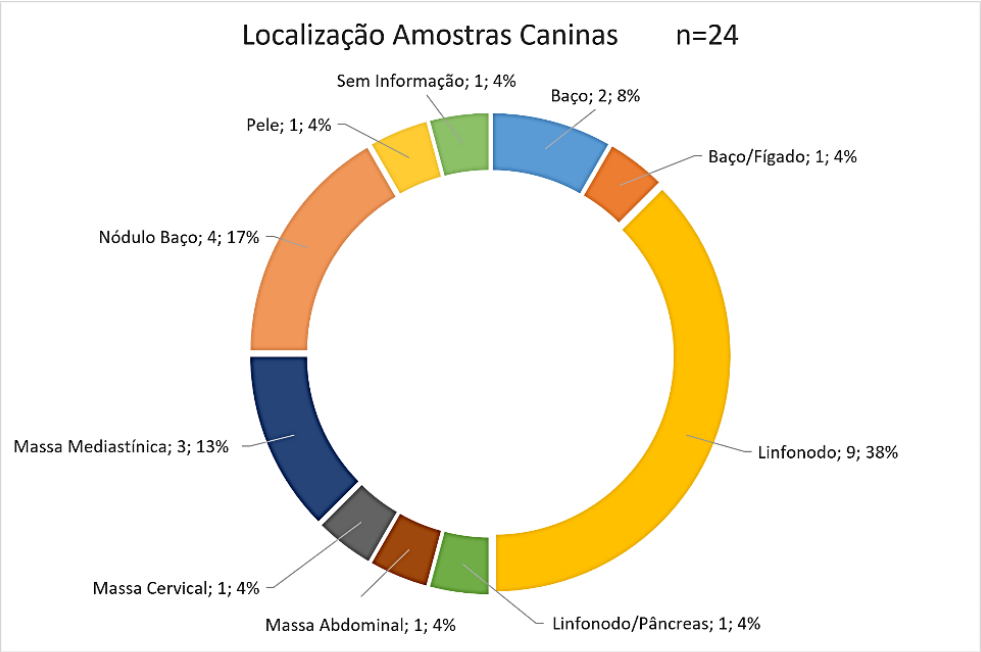
5.1.3. Tipos de amostras e localização.

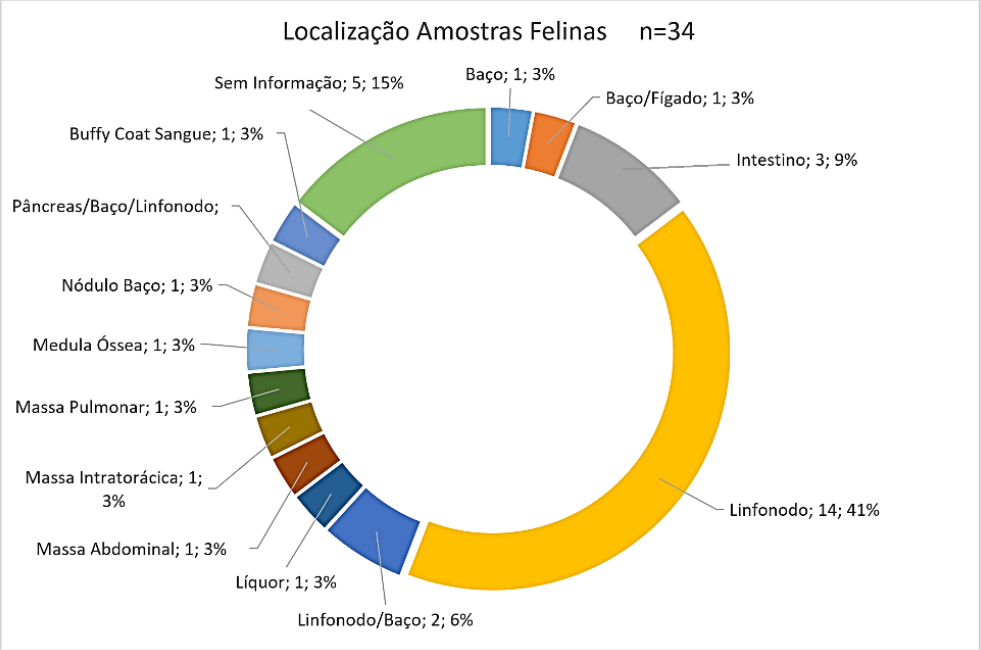
As amostras citológicas representaram a grande maioria das amostras enviadas, totalizando 84,5% (49/58). As amostras histopatológicas representaram apenas 5,2% (3/58). Durante o levantamento, 10,3% (6/58) dos casos apresentavam apenas o relatório da PARR, sem indicação do tipo de amostra utilizada para a realização da análise.

Das 58 amostras enviadas para a realização da PARR, foi possível obter um resultado conclusivo a nível analítico (resultado clonal ou não clonal) em 93,1% dos casos (54/58). Em 5,2% (3/58) dos casos, não foi possível obter resultados devido à baixa representatividade da amostra ou baixa qualidade do DNA extraído. Em uma das amostras, representando 1,7% do total, foi obtido um resultado inconclusivo.

As amostras foram divididas de acordo com as espécies e estão demonstradas nos gráficos nº 4. Algumas das localizações foram representadas de forma combinada (ex. pâncreas/baço/linfonodo) devido ao facto de não estar explícito no sistema laboratorial qual localização do pedido foi enviada para PARR.

A localização mais prevalente em ambas as espécies foram os linfonodos, representando 38% (9/24) nos cães e 41% (14/34) nos gatos. Nos caninos, outras localizações mais prevalentes incluíram nódulo no baço (17%; 4/24), massa mediastínica (13%; 3/24) e baço (8%; 2/24). Já nos gatos, para além dos linfonodos, a maioria das localizações apresentavam apenas uma única amostra, com exceção do intestino (9%; 3/34) e linfonodo/baço (6%; 2/34).





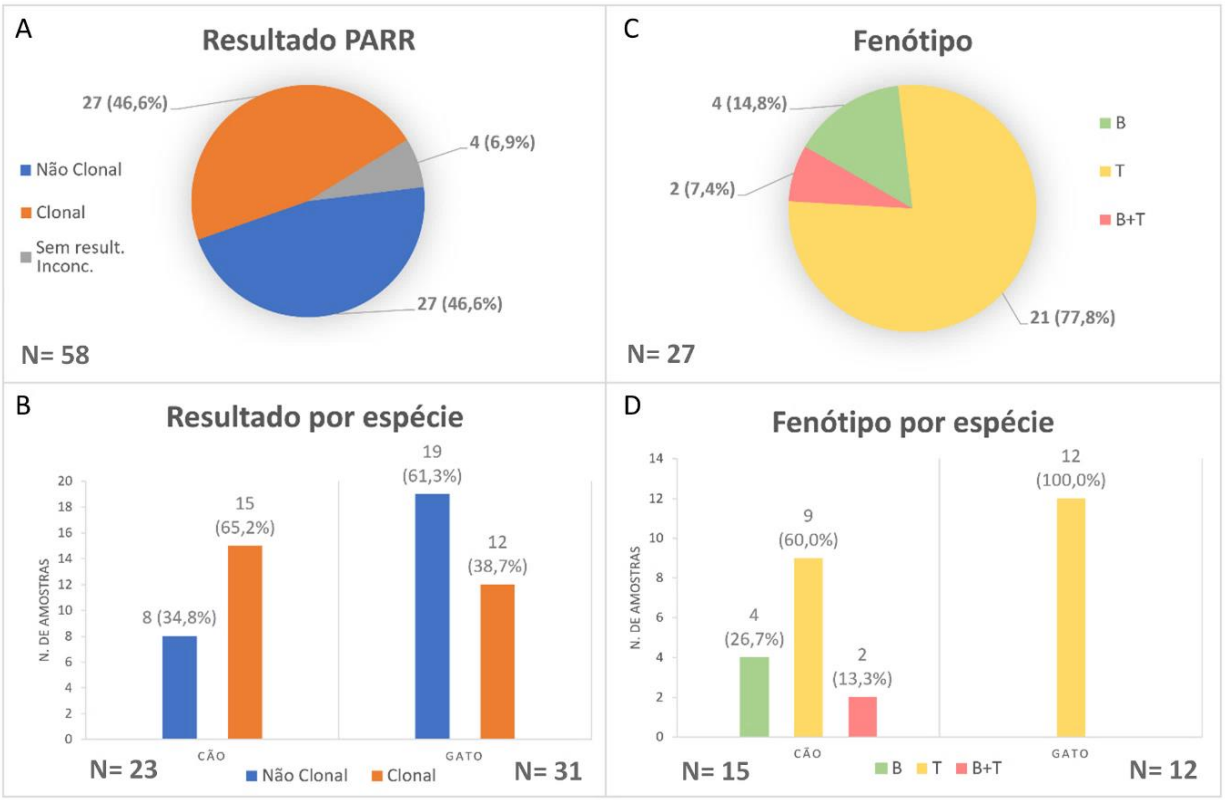
Gráficos nº 4 - *Representações gráficas das amostras de citologia e histopatologia utilizadas para a realização da PARR, subdivididas por espécie.*

5.1.4. Resultados da PARR

Dos 58 resultados totais da PARR, quando analisados de forma global, em 46,6% dos casos (27/58) foi obtido um resultado não clonal e 46,6% dos casos (27/58) foi obtido um resultado clonal, como demonstrado no gráfico nº 5-A. Nos restantes 6,9% (4/58), não foi possível obter um resultado devido à qualidade da amostra ou por um padrão eletroforético inconclusivo. Quando subdivididos por espécie e excluindo os casos sem resultado e

inconclusivos, nos cães os resultados não clonais corresponderam a 34,8% (8/23) e os resultados clonais representaram 65,2% (15/23). Já nos gatos, 61,3% (19/31) tiveram resultados não clonais e 38,7% (12/31) foram clonais (gráfico nº 5-B).

No geral, nos 27 casos da PARR onde o resultado foi clonal os fenótipos obtidos foram T (77,8%; 21/27), B (14,8%; 4/27) e B+T (7,4%; 2/27), como demonstrado pelo gráfico nº 5-C. Quando subdivididos por espécie, os fenótipos nos cães foram T (60%; 9/15), B (26,7%; 4/15) e B+T (13,3; 2/15). Já nos gatos, todos os resultados clonais apresentaram fenótipo T (100%; 12/12) (gráfico nº 5-D).

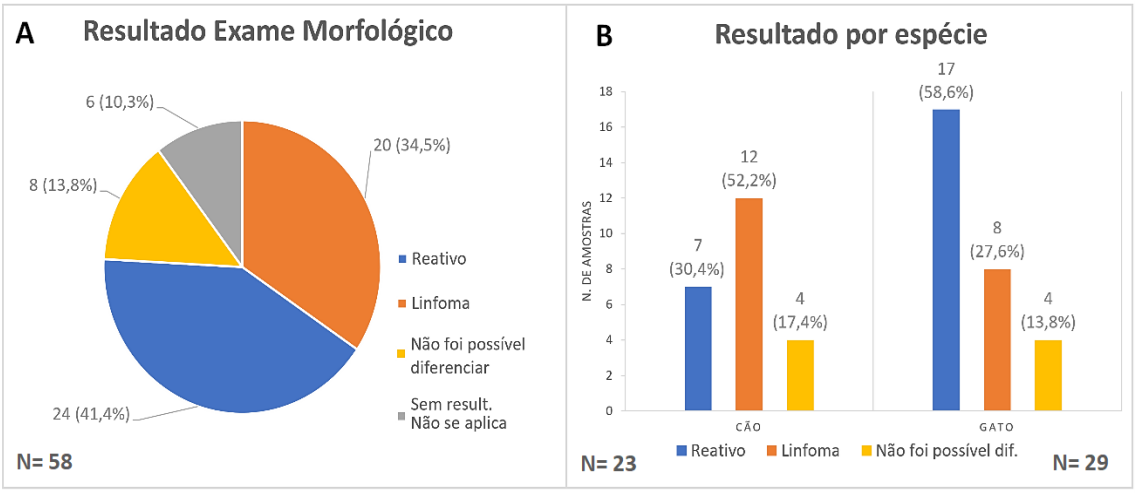


Gráficos nº 5 - A) *Representação gráfica dos resultados gerais da PARR. Em azul encontra-se os resultados não clonais, em laranja os resultados clonais e em cinza as amostras sem resultado ou com resultado inconclusivo. O n é igual a 58, representando todos os casos de PARR do levantamento realizado.* ***B)*** *Representação gráfica dos resultados da PARR subdivididos por espécie. As cores seguem a mesma sequência do gráfico A para melhor visualização. As amostras sem resultados ou com resultados inconclusivos foram excluídas dessa representação.* ***C)*** *Representação gráfica dos fenótipos obtidos pela PARR nos casos em que o resultado foi clonal (n=27). Em verde estão representados os casos com fenótipo B, em amarelo os T e em vermelho os casos B+T.* ***D)*** *Representação gráfica dos fenótipos obtidos pela PARR nos casos em que o resultado foi clonal subdivididos por espécie. As cores seguem a mesma sequência do gráfico C para melhor visualização.*

5.1.5. Resultados dos exames morfológicos

Dos 58 casos selecionados para o estudo, 89,7% (52/58) apresentavam exames morfológicos (citologia ou histologia) realizados no Cedivet e apenas 10,3% (6/58) representavam exames morfológicos realizados fora do Cedivet ou não apresentava informações no sistema.

Ao analisar globalmente, os exames morfológicos apresentaram resultado indicativo de um processo "Reativo" em 41,4% dos casos (24/58), "Linfoma" em 34,5% (20/58) e "Não foi possível diferenciar" em 13,8% (8/58), como representado pelo gráfico nº 6-A. Quando subdivididos por espécie e excluindo os casos ausentes ou sem informação (gráfico nº 6-B), nos cães 52,2% (12/52) representaram casos indicativos de "Linfoma", 30,4 % (7/52) foram indicativos de um processo "Reativo" e 17,4% (4/52) representaram quadros onde "Não foi possível diferenciar". Já nos gatos, 58,6% (17/52) eram indicativos de um processo "Reativo", 27,6% (8/52) de "Linfoma" e 13,8 (4/52) representavam casos onde "Não foi possível diferenciar".



Gráficos nº 6 - A) *Representação gráfica dos resultados gerais dos exames morfológicos (citologia e histologia). Em azul encontram-se os resultados indicativos de um processo reativo, em laranja os resultados indicativos de linfoma, em amarelo as amostras com resultados que não foram possíveis de diferenciar entre um dos dois diferenciais e em cinza as amostras sem resultado ou sem informação no sistema. O n é igual a 58, representando todos os casos selecionados para o estudo.* ***B)*** *Representação gráfica dos resultados dos exames morfológicos subdivididos por espécie. As cores seguem a mesma sequência do gráfico A para melhor visualização. As amostras sem resultado ou sem informação no sistema foram excluídas dessa representação (n=23 para os cães e n=29 para os gatos).*

Os dados referentes aos termos modificadores e tamanho dos linfócitos estão detalhados nas tabelas nº 1. A categoria “Suspeito para Linfoma” foi a que apresentou o maior número de casos, representando 29,3% do total (17/58), e a categoria “Compatível com Linfoma” foi a que apresentou o menor número de casos, representando (1,7%) (1/58). Em relação ao tamanho dos linfócitos, 41,4% (24/58) das amostras apresentavam predomínio de linfócitos pequenos, 17,2 (linfócitos médios) e apenas 1,7% apresentavam predomínio de linfócitos grandes (1/58).

Tabelas nº 1 - *Compilado de dados referentes às informações relevantes recolhidas dos relatórios finais dos exames morfológicos.*

Frequência de distribuição dos resultados classificados

Classificação	N	% do Total
Suspeito para Linfoma	17	29.3 %
Sugestivo de Linfoma	2	3.4 %
Compatível com Linfoma	1	1.7 %
Suspeito para Reativo	6	10.3 %
Sugestivo de Reativo	5	8.6 %
Compatível com Reativo	13	22.4 %
Não foi possível diferenciar	8	13.8 %
Sem resultado/Não se aplica	6	10.3 %
Total	58	

Frequência de distribuição dos tamanhos dos linfócitos

Tamanho dos linfócitos	N	% do Total
Pequenos	24	41.4 %
Pequenos a médios	9	15.5 %
Médios	10	17.2 %
Médios a grandes	5	8.6 %
Grandes	1	1.7 %
Sem resultado/Não se aplica	9	15.5 %
Total	58	

5.2. Concordância PARR x Exame Morfológico

A análise de concordância entre os resultados da PARR e dos exames morfológicos (citologia e histologia) utilizando o coeficiente Kapa de Cohen (Cohens’ Kappa) obteve um resultado de *k*= 0,05. O resultado obtido para a concordância global foi de 0,525 ou 52,5%. Os dados utilizados para os cálculos destes valores estão evidenciados na tabela nº 2.

Tabela nº 2 *- Tabela de frequências para a avaliação dos testes de concordância. Nessa tabela estão assinalados os resultados da PARR e dos exames morfológicos obtidos no levantamento de dados.*

		PARR		
		Não Neoplásico	Neoplásico	Total
Citologia/Histologia	Não Neoplásico	11	10	21
	Neoplásico	9	10	19
	Total	20	20	40
Cohen's Kappa	0,05		% Concordância Global	52,5%

6. DISCUSSÃO

Com duas décadas do primeiro protocolo da PARR descrito em veterinária, o uso e acessibilidade dessa ferramenta vem crescendo na rotina clínica. No levantamento realizado, esse crescimento também pode ser observado na rotina do laboratório Cedivet. O primeiro pedido da PARR foi realizado no ano de 2016 e, desde então, observou-se um crescimento expressivo no número de pedidos, ganhando força a partir de 2020. No ano de 2020, foram requisitados 4 exames e, já no ano de 2022, foram requisitados 30 exames. O crescimento do número de pedidos da PARR reflete uma maior familiarização dos profissionais com a técnica, tanto patologistas quanto veterinários clínicos e oncologistas.

No Cedivet, a maioria das amostras enviadas para a realização da PARR corresponde a amostras citológicas, representando quase 85% do total. A PARR pode ser realizada em diversos tipos de amostra, incluindo tecidos frescos, amostras citológicas e histológicas (Keller *et al.*, 2016; Langerak *et al*., 2012; Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022). O facto de que apenas cerca de 5% das amostras correspondiam a amostras histológicas representa um cenário ainda pouco explorado pelo Cedivet. A baixa utilização desse tipo de amostra poderia corresponder a facilidade de utilizar outros métodos quando já se tem a preparação histológica pronta (ex. imunohistoquímica), preferências individuais dos patologistas e ponderações em relação à qualidade do material obtido através de amostras histológicas.

É indiscutível que o DNA extraído a partir de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE) apresenta menor qualidade e integridade, podendo comprometer a análise e gerar alguns artefactos (Lenze *et al*., 2012). No entanto, a PARR é amplamente aceita para a realização em amostras histológicas, especialmente ao utilizar protocolos adequados de extração e com *primers* desenhados para obter produtos de até cerca de 200pb (Radtanakatikanon *et al*., 2021; Takanosu *et al*., 2019). Na realidade, a maioria dos estudos relacionados à PARR utilizam amostras histológicas. Desta forma, a utilização de amostras histológicas de forma mais rotineira para a realização da PARR no Cedivet pode representar um ponto a ser explorado, com potenciais benefícios a nível diagnóstico e comercial.

Em 10% dos casos não foi possível obter informação quanto ao tipo de amostra, mas muito provavelmente correspondem a amostras citológicas devido a tendência de utilização no laboratório. No entanto, esse dado não pode ser confirmado através do sistema laboratorial. Esses casos representam amostras externas que o material foi encaminhado ao Cedivet apenas para a realização da PARR (sem a realização do diagnóstico morfológico no Cedivet) ou amostras sem um adequado registo no sistema (desvinculadas das fichas originais com o diagnóstico morfológico). O último panorama representa uma questão laboratorial importante e com medidas resolutivas acessíveis. Embora um registo inadequado

nesse aspeto não tenha um impacto direto para o cliente, pode dificultar a obtenção de dados em levantamentos retrospetivos como este.

De todas as amostras enviadas, em 93,1% dos casos foi possível obter um resultado analítico conclusivo (clonal ou policlonal), o que demonstra a adequação da análise PARR na rotina clínica e a efetividade do teste com as amostras normalmente utilizadas. Em uma amostra, que correspondeu a 1,7% do total, foi obtido um resultado inconclusivo devido ao padrão eletroforético observado, sendo de difícil caracterização entre um processo clonal ou policlonal. Esse cenário é completamente aceitável e considerado inerente à técnica, tendo em vista todas as nuances e armadilhas interpretativas existentes. Assumir a impossibilidade de se chegar ao diagnóstico final representa um cenário mais favorável do que sobreinterpretar um padrão difícil, o que pode levar a tomada de decisões clínicas equivocadas. Repetir o teste em uma nova amostra ou utilizar outros exames diagnósticos poderiam auxiliar a interpretar o padrão observado, mas não há registos de novas amostras desse paciente no sistema laboratorial.

Em 5,2% das amostras não foi possível obter resultados devido à baixa quantidade de células ou baixa integridade do DNA. Nos relatórios obtidos pelo laboratório externo, por vezes, não era claro qual das duas situações culminaram na não realização do ensaio. Saber com assertividade qual a fonte do problema melhoraria na elaboração de medidas corretivas, por exemplo, uma melhor seleção do material enviado ou solicitação de extrações seletivas evitando áreas sem material de interesse (Keller *et al.*, 2016).

Em relação aos pacientes, o levantamento demonstrou uma maior quantidade de amostras provenientes de felinos em relação aos caninos (58,6% e 41,4%, respetivamente) e uma maior prevalência de machos em relação às fêmeas (58,6% e 41,4%, respetivamente). Os cães demonstraram uma variedade de raças bem maior que os felinos, com maior representatividade de animais SRD (sem raça definida), seguidos de Labrador Retriever e Golden Retriever. Nos felinos, embora no sistema laboratorial foram observadas descrições de Europeu Comum, Domestic Shorthair e SRD (sem raça definida), na realidade, estas três definições têm o mesmo significado, sendo atribuídas a animais mestiços não pertencentes a nenhuma raça reconhecível em particular.

No estudo, foram observadas algumas raças de cães predispostas aos linfomas de zona T, como o Golden Retriever e o Shih-tzu (Seelig *et al.*, 2014; Vail *et al*., 2019). O linfoma de zona T é um linfoma indolente, de células pequenas a médias, e que eventualmente poderia estar de acordo com a maioria das amostras observadas no estudo. No entanto, ao avaliar os relatórios desses pacientes individualmente, apesar de todos apresentarem rearranjos clonais na PARR, as descrições dos exames morfológicos não correspondiam ao

aspeto citológico característico dos linfomas de zona T, que apresentam características distintivas que facilitam o seu diagnóstico, principalmente pela presença de linfócitos com projeções citoplasmáticas unipolares (morfologia de “espelho de mão”) (Valli *et al.*, 2016). Desse modo, apesar dessa aparente predisposição racial específica, não parece ter sido o caso das amostras desses animais.

A maioria das amostras eram pertencentes a animais de meia-idade e animais idosos. No entanto, a distribuição nos gatos foi bem mais abrangente, com a presença de algumas amostras de animais jovens, o que não foi observado nos cães. O linfoma é uma neoplasia que pode ser observada em animais de todas as idades, mas no cão é uma doença predominantemente de animais de meia-idade e mais velhos (Vail *et al*., 2019). Já nos gatos, pode-se considerar dois picos de prevalência (bimodal), um em animais mais jovens positivos para o vírus da leucemia felina (FeLV) e outro em animais mais velhos negativos para o vírus (Couto, 2019). Embora não tenha informações no sistema laboratorial a respeito do *status* de positividade para FeLV desses animais, o facto do linfoma ser um diagnóstico possível e recorrente em gatos jovens, pode justificar a observação de um maior número de amostras nessa faixa etária para a espécie. Em algumas regiões do mundo observa-se uma drástica diminuição da positividade para esse vírus e uma mudança na apresentação das doenças associadas (chamada era pós-FeLV) (Louwerens, London, Pedersen & Lyons, 2005), no entanto, em Portugal há poucos estudos que avaliam a prevalência do vírus em grandes populações (Azevedo, 2017; Turras, 2014) e o FeLV ainda é frequentemente observado na rotina clínica, bem como suas consequências e complicações.

Outra possibilidade para a presença de casos de felinos jovens a necessitarem do ensaio de clonalidade para diferenciação entre quadros reativos e neoplásicos são as entidades benignas reportadas como “hiperplasia distintiva dos linfonodos periféricos de gatos jovens” e “linfadenopatia generalizada semelhante a linfoma” (Moore, Emerson, Cotter, & DeLellis, 1986; Mooney, Patnaik, Hayes & MacEwen, 1987). Esses casos são normalmente autolimitantes, por vezes associados ao FeLV, apresentando linfonodos periféricos com aumento acentuado e com predomínio de linfócitos médios e grandes, que pode ser confundido com linfoma. Apesar desse cenário ser uma possibilidade, parece pouco provável pois a maioria das amostras dos animais jovens apresentavam predomínio de linfócitos pequenos, não sendo compatíveis morfologicamente com esse quadro.

Em relação às localizações das amostras enviadas para a PARR, foi observado uma grande variedade de origens anatómicas. A localização mais prevalente em cães e gatos foram os linfonodos, representando 38% e 41%, respetivamente. Como a PARR é um exame de clonalidade linfoide, era de se esperar que os linfonodos correspondessem a um sítio

anatómico com elevada representatividade, em parte também refletindo a facilidade de colheita destas estruturas, principalmente se tratando dos linfonodos periféricos. Esses dados também vão de encontro com o levantamento realizado pelo autor sobre amostras gerais enviadas para citologia no Cedivet no período de estágio (primeira secção do trabalho, gráfico nº 1), onde os linfonodos representaram o segundo tipo mais prevalente de amostras, com 12,4% do total, ficando atrás somente das amostras de pele (cutânea e subcutânea) com 48,6%.

Um aspeto importante a discutir é o facto de que diversas amostras apresentavam uma ausência de informações quanto à idade, raça e até mesmo localização das amostras. Quanto à idade, em cães e gatos as amostras sem informações corresponderam a cerca de 8% do total. Quanto à raça, não apresentavam informações 25% das amostras caninas e 21% das amostras felinas. Já em relação à localização das amostras, 4% das amostras caninas e 15% das amostras felinas não apresentavam informações.

Levando em consideração que os ensaios de clonalidade não podem ser considerados exames isolados e devem ser sempre interpretados à luz de toda a história e cenário clínico, a falta de informações pode acabar por tornar a interpretação mais complexa e suscetível a erros (Keller *et al.*, 2016). Além disso, o diagnóstico morfológico, seja na histologia ou citologia, é uma avaliação subjetiva que alcança o seu potencial máximo apenas quando o patologista está plenamente ciente das informações clínicas essenciais (Nakhleh, Gephardt & Zarbo, 1999).

A falta de preenchimento das requisições de solicitação de exames laboratoriais é um problema observado em várias situações além da PARR e é provável que também ocorra em outros laboratórios além do Cedivet. A solução para esse problema reside na conscientização dos veterinários clínicos e oncologistas da importância do correto preenchimento de requisições e do fornecimento da maior quantidade de informações possíveis, garantindo assim uma adequada interpretação laboratorial.

Um exemplo dos impactos negativos da ausência de informações clínicas é o estudo de Nakhleh *et al*. (1999), um levantamento realizado em medicina humana com a participação de 341 instituições e análise de 771.475 casos. O objetivo do estudo foi avaliar e quantificar a ausência de informações clínicas em casos de patologia cirúrgica e seus impactos. Dos casos avaliados, 5594 (0,73%) necessitaram de informações clínicas adicionais antes que o caso pudesse ser concluído. Em 32% desses casos foi constatado que houve um atraso no relatório devido à necessidade de obter informações clínicas adicionais para chegar ao diagnóstico final. Além disso, de forma mais impactante, em 6,1% dos casos em que as

informações adicionais foram obtidas posteriormente foi observado uma alteração significativa no diagnóstico ou foi realizado a emissão de um novo relatório revisado.

Já em relação aos resultados, ao avaliar os dados relativos à PARR, foram observados resultados clonais e não clonais em proporções iguais (46,6% em ambos). No entanto, ao analisar esses resultados com base nas diferentes espécies, pode-se observar um maior número de resultados clonais nos cães, representando 65,2% dos casos, enquanto resultados não clonais compreendem a 34,8%. Já nos gatos, o panorama foi o oposto, com 61,3% das amostras apresentando padrões não clonais e 38,7% sendo resultados clonais.

Tendo em conta os resultados com padrão clonal, foram observados resultados que sugeriam uma população T, B e B+T, nas seguintes proporções 77,8%, 14,8% e 7,4%, respetivamente. Quando analisados por espécie, nos cães observou-se todas as possibilidades relatadas acima, com maior prevalência do fenótipo T (60%). Já nos gatos, foram observados apenas resultados clonais com fenótipo T (100%).

Em relação a estes achados e o fenótipo obtido pela PARR é interessante discutir três tópicos principais: 1) A PARR não deve ser utilizada como método único para determinação do fenótipo, principalmente devido aos casos de rearranjo cruzado entre linhagens, onde células de uma linhagem rearranjam *loci* de outra linhagem (*loci* de células T por células B ou *loci* de células B por células T) (Keller *et al.*, 2016; Seelig & Avery, 2020). Nenhuma das amostras neste estudo apresentavam exames adicionais com o objetivo de confirmar resultados da PARR e o imunofenótipo (ex. imunocitoquímica e imunohistoquímica). Excluindo a possibilidade dos exames confirmatórios terem sido realizados em outro laboratório, a PARR parece estar a ser utilizada como um exame final e, portanto, possivelmente os clínicos e oncologistas estão a assumir o fenótipo obtido pelo ensaio de clonalidade como real, o que pode levar a conclusões fenotípicas equivocadas. Na literatura, é aceite que outras técnicas como a imunohistoquímica e a citometria de fluxo são mais fiáveis na obtenção do fenótipo (Avery, 2012). Mesmo no estudo recente de Waugh *et al*. (2016), com conjuntos de *primers* aprimorados e apresentando 97% de concordância com imunofenótipo obtido por outras técnicas, os autores recomendam utilizar a PARR para se obter o fenótipo apenas quando outros exames não estiverem disponíveis. 2) A presença de padrões clonais que sugerem fenótipo B+T. Resultados dessa natureza são ocasionalmente observados na rotina e na literatura, representando provavelmente eventos de rearranjo cruzado entre linhagens. No entanto, não é possível descartar por completo a presença de duas neoplasias concomitantes (Seelig & Avery, 2020). A confirmação do fenótipo por outros exames complementares é essencial nesses casos. Como discutido anteriormente, em nenhuma das amostras, foi realizado exames complementares para confirmação do fenótipo obtido. 3) O facto de que

100% dos padrões clonais observados em gatos foram indicativos de uma população T. Esse é um achado interessante e que pode talvez ser explicado pelas limitações quanto à sensibilidade da PARR. Historicamente, os ensaios de clonalidade para células B em gatos demonstram valores de sensibilidade bem mais baixos do que os observados em cães, por vezes apresentando valores próximos dos 30% (Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022). Os ensaios de clonalidade em veterinária normalmente utilizam apenas conjuntos de *primers* visando o *locus* IGH, mas essa abordagem tem uma importante limitação que é a presença de hipermutações somáticas (prejudica a ligação do *primer*) (Keller *et al.*, 2016). Em medicina humana, os ensaios de clonalidade utilizam vários conjuntos de *primers* visando diferentes *loci* para reduzir esse problema e aumentar a sensibilidade (Langerak *et al*., 2012; Van Krieken *et al*., 2007; Van Dongen *et al*., 2003). Um estudo recente e promissor, utilizou conjuntos de *primers* aprimorados para a deteção de neoplasias de células B em gatos que visavam os rearranjos completos IGHVDJ, incompletos IGHDJ, elemento de deleção kapa (IGKde) e cadeia leve de imunoglobulina lambda (IGL), alcançando sensibilidade de 87% ao utilizar todos os conjuntos concomitantemente (Rout *et al.*, 2019). No entanto, para efeitos de discussão neste trabalho, como as informações relativas à sensibilidade do ensaio e conjunto de *primers* utilizados foi considerada desconhecida, não é possível tirar conclusões mais assertivas sobre o tópico.

Já em relação aos exames morfológicos, os resultados consideravam como diagnóstico diferencial mais provável um processo reativo em 41,4% dos casos, linfoma em 34,5% dos casos e em 13,8% dos casos não foi possível diferenciar entre os dois processos. Quando avaliados por espécie, nos cães foi observado um maior número de amostras que indicavam linfoma, representando 52,2% dos casos, e nos gatos, 58,6% dos casos apoiavam um quadro reativo. Curiosamente, esta tendência se assemelha com os resultados por espécie obtido na PARR, onde um maior número de amostras clonais foram observadas em cães e um maior número de amostras policlonais foram observadas em gatos, apesar da concordância entre os tipos de análises (PARR x Exame Morfológico) ser considerada baixa (resultados serão discutidos na próxima secção).

É importante ter em consideração que as características das amostras e o cenário em que elas são utilizadas para a realização do ensaio de clonalidade são essenciais para um resultado com utilidade clínica. A PARR tem a sua utilização considerada como ideal quando utilizada em cenários onde o diagnóstico morfológico, seja citológico ou histológico, é duvidoso e não permite um diagnóstico definitivo do processo patológico (Burnett *et al*., 2003; Avery, 2012; Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022; Rout & Avery, 2022; Ehrhart *et al*., 2019; Gentilini *et al*., 2012). Deste modo, essa técnica pode ser até contraindicada em casos

confirmados de linfoma ou leucemia, onde outras técnicas de diagnósticos podem oferecer mais informações úteis (Avery, 2012).

Tendo em conta esta perspetiva, através deste levantamento, foi possível observar que a grande maioria dos ensaios de clonalidade foram realizados em situações que a PARR apresenta a sua maior utilidade e potencialmente apresentaria o maior impacto clínico na diferenciação de processos neoplásicos e reativos. Dois dados em particular apoiam esta conclusão: o tamanho dos linfócitos prevalentes nas amostras e os termos modificadores utilizados.

O diagnóstico de linfoma por muitas vezes é considerado simples, principalmente quando o padrão observado é homogêneo e com predomínio de células grandes. Células com essas características morfológicas normalmente não estão presentes como a população principal em casos benignos (Valli *et al.*, 2016; Martini *et al*., 2022). Em contrapartida, quando o padrão é heterogêneo ou composto maioritariamente por células pequenas e médias, as características morfológicas se sobrepõem em quadros neoplásicos e não neoplásicos (ex. hiperplasia linfoide), tornando o diagnóstico desafiador (Burkhard & Bienzle, 2015; Thrall *et al*., 2022). Ao avaliar tamanho dos linfócitos predominantes nas amostras é possível visualizar que 41,4% correspondiam a amostras com um predomínio de células pequenas. Ao somar as categorias de linfócitos pequenos, pequenos a médios e médios, essas amostras equivalem a cerca de 74% do total. Esses dados apoiam que grande parte das amostras representavam padrões desafiadores e que beneficiariam dos ensaios de clonalidade para chegar a um diagnóstico mais assertivo.

No processo diagnóstico e na realização do relatório final, a expressão da incerteza por parte dos profissionais de saúde geralmente assume a forma de termos descritivos ou termos modificadores que expressam a probabilidade ou o grau de confiança no diagnóstico. Ao expressar a probabilidade de um determinado diagnóstico morfológico, um patologista pode comunicar as limitações de uma amostra e o grau de certeza em uma situação específica, ajudando assim o clínico ou oncologista a definir o valor das informações obtidas e a forma apropriada de usá-las na tomada de decisões médicas (Christopher & Hotz, 2004). Deste modo, é recomendado que relatórios incluam termos modificadores que explicitem a confiança no diagnóstico, principalmente nos casos em que o diagnóstico de linfoma é feito com baixa confiança, alertando a necessidade da realização de outros testes complementares para confirmação dos resultados (Martini *et al*., 2022).

Ao analisar os dados do levantamento sobre os termos modificadores, observa-se que a junção das categorias “Suspeito para Linfoma” e “Suspeito para Reativo” representam cerca de 40% do total de amostras e que 13,8% estavam na categoria “Não foi possível diferenciar”.

Além disso, mais da metade dos resultados abordavam o diferencial oposto ainda como uma possibilidade no relatório (62,1% dos casos) e frequentemente (67,2% dos casos) foram utilizadas expressões que evidenciavam a dificuldade do caso como “não permite excluir por completo”, “não se pode descartar por completo”, “não é possível excluir a possibilidade” e “dados citológicos são reduzidos”. Estes fatores também corroboram com a ideia de que grande parte dos casos utilizados no estudo não apresentavam diagnósticos completamente elucidativos em termos morfológicos e a PARR seria uma boa modalidade diagnóstica para refinar ou confirmar o padrão observado.

Por fim, após a descrição detalhada do panorama da análise no Cedivet, o segundo objetivo do trabalho foi avaliar a concordância entre os resultados da PARR e os resultados dos exames morfológicos (citologia e histologia). Para análise da concordância foram realizados o percentual de concordância global e o coeficiente Kapa de Cohen (*k*).

O percentual de concordância global e o valor de *k* são as métricas mais utilizadas em patologia para avaliar a concordância inter-avaliadores, que no caso, são as duas diferentes técnicas (PARR e exame morfológico) ao avaliarem a mesma amostra. A concordância percentual é a métrica mais simples concebida para essa finalidade, mas não considera a possibilidade de certas concordâncias poderem ser resultado do acaso (Marchevsky, Walts, Lissenberg-Witte & Thunnissen, 2020). O Kapa de Cohen é um teste estatístico considerado mais robusto que o simples cálculo do percentual de concordância justamente por levar em consideração a chance dos eventos ocorrerem por acaso. O valor de *k* pode variar entre -1 e +1, em que 0 representa a concordância que se esperaria do acaso e 1 representa a concordância perfeita entre os avaliadores. Embora sejam possíveis valores de *k* inferiores a 0, na prática, são pouco prováveis. Um *k* negativo representa uma concordância pior do que o esperado pelo acaso ou discordância (McHugh, 2012; Ranganathan, Pramesh & Aggarwal, 2017).

Cohen sugeriu que o resultado de *k* fosse interpretado da seguinte forma: valores ≤ 0 indicam que não há concordância; 0,01-0,20 indicam que não há concordância ou que a concordância é ligeira; 0,21-0,40 indicam uma concordância razoável; 0,41-0,60 indicam uma concordância moderada; 0,61-0,80 indicam uma concordância substancial; 0,81-1,00 indicam uma concordância quase perfeita (McHugh, 2012).

Embora alguns autores utilizem discretas variações dessa classificação (McHugh, 2012; Marchevsky *et al*., 2020), o resultado obtido para o *k* neste trabalho (0,05) é classificado como “não há concordância ou concordância ligeira”. Uma concordância global de 53% também é bem menor que o desejável.

Na literatura, alguns investigadores expressam explicitamente uma insatisfação com a utilização do Kapa de Cohen. A insatisfação é devido ao facto de que as premissas que o teste faz sobre a independência dos avaliadores e outros fatores não estão bem fundamentadas, pelo que pode reduzir excessivamente a estimativa da concordância. Dessa forma, em algumas situações um elevado nível de concordância pode ser paradoxalmente acompanhado por um valor *k* baixo (de Vet, Mokkink, Terwee, Hoekstra, & Knol, 2013; McHugh, 2012; Marchevsky *et al*., 2020). No entanto, esse panorama não se aplica ao resultado obtido no atual trabalho pois a concordância foi verdadeiramente baixa, como também demonstrada pelo percentual global.

Um aspeto importante a enfatizar é que nesta parte do trabalho foi avaliado apenas a concordância entre as técnicas, ou seja, os testes estatísticos não são capazes de dizer qual das técnicas estavam certas ou erradas em uma determinada amostra. Para determinar isso, seria necessário comparar as técnicas com um método padrão-ouro. Tendo em conta que a grande maioria das amostras representaram exames citológicos, o padrão-ouro poderia ser a histopatologia com marcação imunohistoquímica. A ausência de um teste considerado padrão-ouro representa uma grande limitação deste trabalho, já que nenhum dos pacientes realizou outras análises complementares para confirmar o resultado da PARR (como discutido nas secções anteriores). É também por esse motivo que foi decidido não realizar cálculos de sensibilidade e especificidade das técnicas.

Quando se analisa apenas a concordância, a variação ou erro entre os resultados podem acontecer em ambas as técnicas. Embora não tenha sido possível determinar qual o verdadeiro impacto de cada teste na concordância global, sabe-se que o exame morfológico tem limitações significativas quando o padrão observado é composto por linfócitos pequenos ou apresenta um padrão heterogéneo (Burkhard & Bienzle, 2015; Thrall *et al*., 2022). Esse cenário representou grande parte dos casos observados no estudo, como discutido anteriormente. Além disso, mesmo com as limitações da PARR, a técnica é considerada mais específica e mais sensível que o exame morfológico nesses casos e é principalmente utilizada como uma técnica de confirmação (Burnett *et al*., 2003; Avery, 2012; Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022; Rout & Avery, 2022). Dessa forma, é esperado que os baixos valores observados na concordância sejam em grande parte impactados pelo resultado dos exames morfológicos, especialmente a citologia. Devido à elevada especificidade da PARR, este facto se torna ainda mais evidente nos casos em que o ensaio apresentou um resultado clonal e o exame morfológico inclinou-se para um resultado não neoplásico, que representaram 25% dos casos (10/40).

É importante salientar que um nível baixo de concordância neste contexto não necessariamente implica em um problema grave dos resultados laboratoriais. De certa forma, é até esperado que que exista algum grau inconformidade, principalmente tratando-se de padrões tão desafiadores para um diagnóstico morfológico e a realização de análises "confirmatórias" mais específicas e sensíveis. É especialmente nestes cenários, que se destaca o papel da PARR no auxílio diagnóstico, suplantando as limitações dos exames morfológicos e auxiliando numa melhor caracterização do processo patológico.

Talvez um padrão morfológico composto de células pequenas ou heterogéneo seja tão desafiador e apresente pontos de diferenciação tão sutis entre neoplasia e reatividade, que os relatórios finais não sejam reprodutíveis ou sejam fortemente influenciados por outros fatores que não apenas os aspetos morfológicos (sinais clínicos, idade, *etc*.). Talvez o papel da citologia nesses casos seja reconhecer o padrão e direcionar para análises confirmatórias, sem enviesar o relatório para a um diferencial específico, evitando decisões clínicas erróneas baseadas em padrões pouco discerníveis.

Em alguns cenários na literatura, é aceito que a citologia tem pouca utilidade na diferenciação entre linfoma de pequenas células e populações linfoides reativas. Um clássico exemplo para esse panorama é a diferenciação entre enterite linfoplasmocitária e linfoma de baixo grau em punções de intestino em gatos (Marsilio *et al*., 2023; Sabattini *et al*., 2016, Maeda *et al*., 2017). O consenso do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) publicado em 2023 sobre o tema atesta que, devido às limitações do exame citológico em relação à arquitetura tecidual e o padrão que se sobrepõe nos dois processos patológicos, o exame citológico não oferece auxílio na diferenciação entre as duas entidades. Nessa situação, o exame citológico é mais útil para descartar outros diferenciais identificáveis como linfoma de alto grau e agentes infeciosos (Marsilio *et al*., 2023).

Interessantemente, alguns dados do levantamento realizado no Cedivet também apontam para cenários em que a PARR pode ter influenciado negativamente na concordância. Esse cenário é evidenciado especialmente quando se verificou a presença de três casos em que o tamanho dos linfócitos predominantes na amostra foi classificado com médios a grandes, com os patologistas inclinando o diagnóstico para um linfoma, mas que a PARR não detetou uma população clonal. Padrões compostos predominantemente de células médias a grandes são fortemente sugestivos de um processo neoplásico, já que essas células representam apenas uma minoria da população em processos não neoplásicos (Martini *et al*., 2022). Esses resultados podem estar relacionados a questões técnicas e analíticas da PARR, como a falta de cobertura dos *primers*, e questões imunobiológicas, como a hipermutação somática (Keller *et al*., 2016). Além disso, dois desses casos eram de felinos e sabe-se que

os *primers* rotineiramente utilizados em veterinária apresentam uma menor sensibilidade para essa espécie, especialmente em neoplasias de células B (Rout *et al.*, 2019; Goto-Koshino & Tsujimoto, 2022).

Foi solicitado via e-mail ao laboratório responsável pela realização dos ensaios de clonalidade informações relativas aos tipos de *primers* utilizados, protocolo de análise e sensibilidade e especificidade. Esses dados não foram fornecidos pelo laboratório, com recomendação de procurar tais informações na literatura. No entanto, a literatura sobre os ensaios de clonalidade é bastante diversa e pouco padronizada. Desta forma, os dados gerais da análise PARR foram considerados desconhecidos para as amostras do presente trabalho, não assumindo nenhum tipo de sensibilidade e especificidade ou tipos de *primers* da literatura para evitar a utilização de dados incorretos que culminariam em conclusões equivocadas. Saber estes parâmetros específicos do ensaio utilizado auxiliaria a compreender melhor o impacto da PARR nas métricas de concordância observadas.

Outro possível cenário relacionado à PARR que poderia acarretar em discordâncias com o exame morfológico é a possibilidade de resultados falso-positivos devido a uma expansão clonal benigna (Keller *et al.*, 2016). Essa possibilidade é normalmente atribuída à presença de agentes infeciosos, especialmente a *Ehrlichia* spp. e *Leishmania* spp. (Burkhard & Bienzle, 2015; Burnett *et al*., 2003; Qurollo *et al*., 2013; Melendez-Lazo *et al.*, 2019). Em nenhum dos casos foi visualizado a presença de agentes infeciosos, no entanto, sabe-se que a não visualização de agentes etiológicos através dos exames morfológicos não permite descartar por completo essa possibilidade. Dessa forma, em casos discordantes entre os ensaios de clonalidade e os aspetos clínicos, é importante descartar a presença de agentes infeciosos, por exemplo por meios de exames serológicos ou biologia molecular. Nenhum dos pacientes apresentavam exames complementares dessa natureza no sistema laboratorial, o que não permite averiguar esse cenário com mais profundidade.

É evidente que avaliar apenas a concordância entre as técnicas, especialmente em estudos retrospetivos, com informações limitadas e sem a comparação com metodologias consideradas padrão-ouro, apresenta significativas limitações quanto as conclusões a serem obtidas. No entanto, este trabalho não deixa de ser importante pois identificou divergências entre as metodologias diagnósticas e que precisam ser avaliadas. Estas divergências podem gerar conflitos e quebras de expectativas entre os patologistas e os solicitantes da análise (clínico/oncologista e tutor). Entender melhor este panorama e perceber que é um cenário passível de ocorrer na rotina diagnóstica, pode melhorar o diálogo entre as partes e auxiliar numa melhor tomada de decisões quando os resultados são divergentes.

Além disso, a realização de um estudo prospetivo e mais abrangente, que inclua a realização concomitante de várias técnicas diagnósticas na mesma amostra ou paciente (citologia/histologia, imunocito/histoquímica, citometria de fluxo e PARR), assim como a análise da informação clínica detalhada e do desfecho, seria muito interessante e importante para determinar o real papel de cada modalidade diagnóstica e o real grau de concordância entre as técnicas.

7. CONCLUSÃO

Linfoma é uma patologia importante em medicina veterinária e frequentemente observada na rotina clínica e oncológica. Por vezes o diagnóstico é simples e direto, mas em algumas situações representa um verdadeiro desafio para patologistas, clínicos e oncologistas. Com o avanço do conhecimento sobre a biologia do linfoma, dos seus subtipos e do comportamento clínico, é cada vez mais necessário a utilização de ferramentas auxiliares para um diagnóstico mais preciso e pormenorizado, incluindo a PARR.

Este trabalho apresentou uma revisão bibliográfica e uma análise aprofundada da utilização da PARR no Laboratório Cedivet. O material apresentado pode servir de apoio técnico para estudo dos ensaios de clonalidade, tanto para estudantes quanto para profissionais que já atuam na área.

É importante salientar que o presente estudo apresenta significativas limitações. A principal delas foi o não conhecimento dos protocolos e tipos de *primers* utilizados para realizar a PARR, impedindo uma melhor compreensão dos resultados e do impacto do ensaio na concordância com o exame morfológico. As outras limitações são principalmente relacionadas ao carácter retrospetivo, especialmente na recolha dos dados, onde ocasionalmente não foi possível obter informações completas para todos os casos.

A nível interno do laboratório Cedivet, estudos como este podem servir também como uma espécie de audição, onde são identificadas áreas em conformidade e áreas passíveis de aprimoramento. Após apresentação do trabalho internamente no laboratório, o corpo profissional do Cedivet demonstrou disposição e prontidão para otimizar algumas áreas analisadas no estudo, principalmente em relação aos dados clínicos limitados em alguns casos, oportunidade de utilização de mais amostras histopatológicas, interpretação tendo em conta as particularidades de cada modalidade diagnóstica e eventuais revisões de casos.

Como os ensaios de clonalidade tornam-se cada vez mais acessíveis e populares em medicina veterinária, consequentemente, é necessário um maior entendimento das particularidades intrínsecas da técnica, assim como suas nuances, armadilhas interpretativas e possíveis causas de resultados falso-positivos e falso-negativos. Apenas com a familiaridade dos profissionais com os ensaios de clonalidade é possível utilizar a técnica de forma adequada e nas situações em que seu potencial pode ser explorado ao máximo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affolter, V. K., Gross, T. L., & Moore, P. F. (2009). Indolent cutaneous T-cell lymphoma presenting as cutaneous lymphocytosis in dogs. *Veterinary dermatology*, *20*(5-6), 577-585.

Albanese, F., Abramo, F., Marino, M., Massaro, M., Marconato, L., Minoli, L., ... & Aresu, L. (2022). Canine and feline cutaneous lymphocytosis: reactive process or indolent neoplastic disease?. *Vet Sci*., 11;9(1):26.

Amores-Fuster, I., Cripps, P., Graham, P., Marrington, A. M., & Blackwood, L. (2015). The diagnostic utility of lymph node cytology samples in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, *56*(2), 125-129.

Andrews, C., Operacz, M., Maes, R., & Kiupel, M. (2016). Cross lineage rearrangement in feline Enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Veterinary Pathology*, *53*(3), 559-562.

Avery, A. (2009). Molecular diagnostics of hematologic malignancies. *Topics in companion animal medicine*, *24*(3), 144-150.

Avery, A. C. (2012). Molecular diagnostics of hematologic malignancies in small animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, *42*(1), 97-110.

Azevedo, P. S. M. (2017). Avaliação da ocorrência de coinfeção de FIV, FELV e Micoplasmas Hemotrópicos (Mycoplasma Haemofelis e M. Haemominutum) em gatos domésticos na zona norte de Portugal.

Beaubier, N. T., Hart, A. P., Bartolo, C., Willman, C. L., & Viswanatha, D. S. (2000). Comparison of capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for the evaluation of T and B cell clonality by polymerase chain reaction. *Diagnostic Molecular Pathology*, *9*(3), 121-131.

Blackwood, L. (2013). Cats with Cancer: Where to start. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *15*(5), 366-377.

Burkhard, M. J., & Bienzle, D. (2015). Making sense of lymphoma diagnostics in small animal patients. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(3), 591-607.

Burnett, R. C., Vernau, W., Modiano, J. F., Olver, C. S., Moore, P. F., & Avery, A. C. (2003). Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology*, *40*(1), 32-41.

Campbell, M. W., Hess, P. R., & Williams, L. E. (2013). Chronic lymphocytic leukaemia in the cat: 18 cases (2000–2010). *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 256-264.

Carrasco, V., Rodríguez-Bertos, A., Rodríguez-Franco, F., Wise, A. G., Maes, R., Mullaney, T., & Kiupel, M. (2015). Distinguishing intestinal lymphoma from inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples. *Veterinary pathology*, *52*(4), 668-675.

Chaubert, P., Chaubert, A. S. B., Sattler, U., Forster, U., Bornand, V., Suter, M., & Welle, M. (2010). Improved polymerase chain reaction–based method to detect early-stage epitheliotropic T-cell lymphoma (mycosis fungoides) in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens of the dog. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, *22*(1), 20-29.

Christopher, M. M., & Hotz, C. S. (2004). Cytologic diagnosis: expression of probability by clinical pathologists. *Veterinary clinical pathology*, *33*(2), 84-95.

Couto, C. G. (2019). Lymphoma. *In* Nelson, R. W., & Couto, C. G. (Eds.), Small Animal Internal Medicine, (6ªEd pp. 1294-1310). Elsevier Health Sciences.

Ehrhart, E. J., Wong, S., Richter, K., Zismann, V., Grimes, C., Hendricks, W., & Khanna, C. (2019). Polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangement: Benchmarking performance of a lymphoid clonality assay in diverse canine sample types. *Journal of veterinary internal medicine*, *33*(3), 1392-1402.

Fukushima, K., Ohno, K., Koshino-Goto, Y., Uchida, K., Nomura, K., Takahashi, M., ... & Tsujimoto, H. (2009). Sensitivity for the detection of a clonally rearranged antigen receptor gene in endoscopically obtained biopsy specimens from canine alimentary lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, *71*(12), 1673-1676.

Gambini, M., Martini, V., Bernardi, S., Caniatti, M., Gelain, M. E., Roccabianca, P., & Comazzi, S. (2021). Cytology of Feline Nodal Lymphoma: Low Interobserver Agreement and Variable Accuracy in Immunophenotype Prediction. *Journal of Comparative Pathology*, *184*, 1-6.

Gentilini, F., Calzolari, C., Turba, M. E., Bettini, G., & Famigli-Bergamini, P. (2009). GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Veterinary immunology and immunopathology*, *127*(1-2), 47-56.

Gentilini, F., Turba, M. E., & Calzolari, C. (2012). PCR and veterinary cancer diagnostics. In Wang, C., Kaltenboeck, B., & Freeman, M. D. (Eds.), *Veterinary PCR Diagnostics* (pp. 106-135). Bentham Science Publishers.

Gilbert, S., Affolter, V. K., Schmidt, P., Kosten, S., Kramme, P. M., Gross, T. L., ... & Moore, P. F. (2004). FC-14 Clonality studies of feline cutaneous lymphocytosis. *Veterinary Dermatology*, *15*, 24-24.

Goto-Koshino, Y., & Tsujimoto, H. (2022). Determination of Clonality. *In* Brooks, M. B., Harr, K. E., Seelig, D. M., Wardrop, K. J., & Weiss, D. J. (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (7ªEd, pp. 500-507). John Wiley & Sons, Inc.

Hayes, A. (2006). Feline lymphoma 1. Principles of diagnosis and management. *In Practice*, *28*(9), 516-524.

Hiyoshi, S., Ohno, K., Uchida, K., Goto-Koshino, Y., Nakashima, K., Fukushima, K., ... & Tsujimoto, H. (2015). Association between lymphocyte antigen receptor gene rearrangements and histopathological evaluation in canine chronic enteropathy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *165*(3-4), 138-144.

Kaneko, N., Yamamoto, Y., Wada, Y., Miyama, T. S., Hiraoka, H., Itamoto, K., ... & Okuda, M. (2009). Application of polymerase chain reaction to analysis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, *71*(5), 555-559

Keating, M. K., Rosenkrantz, W. S., Keller, S. M., & Moore, P. F. (2022). Evaluation of clonality from multiple anatomic sites in canine epitheliotropic T cell lymphoma. *Veterinary Dermatology*, *33*(6), 559-567.

Keller, R. L., Avery, A. C., Burnett, R. C., Walton, J. A., & Olver, C. S. (2004). Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Veterinary clinical pathology*, *33*(3), 145-149

Keller, S. M., & Moore, P. F. (2012a). A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations. *Veterinary immunology and immunopathology*, *145*(1-2), 410-419.

Keller, S. M., & Moore, P. F. (2012b). Rearrangement patterns of the canine TCRγ locus in a distinct group of T cell lymphomas. *Veterinary immunology and immunopathology*, *145*(1-2), 350-361.

Keller, S. M., Vernau, W., & Moore, P. F. (2016). Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. *Veterinary pathology*, *53*(4), 711-725.

Ku, C. K., Kass, P. H., & Christopher, M. M. (2017). Cytologic–histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. *Veterinary and comparative oncology*, *15*(4), 1206-1217.

Lana, S. E., Jackson, T. L., Burnett, R. C., Morley, P. S., & Avery, A. C. (2006). Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *Journal of veterinary internal medicine*, *20*(2), 329-334.

Langerak, A. W. (2016). Toward standardization of clonality testing in veterinary medicine. *Veterinary Pathology*, *53*(4), 705-706.

Langerak, A. W., Groenen, P. J., Brüggemann, M., Beldjord, K., Bellan, C., Bonello, L., ... & Van Dongen, J. J. M. (2012). EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*, *26*(10), 2159-2171.

Lenze, D., Müller, H. H., & Hummel, M. (2012). Considerations for the use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens for clonality analysis. *Journal of Hematopathology*, *5*, 27-34.

Louwerens, M., London, C. A., Pedersen, N. C., & Lyons, L. A. (2005). Feline lymphoma in the Post—Feline leukemia virus era. *Journal of veterinary internal medicine*, *19*(3), 329-335.

Luckschander-Zeller, N., Hammer, S. E., Ruetgen, B. C., Tichy, A., Thalhammer, J. G., Haas, E., ... & Burgener, I. A. (2019). Clonality testing as complementary tool in the assessment of different patient groups with canine chronic enteropathy. *Veterinary immunology and immunopathology*, *214*, 109893.

Maeda, S., Tsuboi, M., Sakai, K., Ohno, K., Fukushima, K., Kanemoto, H., ... & Matsuki, N. (2017). Endoscopic cytology for the diagnosis of chronic enteritis and intestinal lymphoma in dogs. *Veterinary pathology*, *54*(4), 595-604.

Marchevsky, A. M., Walts, A. E., Lissenberg-Witte, B. I., & Thunnissen, E. (2020). Pathologists should probably forget about kappa. Percent agreement, diagnostic specificity and related metrics provide more clinically applicable measures of interobserver variability. *Annals of Diagnostic Pathology*, *47*, 151561.

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.

Marsilio, S., Freiche, V., Johnson, E., Leo, C., Langerak, A. W., Peters, I., & Ackermann, M. R. (2023). ACVIM consensus statement guidelines on diagnosing and distinguishing low-grade neoplastic from inflammatory lymphocytic chronic enteropathies in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.

Martini, V., Marano, G., Aresu, L., Bonfanti, U., Boracchi, P., Caniatti, M., ... & 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.

Massari, S., Bellahcene, F., Vaccarelli, G., Carelli, G., Mineccia, M., Lefranc, M. P., ... & Ciccarese, S. (2009). The deduced structure of the T cell receptor gamma locus in Canis lupus familiaris. *Molecular immunology*, *46*(13), 2728-2736.

McDonough, S. P., & Moore, P. F. (2000). Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis. *Veterinary pathology*, *37*(6), 637-646.

McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia medica*, *22*(3), 276-282.

Melendez-Lazo, A., Jasensky, A. K., Jolly-Frahija, I. T., Kehl, A., Müller, E., & Mesa-Sánchez, I. (2019). Clonality testing in the lymph nodes from dogs with lymphadenomegaly due to Leishmania infantum infection. Plos one, 14(12).

Mooney, S. C., Patnaik, A. K., Hayes, A. A., & MacEwen, E. G. (1987). Generalized lymphadenopathy resembling lymphoma in cats: six cases (1972-1976). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *190*(7), 897-900.

Moore, F. M., Emerson, W. E., Cotter, S. M., & DeLellis, R. A. (1986). Distinctive peripheral lymph node hyperplasia of young cats. *Veterinary Pathology*, *23*(4), 386-391.

Moore, P. F., Rodriguez-Bertos, A., & Kass, P. H. (2012). Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Veterinary pathology*, *49*(4), 658-668

Moore, P. F., Woo, J. C., Vernau, W., Kosten, S., & Graham, P. S. (2005). Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Veterinary immunology and immunopathology*, *106*(3-4), 167-178.

Nakashima, K., Matsumoto, I., Goto-Koshino, Y., Hiyoshi-Kanemoto, S., Kojima, K., Chambers, J. K., ... & Uchida, K. (2023). Prognostic value of increased intraepithelial lymphocytes and lymphocytic clonality in dogs with chronic enteropathy or small-cell lymphoma. *The Veterinary Journal*, *296*, 105993.

Nakhleh, R. E., Gephardt, G., & Zarbo, R. J. (1999). Necessity of clinical information in surgical pathology: a College of American Pathologists Q-Probes study of 771 475 surgical pathology cases from 341 institutions. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, *123*(7), 615-619.

Ohmura, S., Leipig, M., Schöpper, I., Hergt, F., Weber, K., Rütgen, B. C., ... & Hirschberger, J. (2017). Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs. *Veterinary and comparative oncology*, *15*(1), 194-207.

Olivero, D., Turba, M. E., & Gentilini, F. (2011). Reduced diversity of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in chronic inflammatory gastrointestinal diseases in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *144*(3-4), 337-345.

Pariser, M. S., & Gram, D. W. (2014). Feline cutaneous lymphocytosis: case report and summary of the literature. *Journal of feline medicine and surgery*, *16*(9), 758-763.

Qurollo, B. A., Davenport, A. C., Sherbert, B. M., Grindem, C. B., Birkenheuer, A. J., & Breitschwerdt, E. B. (2013). Infection with Panola Mountain E hrlichia sp. in a Dog with Atypical Lymphocytes and Clonal T-Cell Expansion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *27*(5), 1251-1255.

Radtanakatikanon, A., Keller, S. M., Darzentas, N., Moore, P. F., Folch, G., Nguefack Ngoune, V., ... & Vernau, W. (2020). Topology and expressed repertoire of the Felis catus T cell receptor loci. *BMC genomics*, *21*, 1-13.

Radtanakatikanon, A., Moore, P. F., Keller, S. M., & Vernau, W. (2021). Novel clonality assays for T cell lymphoma in cats targeting the T cell receptor beta, T cell receptor delta, and T cell receptor gamma loci. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *35*(6), 2865-2875.

Ranganathan, P., Pramesh, C. S., & Aggarwal, R. (2017). Common pitfalls in statistical analysis: Measures of agreement. *Perspectives in clinical research*, *8*(4), 187.

Raskin, R. E (2022). Hemolymphatic system. *In* Raskin, R. E., Meyer, D.J., Boes, K.M. (Eds.), *Canine and Feline Cytopathology: A Color Atlas and Interpretation Guide*, (4ªEd). Elsevier.

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.

Rout, E. D. & Avery A. C. (2022). Molecular Diagnostics of Hematologic Malignancies. *In* Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W. (Eds.), *Veterinary hematology, clinical chemistry, and cytology*, (6ªEd., pp. 161-169). John Wiley & Sons.

Rout, E. D., Burnett, R. C., Yoshimoto, J. A., Avery, P. R., & Avery, A. C. (2019). Assessment of immunoglobulin heavy chain, immunoglobulin light chain, and T-cell receptor clonality testing in the diagnosis of feline lymphoid neoplasia. *Veterinary Clinical Pathology*, *48*, 45-58.

Rout, E. D., Labadie, J. D., Yoshimoto, J. A., Avery, P. R., Curran, K. M., & Avery, A. C. (2021). Clinical outcome and prognostic factors in dogs with B-cell chronic lymphocytic leukemia: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(4), 1918-1928.

Sabattini, S., Bottero, E., Turba, M. E., Vicchi, F., Bo, S., & Bettini, G. (2016). Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies. *Journal of Small Animal Practice*, *57*(8), 396-401

Sapierzynski, R., Kliczkowska-Klarowicz, K., Jankowska, U., & Jagielski, D. (2016). Cytodiagnostics of canine lymphomas-possibilities and limitations. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *19*(2).

Scase, T. J., & Dobson, J. M. (2011). How to make a diagnosis. *In* Dobson, J. M., & Lascelles, B. D. X. (Eds.) *BSAVA manual of canine and feline oncology* (Ed. 3, pp. 6-19). British Small Animal Veterinary Association.

Seelig, D. M., Avery, A. C., Ehrhart, E. J., & Linden, M. A. (2016). The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Veterinary sciences*, *3*(2), 11.

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.

Seelig, D., & Avery, A. C. (2020). Molecular Clonality Testing. *In* Sharkey, L. C., Radin, M. J., & Seelig, D. M. (Eds.), *Veterinary cytology (pp. 79-84).* John Wiley & Sons, Inc.

Stokol, T., Nickerson, G. A., Shuman, M., & Belcher, N. (2017). Dogs with acute myeloid leukemia have clonal rearrangements in T and B cell receptors. *Frontiers in Veterinary Science*, *4*, 76.

Takanosu, M., & Kagawa, Y. (2015). Comparison of primer sets for T-cell clonality testing in canine intestinal lymphoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *27*(5), 645-650.

Takanosu, M., Nakano, Y., & Kagawa, Y. (2019). Improved clonality analysis based on immunoglobulin kappa locus for canine cutaneous plasmacytoma. *Veterinary immunology and immunopathology*, *215*.

Takanosu, M., Okada, K., & Kagawa, Y. (2018). PCR-based clonality analysis of antigen receptor gene rearrangements in canine cutaneous plasmacytoma. *The Veterinary Journal*, *241*, 31-37.

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.

Thrall, A. M., Meuten, D., Bohn, A. A. & Meichner, K. (2022). *In* Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W. (Eds.), *Veterinary hematology, clinical chemistry, and cytology*, (6ªEd., pp. 752-773). John Wiley & Sons.

Turras, M. C. C. D. (2014). *Estudo da prevalência de FIV/FeLV numa população de 88 gatos errantes da região metropolitana de Lisboa*.

Twomey, L. N., & Compendium, A. A. (2005). Cytodiagnosis of feline lymphoma. *Compendium*, *27*(1), 17-30.

Vail, D. M., Pinkerton, M., & Young, K. M. (2019). Hematopoietic tumors. *In* Vail, D. M., Thamm, D. H., & Liptak, J. M. (Eds.), *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*, (6ªEd., pp. 688-772). Elsevier, Inc.

Valli, V. E., Bienzle, D., & Meuten, D. J. (2016). Tumors of the hemolymphatic system. *In* Meuten, D. J. (Ed.), *Tumors in domestic animals*, (6ªEd, pp. 203-321.). John Wiley & Sons, Inc.

Valli, V. E., Kass, P. H., Myint, M. S., & Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary pathology*, *50*(5), 738-748.

Valli, V. E., Vernau, W., De Lorimier, L. P., Graham, P. S., & Moore, P. F. (2006). Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology*, *43*(3), 241-256.

van den Ingh, T. S. M., Cullen, J. M., Twedt, D. C., Van Winkle, T., Desmet, V. J., & Rothuizen, J. (2006). Morphological classification of biliary disorders of the canine and feline liver. *WSAVA Standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver disease*, 61.

Van Dongen, J. J. M., Langerak, A. W., Brüggemann, M., Evans, P. A. S., Hummel, M., Lavender, F. L., ... & Macintyre, E. A. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, *17*(12), 2257-2317.

Van Krieken, J. H. J. M., Langerak, A. W., Macintyre, E. A., Kneba, M., Hodges, E., Sanz, R. G., ... & Van Dongen, J. J. M. (2007). Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*, *21*(2), 201-206.

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.

Vessieres, F., Rasotto, R., Peters, I., Villiers, E., Berlato, D., & Cian, F. (2018). Assessment of lymphoid molecular clonality in canine thymoma. *Journal of comparative pathology*, *158*, 66.

Villiers, E. (2020). Diagnosing lymphoma in dogs. *In Practice*, *42*(2), 69-81.

Waugh, E. M., Gallagher, A., Haining, H., Johnston, P. E., Marchesi, F., Jarrett, R. F., & Morris, J. S. (2016). Optimisation and validation of a PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) assay to detect clonality in canine lymphoid malignancies. *Veterinary immunology and immunopathology*, *182*, 115-124.

Weiss, A. T. A., Klopfleisch, R., & Gruber, A. D. (2011). T-cell receptor γ chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B-and T-cell lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*, *144*(2-3), 123-134.

Weiss, D. J. (2005). Differentiating benign and malignant causes of lymphocytosis in feline bone marrow. *Journal of veterinary internal medicine*, *19*(6), 855-859.

Yamazaki, J., Baba, K., Goto-Koshino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Fujino, Y., Ohno, K., & Tsujimoto, H. (2008). Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Veterinary immunology and immunopathology*, *126*(3-4), 321-331.

Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, *36*(2), 76-104.

ARMADILHAS INTERPRETATIVAS DA PARR	CAUSAS E EXPLICAÇÕES Adaptado de Keller *et al.*, 2016
Falha em detetar clonalidade na presença de neoplasia	**Cobertura inadequada de *primers*** - A amplificação bem-sucedida de um rearranjo clonal depende de um reconhecimento dos genes pelos *primers* do ensaio. Se um clone neoplásico apresenta um gene que não é detetado por nenhum dos primers na mistura, será obtido um resultado falso-negativo. Esse panorama pode ser suspeitado quando os resultados de clonalidade negativos entram em conflito com dados clínicos, morfológicos e imunofenotípicos ou quando já é conhecido que o ensaio utilizado tem uma cobertura incompleta de *primers*. **Mutação no local do *primer*** - As células B podem aumentar a afinidade dos anticorpos por meio de um processo chamado hipermutação somática, que acontece devido à mutação dos nucleotídeos dos genes recetores de antigénio destas células. Essas mutações podem prejudicar ou impedir a ligação do *primer*. Dessa forma, pode-se obter um resultado falso-negativo. Esse panorama pode ser suspeitado quando os resultados de clonalidade negativos entram em conflito com dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e se a população neoplásica em questão tiver origem em células B do centro germinativo ou pós-centro germinativo. **Fundo policlonal** - A maioria dos linfomas contêm alguma proporção de linfócitos não neoplásicos, seja porque o tumor tem origem em um órgão linfoide (ex. linfomas difusos em fase inicial ou linfomas nodulares) ou ocorre concomitantemente com uma população inflamatória. Se a proporção de linfócitos não neoplásicos for significativa, um sinal clonal pode ser mascarado pela amplificação gerada pela população policlonal e pode-se obter um resultado falso-negativo. Esse panorama pode ser suspeitado quando os resultados de clonalidade negativos entram em conflito com dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos ou se houver um número significativo de linfócitos não neoplásicos na amostra analisada. **Aberrações cromossómicas** - Estes eventos, como por exemplo as translocações, podem eliminar ou deslocar genes dos recetores de antigénio, impedindo sua amplificação. Embora aberrações cromossómicas tenham sido documentadas em neoplasias linfoides em animais, seu efeito nos testes de clonalidade ainda não foi investigado. Além disso, a possibilidade de um rearranjo amplificável em um segundo alelo pode reduzir a incidência dessa causa de resultados falso-negativos.
Deteção de clonalidade na ausência de neoplasia	**Expansões clonais em resposta à estimulação antigénica** - Após a estimulação antigénica, os linfócitos passam por uma expansão clonal como parte de uma resposta imune normal. Na maioria dos casos, isso afetará inúmeros clones de linfócitos com comprimentos variáveis de CDR3, resultando em um perfil de eletroforese policlonal. No entanto, em algumas situações, poucos clones podem proliferar de forma desproporcional e resultar em picos distintos sobre um fundo policlonal variável. Em medicina veterinária, algumas condições que têm sido associadas a clones benignos incluem erliquiose, leishmaniose, o histiocitoma cutâneo em regressão e hepatite associada à reação de hipersensibilidade a medicamento (caso único – Rimadyl). **Rearranjos canónicos** - Em humanos, certos clones de células T γδ utilizam combinações de V/J sem adições significativas de nucleotídeos, resultando em um CDR3 com diversidade mínima. Esses rearranjos são chamados de rearranjos canónicos e podem mimetizar uma população clonal em um contexto policlonal. Os rearranjos canónicos ainda não foram investigados sistematicamente em medicina veterinária. * Salienta-se que a identificação e reconhecimento de expansões clonais benignas não pode ser feita com base no perfil de eletroforese, mas requer a integração de todos os dados clínicos, morfológicos e imunofenotípicos. **Amplificação inespecífica** - Este termo é utilizado quando sequências de DNA diferentes das dos genes de receptores de antígenos são amplificadas. O tamanho do pico pode estar dentro ou fora da faixa de tamanho esperada. A amplificação inespecífica é mais provável de ocorrer em amostras com reduzida quantidade de DNA alvo, porque os alvos inespecíficos geralmente são superados por alvos específicos, quando presentes. Amplificações inespecíficas podem ser suspeitadas se clones de tamanho idêntico aparecerem em várias amostras diferentes, especialmente se estiverem fora da faixa de tamanho alvo esperada. Em medicina humana, existe uma lista de alvos inespecíficos conhecidos para os testes de clonalidade. No entanto, como existe uma falta de padronização em medicina veterinária, a identificação de amplificações inespecíficas depende da experiência do patologista a interpretar um ensaio específico. É importante salientar que nem sempre um pico clonal fora da faixa de tamanho esperada é uma amplificação inespecífica, podendo também representar uma amplificação específica contendo inserções ou deleções, devendo ser confirmada por sequenciamento para evitar diagnósticos falso-positivos.
Picos de significado incerto	Perfis de eletroforese podem ser misturas de padrões ou padrões que não se encaixam em nenhuma categoria estabelecida. Um desafio na interpretação desses resultados é um perfil de eletroforese com um ou mais picos em uma curva gaussiana de fundo (padrão policlonal com clones menores). Isso pode indicar um processo neoplásico com um componente reativo concomitante ou poderia representar uma resposta imune dominante após estimulação antigénica. Nesses casos, a interpretação dos padrões eletroforéticos requerem uma atenta integração dos dados clínicos, morfológicos e imunofenotípicos.
Perfis pseudoclonais/sem produto específico	Estes perfis de eletroforese podem indicar um processo neoplásico ou reativo, dependendo da situação. Podem ocorrer em decorrência da falta de cobertura dos primers, mutação nos locais de ligação ou escassez de DNA alvo (proporção de DNA disponível para amplificação). Para interpretar estes tipos de perfis eletroforéticos é essencial avaliar a abundância dos linfócitos e seu respetivo imunofenótipo, ou seja, a abundância de células B ao interpretar os perfis de IGH e a abundância de células T ao interpretar os perfis de TRG.

POSSÍVEL UTILIZAÇÃO DA PARR	DESCRIÇÃO	EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS
Diagnóstico de linfomas indolentes	Linfomas indolentes podem representar verdadeiros desafios diagnósticos, por vezes até mesmo em histologia, uma vez que podem preservar a arquitetura do linfonodo e, especialmente em fases iniciais, serem confundidos com processos hiperplásicos. Nos cães, estes tumores incluem o linfoma da zona marginal, o linfoma das células do manto e o linfoma folicular (origem nas células B) e os linfomas da zona T (origem nas células T). Devido à uma significativa zona cinzenta entre hiperplasia e neoplasia, é muito provável que estes linfomas estejam a ser subdiagnosticados. Tendo em vista esta perspectiva, os ensaios de clonalidade podem ser uma boa ferramenta complementar para auxílio do diagnóstico e melhor reconhecimento destas neoplasias.	Valli *et al* ., 2006
Linfocitose cutânea em cães e gatos	A linfocitose cutânea canina e felina é uma doença linfoproliferativa pouco frequente, que partilha semelhanças clínicas e histológicas com a mesma doença humana, cuja etiologia e patogénese não são completamente compreendidas. A PARR foi utilizada para demonstrar que a entidade conhecida como linfocitose cutânea em cães e gatos pode corresponder a um linfoma cutâneo indolente.	Affolter, Gross & Moore, 2009; Gilbert *et al* ., 2004; Albanese *et al* ., 2022; Pariser & Gram, 2014
Linfoma epiteliotrópico de células T (Micose Fungoide)	Essa é uma neoplasia relativamente rara em cães e, principalmente em estágios iniciais, é um diagnóstico diferencial importante para dermatopatologistas veterinários, já que os padrões clínicos e histológicos podem ser confundidos com uma ampla gama de doenças inflamatórias da pele. Além disso, as células neoplásicas normalmente apresentam-se misturadas com células dendríticas (células de Langerhans) e outros tipos de histiócitos/macrófagos teciduais, tornando a composição geral dos infiltrados celulares na micose fungoide bastante heterogénea e muito semelhante à das dermatites de interface. Como essa neoplasia pode progredir rapidamente para um quadro agressivo, o diagnóstico precoce é essencial e a PARR pode ser de grande valia nestes casos.	Chaubert *et al* ., 2010; Keating, Rosenkrantz, Keller & Moore, 2022
Linfomas intestinais em cães e gatos	Linfoma intestinais de pequenas células frequentemente apresentam-se como um dilema diagnóstico nos cães e nos gatos. A doença inflamatória intestinal grave pode apresentar muitas das características histológicas dos linfomas intestinais, incluindo um aumento significativo da população de células T da lâmina própria e um aumento dos linfócitos pequenos intra-epiteliais. Mesmo com amostras de biopsia representativas de todas as camadas intestinais, alguns casos ainda podem ser difíceis de diagnosticar. Estabelecer que o infiltrado linfocítico intestinal é clonal pode ajudar a distinguir entre entidades inflamatórias e neoplásicas.	Kaneko *et al.* , 2009; Maeda *et al* ., 2017; Carrasco *et al* ., 2015; Ohmura *et al* ., 2017; Takanosu & Kagawa, 2015; Nakashima *et al.* , 2023; Hiyoshi *et al* ., 2015; Olivero, Turba & Gentilini, 2011; Luckschander-Zeller *et al.* , 2019; Moore, Rodriguez-Bertos & Kass, 2012; Andrews *et al* ., 2016; Weiss *et al* ., 2011; Moore *et al* ., 2005; Sabattini *et al* ., 2016; Gress *et al.* , 2016
Colangite/Colangiohepatite	A colangite/colangiohepatite é uma doença comum em gatos e ainda apresenta etiologia e patogénese desconhecidas. Geralmente é uma doença progressiva muito lenta e de caráter crónico. A doença é caracterizada por uma infiltração consistente de pequenos linfócitos na região portal e periportal, frequentemente apresentando um predomínio de células T. Morfologicamente pode ser difícil distinguir o linfoma de pequenas células da colangite/colangiohepatite linfocítica, requerendo por vezes a realização exames complementares, como a PARR.	Warren *et al* ., 2011; van den Ingh *et al.* , 2006; Radtanakatikanon *et al.* , 2021
Leucemia infocítica crónica (LLC)	Quando se observa um aumento do número de linfócitos pequenos, sem evidentes alterações morfológicas e na ausência de uma possível causa aparente, é frequentemente considerado um diagnóstico diferencial de leucemia linfocítica crónica (LLC). A confirmação desse diagnóstico apresenta-se desafiador principalmente quando a contagem de linfócitos não está drasticamente elevada, sobrepondo-se aos valores passíveis de serem encontrados em situações fisiológicas e reativas. A PARR pode ser uma das ferramentas utilizadas para auxiliar na distinção de um processo neoplásico ou reativo.	Campbell, Hess & Williams, 2013; Weiss, 2005; Rout *et al.* , 2021; Vernau & Moore, 1999
Plasmocitoma e mieloma múltiplo	A PARR pode também ser utilizadas em neoplasias que não sejam o especificamente o linfoma ou leucemia. Rearranjo clonal para IGH também foi demonstrado em casos caninos e felinos com plasmocitoma e mieloma múltiplo.	Takanosu, Okada & Kagawa, 2018; Takanosu *et al.* , 2019
Timoma	Um exemplo de neoplasia não linfoide onde a PARR poderia ter alguma utilidade é o timoma. Principalmente em citologia, onde o padrão epitelial pode não ser evidente, a diferenciação entre timoma e linfoma pode se tornar desafiadora. Um estudo com 13 cães com timoma, em 92,3% (12/13) dos animais testados foi observado um padrão policlonal na PARR. Diferentemente dos outros cenários, a PARR no caso do timoma é útil quando não é positiva, ou seja, exibe um resultado policlonal. Embora os autores do estudo concluam o artigo evidenciando o potencial da PARR nessa situação, algumas ressalvas devem ser feitas principalmente pela presença de um caso de timoma com rearranjo clonal e pela dificuldade de diferenciar um resultado policlonal de um resultado falso-negativo (ex. falta de cobertura dos *primers*).	Vessieres *et al* ., 2018
Estadiamento clínico e doença residual mínima (DRM)	Uma possível aplicação dos ensaios de clonalidade envolve o processo de estadiamento clínico e deteção da doença residual mínima. Alguns estudos demonstraram que a PARR pode ser mais sensível do que a análise morfológica microscópica para a deteção de **populações linfoides neoplásicas** no sangue periférico nessas situações. Embora esses resultados pareçam promissores, ainda são necessários mais estudos para afirmar a utilidade prática e correlação prognóstica da utilização de técnicas tão sensíveis nestes cenários.	Keller, Avery, Burnett, Walton & Olver, 2004; Lana, Jackson, Burnett, Morley & Avery, 2006; Yamazaki *et al.* , 2008