

**LINFOMA DE CÉLULAS B NA ESPÉCIE CANINA,
ESTUDO PROPONDO UM NOVO MÉTODO
DIAGNÓSTICO PARA IMUNOFENOTIPAGEM E
ESTADIAMENTO CLÍNICO**

RENATA ANDRÉA SETTI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Setti, Renata Andréa

Linfoma de células B na espécie canina, estudo propondo um novo método diagnóstico para imunofenotipagem e estadiamento clínico / Renata Andréa Setti – São Paulo, 2017.

51p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Linfoma de Células B/Lymphoma, B-Cell. 2. Cães/Dogs. 3. Diagnóstico/Diagnosis. 4. Imunofenotipagem/Immunophenotyping. 5. Estadiamento de Neoplasias /Neoplasm Staging.

“O caminho do progresso não é fácil nem rápido”

Marie Curie

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlene e Ronaldo, que me ensinaram a honestidade e me proporcionaram os estudos para que eu chegasse sempre mais longe.

A minha irmã Lili pela amizade e fidelidade.

Ao meu companheiro e marido José Sergio Osse, pelo apoio, companheirismo e amizade nos momentos de ansiedade e pelas críticas para eu seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando A. Soares, o meu reconhecimento e gratidão pela paciência e dedicação na elaboração deste estudo. É uma honra tê-lo como orientador e como exemplo.

Ao Dr. Victor Pianade Andrade, pela paciência, disponibilidade e gentileza dedicada a mim e a este estudo.

Ao A.C.Camargo Cancer Center por incentivar a pesquisa multidisciplinar.

À Suely Nonogaki, pelo profissionalismo e dedicação. Sem o seu trabalho esse estudo não seria concluído.

À biblioteca, pela disponibilidade imediata sempre quando preciso e especialmente a Suely Francisco pelo profissionalismo e amizade na elaboração da dissertação.

Ao laboratório de anatomia patológica pela prontidão e profissionalismo.

À pós graduação pela ajuda na parte burocrática sempre necessária.

À minha família, inclusive os da espécie canina e felina, que estão sempre presentes.

Aos meus amigos de longa data e aqueles que conheci nesta jornada.

Ao Zé, meu companheiro nerd.

RESUMO

Setti RA. **Linfoma de células B na espécie canina, estudo propondo um novo método diagnóstico para imunofenotipagem e estadiamento clínico.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O linfoma é uma das neoplasias mais comuns que atingem a espécie canina. Estima-se representar 20% do total de neoplasias diagnosticadas e 83% das neoplasias hematopoiéticas. A sintomatologia pode se manifestar de diversas maneiras, como linfadenomegalia periférica, multicêntrica ou na forma extranodal, prostração, hiporexia, alterações hematológicas ou simplesmente pelo comportamento indolente, sendo diagnosticada em achados de exames rotineiros. O método diagnóstico mais utilizado é a citologia aspirativa de linfonodos, seguida pela biópsia incisional ou excisional do linfonodo. A fenotipagem do linfoma em cães para subclassificação tem aplicação clínica e pode ser realizada por imunocitoquímica ou citometria de fluxo. Na prática, muitos casos não são fenotipados dada a dificuldade de obtenção do fragmento por abordagem cirúrgica ou a pouca disponibilidade da citometria de fluxo na rotina diagnóstica. Este é um estudo prospectivo que tem por objetivo testar a viabilidade da fenotipagem para o linfoma canino utilizando a imunocitoquímica em material para diagnóstico citológico obtido por meio de punção aspirativa por agulha fina e processamento em meio líquido. A análise citológica em meio líquido (ThinPrep®) foi processada, corada em HE e seu excedente processado para pesquisa dos anticorpos monoclonais anti-CD79 α , CD3, CD10, e MUM-1 em protocolo padronizado para imunocitoquímica em reação manual. Com base nesses achados, as amostras foram analisadas e classificadas de acordo com sua imunofenotipagem em linfomas de células T e linfomas de célula B de origem de centro germinativo e células ativadas. A maioria dos linfomas foi classificada como linfoma de célula B de células ativadas. A citologia em meio líquido e a imunofenotipagem por imunocitoquímica são métodos alternativos para o diagnóstico e estadiamento do linfoma da espécie canina.

SUMMARY

Setti RA. **[B-Cell canine lymphoma, a new approach to immunophenotyping diagnostic method and clinical staging]**. São Paulo; 2017.[Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Canine lymphoma is one of the most common neoplasms in dogs, with an incidence at 20% of all neoplasms and 83% of all hematopoietic tumors. The clinical signs are variable and could affects peripheral lymph nodes, multicentric form or extra nodal, generalizes painless, anorexia, blood involvement or in a indolene form found in routine exams. Cytology examination of fine needle aspiration is the most used diagnostic method then the incisional or excisional lymph node biopsy. The immunohistochemistry and flow cytometry had been used to immunophenotyping canine lymphoma and had implication on clinical approach. Surgery procedure are impossible in some dogs and flow cytometry method is not a routine yet, so in many cases the immunophenotyping is not available. The aim of this prospective study was to verified the immunophenotapying of canine lymphoma by fine neddle aspiration on liquid based cytology using the immunocytochemistry method. The liquid based cytological analysis (ThinPrep®) was process, staining in HE and the remaining cells was processed to research monoclonal antibodies anti-CD79a, CD3, CD10 e MUM-1 using the immunocytochemistry in manual standardized proceeding. Based on results, the samples was analyzed and classificated by immunophenotyping in T cells lymphoma and B cells lymphomas origins in germinative center and active cells. The most of the samples was active B cells lymphoma. The liquid based cytology and the immunophenotyping by immunocytochemistry could be alternative methods for diagnosis and staging of canine lymphoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama do linfonodo.....	4
Figura 2	Diagrama colorido dos territórios linfáticos do cão.....	5
Figura 3	Centros linfáticos comparados entre cães e humanos.....	5
Figura 4	Similaridades no câncer compartilhada entre humanos e cães.....	20
Figura 5	Atual fluxograma de desenvolvimento de pesquisa de drogas usando cães normais.....	21
Figura 6	Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD79a.....	31
Figura 7	Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD3	32
Figura 8	Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD3.....	33
Figura 9	Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD10.....	34
Figura 10	Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de MUM-1.....	35
Figura 11	Fotomicrografia de imunocitoquímica mostrando presença de expressão para CD79a.....	36
Figura 12	Fotomicrografia de citologia em meio líquido de linfonodo por aspirado de agulha fina em coloração HE.....	37

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Estadiamento do linfoma canino.....	8
Quadro 2	Sumário da Classificação Revista de Linfomas Caninos baseado na Classificação Revisada Europeia-Americana de Neoplasias de Origem Linfóide/World Health Classification of lymphoid neoplasms.....	10
Quadro 3	Reatividade e padrão de marcação dos anticorpos.....	26
Tabela 1	Relação entre as amostras e a expressão dos anticorpos testados.....	29
Tabela 2	Associação entre as amostras e a expressão na reação imunocitoquímica.....	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BL	Linfoma de Burkitt e Burkitt-like
CEUA	Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais
CÉL B A	célula B ativada
CÉL B CG	Célula B centro germinativo
CHOP	Protocolo quimioterápico vincristina/ciclosfosfamida/doxorubicina/ prednisona
DAB	Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DLBCL	Linfoma difuso de grandes célula B / Difuselarge B celllymphoma
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F	Fêmea
FC	Citometria de fluxo
FISH	Hibridização in situ
HE	Hematoxilina - Eosina
LBC	Liquidbasedcitology / citologia em meio líquido
LBT	Linfoma linfoblástico de célula T
M	Macho
MZL	Linfoma zona marginal
Nº	Número
OMS	Organização mundial de saúde
PAFF	Aspirado por agulha fina
PBS	Tampãoofosfatosalino/ phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PTCL	Linfomas periféricos de célula T não especificados
RNA	Ácido ribonucléico
TZL	Linfoma zona T
UNISA	Universidade Santo Amaro
WHO	World Health Organization

INDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O câncer na espécie canina	1
1.2	O linfoma na espécie canina	2
1.3	O sistema linfático na espécie canina	3
1.4	Casuística	6
1.5	Patogênese.....	7
1.6	Classificação do linfoma da espécie canina.....	8
1.7	Linfoma de células B	11
1.7.1	Linfoma de células B de centro germinativo e células ativadas	11
1.8	Linfoma de células T.....	13
1.9	Fatores Prognósticos	13
1.10	Métodos Diagnósticos.....	14
1.10.1	Citologia por aspirado de agulha fina (PAFF)	15
1.10.2	Imunocitoquímica	16
1.10.3	Imunoistoquímica.....	17
1.10.4	Citologia em meio líquido.....	17
1.11	A espécie canina como modelo animal.....	19
2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivo Específico.....	23
3.3	Justificativa	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Casuística	24
4.2	Imunocitoquímica	25
4.3	Critério de exclusão	27

5	RESULTADOS	28
5.1	Imunocitoquímica do anticorpo CD79 α	30
5.2	Imunocitoquímica do anticorpo CD3.....	32
5.3	Imunocitoquímica do anticorpo CD10.....	33
5.4	Imunocitoquímica do anticorpo MUM-1	35
5.5	Exemplo de painel imunocitoquímico para linfoma canino	36
5.6	Exemplo de citologia de linfonodo através de PAFF em meio líquido	37
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÃO	43
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa no uso de Animais (CEUA – UNISA)

Anexo 2 Quadro da classificação de Kiel modificada para linfomas Non-Hodgkin

Anexo 3 Quadro da relação dos 25 casos analisados

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER NA ESPÉCIE CANINA

A relação entre cães e humanos vem sofrendo mudanças ao longo de 15.000 anos. Inicialmente os cães eram escolhidos por suas capacidades, sendo sua função ajudar na caça e na proteção do grupo (SCHIFFMAN e BREEN 2015). Hoje, esses animais são companheiros, dividem a mesma casa e são considerados membros da família, mantendo ainda uma relação de co-dependência. Segundo o último dado disponibilizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2013), a população nacional de cães foi estimada em 52,2 milhões sendo 2,5 milhões na cidade de São Paulo (TEDARDI et al. 2015).

Nos últimos anos, registrou-se aumento na incidência de várias doenças em animais de companhia, em particular o câncer. Uma das causas prováveis é o aumento na expectativa de vida desses animais (KOMAZAWA et al. 2016), que corresponde a aproximadamente um sétimo (1/7) da expectativa de vida dos humanos (GAMLEM et al. 2008).

O câncer em cães aparece de forma espontânea e apresenta sinais clínicos e patofisiologia semelhantes aos observados em seres humanos (SCHIFFMAN e BREEN 2015). Dois estudos sobre causa morte em cães adultos, realizados nos EUA (FLEMING et al. 2011) e Inglaterra (O'NEILL et al. 2013) indicam que a principal causa atribuída a morte nesses animais foi o câncer.

Atualmente, mais de 400 raças de cães são reconhecidas mundialmente. Algumas raças puras são conhecidas pela alta incidência e elevado risco de desenvolver alguns subtipos de câncer – em alguns casos, até mais de um subtipo (SCHIFFMAN e BREEN 2015). Raças como boxer, goldenretriever, são bernardo, rottweiler e bulldog, por exemplo, são associadas com alto risco em desenvolver linfoma. Raças de grande porte, como mastiff, são associados a tumores ósseos. Herança genética e síndromes hereditárias podem estar associadas às raças descritas. Estudos genéticos de cães assintomáticos ainda não se tornaram exames de rotina na medicina veterinária (SCHIFFMAN e BREEN 2015).

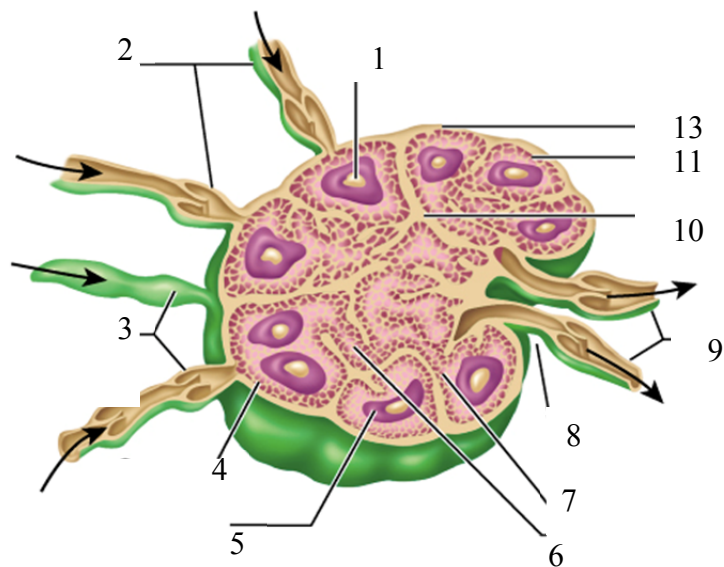
1.2 O LINFOMA NA ESPÉCIE CANINA

O termo linfoma descreve um grupo heterogêneo de desordens envolvendo proliferação monoclonal de linfócitos malignos (ITO et al 2014). O linfoma canino se encaixa na mesma descrição, sendo um grupo heterogêneo de doenças que compartilham a transformação maligna dos linfócitos (BIENZLE e VERNAU 2011; FRANTZ et al. 2013; VALLI et al. 2013), exibe um comportamento biológico de acordo com seu subtipo histológico e distribuição sistêmica (MARCONATO et al. 2017) sendo o linfoma não-Hodgkin (non-Hodgkin, como é conhecido em inglês) o mais comum na espécie canina (PONCE et al. 2010). Como um grupo, são a causa mais comum de tumores em cães (COMAZZI et al. 2014) e consequentemente a neoplasia mais comumente tratada com quimioterapia, afetando cães de todas as raças e idades (VALLI et al. 2011).

Estudos americanos recentes estimam taxa anual de 21,7 casos de linfoma para cada 100.000 cães, o que sustenta a conclusão que esse grupo de doenças acomete proporcionalmente mais cães do que humanos (ITO et al. 2014; RICHARDS e SUTER 2015). O linfoma não-Hodgkin é a neoplasia hematopoiética mais comum, demonstrando representar aproximadamente 10% de todos os tumores e 83% de todas as neoplasias hematopoiéticas (COMAZZI et al. 2014), ocupando o segundo lugar entre todas as neoplasias caninas, sendo a primeira o tumor mamário (RICHARDS e SUTER 2015).

1.3 O SISTEMA LINFÁTICO NA ESPÉCIE CANINA

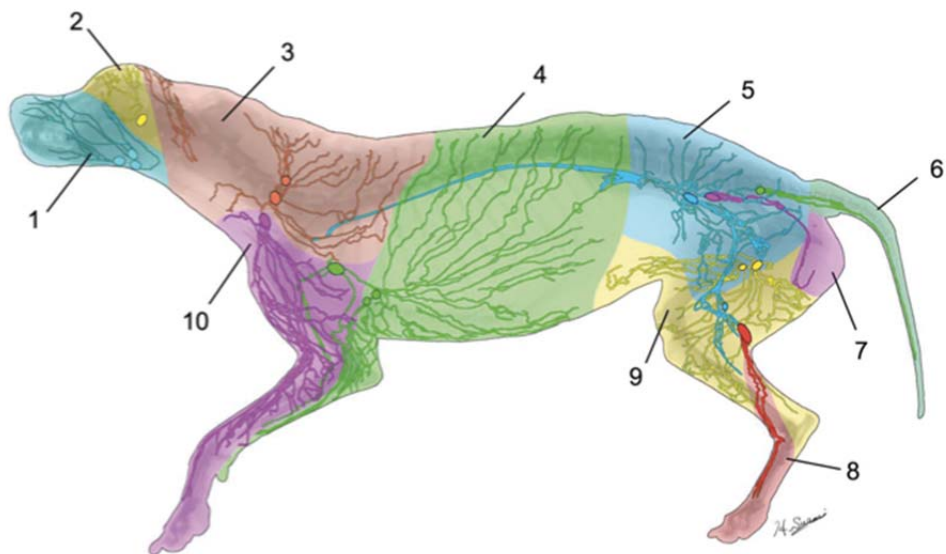
A expressão “sistema linfático” inclui, num sentido amplo, os aspectos descritivos e funcionais das estruturas do tecido linfático, constituído pelos vasos linfáticos e linfonodos (GETTY 1975).



Fonte: Adaptado de KOFFMAN (2015).

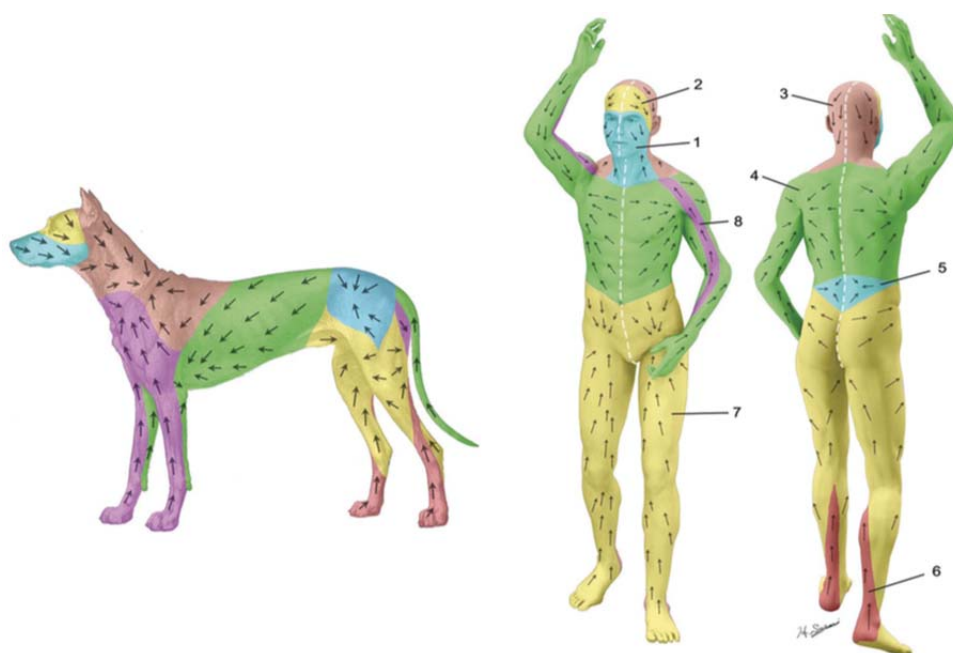
Figura 1 - Diagrama do linfonodo. 1, centro germinativo; 2 e 3, vasos linfáticos aferentes; 4, córtex; 5, foliculo; 6, cordão medular; 7, sinus medular; 8, hilus; 9, vasos linfáticos eferentes; 10, trabécula; 11, sinussubscapsular; 12, cápsula.

Um centro linfático é um linfonodo ou um grupo de linfonodos que ocorrem constantemente na mesma região do corpo e recebem vasos aferentes de regiões semelhantes em todas as espécies. Os linfonodos dos mamíferos são agrupados em centros linfáticos: cabeça (mandibular, parotídeo e retrofaringeo), pescoço (cervical superficial e profundo), membro anterior (axilar), cavidade torácica (torácico dorsal e ventral, mediastínico e bronquial), paredes pélvica e abdominal (lombar, iliossacral, inguinofemoral e isquiático), membro posterior (ileofemoral e poplíteo), vísceras abdominais (celíaco, mesentérico cranial e caudal) (GETTY 1975).



Fonte: Adaptado de SUAMI et al. (2013).

Figura 2 – Diagrama colorido dos territórios linfáticos do cão. 1, submandibular; 2, parotídeo; 3, cervical dorsal superficial; 4, axilar; 5 ilíaco medial; 6, lateral sacral; 7, hipogástrico; 8, poplíteo; 9, inguinal superficial; 10, cervical superficial ventral.



Fonte: Adaptado de SUAMI et al. (2013).

Figura 3 - Centros linfáticos comparados entre cães e humanos. 1, frontal cervical; 2, parótídeo; 3, cervical posterior; 4, axilar; 5 retroperitoneal; 6, poplíteo; 7 superficial inguinal; 8, subclavicular.

1.4 CASUÍSTICA

A maioria dos cães acometidos pela doença e não tratados morre entre 4 a 6 semanas após a diagnóstico (ITO et al. 2015; MUNASINGHE et al. 2015). Aproximadamente, entre 60% e 90% dos cães em tratamento quimioterápico entram em remissão, com sobrevida de 6 a 12 meses (MUNASINGHE et al. 2015). Cães que alcançam a remissão, posteriormente apresentarão recidiva da doença, com maior dificuldade em atingir a segunda remissão. Para esses cães, há também a possibilidade do surgimento de clones neoplásicos resistentes às drogas anti-neoplásicas (MUNASINGHE et al. 2015).

Usualmente é observada tendência particular em algumas raças de cães em desenvolver certos subtipos de linfomas (ITO et al. 2014). Linfomas de célula B representam entre 35% e 40% de todos os linfomas diagnosticados em cães. Essa prevalência pode ser desproporcionalmente influenciada por traços hereditários. Algumas raças nórdicas e asiáticas normalmente desenvolvem linfomas de célula T enquanto algumas raças europeias desenvolvem mais linfomas célula B (SAPIERZYŃSKI et al. 2012). Esses dados são regionais e não há uma raça apontada como mais propensa a desenvolver neoplasias hematopoiéticas no geral. Não há uma diferença significativa entre sexo ou idade para linfomas de célula B e T na espécie canina (PONCE et al. 2010; ZANDVLIET 2016). Fêmeas não castradas demonstram ter menor risco (ZANDVLIET 2016), sendo observado maior incidência na faixa entre 6 e 9 anos (STARKEY e MURPHY 2010). Há estudos que correlacionam a poluição do ar com a incidência de linfoma em cães na cidade de

São Paulo, traçando comparação com a mesma incidência na espécie humana (KIMURA et al. 2013).

Com o passar das últimas décadas foi observado o aumento da incidência de linfoma em cães tal qual nos humanos (ZANDVLIET 2016). De acordo com SUEIRO et al. (2004), há um aumento na expressão positiva do gene p53 com o avanço da idade, sustentando a hipótese que as mutações genéticas tendem a se acumular com o envelhecimento, quando a reparação do DNA fica menos eficiente, isso pode ser aplicado aos cães.

1.5 PATOGÊNESE

O linfoma usualmente acomete tecidos linfoides, como linfonodos, baço e medula óssea mas pode aparecer em qualquer tecido do corpo (WITHROW et al. 2013b). Os sintomas clínicos são variáveis e dependem da extensão e da localização do tumor. O estadiamento do linfoma canino baseia-se na localização, estágio clínico e manifestação clínica, conforme visto no Quadro 1.

Quadro 1 - Estadiamento do linfoma canino

Localização	
A	Generalizado
B	Alimentar
C	Tímico
D	Cutâneo
E	Leucemia
F	Outros (incluindo renal isolado)
Estágio Clínico (a incluir localização anatômica)	
I	Envolvimento limitado à um único linfonodo ou tecido linfoide em órgão isolado
II	Envolvimento de vários linfonodos em uma região
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos
IV	Fígado e/ou baço acometidos ($\pm$ estágio III)
V	Manifestação sanguínea e envolvimento de medula óssea e/ou outro órgão ($\pm$ estagio IV)
Subclassificação de cada estágio	
a	Sem sinais sistêmicos
b	Com sinais sistêmicos

Fonte: Adaptado de WITHROW et al. (2013b)

A classificação do linfoma canino segue o sistema de classificação desenvolvido para humanos e caracterizado por meio de adaptações em linha com a última Classificação de Doenças dos Tecidos Linfáticos da Organização Mundial da Saúde (OMS) – *World Health Organization (WHO) Classification of Neoplastic Diseases of Lymphoid Tissues*, na sigla em inglês (FRANTZ et al. 2013; VEZZALI et al. 2010).

1.6 CLASSIFICAÇÃO DE LINFOMA NA ESPÉCIE CANINA

Linfoma é um termo que generaliza grupos de uma doença heterogênea, englobando grande número de subtipos, resultante da transformação neoplásica dos linfócitos de célula B e T em diferentes estágios de seu desenvolvimento (ARESU 2016).

O mais recente sistema de classificação WHO para linfomas de célula B e T incluiu aproximadamente 30 subtipos. O sistema combina morfologia, topografia, imunofenotipagem e progressão clínica (FRANTZ et al. 2013). De acordo com FRANTZ et al. (2013), seis subtipos são mais comumente observados: linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), linfoma zona marginal (MZL), linfoma de Burkitt e Burkitt-like (BL), linfomas periféricos de célula T não especificados (PTCL), linfoma zona T (TZL), linfoma linfoblástico de célula T (LBT). Eles podem ser subdivididos em três subgrupos moleculares: linfomas célula T de alto grau (LBT, PTCL), linfomas célula T de baixo grau (TZL), e linfomas de célula B (DLBCL, BL e MZL).

Essa classificação foi adaptada da medicina humana e acrescida de outros tumores hematopoiéticos mielóides seguindo os critérios do painel WHO de veterinários especializados. A classificação do linfoma animal é uma lista pragmática de neoplasias hematopoiéticas (VEZZALI et al. 2010).

Recentemente, foi publicado um estudo internacional realizado com patologistas veterinários experientes (VALLI et al. 2011) indicou que 80% deles concordam com a aplicação da classificação WHO como critério para o diagnóstico do linfoma canino baseado na histologia e imunoistoquímica (ARESU 2016).

Quadro 2 -Sumário da Classificação Revista de Linfomas Caninos baseado na Classificação Revisada Europeia-Americana de Neoplasias de Origem Linfóide/World Health Classification of lymphoid neoplasms.

Neoplasias de célula B
Neoplasia precursoras de célula B
Leucemia/linfoma linfoblástico precursor célula B
Neoplasia maduras (peféricas) de célula B
Leucemia linfocítica/pró linfocítica crônica de célula B
Leucemia/linfoma linfocítico de pequenas células
Leucemia pró linfocítica de célula B
Linfoma linfoblasmocítico
Linfoma esplênico de zona marginal de célula B
Plasmocitoma/Mieloma múltiplo
Linfoma extranodal de zona marginal de célula B de mucosa associado a tecido linfóide
Linfoma nodal de zona marginal
Linfoma folicular
Linfoma de células do manto
Linfoma difuso de grandes célula B
Linfoma mediastinal de grandes células B
Linfoma de Burkitt/ leucemia de células de Burkitt
Linfoma de alto grau de grandes células B Burkitt like (nomenclatura provisória)
Linfoma de efusão primário
Neoplasias de célula T e Natural Killer
Neoplasias precursoras de célula T
Linfoma/leucemia linfoblásticas precursoras de célula T
Neoplasias de célula T madura e neoplasias de célula natural killer
Leucemia pró linfocítica de célula T
Leucemia linfocítica de células grandes granulares (LGL)
Leucemia agressiva de células natural killer
Linfoma periférico de célula T (não específico)
Linfoma/leucemia adulto de célula T
Linfoma intestinal de célula T
Linfoma hepatoesplênico de célula T _{γδ}
Síndrome de Sezari/micose fungoide
Linfoma anaplástico de grandes células T e null cell cutâneo primário
Linfoma periférico de célula T não especificado
Linfoma angioimunoblástico de célula T
Linfoma angiocêntrico de célula T

Fonte: Adaptado de VALLI et al. (2011).

1.7 LINFOMAS DE CÉLULAS B

O linfoma de célula B é o mais comum entre cães, sendo o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) o subtipo mais comum. Ele possui muitas semelhanças com a manifestação em humanos, incluindo comportamento biológico, genética do tumor e resposta ao tratamento (MARCONATO et al. 2014).

1.7.1 Linfoma de células B de centro germinativo e células ativadas

O DLBCL é reconhecido por apresentar sinais clínicos heterogêneos. A grande variedade de sintomas associada ao mesmo quadro histológico levou ao estabelecimento de uma subcategoria molecular desses tumores (RICHARDS et al. 2013).

ALIZADEH et al. (2000) demonstrou que é necessário mais que a avaliação imunoistoquímica do linfoma na espécie humana para identificar subgrupos de diagnóstico nos casos de DLBCL. O perfil de expressão gênica identificou dois subtipos: células B ativadas (CBA) e células B de centro germinativo (CCG) (RICHARDS et al. 2013; HABINEZA NDIKUYEZE et al. 2014). Essas subcategorias refletem a origem celular, sendo a CBA originária de células do pós-centro germinativo e a CCG de células do centro germinativo (RICHARDS et al. 2013). Comparativamente, os linfomas de centro germinativo apresentam melhores prognósticos (ALIZADEH et al. 2000; SATO et al. 2012; ARESU et al. 2015).

HANS et al. (2004), em estudo complementar, comprovou que a expressão de CD10, bcl-6, MUM-1, bcl-2 e ciclina D2 podem ser usados como marcadores prognósticos no DLBCL. Os resultados combinados de CD10, bcl-6 e MUM-1

podem dividir os DLBCL nos subgrupos de células de centro germinativo e células ativadas como já havia sido proposto por ALIZADEH et al. (2000).

CHOI et al. (2009) propôs um algoritmo de histoquímica mais apurado para a subclassificação dos DLBCL, que se replicam mais próximos ao proposto por ALIZADEH et al. (2000), proporcionando novas formas de tratamento para os subgrupos de linfoma de grandes células. Esses dados são pouco divulgados na medicina veterinária até o presente momento.

DLBCL acomete cães entre 5 e 9 anos, comprometendo múltiplos ou todos os linfonodos, nesses animais, a resposta à poliquimioterapia é variável. O protocolo de tratamento de primeira escolha (51%) é o CHOP (vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona) (RICHARDS e SUTER 2015). Aproximadamente 85% dos cães com linfoma respondem ao tratamento (ITO et al. 2011) que é baseado na remissão e controle da doença. A sobrevida de cães em tratamento varia entre 8 meses e 1 ano.

Histologicamente, o DLBCL é caracterizado por uma proliferação difusa de grandes células linfoides neoplásicas. O DLBCL expressa, normalmente, os anticorpos CD79, CD20 e PAX5 (ARESU 2016).

O linfoma difuso canino de células B é morfológicamente similar ao linfoma difuso humano de células B, especialmente em relação aos subtipos de CCG e CBA, e seu tratamento é baseado em protocolos quimioterápicos similares (FRANTZ et al. 2013; RICHARDS et al. 2013). O DLBCL não pode mais ser considerado uma doença única, pois seu comportamento biológico demonstra ser dependente de ter ou não origem em células B ativadas (ARESU 2016).

1.8 LINFOMA CÉLULAS T

A porcentagem de linfomas de origem de célula T varia entre 17 e 28% (MOORE 2016). Os subtipos de linfoma de célula T mais registrados na medicina veterinária são: linfoma célula T de alto grau, linfoma extranodal de célula T e linfoma de célula T indolente (MOORE 2016). Esses linfomas geralmente expressam CD3 (SÖZMEN et al. 2005). Algumas células T neoplásicas perdem o antígeno CD3, mas mantém o receptor de célula T, uma vez que são negativas CD3 mas positivas no teste por PCR (MOORE 2016).

Quando tratados com protocolos baseado no CHOP, cães com linfoma de célula T de alto grau têm taxa de remissão menor. Aqueles que entraram em remissão apresentaram recidiva mais rápida e sobrevida menor se comparados a cães com linfoma de célula B. Linfomas indolentes de célula de T apresentam melhor prognóstico. Não há aumento na sobrevida se comparados protocolos agressivos como o CHOP àqueles baseados em clorambucil, prednisona e L-aspariginase. Já foi descrita a alta prevalência de linfoma célula T em cães com menos de 3 anos (MOORE 2016).

1.9 FATORES PROGNÓSTICOS

Vários fatores prognósticos atualmente são relatados nos linfomas caninos, incluindo peso corporal, presença de anemia, estágio clínico e imunofenotipagem. Mesmo assim, ainda não se sabe qual o papel que o entendimento adequado da

biologia celular do tumor pode ter na definição do prognóstico e se sua falta justifica prognósticos ruins (RICHARDS et al. 2013).

De acordo com MUNASINGHE et al. (2015), propondo um estudo comparando análise citológica de linfonodo de cães com linfoma no momento do diagnóstico e após tratamento, o número de mitoses é maior no momento do diagnóstico se comparados aos achados de cães em remissão. Esse fator prognóstico não faz parte da rotina clínica até o momento. Não há um fator prognóstico estipulado na medicina veterinária como o Índice Internacional Prognóstico usado na medicina humana para linfomas de alto grau (ZANDVLIET 2016).

Maiores índices de sobrevida são associados aos linfomas de célula B e curtos períodos de remissão e sobrevida aos linfomas de célula T (MUNASINGHE et al. 2015).

1.10 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Os métodos diagnósticos na suspeita de linfoma incluem exame físico, ultrassom abdominal, radiografia torácica, citologia aspirativa e biópsia incisional ou excisional, sendo essa última a forma de fenotipagem mais utilizada até o presente momento. Na medicina veterinária, o diagnóstico morfológico dos linfomas caninos está historicamente ligado a detalhes citológicos (ARESU et al. 2015).

Na rotina, a citologia e a histopatologia podem ser suplementadas com imunoistoquímica, citometria de fluxo e PCR no diagnóstico do linfoma canino, buscando a determinação imunofenotípica, que demonstra ser um dos mais importantes indicadores de prognósticos da doença (THALHEIM et al. 2013). A

técnica de imunofluorescência para fenotipagem do linfoma canino foi descrita por SAWA et al. (2015) e a citometria de fluxo é demonstrada em vários estudos como mais uma forma de imunofenotipagem da doença na espécie (SÖZMEN et al. 2005; COMAZZI e GELAIN 2011; THALHEIM et al. 2013). Segundo levantamento realizado entre abril/2009 e maio/2011 na *NationWideLaboratories*, em 837 amostras de citologia de linfonodo realizadas em cães, 284 (33,9%) tinham o histórico clínico de comprometimento de linfonodo como único sinal clínico e 271 (32,4%) associavam sintomas clínicos sistêmicos. Em 928 amostras citológicas, 351 casos foram conclusivos para linfoma e 97 foram classificadas como possível linfoma e 31 como provável linfoma (AMORES-FUSTER et al. 2015).

1.10.1 Citologia por aspirado de agulha fina (PAFF)

A análise citológica de aspirado dos linfonodos é o diagnóstico mais comumente utilizado na suspeita de linfoma (SÖZMEN et al. 2005; MUNASINGHE et al. 2015; SAPIERZYŃSKI et al. 2016) e permite diagnosticar um linfoma na maioria dos casos. Adicionalmente, permite dividi-los em baixo ou alto grau (SAPIERZYŃSKI et al. 2012). A ampla utilidade dessa técnica se deve à facilidade em coletar amostras, procedimento minimamente invasivo, precisão diagnóstica e facilidade em acesso a serviços de patologia (KU et al. 2017).

A grande maioria dos linfomas caninos são difusos e intermediários de grandes células e, para esses tipos, a citologia é um método adequado (REGAN et al. 2013). Durante a análise citológica, as células tumorais geralmente se descamam. Assim, vários componentes podem contaminar a amostra (debris necróticos e células inflamatórias), interferindo em sua análise (IMURA et al. 2014). Segundo KU et al.

(2017), o exame citológico por PAFB dos linfonodos é altamente específico para neoplasia com alto valor preditivo positivo.

Em cães com suspeita de linfoma, o exame citológico dos linfonodos pode indicar o linfonodo mais representativo para a biópsia excisional, monitorar a resposta ao tratamento e auxiliar no estadiamento da doença (SAPIERZYŃSKI et al. 2016).

A imunofenotipagem do linfoma, baseada em exemplos de análise citológica coletados de forma não invasiva, pode ser excelente alternativa em comparação ao exame histopatológico, procedimento que, normalmente, necessita de anestesia geral para ser realizado.

1.10.2 Imunocitoquímica

A imunocitoquímica é aplicada na medicina humana como diagnóstico citológico de acompanhamento usando antígenos de superfície específicos e outros marcadores (FISHER et al. 1995). Na rotina da medicina veterinária, essa técnica é pouco utilizada, embora tenha sido descrita por FISHER et al. (1995) e CANIATTI et al. (1996), utilizando método em citospin, e FERNANDES et al. (2016), em cellblock.

O citodiagnóstico de neoplasias é normalmente associado a sua precisão e segurança, particularmente nos casos de linfoma. A imunocitoquímica pode ser usada como método de confirmação na linhagem celular (FISHER et al. 1995).

Os anticorpos CD79a, Pax5 e CD20 são utilizados para determinar linfoma de origem de célula B e o anticorpo CD3 para determinar linfoma de origem de célula T (BIENZLE e VERNAU 2011; WITHROW et al. 2013a).

1.10.3 Imunoistoquímica

Confirmando a importância da imunofenotipagem, 76% dos oncologistas veterinários solicitam a diferenciação entre linfócitos B e T. Após o resultado de linfoma, 31% realizam tratamentos diferenciados (THALHEIM et al. 2013). Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para leucócitos de animais de companhia (cães e gatos), a imunofenotipagem de subpopulações de leucócitos se tornou método mais utilizado na rotina diagnóstica.

Mais comumente, a imunofenotipagem do linfoma canino é realizada por meio de exame histopatológico (pode ser optado pela forma de biópsia incisional ou retirada completa do linfonodo). Isso exige que o paciente seja submetido a anestesia geral para a realização do procedimento. Muitas vezes, não é possível submeter o paciente canino com sintomatologia de linfoma a esse tipo de procedimento. Antes de 2009, o diagnóstico era baseado no exame citológico de aspirado da medula óssea e a imunofenotipagem era determinada por meio de imunoistoquímica de biópsia de linfonodo. Desde então, a imunoistoquímica de biópsias de linfonodos vem sendo substituída pelo uso de citometria de fluxo de aspirado de linfonodo, tecido aspirado de fígado e baço, sangue periférico, efusão cavitária ou amostra de medula óssea (MUTZ et al. 2015).

Consequentemente, a imunoistoquímica e imunocitoquímica são métodos estabelecidos para caracterização de tecido linfoide (RÜTGEN et al. 2010).

1.10.4 Citologia em meio líquido

O método de esfregaço convencional tem algumas desvantagens. Entre elas, a necessidade de um técnico para preparar as lâminas, de uma extensa área para análise

e resultados falso negativos (ABEDI-ARDEKANI e VIELH 2014). A citologia em meio líquido (LBC) foi introduzida há duas décadas primeiramente por ginecologistas (ABEDI-ARDEKANI e VIELH 2014) e foi ampliada para outras áreas além da ginecologia, sendo hoje utilizada para citologia de região cervical, citologia de linfonodos (HONG et al. 2014), citologia pulmonar (KONOFAOS et al. 2006), entre outros.

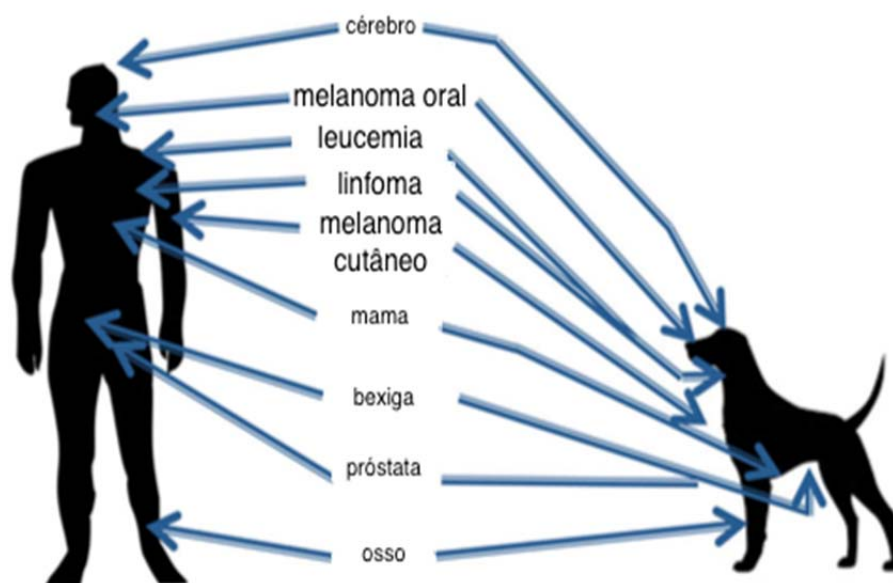
O material é coletado por aspirado de agulha fina (KONOFAOS et al. 2006), primeiramente preservado em meio líquido e as lâminas são preparadas por um sistema automatizado (ABEDI-ARDEKANI e VIELH 2014). Com o método LBC, as células são mais bem preservadas, mantendo melhor estrutura citomorfológica, melhor distribuição no material pela lâmina, melhor visualização das características nucleares, sem sofrer interferência de sangue ou muco (ABEDI-ARDEKANI e VIELH 2014) e eliminando artefatos (KONOFAOS et al. 2006). O material residual pode ser utilizado para extração de alta qualidade de DNA/RNA mesmo após longo tempo de preservação e podem ser aplicadas técnicas como as de reação de polimerase em cadeia (PCR) e de hibridização in situ (FISH) (ABEDI-ARDEKANI e VIELH 2014).

FERNANDES et al. (2016) demonstrou a técnica de citologia em meio líquido na veterinária, com material obtido da punção aspirativa de linfonodos de um grupo de cães com diagnóstico prévio de linfoma e de outro grupo com diagnóstico de leishmaniose. A comparação desse método com o de com lâminas de esfregaço citológico evidenciou qualidade superior do primeiro. O mesmo estudo realizou análise imunocitoquímica por meio do método de conservação cellblock.

1.11 A ESPÉCIE CANINA COMO MODELO ANIMAL

Tumores espontâneos nos animais de companhia, especialmente em cães, são únicos e pouco usados como pesquisa como modelo para biologia do câncer em humanos e para terapias translacionais (PINHO et al. 2012). O crescente interesse de pesquisadores focados em câncer neste modelo animal e o aumento de publicações da área de oncologia veterinária faz da oncologia comparada ponto importante da medicina translacional, permitindo rápido fluxo de dados para a aplicação na medicina humana (PINHO et al. 2012). A atualização recente da sequência do genoma canino mostra alta homologia e similaridades próximas com o genoma humano (PINHO et al. 2012). Vantagens exclusivas podem ser atribuídas à espécie canina como modelo animal: ocorrência espontânea da doença, cronologia da doença comparada à expectativa de vida, compartilhar o meio ambiente e ‘status’ social que permite ao cão ser tratado como paciente e ao mesmo tempo poder explorar eticamente inovações translacionais e a organização em raças que permite uma homogeneidade genética (ITO et al. 2014).

Alguns genes que predispõem câncer nos seres humanos e já foram descritos em cães com câncer incluem BRCA1/BRCA2, que lideram síndromes hereditárias em câncer de mama e ovário e mutação no TP53, que lidera a síndrome de Li-Fraumeni em humanos (SCHIFFMAN e BREEN 2015).

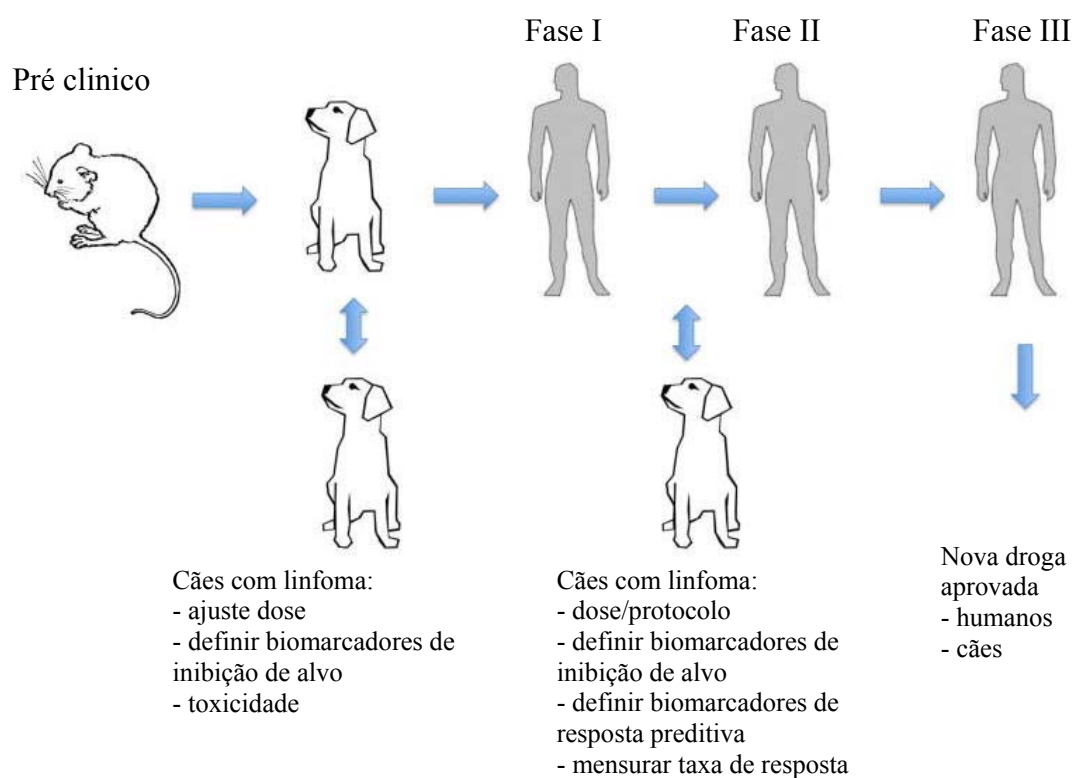


Fonte: Adaptado de SCHIFFMAN e BREEN (2015)

Figura 4 - Similaridades no câncer compartilhada entre humanos e cães.

Cães de estimação que desenvolvem linfoma non-Hodgkins são reconhecidos como modelo animal clinicamente relevante para o linfoma em humanos (HABINEZA NDIKUYEZE et al. 2014), dadas suas características intrínsecas (COMAZZI et al. 2014). Crescente número de estudos demonstra que linfomas espontâneos em cães podem ser um valioso método de pesquisa para compreender a biologia e o tratamento dessa patologia (RICHARDS e SUTER 2015). A espécie canina compartilha o mesmo ambiente com os humanos há milhares de anos. Assim, os tumores caninos capturam a “essência” dos tumores humanos de maneira única, que não pode ser emulada por qualquer outra espécie animal (RÜTGEN et al. 2010), dividindo características como apresentação clínica, biologia do tumor, resposta ao tratamento quimioterápico (LIU et al. 2015) e similaridades como diversidade genética e heterogeneidade fenotípica (MUDALIAR et al. 2013).

A exploração desse modelo pode permitir a criação e o uso de modelos laboratoriais, criando uma estratégia para aprimorar tratamentos nos animais, que permitiria um melhor entendimento da doença em humanos pela referência cruzada entre espécies e suas características oncogenômicas, enquanto se aprimora o estudo do câncer na veterinária (RICHARDS e SUTER 2015).



Fonte: Adaptado de RICHARDS e SUTER (2015).

Figura 5 - Atual fluxograma de desenvolvimento de pesquisa de drogas usando cães normais. Cães com linfoma poderiam ser estudados em fases iniciais.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O linfoma está entre as maiores causas de câncer em cães e, até o presente momento, o diagnóstico mais efetivo se dá pelo exame anátomo patológico e imunoistoquímico de amostras provindas de biópsia incisional ou excisional, sendo a última mais indicada para a realização dos exames.

Há ainda muitos casos em que os pacientes caninos têm o protocolo de tratamento para o linfoma estipulado somente pelo exame citológico. Essa escolha de tratamento é definida basicamente por dois motivos: custo do método de diagnóstico proposto e condições do paciente canino em suportar uma anestesia inalatória.

A citologia em meio líquido ainda é pouco estudada dentro da medicina veterinária. Além de permitir a avaliação morfológica convencional, permite preservar amostra do mesmo material já coletado para exames futuros, incluindo a imunocitoquímica. A proposta inicial deste estudo é ampliar o uso desse método, juntamente com a imunofenotipagem do linfoma canino, cooperando para um diagnóstico específico e não invasivo, tratamento efetivo e um prognóstico apurado. Propõe-se, também, estabelecer um comparativo entre o linfoma humano e canino analisando suas similaridades e propondo o cão como modelo animal para essa doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilidade do meio citológico de base líquida como alternativa de diagnóstico e classificação para o linfoma canino;

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO

Definir o método de citologia em meio líquido como alternativa diagnóstica para a linfoma canino;

Diferenciar linfócitos de células B e linfócitos de células T através da técnica imunocitoquímica em material fixado em meio líquido;

Diferenciar, no linfoma difuso de grandes células B, as células de origem do centro germinativo e células ativadas;

3.3 JUSTIFICATIVA

O maior desafio deste projeto é mostrar que o método de citologia em meio líquido é possível e útil no diagnóstico do linfoma canino, avaliar o custo benefício do estudo sugerido perante a rotina patológica na medicina veterinária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Universidade de Santo Amaro (CEUA-UNISA) (Anexo 1). Os 25 cães selecionados para este estudo apresentavam sintomatologia suspeita para linfoma, em investigação diagnóstica no Hospital Veterinário Pompéia e no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro. Os pacientes foram submetidos a aspirado de agulha fina de linfonodos periférico. A seleção das punções foi baseada no histórico clínico, linfadenomegalia e condições clínicas do paciente.

O procedimento de aspiração por agulha fina abrange a compressão manual e aspiração com agulha 24G, sem sedação ou anestesia geral para tais procedimentos. Todos os exames foram autorizados pelos proprietários que estavam presentes no momento da coleta.

Pacientes já em tratamento para linfoma foram incluídos no projeto. Essa decisão foi tomada posto que não há influência do tratamento na análise citológica e imunocitoquímica.

As amostras coletadas foram dispostas em esfregaços e armazenadas em meio líquido (ThinPrep®). As amostras conservadas em ThinPrep® foram processadas no equipamento ThinPrep 2000 processor e analisadas posteriormente por patologistas.

As lâminas foram processadas e mantidas em álcool até o momento da execução. Seguindo o seguinte protocolo de imunocitoquímica manual.

4.2 IMUNOCITOQUIMICA

As 25 amostras foram identificadas com etiquetas de códigos de barras, marcadas com caneta hidrofóbica e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% (Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP) v/v com metanol (Merck, 1.06009.1000, Darmstadt, Alemanha). Foram realizadas 3 trocas de 5 minutos cada e 10 minutos no Novocastra Peroxidase Block (Leica Biosystems Newcastle Ltd, RE7101, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido), seguido de lavagem em água corrente e destilada. Posteriormente, foram submetidas ao bloqueio das proteínas inespecíficas com Novocastra Protein Block (Leica Biosystems Newcastle Ltd, RE7102, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) por 5 minutos a temperatura ambiente, em seguida o bloqueador foi desprezado. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários diluídos nos títulos previamente estabelecidos, conforme tabela abaixo, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Inlab, 1870, São Paulo, SP) e azida sódica (Merck, 6688, Rio de Janeiro, RJ) 0,1%, por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Quadro 3 -Reatividade e padrão de marcação dos anticorpos

Anticorpo	Clones	Títulos	Fabricantes	Reatividade	Padrão de marcação
CD3	F7.2.38	1:200	Dako, M7254, Glostrup, Dinamarca	Células linfoides T	membrana
CD10	56C6	1:50	Dako, M7308	Células linfoides B de origem de centro germinativo	membrana
CD79 α	JCB117	1:50	Dako, M7050	Células linfoides B	Membrana/citoplasma
MUM-1	MUM1p	1:50	Dako, M7259	Células linfoides B ativadas	núcleo

Seguidamente passaram por lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. As lâminas posteriormente foram incubadas com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica Biosystems Newcastle Ltd, RE7150-k, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) por 30 min a 37°C e então passaram por lavagem com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada. Posteriormente, foram incubadas com o NovoLink Polymer do kit por 30 min a 37° C, passaram por lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. As lâminas foram então incubadas em solução substrato: 100 mg de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, St Louis, MO, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (J. T. Baker, 9224-03, Center Valley, PA, EUA); 1 mL de H₂O₂ 6% Quimesp Química, Guarulhos, SP); 100 mL de PBS por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Submetidas a análise ao microscópio, nas lâminas controles, foi observado o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. Passaram então por lavagem em água corrente e água destilada por 3 minutos. Posteriormente, foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 20 segundos e então nova lavagem em água corrente e destilada. Seguidas de duas imersões em solução de hidróxido de amônio 0,5%, lavando em seguida em água corrente e destilada. As lâminas foram então desidratadas em: etanol 80%, 30 segundos, etanol 95%, 30 segundos, etanol 100%,

30 segundos cada. Diafanizadas com Xilol 4 vezes, 30 segundos cada. Finalmente foram montadas com lamínulas e Entellan neu (Merck, 1.07961.100, Alemanha).

Os quatro anticorpos utilizados são monoclonais.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Análises citológicas de pacientes caninos não-conclusivas para linfoma foram excluídas do estudo.

5 RESULTADOS

Com os resultados obtidos, os questionamentos deste trabalho foram a importância da imunofenotipagem das células do linfoma para o tratamento do paciente canino; provar que o método de citologia em meio líquido pode proporcionar diagnóstico apurado e, fazer uma correlação com o linfoma no paciente humano proporcionando o modelo animal para pesquisas futuras.

A idade dos pacientes caninos analisados variou entre os extremos de 6 a 15 anos. Dos 25 pacientes caninos, 12 eram fêmeas e 13 machos e estavam em estágios diferentes da doença. A sobrevida dos pacientes caninos não foi analisada neste estudo. O diagnóstico de linfoma foi realizado por análise citológica das amostras em HE por patologistas veterinários de diferentes instituições sendo que as amostras foram reavaliadas pelos pesquisadores.

Das 25 amostras que foram analisadas, 20 amostras (80%) expressaram positividade para CD79 α , 7 amostras (28%) expressaram positividade para CD10, 3 amostras (12%) expressaram positividade para CD3 e 18 amostras (72%) expressaram positividade para MUM-1; 2 amostras foram positivas para todos os anticorpos testados, 2 amostras foram negativas para todos os anticorpos testados e 1 amostra não apresentou reação em nenhum dos anticorpos testados. Para todas as 25 amostras foram confeccionadas lâminas de esfregaço citológico e coradas em HE para comparação futura com as lâminas de LBC.

Tabela 1 -Relação entre as amostras e a expressão dos anticorpos testados.

AC	CD79A	CD10	CD3	MUM-1
Nº amostras (%)	20 (80)	7(28)	3(12)	18(72)

As leituras das lâminas foram feitas em microscópio comum por um patologista e os resultados foram classificados em relação a intensidade da reação positiva, as imagens das lâminas foram capturadas por fotomicroscópio e selecionadas por um patologista.

Tabela 2 -Associação entre as amostra e a expressão na reação imunocitoquímica.

No. Amostra	Antígeno			
	CD79a	CD10	CD3	MUM-1
1	+	-	-	+
2	+	-	-	+
3	+	+	+	+
4	+	-	-	+
5	-	-	+	+
6	+	-	-	+
7	+	-	+/-	+
8	+	+	-	+
9	+	-	-	+
10	+	-	-	+
11	+	+	-	-
12	+	+	+	+
13	-	-	-	+
14	+	+	-	-
15	+	-	-	+
16	celularidade baixa para a análise			
17	+	-	-	+
18	+	-	-	+
19	+	-	-	+
20	+	-	-	+
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	+	+	-	-
24	+	-	-	+
25	+	+	-	-

Em relação a imunofenotipagem, tivemos 24 casos com celularidade suficiente para análise. Destes três não permitiram imunofenotipagem conclusiva, sendo que dois deles porque nenhum anticorpo foi positivo e outro somente a coloração para MUM1 foi positiva. Dos casos que tiveram imunofenotipagem conclusiva, um caso foi de linfoma de células T e 20 de células B. Quanto ao subgrupo de células B, 5 casos apresentaram perfil de origem em centro germinativo (CD10 positivo/MUM1 negativo) e 13 casos o perfil de células ativadas (CD10 negativo/MUM1 positivo). Em dois casos houve a co-expressão de CD10/MUM1.

5.1 IMUNOCITOQUIMICA DO ANTICORPO CD79A

O imunocitoquímica com o anticorpo CD79A foi a que mostrou a mais fidedigna entre os marcadores B. Na Figura 6 mostra-se um grupo de células neoplásicas positivas para CD79A e em meio aos blocos de células neoplásicas há linfócitos T não-neoplásico negativo para o marcador. Observar que embora haja uma coloração citoplasmática há nítido reforço de membrana.

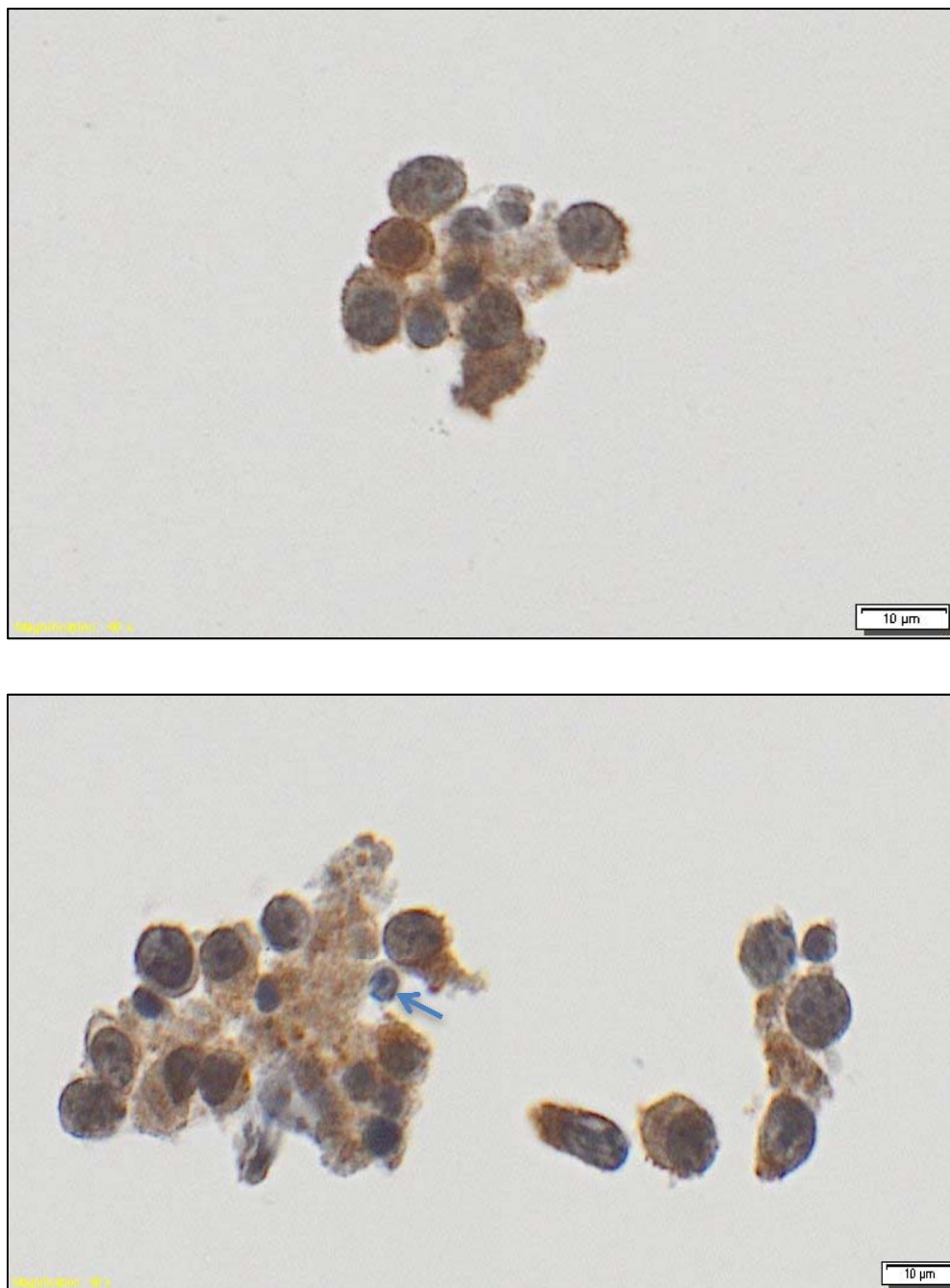


Figura 6 - Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD79a. Notar Linfócito T não-neoplásico negativo para a reação (seta).

5.2 IMUNOCITOQUIMICA DO ANTICORPO CD3

A marcação com anti-CD3 foi bastante confiável, especialmente quando os elementos celulares estavam isolados. Há marcação na membrana e o citoplasma também se cora. Esta identificação é um pouco mais difícil quando os linfócitos T estão em meio a blocos neoplásicos.



Figura 7 - Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD3 em linfócitos.



Figura 8 - Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD3.

5.3 IMUNOCITOQUIMICA DO ANTICORPO CD10

A Figura 9 são representativas da marcação das células neoplásicas com anticorpo anti-CD10. O reforço da coloração de membrana não é tão notável como no anti-CD79A fazendo que a interpretação e a separação das células seja um pouco menos apreciável.

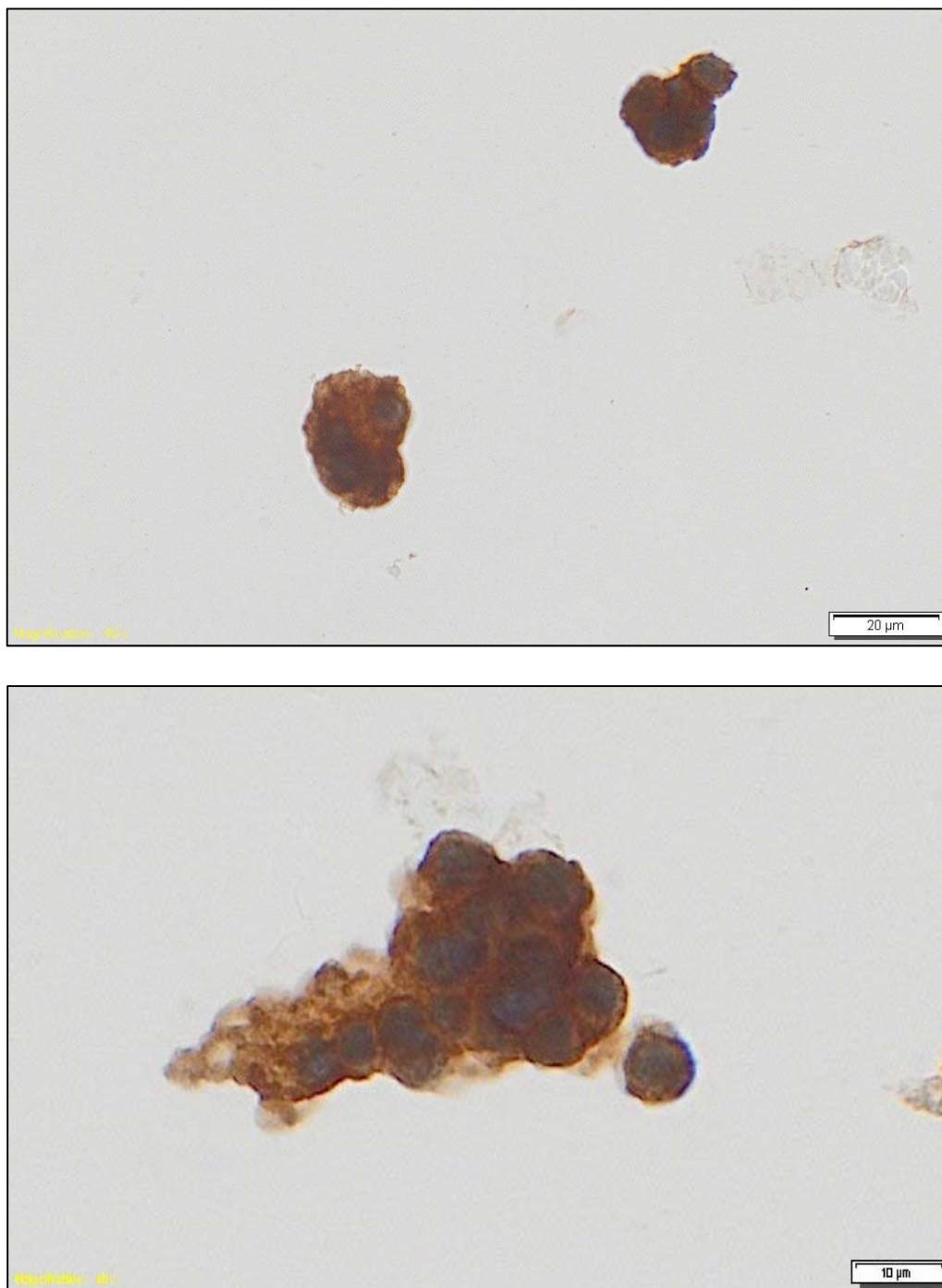


Figura 9 - Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de CD10.

5.4 IMUNOCITOQUIMICA DO ANTICORPO MUM-1

O anticorpo anti-MUM foi o que menos coloração citoplasmática apresentou e de modo geral foi a mais fácil de se identificar.

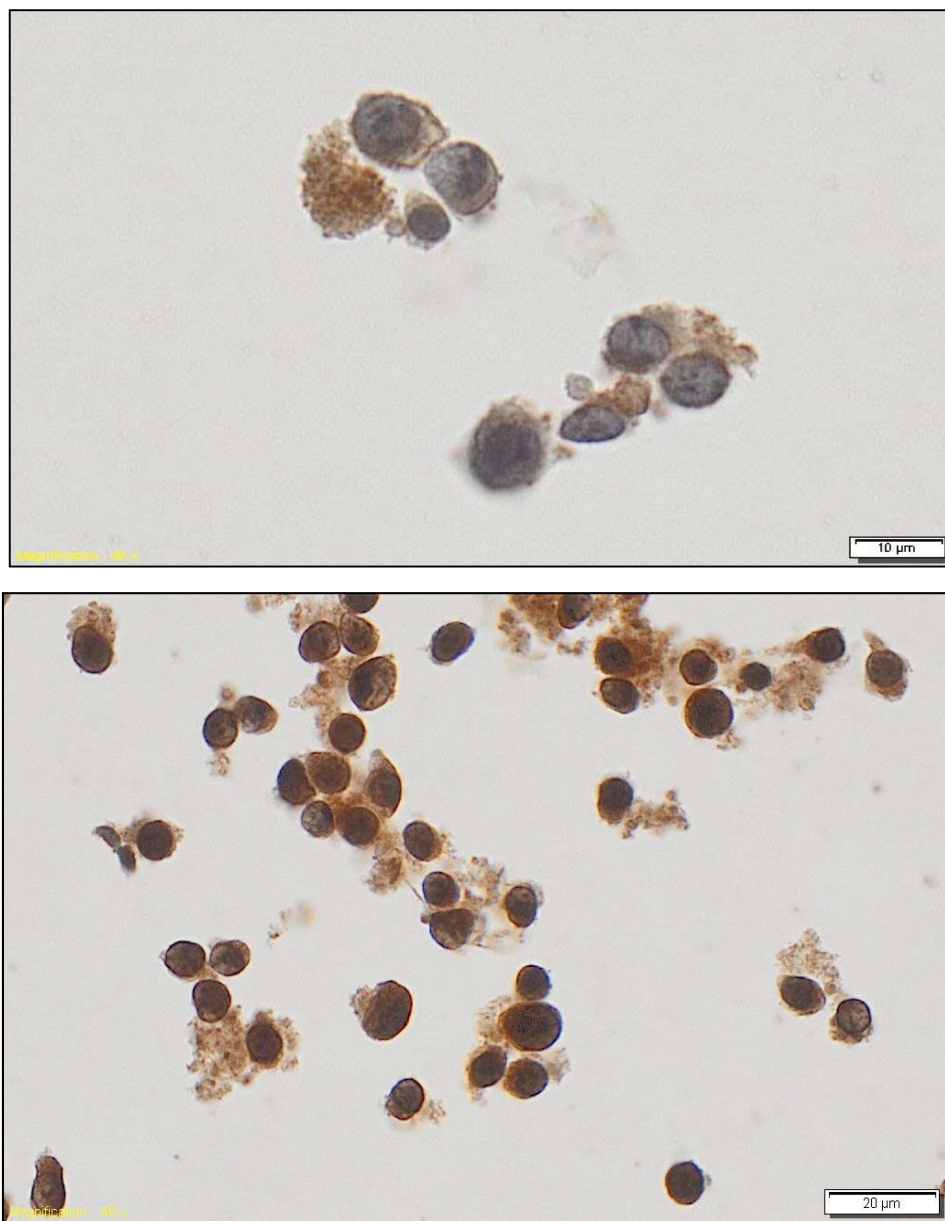


Figura 10 - Fotomicrografia de linfoma canino mostrando exemplo de presença de expressão imunocitoquímica de MUM-1.

5.5 EXEMPLO DE PAINEL IMUNOCITOQUIMICO PARA LINFOMA CANINO

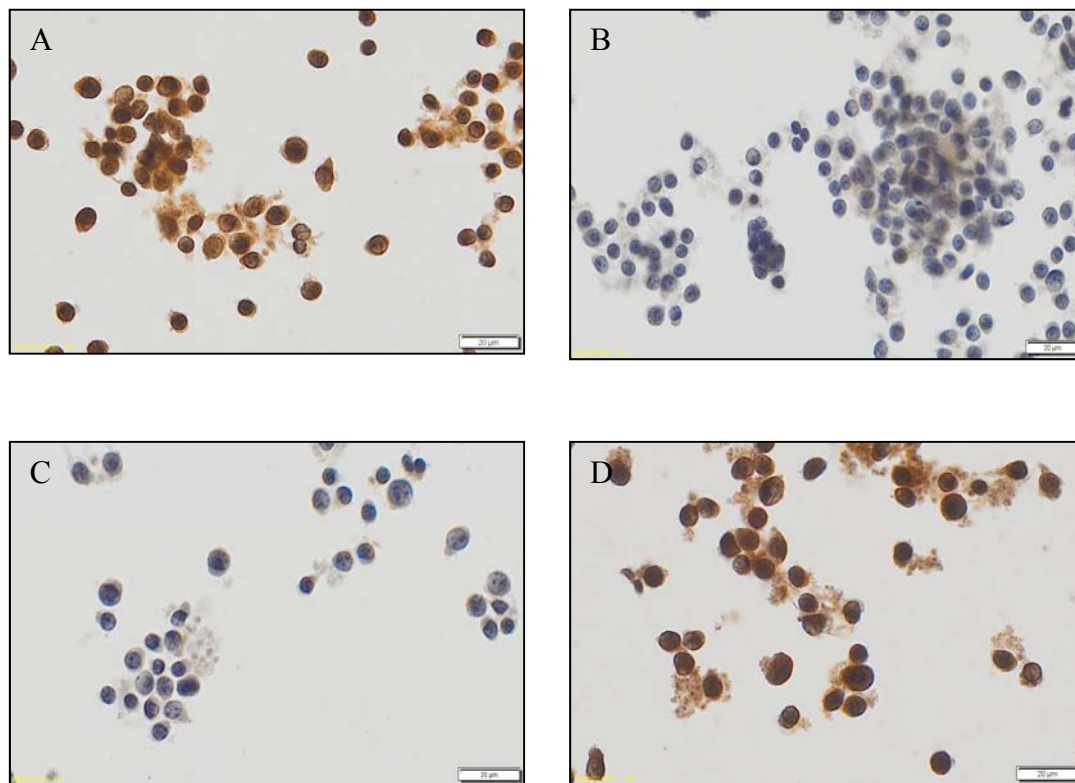


Figura 11 - Fotomicrografia de imunocitoquímica mostrando presença de expressão para CD79a. (A), ausência de expressão para CD10 (B), ausência de expressão para CD3 (C) e presença de expressão para MUM-1 (D).

5.6 EXEMPLO DE CITOLOGIA DE LINFONODO ATRAVÉS DE PAFF EM MEIO LÍQUIDO

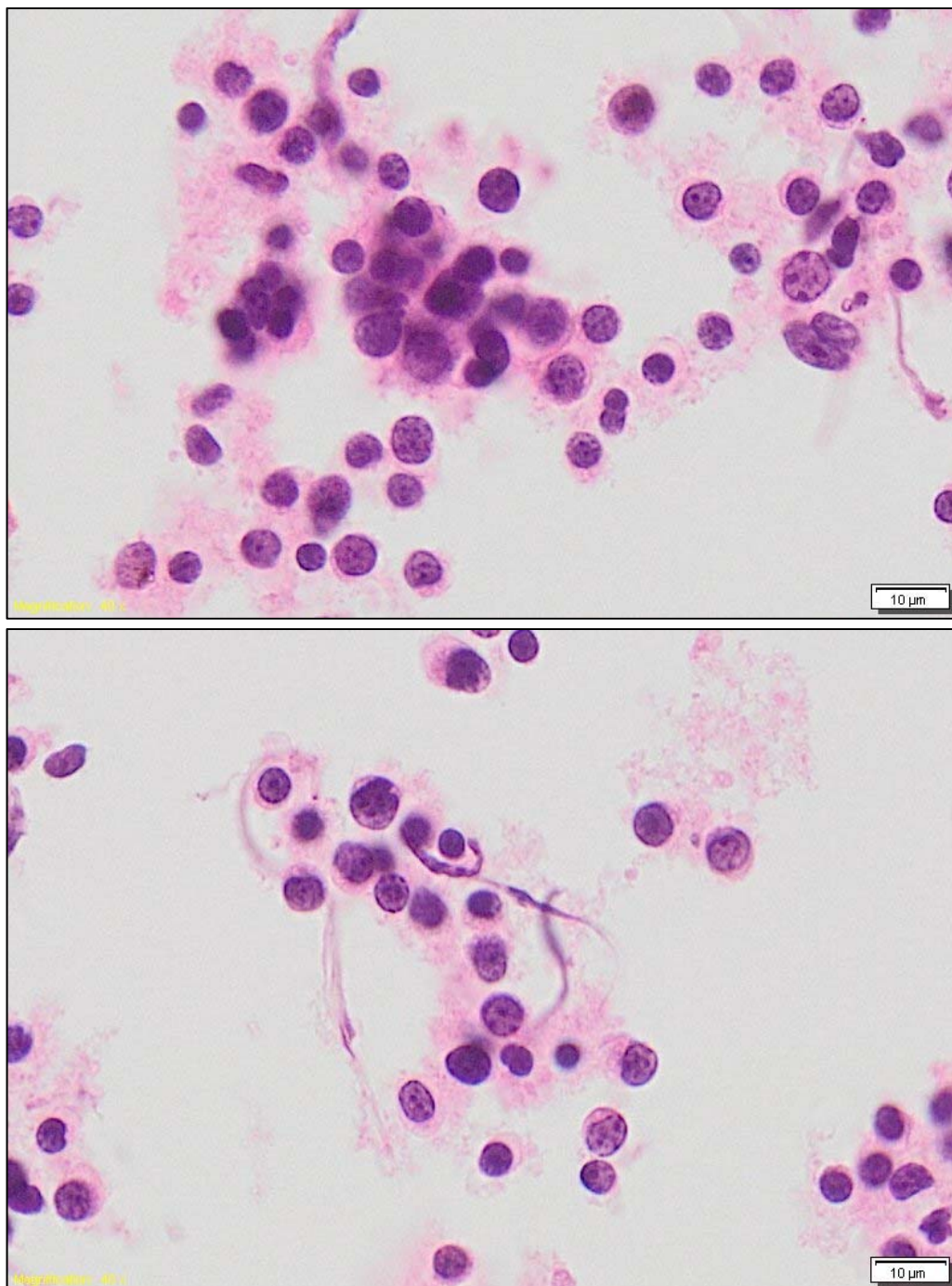


Figura 12 - Fotomicrografia de citologia em meio líquido de linfonodo por aspirado de agulha fina em coloração HE.

6 DISCUSSÃO

O estudo foi prospectivo analisando os casos de linfoma canino dos cães atendidos no Hospital Veterinário Unisa e Hospital Veterinário Pompéia no período entre janeiro de 2015 e outubro de 2016, no momento do diagnóstico ou durante o tratamento quimioterápico. Nesse período, os pacientes que apresentavam linfadenomelagia periférica foram submetidos a citologia nos linfonodos acometidos por meio da punção por agulha fina e posteriormente esfregaço citológico. Diagnósticos negativos para a suspeita de linfoma foram excluídos no estudo. Os anticorpos selecionados já haviam sido previamente testados para o diagnóstico do linfoma em humanos e apresentação reação imunocitoquímica também na espécie canina.

Os métodos de diagnóstico do linfoma canino foram explorados por esse estudo. De acordo com ARESU et al. (2015), na medicina veterinária o diagnóstico morfológico do linfoma canino é historicamente liderado pelos detalhes citológicos, o valor da análise histopatológica foi considerado necessário para a avaliação estrutural dos linfonodos e baço.

Com a análise de biópsia de 992 cães com diagnóstico clínico de linfoma, VALLI et al. (2013) concluiu que o diagnóstico histopatológico do linfoma canino é fundamental, sendo que o diagnóstico específico direciona para o protocolo quimioterápico apropriado, levando em consideração que o linfoma na espécie canina é incurável e visa somente a remissão da doença com qualidade de vida (MARCONATO et al. 2014). VALLI et al. (2013) reinterpreta que é possível o

diagnóstico de linfoma canino por meio de exame citológico, mas que ainda não foi descrito o diagnóstico específico e subtipo do linfoma canino por meio do método de citologia aspirativa.

O presente estudo propõe a comparação entre os métodos de citologia em esfregaço seco e de citologia em meio líquido e a análise imunocitoquímica neste método, sendo esse último um recurso diagnóstico pouco explorado na medicina veterinária. A proposta da imunocitoquímica neste estudo é a avaliação da imunofenotipagem do linfoma canino e sob o nosso conhecimento e até o presente momento, essa técnica em meio líquido ainda não foi descrita.

A imunocitoquímica foi demonstrada por alguns autores, FISHER et al. (1995), por exemplo, comparou a avaliação citológica por meio de citospin e histológica de 11 pacientes caninos com linfadenopatia periférica sem avaliar a imunofenotipagem das amostras. O objetivo foi comparar qual antígeno teria marcação positiva ou negativa nos dois métodos, concluindo que a imunofenotipagem pode ser realizada por meio de citocentrifugação do aspirado de linfonodos.

No estudo de CANIATTI et al. (1996), 18 amostras de linfomas caninos foram preparadas em citoespin e submetidas a imunocitoquímica e o resultado obtido demonstrou uma nova opção para o método de imunofenotipagem do linfoma canino.

Por meio do estudo de FERNANDES et al. (2016), 18 amostras de aspirado de linfonodo canino foram analisadas e comparadas em esfregaço citológico e citologia em meio líquido, demonstrando que a segunda técnica possibilita melhor citomorfologia na visualização e análise das lâminas. O mesmo estudo realizou a imunocitoquímica em cellblock para imunofenotipagem de linfoma canino de origem

de célula B e célula T, propondo a introdução da citologia em meio líquido na medicina veterinária como alternativa no diagnóstico do linfoma canino.

No presente estudo, a imunofenotipagem entre linfomas de origem de célula B e célula T foi observada como também a divisão dos subgrupos de linfoma de origem de célula B em células de centro germinativo e células ativadas. Dentre as 25 amostras analisadas, 6 foram inconclusivas por diferentes motivos, tais como pouca celularidade ou expressão positiva ou negativa para todos os anticorpos testados. Quatro (4) amostras sugerem linfomas de célula B de origem de centro germinativo, 14 amostras sugerem linfomas de célula B de células ativadas e 1 amostra sugere linfoma de célula T. Foi demonstrado o painel para diagnóstico do linfoma canino de origem de células B ativadas (Figura 14). A incidência maior de linfoma de célula B na espécie canina já foi descrita anteriormente (PONCE et al. 2010; VALLI et al. 2011).

De acordo com POGGI et al. (2015), a citologia aspirativa de linfonodo é um método bem definido e uma ferramenta de diagnóstica muito utilizada no linfoma canino por ser rápida, minimamente invasiva e de baixo custo. Assim, a proposta do estudo foi criar um método novo e mais econômico para a imunofenotipagem e subclassificação do linfoma canino aplicável a rotina, analisando suas vantagens e desvantagens.

Além da imunoistoquímica, a citometria de fluxo (FC) vem apresentando bons resultados para a imunofenotipagem do linfoma canino. Sendo um método minimamente invasivo, mas com custo mais elevado, a FC se mostra uma opção para a imunofetipagem do linfoma. O acesso restrito à técnica e a necessidade de

processamento em até 24h da data da coleta da amostra (COMAZZI e GELAIN 2011) é uma das desvantagens da técnica.

A proposta inicial do estudo foi processar automaticamente as reações de imunocitoquímica com um painel mais amplo para a subclassificação do linfoma de célula B, baseado no algoritmo de Hans já citado anteriormente. O planejamento inicial foi avaliar 2 anticorpos por amostra seguindo o seguinte painel: CD20, CD10, bcl-6 e MUM-1. As reações iniciais imunocitoquímicas realizadas não expressaram CD20 e bcl-6 e, assim, esses anticorpos foram excluídos do estudo. Com o número reduzido de amostras, foi optado por se realizar 4 reações por lâmina por meio da técnica de reação manual para melhor definir o painel imunocitoquímico e avaliar a técnica proposta.

O anticorpo monoclonal CD20, clone EP459Y da Abcam foi selecionado na etapa inicial do estudo para a avaliação dos linfócitos de origem de célula B nas amostras selecionadas. As reações de imunocitoquímica foram realizadas na forma automatizada e manual e ambas não apresentaram padrão de marcação para o anticorpo testado, sendo assim, o anticorpo anti-CD20 foi substituindo pelo anticorpo anti-CD79A no painel imunocitoquímico deste estudo.

A proteína MUM-1 é membro da família de fatores reguladores de interferon dos fatores de transcrição que são envolvidos em vários aspectos da hematopoiese e especialmente na diferenciação de linfócitos B em células plasmáticas (KOL et al. 2013). MUM-1 é expressa em uma grande parte das células B de centro germinativo, células plasmáticas, células T ativadas e em grande parte dos macrófagos e células dendríticas (RAMOS-VARA et al. 2007). Anticorpos anti-MUM-1 são usados como

parte do painel imunoistoquímico para determinar neoplasias de origem de célula B na medicina humana (RAMOS-VARA et al. 2007).

Com base nos resultados deste estudo pode-se futuramente avaliar o fator prognóstico dos subgrupos do linfoma canino de célula B. FRANTZ et al. (2013) analisou a expressão gênica de 35 amostras de pacientes caninos com linfoma e demonstrou ao menos 3 subgrupos moleculares com prognósticos distintos, mas não se encontrou relação significativa com a expressão gênica determinante para os subgrupos de CCG e CA como no linfoma humano.

Assim, temos que a técnica de citologia em meio líquido de aspirado de linfonodo pode ser uma alternativa viável para o diagnóstico do linfoma canino. A imunofenotipagem e a subclassificação do linfoma de origem de célula B também se mostrou uma opção viável, porém com algumas dificuldades como a pouca celularidade na amostra e a expressão fraca de alguns marcadores. A possibilidade de armazenamento da mesma amostra para testes futuros e a melhor visualização da citomorfologia são vantagens deste método.

A associação do método proposto neste estudo com o método em técnica de cellblock proposto por FERNANDES et al. (2016) pode ser uma opção de estudo prognóstico futuro para o linfoma da espécie canina.

7 CONCLUSÕES

1. A citologia em meio é um método alternativo e viável para o diagnóstico citológico do linfoma na espécie canina, embora melhoras técnicas tenham que ser implementadas no sentido de melhor representatividade do material e melhor definição da imunofenotipagem
2. A imunofenotipagem com os anticorpos CD79a, CD3, CD10 e MUM-1 mostrou-se possível em citologia no meio líquido. O anticorpo CD20 não se mostrou adequado pela técnica testada.
3. A maioria dos LDGCB estudados nesta amostra foi com o perfil de células B ativadas definido pela expressão de MUM1

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abedi-Ardekani B, Vielh P. Is liquid-based cytology the magic bullet for performing molecular techniques? **ActaCytol** 2014; 58:574-81.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature** 2000; 403:503-11.

Amores-Fuster I, Cripps P, Graham P, Marrington AM, Blackwood L. The diagnostic utility of lymph node cytology samples in dogs and cats. **J Small AnimPract** 2015; 56:125-9.

Aresu L, Martini V, Rossi F, et al. Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. **Vet Comp Oncol** 2015; 13:348-62.

Aresu L. Canine lymphoma, more than a morphological diagnosis: what we have learned about diffuse large B-cell lymphoma. **Front Vet Sci** 2016;3:77.

Bienzle D, Vernau W. The diagnostic assessment of canine lymphoma: implications for treatment. **Clin Lab Med** 2011; 31:21-39.

Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. **Vet Pathol** 1996; 33:204-12.

Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. **Clin Cancer Res** 2009; 15:5494-502.

Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometricimmunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. **Vet J** 2011; 188:149-55.

Comazzi S, Guscetti F, Marconato L. First meeting of the European canine lymphoma group Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma CH-Lugano, 22 June 2013. **Hematol Oncol** 2014; 32:68-71.

Fernandes NC, Guerra JM, Réssio RA, et al. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. **Vet Comp Oncol** 2016;14 Suppl 1:107-16.

Fisher DJ, Naydan D, Werner LL, Moore PF. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples. **Vet Clin Pathol** 1995; 24:118-23.

Fleming JM, Creevy KE, Promislow DE. Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. **J Vet Intern Med** 2011; 25:187-98.

Frantz AM, Sarver AL, Ito D, et al. Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. **Vet Pathol** 2013; 50:693-703.

Gamlem H, Nordstoga K, Glatte E. Canine neoplasia--introductory paper. **APMIS Suppl** 2008; (125):5-18.

Getty R. Sistema linfático em geral. Rosenbaun CE, Ghoshal NG, Hillmann D, editors. **Anatomia dos animais domésticos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1975. p.163-7.

Habineza Ndikuyeze G, Gaurnier-Hausser A, Patel R, et al. A phase I clinical trial of systemically delivered NEMO binding domain peptide in dogs with spontaneous activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma. **PLoS One** 2014; 9:e95404.

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood** 2004; 103:275-82.

Hong L, Wang X, Huang Z, Cheng L, Wang J. Histiocytic necrotizing lymphadenitis diagnosed by conventional cytology and liquid based cytology. **Int J ClinExpPathol** 2014; 7:6186-90.

[IBGE] IN Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde**. 2013. Disponível em: <URL:<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>>[2017 fev 17].

Imura J, Abe K, Uchida Y, Shibata M, et al. Introduction and utility of liquid-based cytology on aspiration biopsy of peripheral nodular lesions of the lung. **OncolLett** 2014; 7:669-73.

Ito D, Endicott MM, Jubala CM, et al. A tumor-related lymphoid progenitor population supports hierarchical tumor organization in canine B-cell lymphoma. **J Vet Intern Med** 2011; 25:890-6.

Ito D, Frantz AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. **Vet Immunol Immunopathol** 2014; 159:192-201.

Ito D, Brewer S, Modiano JF, Beall MJ. Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential. **Leuk Lymphoma** 2015; 56:219-25.

Kimura KC, de Almeida Zanini D, Nishiya AT, Dagli ML. Domestic animals as sentinels for environmental carcinogenic agents. **BMC Proc** 2013; 7 Suppl 2:K13.

Koffman B. **What is a lymph node: the CLL Tribune 2015; Q4 1.** Available from: <URL:<http://www.cllsociety.org/newsletter/quarter-4-2015-volume-1-issue-2/what-is-a-lymph-node>> [2017 ago 17]

Kol A, Christopher MM, Skorupski KA, Tokarz D, Vernau W. B-cell lymphoma with plasmacytoid differentiation, atypical cytoplasmic inclusions, and secondary leukemia in a dog. **Vet Clin Pathol** 2013; 42:40-6.

Komazawa S, Sakai H, Itoh Y, et al. Canine tumor development and crude incidence of tumors by breed based on domestic dogs in Gifu prefecture. **J Vet Med Sci** 2016; 78:1269-75.

Konofaos P, Tomos P, Malagari K, et al. The role of ThinPrep cytology in the investigation of lung tumors. **Surg Oncol** 2006; 15:173-8.

Ku CK, Kass PH, Christopher MM. Cytologic-histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. **Vet Comp Oncol** 2017; 15:1206-17.

Liu W, Selçuk F, Rütgen BC, et al. Evaluation of stem cell marker expression in canine B-cell lymphoma cell lines, B-cell lymphoma-generated spheres and primary samples. **Anticancer Res** 2015; 35:2805-16.

Marconato L, Frayssinet P, Rouquet N, et al. Randomized, placebo-controlled, double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma. **Clin Cancer Res** 2014; 20:668-77.

Marconato L, Polton GA, Sabattini S, et al. European Canine Lymphoma Network. Conformity and controversies in the diagnosis, staging and follow-up evaluation of canine nodal lymphoma: a systematic review of the last 15 years of published literature. **Vet Comp Oncol** 2017; 15:1029-40.

Moore AS. Treatment of T cell lymphoma in dogs. **Vet Rec** 2016;179:277.

Mudaliar MA, Haggart RD, Miele G, et al. Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF- κ B activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). **PLoS One** 2013; 8:e72591.

Munasinghe LI, Kidney BA, MacDonald-Dickinson V, et al. Evaluation of lymph node aspirates at diagnosis and relapse in dogs with high-grade multicentric lymphoma and comparison with survival time. **Vet Clin Pathol** 2015; 44:310-9.

Mutz M, Boudreaux B, Kearney M, et al. Prognostic value of baseline absolute lymphocyte concentration and neutrophil/lymphocyte ratio in dogs with newly diagnosed multi-centric lymphoma. **Vet Comp Oncol** 2015; 13:337-47.

O'Neill DG, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC. Longevity and mortality of owned dogs in England. **Vet J** 2013; 198:638-43.

Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gärtner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Transl Res** 2012; 159:165-72.

Poggi A, Miniscalco B, Morello E, et al. Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. **Vet Comp Oncol** 2015; 13:475-80.

Ponce F, Marchal T, Magnol JP, et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Vet Pathol** 2010; 47:414-33.

Ramos-Vara JA, Miller MA, Valli VE. Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79a and CD20. **Vet Pathol** 2007; 44:875-84.

Regan RC, Kaplan MS, Bailey DB. Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians. **Vet Comp Oncol** 2013; 11:287-95.

Richards KL, Motsinger-Reif AA, Chen HW, et al. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. **Cancer Res** 2013; 73:5029-39.

Richards KL, Suter SE. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? **Immunol Rev** 2015; 263:173-91.

Rütgen BC, Hammer SE, Gerner W, et al. Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. **Leuk Res** 2010; 34:932-8.

Sapierzyński R, Dolka I, Fabisiak M. High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. **Pol J Vet Sci** 2012; 15:247-52.

Sapierzyński R, Kliczkowska-Klarowicz K, Jankowska U, Jagielski D. Cytodiagnosics of canine lymphomas - possibilities and limitations. **Pol J Vet Sci** 2016; 19:433-9.

Sato M, Kanemoto H, Kagawa Y, et al. Evaluation of the prognostic significance of BCL6 gene expression in canine high-grade B-cell lymphoma. **Vet J** 2012; 191:108-14.

Sawa M, Yabuki A, Setoguchi A, Yamato O. Development and application of multiple immunofluorescence staining for diagnostic cytology of canine and feline lymphoma. **Vet Clin Pathol** 2015; 44:580-5.

Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2015; 370(1673).

Sözmen M, Tasca S, Carli E, De Lorenzi D, Furlanello T, Caldin M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. **J Vet Diagn Invest** 2005; 17:323-30.

Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. **Lancet** 1988; 1:292-3

Starkey MP, Murphy S. Using lymph node fine needle aspirates for gene expression profiling of canine lymphoma. **Vet Comp Oncol** 2010;8:56-71.

Suami H, Yamashita S, Soto-Miranda MA, Chang DW. Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. **PLoS One** 2013; 8:e69222.

Sueiro FA, Alessi AC, Vassallo J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **J Comp Pathol** 2004;131: 207-13.

Tedardi MV, Veneziano DB, Kimura KC, et al. Sao Paulo Animal Cancer Registry, the first in Latin America. **Vet Comp Oncol** 2015; 13:154-5.

Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE, Suter SE. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. **J Vet Intern Med** 2013; 27:1509-16.

Valli VE, San Myint M, Barthel A, et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. **Vet Pathol** 2011; 48:198-211.

Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. **Vet Pathol** 2013; 50:738-48.

Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. **Vet Comp Oncol** 2010; 8:38-49.

Withrow SJ, Vail DM, Page RL. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 5th ed. Sant Louis, Missouri: Elsevier; 2013a. Molecular diagnostics; p.131-42.

Withrow SJ, Vail DM, Page RL. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 5th ed. Sant Louis, Missouri USA: Elsevier; 2013b. Hematopoietic tumors; p.608-678.

Zandvliet M. Canine lymphoma: a review. **Vet Q** 2016; 36:76-104.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais (CEUA-UNISA)



PARECER N.º 18 /2015

REGISTRO CEP UNISA N.º 104 /2015 – PROJETO DE PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Linfoma de Células B na espécie canina, estudo propondo um novo método diagnóstico para imunofenotipagem e estadiamento clínico.

**Pesquisadores Responsáveis: Cláudia Prado de Brito
Renata Andréa Setti**

Curso: Mestrado

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

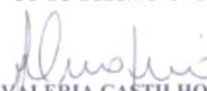
O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), esta de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca) que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, manifestando-se pela **APROVAÇÃO** do Projeto “**Linfoma de Células B na espécie canina, estudo propondo um novo método diagnóstico para imunofenotipagem e estadiamento clínico**”.

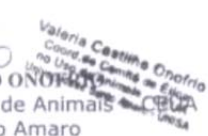
* Trocar nome do coordenador para o da Profa. Claudia Brito – Formulário Registro de Pesquisa II

*** Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

- Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.
- Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia informada no Projeto de Pesquisa.

São Paulo, 16 de dezembro de 2015.


PROFA. DRA. VALÉRIA CASTILHO ONOFRE
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais
UNISA - Universidade de Santo Amaro



Anexo 2 - Quadro da classificação de Kiel modificada para os linfomas de Non-Hodgkins.

Linfoma Célula B	Linfoma Célula T
Baixo grau Linfocítico - Linfocítico crônico e leucemia prolinfocítica; leucemia de células pilosas Linfoplasmocítico Plasmocítico Centroblástico/Centrocítico Alto Grau Centroblástico Imunoblástico Anaplásico de grandes células Linfoma de Burkitt Linfoblástico	Baixo grau Linfocítico – linfocítico crônico e leucemia prolinfocítica Linfoepiteliotrópico Angioimunoblástico Zona T Pleomórfico, pequenas células Alto Grau Pleomórfico, médio e grandes células Imunoblástico Anaplásico de grandes células Linfoblástico

Fonte: Adaptado de STANSFELD et al. (1988).

Anexo 3 - Quadro da relação dos 25 casos analisados

	Raça	Idade	Sexo	Fenotipagem	Estadiamento
1	Cocker Spaniel	15	F	Cél B A	IV
2	Bichon Frisé	12	F	Cél B A	IV
3	S.R.D.	10	M	inconclusivo	III
4	Yorkshire	14	F	Cél B A	I
5	Beagle	10	M	Cél T	IV
6	Lhasa Apso	16	F	Cél B A	III
7	S.R.D.	11	F	Cél B A	III
8	Beagle	10	M	inconclusivo	III
9	SRD	12	M	Cél B A	III
10	Labrador	9	M	Cél B A	IV
11	Pit Bull	7	M	Cél B CG	IV
12	SRD	9	F	inconclusivo	II
13	Poodle	10	M	Cél B A	IV
14	Shi Tzu	12	M	Cél B CG	V
15	Beagle	11	F	Cél B A	IV
16	Border Collie	9	F	inconclusivo	III
17	SRD	8	M	Cél B A	IV
18	Maltês	7	F	Cél B A	IV
19	Lhasa Apso	10	M	Cél B A	IV
20	SRD	13	F	Cél B A	III
21	Cocker Spaniel	9	M	inconclusivo	IV
22	Golden	7	M	inconclusivo	IV
23	Lhasa Apso	6	M	Cél B CG	IV
24	SRD	10	F	Cél B A	III
25	SRD	8	F	Cél B CG	IV