

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Marcella Procópio Valle Couto

**LINFOMA CUTÂNEO CANINO: ASPECTOS CITOLÓGICOS, DE CLONALIDADE E
TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA**

Belo Horizonte

2025

Marcella Procópio Valle Couto

**LINFOMA CUTÂNEO CANINO: ASPECTOS CITOLÓGICOS, DE CLONALIDADE E
TEMPO DE SOBREVIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes

Coorientadores: Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Horta, Dra. Mariana de Pádua Costa

Belo Horizonte

2025

Couto, Marcella Procópio Valle ,1998-

C8711 *Linfoma cutâneo canino: Aspectos citológicos, de clonalidade e tempo de sobrevida*
/ Marcella Procópio Valle Couto.-2025.
51f.: il

Orientador: Ricardo de Oliveira Paes

Coorientadores: Mariana de Pádua Costa

Rodrigo dos Santos Horta

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Inclui Bibliografia

1. Cães - Teses - 2. Doenças - Teses – I. Paes, Ricardo de Oliveira. II. Costa, Mariana de Pádua. – III Horta, Rodrigo dos Santos. – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELLA PROCÓPIO VALLE COUTO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada: "**Linfoma cutâneo e inflamação linfocítica caninas: aspectos citológicos, de clonalidade no PCR PARR e tempo de sobrevida.**"

Aprovado(a) em 14 de fevereiro de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Paulo Ricardo de Oliveira Paes - Orientador(a)
Dr.(a). Fabíola de Oliveira Paes Leme
Dr.(a). Flávio Herberg de Alonso



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Ricardo de Oliveira Paes, Professor do Magistério Superior**, em 17/02/2025, às 13:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 17/02/2025, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Herberg de Alonso, Usuário Externo**, em 18/02/2025, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3964663** e o código CRC **96CAD71C**.

AGRADECIMENTOS

Não posso começar a minha lista de agradecimentos diferente do que primeiro agradecendo minha família. Obrigada pelo apoio, mesmo por muitas vezes não fazendo a mínima ideia do que eu estava fazendo, e pelas palavras de conforto que sempre me acalmam.

Gustavo, agradeço a companhia, por sempre tornar meus momentos fora da universidade os melhores possíveis e por me aguentar sempre quando alguma coisa me deixava fora do eixo.

Aos meus amigos, divido a vida com vocês desde sempre e não seria em um momento tão importante como esse que vocês ficariam de fora. Eu juro que o prêmio de maior crânio do ano vai ser honrado!

Professor Paulo, agradeço primeiramente por ter compartilhado a arte da citologia, a qual mais do que ter me dado uma profissão, me traz imensa alegria. Não poderia deixar de citar o seu amor pelo (melhor) time de futebol do Brasil, e principalmente a sua humildade (não professor, não esqueci disso!). Saiba que vou levar sempre comigo, além dos seus ensinamentos de citologia, seus ensinamentos de vida.

Professora Fabíola, que me faz ter a plena consciência de que de fato não existe ex-mãe, obrigada por nos carregar no colo com palavras e ações certas em diversos momentos. Seu companheirismo me faz sempre querer ser uma pessoa melhor. Obrigada também por ser a pessoa que podemos contar em momentos de desespero patológicos.

Por fim, agradeço aos meus amigos de residência e mestrado, dividir a jornada com vocês tornou e torna tudo muito mais fácil e divertido!

RESUMO

O linfoma é uma neoplasia de linfócitos que representa cerca de 90% das neoplasias hematopoiéticas caninas. Quando se manifesta na derme, é denominado linfoma cutâneo, e corresponde a 13% dos casos de linfoma canino. Não foram encontrados estudos sobre a utilização da citologia no diagnóstico do linfoma cutâneo. O presente estudo avaliou as características clínicas e citológicas do linfoma e inflamações linfocíticas cutâneas em cães. Para tal, foram reavaliadas 40 amostras citológicas, sendo 28 com resultado citológico prévio de amostras sugestivas/compatíveis com linfoma cutâneo, três de amostras sugestivas/compatíveis com inflamação linfocítica e nove de amostras não conclusivas para inflamação linfocítica ou linfoma cutâneo. No exame de PARR, considerando todas as amostras, 73% resultaram em proliferação monoclonal e 28% em proliferação policlonal. Após comparação estatística entre o linfoma e a inflamação, as características clínicas mais associadas ao linfoma foram idade dos animais (mediana de 106 meses no linfoma x 29 meses nos casos de inflamação; $p = 0,0034$) e tamanho dos nódulos (5,0 x 1,5 cm; $p = 0,0013$). As características citológicas mais associadas ao linfoma foram nucléolos visíveis únicos/múltiplos ($p = 0,0195$), basofilia citoplasmática intensa ($p = 0,0080$) e maior concentração de figuras de mitose ($p = 0,0372$), além de fundo de lâmina basofílico ($p = 0,0289$) com maior concentração de vacúolos de gordura ($p = 0,0197$). Dos animais com linfoma, 52% foram submetidos à tratamento quimioterápico. A mediana de sobrevida desses animais foi de 60 dias. Nos animais sem tratamento quimioterápico a mediana de sobrevida foi de 28 dias. Nos animais submetidos à cirurgia a mediana de sobrevida foi de 148 dias. No total, a mediana de sobrevida foi de 52 dias. Conclui-se que o linfoma cutâneo canino apresenta menor sobrevida que o descrito na literatura e que a citologia, aliada às informações clínicas, é um método eficiente para diagnóstico, sendo necessário aprofundar o estudo das características celulares e seu impacto no comportamento biológico da doença.

Palavras- Chave: Cães; linfócitos; diagnóstico; neoplasia; citologia.

ABSTRACT

Lymphoma is a lymphocyte neoplasm that accounts for nearly 90% of all hematopoietic neoplasms. When it affects the dermis, it is classified as cutaneous lymphoma, representing 13% of all cases. No studies were found regarding the use of cytology in diagnosing cutaneous lymphoma. This study evaluates clinical and cytological characteristics of cutaneous lymphoma and lymphocytic inflammation in dogs. A total of 40 cytological samples were reevaluated: 28 with a prior cytological result or findings suggestive/compatible with cutaneous lymphoma, three suggestive/compatible with lymphocytic inflammation, and nine inconclusive for both conditions. PARR analysis of all samples revealed monoclonal proliferation in 73% and polyclonal proliferation in 28% of samples. Clinically, cutaneous lymphoma was significantly associated with older age (median: 106 months vs. 29 months in inflammation; $p = 0.0034$) and larger nodule size (5.0 cm vs. 1.5 cm; $p = 0.0013$). Cytological features most associated with cutaneous lymphoma included prominent nucleoli ($p = 0.0195$), intense cytoplasmic basophilia ($p = 0.0080$), increased mitotic figures ($p = 0.0372$), basophilic background ($p = 0.0289$), and higher fat vacuole concentration ($p = 0.0197$). Among lymphoma cases, 52% underwent chemotherapy, with a median survival of 60 days. Untreated dogs had a median survival of 28 days, while those undergoing surgery survived a median of 148 days. Overall, the median survival was 52 days. In conclusion, cutaneous lymphoma in dogs has a shorter survival time than previously reported. Cytology, when combined with clinical data, is a valuable diagnostic tool. Further studies are needed to assess cellular characteristics and their impact on disease behavior.

Key words: Dogs; lymphocytes; diagnosis; neoplasia; cytology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Principais classificações do linfoma canino. 15
- Figura 2. Representação de células pequenas (seta amarela), médias (seta preta) e grandes (seta vermelha) segundo critérios de Valli *et al.* (2017) na citologia de linfoma cutâneo canino. 32
- Figura 3. Proporção de animais vivos dentro de cada grupo de score de tamanho celular observado no exame citológico de cães portadores de linfoma cutâneo. 43

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Marcadores fenotípicos de interesse para o diagnóstico de linfoma cutâneo em cães. 18
- Quadro 2. Classificação do tamanho de linfócito quando comparado ao tamanho de uma hemácia canina. 21
- Quadro 3. Índice mitótico (IM) de acordo com a quantidade de mitoses por campo (cp) nas objetivas de 40x e 50x. 21
- Quadro 4. Características clínicas e citológicas do linfoma cutâneo em cães, de acordo com Azuma *et al.* (2022) e Mazaro *et al.* (2023). 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas da inflamação linfocítica cutânea canina, diagnosticadas por meio de citologia, PARR e histopatologia.	34
Tabela 2: Características de amostras citológicas de inflamação linfocítica canina.	34
Tabela 3: Características clínicas de cães portadores de linfoma cutâneo diagnosticado por meio de citologia, PARR e histopatologia.	36
Tabela 4: Características clínicas dos pacientes e histórico clínico dos casos com diagnóstico citológico de linfoma cutâneo canino e resultado policlonal no PARR.	37
Tabela 5: Característica de fundo de lâmina e celulares de amostras citológicas com diagnóstico molecular de linfoma cutâneo canino.	39
Tabela 6: Característica de fundo de lâmina e celulares dos casos com sugestão citológica de linfoma cutâneo canino e resultado policlonal no PARR.	40
Tabela 7: Comparações de características clínicas encontradas em cães diagnosticados com inflamação linfocítica e linfoma cutâneo na análise citológica e PARR.	41
Tabela 8: Comparações de características citológicas de cães diagnosticados com inflamação linfocítica e linfoma cutâneo na análise citológica e PARR.	41
Tabela 9: Média, desvio padrão e mediana de dias de sobrevida de 27 casos de linfoma cutâneo canino de acordo com o tamanho celular predominante na amostra citológica.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Marcador de Superfície (<i>cluster of differentiation</i>)
CP	Campo
GG	Grupo grandes
GM	Grupo médios
GMG	Grupo médios grandes
GP	Grupo pequenos
GPM	Grupo pequenos médios
GPMG	Grupo pequenos médios e grandes
HV-UFMG	Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
IHQ	Imuno-histoquímica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARR	PCR de Rearranjo de Receptor de Antígeno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Linfócitos e Linfoma	13
2.2 Patogenia, Apresentações e Diagnóstico do Linfoma Cutâneo	15
2.3 Epidemiologia	18
2.4 Métodos de Classificação dos Linfócitos e Prognóstico	19
2.5 Referências	22
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. ARTIGO (LINFOMA CUTÂNEO CANINO: ASPECTOS CITOLÓGICOS, DE CLONALIDADE E TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA)	28
Resumo	28
4.1 Introdução	29
4.2 Material e Métodos	30
4.2.1 Casos Clínicos	30
4.2.2 Avaliação Morfológica na Citologia	31
4.2.3 Determinação da Clonalidade e Imunofenótipo	32
4.2.4 Histopatologia	32
4.2.5 Análise Estatística	33
4.3 Resultados	33
4.4 Discussão	43
4.5 Referências Bibliográficas	47

1. INTRODUÇÃO

O linfoma, anteriormente conhecido como linfossarcoma ou linfoma maligno, é uma neoplasia causada pela mutação e proliferação clonal de linfócitos. Dada a contínua migração dessas células aos diferentes tecidos, o desenvolvimento do linfoma pode se dar em qualquer órgão do corpo. Não obstante, há uma maior ocorrência da neoplasia nos órgãos linfoides, como linfonodo, medula óssea e baço (Calazans *et al.*, 2016). Nos cães, a localização anatômica mais comum é a que acomete os linfonodos palpáveis no exame semiológico, como poplíteo e submandibular. Esse linfoma, denominado multicêntrico, representa aproximadamente $\frac{3}{4}$ dos linfomas caninos (Vail *et al.*, 2013).

Os linfomas multicêntricos podem ter um comportamento biológico agressivo, como no caso do linfoma de grandes células B, linfoma de células T periféricas não especificado e linfoma linfoblástico; ou um comportamento biológico indolente, como no caso do linfoma de zona T e linfoma de zona marginal (Valli *et al.*, 2013).

Quando apenas a pele está acometida, a neoplasia é denominada linfoma cutâneo (Vermeer, 2021). Em cães, essa localização anatômica é a segunda mais comum, representando de 10 a 15% dos linfomas da espécie (Comazzi; MacNeil, 2017). Geralmente, de acordo com o grau de invasão da epiderme observada no exame histopatológico, o linfoma cutâneo é classificado como epiteliotrópico ou não epiteliotrópico (Vezzali, 2009). Alguns estudos têm demonstrado um comportamento mais agressivo para a forma epiteliotrópica (Azuma *et al.*, 2022).

Apesar do exame histopatológico ser o teste ouro para o diagnóstico do linfoma cutâneo, associado ou não à testes complementares, como a imuno-histoquímica (IHQ), o diagnóstico inicial da neoplasia em cães geralmente é obtido por meio do exame citológico. A citologia, por ser pouco invasiva e de resultado rápido e econômico, frequentemente é o único exame realizado na rotina veterinária para o diagnóstico do linfoma cutâneo. Isso ocorre tanto por questão de custo, quanto pela frequente impossibilidade do animal ser submetido à anestesia para coleta de amostra histopatológica (Ipek; Cangul; Akkoc, 2021). Apesar disso, não foi encontrado na literatura nenhum estudo associando as características da citologia com o comportamento do linfoma cutâneo canino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfócitos e Linfoma

Os linfócitos são leucócitos, que apresentam como principal função atuar no sistema de defesa do organismo. Animais com deficiência dessas células tem como principal consequência a redução da habilidade de evitar doenças por meio da imunidade celular e humoral (Day, 2010).

Essas células podem ser subdivididas em três populações distintas, denominadas a partir da presença de imunoglobulinas e marcadores de superfície (CDs, do inglês *cluster of differentiation*). A primeira população, composta pelos linfócitos B, é responsável pela promoção da imunidade humoral, a partir da produção de anticorpos. Na segunda, os linfócitos T atuam na imunidade celular por meio de produção de citocinas. Os linfócitos T são compostos por dois tipos celulares: células T-indutoras (CD4+) e células T-citotóxicas (CD8+). O terceiro grupo, composto por células nulas, isto é, não positivas para B ou T, incluem principalmente os linfócitos *natural killers* (células-NK) e os grandes linfócitos granulares (Weiser, 2015). As células linfoides apresentam um precursor medular comum, entretanto, a maturação das células designadas a se tornarem linfócitos B ocorre basicamente na própria medula óssea, enquanto a maturação das células destinadas a linfócitos T ocorre principalmente no timo e placas de Peyer (Stockham e Scott, 2011).

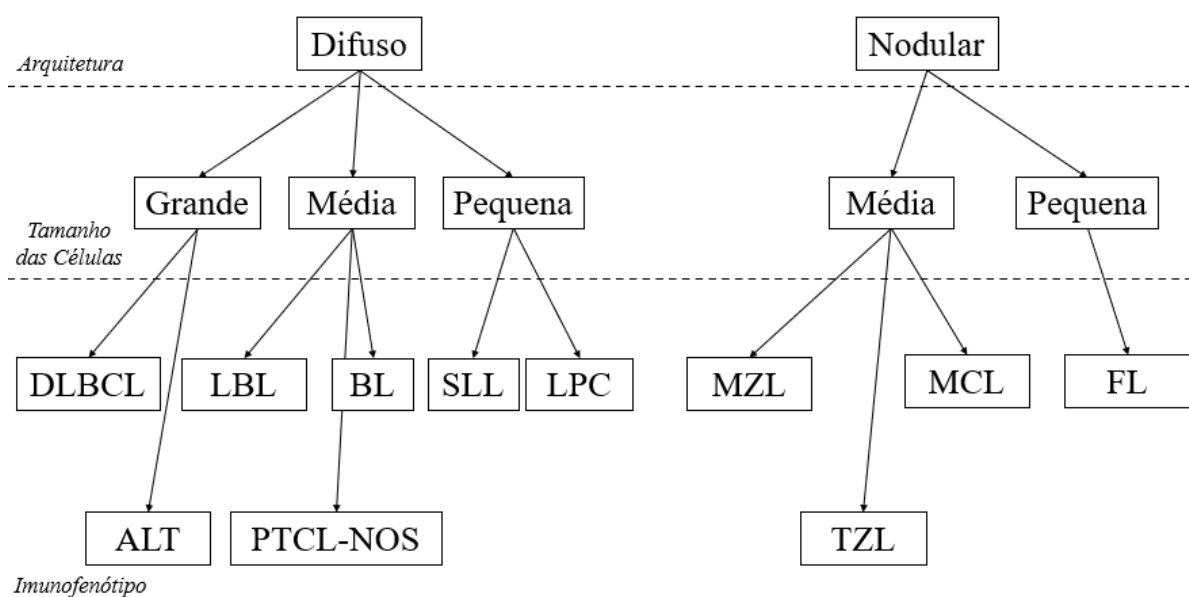
Diversas condições podem provocar alterações nas concentrações sanguíneas dos linfócitos. A concentração acima dos valores de referência para a espécie, denominada linfocitose, pode ser causada por vários fatores, que incluem processos fisiológicos (liberação de catecolamina em resposta a situações de estresse agudo), inflamação crônica, neoplasia linfoide (linfoma/leucemia) e hipoadrenocorticismo. Já a concentração abaixo dos valores de referência, denominada linfopenia, pode ocorrer em situações de inflamação aguda, excesso de glicocorticoide endógeno ou exógeno, depleção celular em efusões cavitárias linfoides, e aplasia ou hipoplasia linfoide (Stockham e Scott, 2011).

A mutação e proliferação de linfócitos neoplásicos resulta no desenvolvimento da neoplasia maligna denominada linfoma, que pode ocorrer em praticamente todo órgão do corpo. O linfoma corresponde a um grupo heterogêneo e relacionado, apesar de distinto, representando uma das neoplasias mais comuns, tanto na medicina

veterinária, quanto na humana (Krapcho *et al.*, 2015). Apesar da incidência de neoplasias caninas serem subdiagnosticadas, o linfoma é reconhecidamente a neoplasia hematopoética mais comum, representando aproximadamente 90% dos casos (que incluem as leucemias e mastocitose, histiocitoses e plasmocitoses sistêmicas), e 6% de todas as neoplasias da espécie canina, sendo uma das três neoplasias mais frequentes (Dorn *et al.*, 1996; Seelig *et al.*, 2016).

Quando ocorre em órgãos linfoides, a denominação do linfoma se dá a partir da separação de diretrizes reprodutíveis e com relevância clínica. A classificação, feita a partir dos achados em humanos, segue as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS). Nessa classificação os linfomas são definidos de acordo com a citomorfologia, imunofenótipo e características genéticas, moleculares e clínicas (Campo *et al.*, 2011).

Na histopatologia, três fatores principais determinam a classificação do linfoma: 1- arquitetura do tumor; 2- morfologia das células (tamanho, forma, alterações nucleares e citoplasmáticas) e; 3- atividade mitótica (Serdlow *et al.*, 2008). Na arquitetura, os linfomas são classificados como difuso, quando toda ou quase toda arquitetura do linfonodo é afetada pelas células neoplásicas, ou nodular/folicular, quando o infiltrado neoplásico é organizado de forma a imitar ou poupar alguma porção do tecido original. As células são então classificadas pelo tamanho (pequenas, médias ou grandes) e características nucleares e citoplasmáticas. Por fim, pode-se avaliar a proliferação celular por meio do índice mitótico, que determina a quantidade de figuras de mitose em um número pré-definido de campos microscópicos. Para a classificação final da neoplasia, geralmente é necessária a determinação do imunofenótipo do linfoma, realizada por meio de testes de IHQ e/ou citometria de fluxo (Seelig *et al.*, 2016). As principais classificações de linfoma encontram-se sumarizadas na figura 1.



Do inglês: DLBCL – Linfoma Difuso de Grandes Células B; LBL – Linfoma Linfoblástico; BL – Linfoma Bukitt; SLL – Linfoma de Pequenas Células; LPC – Linfoma Linfoplasmocitoide; MZL – Linfoma de Zona Marginal; MCL – Linfoma de Células do Manto; FL – Linfoma Folicular; ALC – Linfoma Anaplásico de Grandes Células; PTCL-NOS – Linfoma de Células T Periféricas Inespecífico; TZL – Linfoma de Zona T. Fonte: Adaptado de Seelig *et al.* (2016).

Figura 1. Principais classificações do linfoma canino.

2.2 Patogenia, Apresentações e Diagnóstico do Linfoma Cutâneo

Quanto a localização, o linfoma mais comumente diagnosticado em cães é o linfoma multicêntrico, que atinge um ou mais linfonodos palpáveis ao exame físico, e representa aproximadamente 3/4 dos linfomas na espécie. A segunda localização mais comum de linfoma canino é a pele, que representa entre 10 e 15% da casuística da espécie (Vezzali *et al.*, 2009). O linfoma cutâneo ocorre a partir da infiltração e proliferação neoplásica de linfócitos B ou T em tecidos cutâneos, que pode ser apresentado como um processo neoplásico primário ou secundário à extensão do linfoma extra cutâneo multicêntrico (Watton *et al.*, 2021).

Na medicina veterinária, o diagnóstico inicial do linfoma geralmente é obtido por meio de exame citológico, que é um teste pouco invasivo, econômico e com resultado rápido. Entretanto, a citologia nem sempre é diagnóstica definitiva,

principalmente nos casos de linfoma multicêntrico indolente, como linfomas foliculares/nodulares e difusos de pequenos linfócitos, e linfomas cutâneos de pequenos linfócitos, que podem ser confundidos com inflamações linfocíticas. Nesses casos é imprescindível o uso de ferramentas diagnósticas adicionais, que incluem o PARR (PCR de Rearranjo de Receptor de Antígeno), a citometria de fluxo e o exame histopatológico com marcação IHQ (Ipek; Cangul; Akkoc, 2021).

O linfoma cutâneo é classificado como epiteliotrópico a partir do tropismo das células neoplásicas pela epiderme e/ou epitélio anexial e corresponde a uma neoplasia exclusiva de linfócitos T. Baseadas em evidências clínicas e histopatológicas, o linfoma epiteliotrópico pode ter três apresentações distintas: micose fungoide, síndrome de Sezary e reticulose pagetoide (Gilbert, 2004; Valli, 2013).

No exame histopatológico, a micose fungoide é caracterizada pela infiltração de linfócitos pequenos e médios na epiderme, sem disseminação sanguínea e com comportamento agressivo. Em lesões bem diferenciadas é possível perceber fendas na epiderme chamadas de micro abscesso de Pautrier, que compreende um aglomerado de células neoplásicas (Valli, 2016). Ainda não foi bem descrita a causa da micose fungoide, mas evidências sugerem que sua ocorrência se dá a partir de estimulação antigênica crônica originando mutação, proliferação e acúmulo de linfócitos T na pele. Esse estímulo sofre grande influência do microambiente da pele, que envolve células dendríticas, células T citotóxicas reativas (CD8+) e T reguladoras (CD4+). A doença, pode se iniciar como dermatite, progredindo para placas (Jawed *et al.*, 2014; Lobato *et al.*, 2021).

A síndrome de Sezary é reconhecida como uma evolução da micose fungoide, sendo diagnosticada quando existe a presença de células T neoplásicas na circulação sanguínea, além da presença de lesões cutâneas eritematosas e linfadenopatia periférica (Foss e Girardi, 2016; Valli, 2016; Lee *et al.*, 2021). Já a reticulose pagetoide é descrita como uma alteração cutânea linfoproliferativa que apresenta comportamento biológico indolente, porém, com potencial de disseminação. Diferente da classificação da medicina humana, que considera a reticulose pagetoide como uma variante da micose fungoide, na medicina veterinária a reticulose pagetoide é classificada como um tipo específico raro de linfoma cutâneo epiteliotrópico com curso

clínico indolente (Mazaro *et al.*, 2018). Os animais com reticulose pagetoide geralmente apresentam pápulas, nódulos ou placas solitárias eritematosas ou queratinócicas, podendo ou não estar ulceradas. Na histopatologia os linfócitos podem se apresentar restritos à epiderme e ao epitélio anexial, sem invasão da derme, mas a principal diferenciação dos linfomas epiteliotrópicos é clínica (Gross, 2005).

Diferentemente do linfoma epiteliotrópico, que é exclusivamente de células T, no linfoma não epiteliotrópico a origem pode ser em células B ou T. Sua identificação se dá a partir da presença de camadas e aglomerados de linfócitos neoplásicos principalmente na derme. A presença de leve infiltrado na epiderme pode ocorrer, entretanto sem afetar as estruturas anexas da pele, como ocorre no linfoma epiteliotrópico (Bosschere e Declercq, 2008; Fontaine, 2009; Hendrick, 2017). As lesões neoplásicas macroscopicamente podem variar e se apresentar como escamas generalizadas, placas ou nódulos (Cortina *et al.*, 2020). Na histopatologia, a aparência do linfoma não epiteliotrópico varia consideravelmente de acordo com a morfologia das células neoplásicas e do arranjo do tumor, gerando uma variedade de subtipos histológicos para a doença, sendo os mais comuns o linfoma anaplásico de grandes células T, linfoma de células T periféricas inespecífico, linfoma de células T semelhante a paniculite subcutânea e linfoma difuso de grandes células B (Kondo *et al.*, 2018; Noland *et al.*, 2018).

No exame histopatológico, o linfoma anaplásico de grandes células T é caracterizado por uma proliferação densa de linfócitos neoplásicos substituindo grande parte da derme e anexos cutâneos, podendo estar organizados em manto ou formando áreas nodulares a coesas (Jacobsen, 2006; Moodley *et al.*, 2019). O linfoma de células T semelhante a paniculite subcutânea e o linfoma difuso de grandes células B têm em comum a presença de uma população bem delimitada e densamente celular infiltrando e substituindo o tecido subcutâneo por meio de grandes lobos separados por feixes de colágeno, mas mantendo os espaços vazios dos adipócitos (Noland *et al.*, 2018; Mazaro *et al.*, 2023). O linfoma de células T periféricas inespecífico corresponde a um grupo heterogêneo de apresentações histológicas de todos aqueles linfomas que não puderam ser incluídos nas outras categorias (Cerroni, 2014).

Adicionalmente ao diagnóstico histopatológico, pode ser realizado o exame IHQ, que permite a localização e visualização de antígenos em cortes histológicos. Na

oncologia clínica, essa técnica permite a determinação do imunofenótipo das células neoplásicas, útil como fator prognóstico e, também, diagnóstico de neoplasias indiferenciadas (Fernandez *et al.*, 2005; Subapriya *et al.*, 2021). No quadro 1 estão representados os principais marcadores fenotípicos para o diagnóstico de linfoma em cães.

Quadro 1. Marcadores fenotípicos de interesse para o diagnóstico de linfoma cutâneo canino.

Marcador	Função
Vimentina	Marcador de células mesenquimais
CD45	Marcador de todas as células hematopoiéticas nucleadas
CD3	Marcador de células T
CD4	Marcador de superfície de células T indutoras
CD8	Marcador de superfície de células T citotóxicas
CD79a	Marcador de células B e plasmócitos
CD20	Marcador de células B e alguns plasmócitos.
Pax5	Marcador de células B

Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2016)

Outra técnica de diagnóstico que vem sendo amplamente utilizada consiste no PCR para ensaio de rearranjo de receptor de antígeno (PARR), que se baseia em uma ferramenta de base molecular com aplicações para o diagnóstico de linfomas e leucemias (Avery, 2009). Sua fundamentação se dá nos genes receptores de linfócitos normais que, ao realizarem rearranjo genético durante a maturação, apresentam sequências policlonais. Já os linfócitos neoplásicos descendem de apenas um único clone, o que faz com que os genes receptores apresentem a mesma sequência e tamanho. No exame PARR esses genes receptores são amplificados, com tecidos normais e reativos tendendo a formar bandas ou esfregaços policlonais após a eletroforese em gel, enquanto o linfoma tende a formar uma única banda, já que a maioria dos linfócitos presentes na amostra apresentam um gene de tamanho único gerado apenas de um único clone (Burnett *et al.*, 2003; Nowosh *et al.*, 2017). Em estudos, a sensibilidade do teste PARR para diagnóstico de linfoma canino foi de 74% (Thalheim *et al.*, 2013), 75% (Avery, 2009) e 91% (Burnett *et al.*, 2003).

2.3 Epidemiologia

Considerando todas as neoplasias cutâneas que acometem a espécie canina, o linfoma cutâneo é considerado uma neoplasia incomum (Ponce *et al.*, 2010; Houtana e Geine-Romanova, 2022). Em estudos retrospectivos, o linfoma representou de 0,2 a 2,4% dos casos de tumores cutâneos caninos (De Souza *et al.*, 2006; Villamil *et al.*,

2011; Kok *et al.*, 2019) e de 5 a 15% dos linfomas caninos (Ponce *et al.*, 2010; Houtana e Geine-Romanova, 2022).

Não existe consenso na literatura a respeito da maior prevalência de manifestação histopatológica do linfoma cutâneo como epiteliotrópico ou não epiteliotrópico. Mazaro *et al.* (2023) encontraram prevalência de 55% de linfoma não epiteliotrópico e 45% de linfoma epiteliotrópico, proporções semelhantes às observadas por Duarte *et al.* (2016) e Vezzali *et al.* (2009). Já Araújo *et al.* (2012) relataram 25% da forma não epiteliotrópica e 58% epiteliotrópica, com 17% não sendo possível realizar a classificação devido a ulceração na epiderme, enquanto Ponce *et al.* (2010), observaram prevalência de 56% de linfoma epiteliotrópico.

A literatura também é controversa com respeito a proporção de imunofenótipos B e T nos linfomas não epiteliotrópicos. Alguns autores afirmam que as concentrações de ambos são semelhantes, formando dois grupos homogêneos (Miller *et al.*, 2013; Kondo *et al.*, 2019). Entretanto, na medicina veterinária foram encontrados apenas quatro relatos de linfoma não epiteliotrópico de células B (Bosschere e Declercq, 2008; Witt *et al.*, 2018; Cortina *et al.*, 2020; Antognoni *et al.*, 2021).

Considerando outros aspectos epidemiológicos do linfoma epiteliotrópico canino, Mazaro *et al.* (2023) encontraram maior prevalência em fêmeas (56%) com relação aos machos (44%), mediana de 10 anos de idade, e predomínio de animais de raça definida, buldogue francês (29%) e cocker spaniel (21%). Outro estudo realizado por Chan *et al.* (2017) encontrou predomínio de 63% em fêmeas e 38% em machos, além da prevalência de animais sem raça definida, seguidos por golden retriever e labrador retriever. Considerando os linfomas não epiteliotrópicos, Mazaro *et al.* (2023) encontraram maior prevalência de machos (67%), com mediana de 8,5 anos de idade. A maior concentração de casos também acometeu animais de raça definida (72%), com maior predomínio no pastor alemão, dachshund, cocker spaniel e pitbull.

2.4 Métodos de Classificação dos Linfócitos e Prognóstico

Outra forma de classificação dos diferentes tipos de linfomas está baseada principalmente no tamanho das células linfoides, que podem ser divididas entre células linfoides pequenas, médias ou grandes. Além disso, diferentes formas de contagem de índice mitótico classificam o tumor em alto ou baixo grau. Vários autores

já fizeram uma extensa revisão a respeito da maneira como se medir o tamanho dos linfócitos e sobre a quantidade de mitoses por campo que devem ser consideradas. Sobre a forma de medição do tamanho dos linfócitos, a maneira mais utilizada nos cães diz respeito a comparação do tamanho do núcleo da célula linfóide com o tamanho de uma hemácia (Fornel-Fleury *et al.*, 1997; Comazzi; MacNeil, 2017; Valli *et al.*, 2017; Raskin, 2023). Segundo Jain (1993), o diâmetro médio de uma hemácia canina é de 7,0 μm .

Fornel-Fleury *et al.* (1997) realizaram um estudo para classificação de linfomas caninos, em comparação com linfomas na espécie humana. Para esse estudo, células linfóides pequenas foram definidas como aquelas com núcleo menor do que o equivalente à duas hemácias, células linfóides médias como aquelas com núcleo igual à duas hemácias, e células linfóides grandes como aquelas com núcleo maior do que o equivalente à duas hemácias. Além disso, o índice mitótico (IM) foi calculado a partir da contagem de mitoses em cinco campos na objetiva de 50x. O IM foi definido como baixo na presença de 0-1 mitoses/campo, médio na presença de 2-4 mitoses/campo, e alto na contagem de cinco ou mais mitoses por campo. Comazzi, MacNeil (2017) classificaram os linfócitos da mesma forma, entretanto a partir de comparações diretas após medição, com o diâmetro das hemácias, considerado de 7,0 μm .

Valli *et al.* (2017) classificaram por meio da histopatologia as células linfóides pequenas como aquelas que apresentam o núcleo menor que o equivalente a uma hemácia e meia, células linfóides médias com núcleo equivalente a uma hemácia e meia e células linfóides grandes com núcleo igual ou maior que o equivalente à duas hemácias. Para Valli *et al.* (2017), o IM é estabelecido a partir da contagem de figuras de mitose em 10 campos na objetiva de 40x, sendo considerado baixo com 0 a 5, moderado com 6 a 10, e alto com mais de 10.

Já Raskin (2023), classifica as células linfóides pequenas a partir do núcleo de tamanho 1-1,5x hemácias, células linfóides médias como 2-2,5x hemácias e células linfóides grandes maior do 3x o tamanho de uma hemácia. O índice mitótico é classificado em 10 campos de objetivas de 40x ou 15 campos 50x, sendo campos que contenham mais mitoses (*hot-spots*). O índice baixo é definido com 0-2 figuras por campo, índice moderado com 2-5 figuras por campo e índice alto com mais do que 6 figuras por campo.

As diferentes formas de classificação quanto ao tamanho dos linfócitos e índice mitótico dos principais autores citados anteriormente foram resumidas nos quadros 2 e 3 respectivamente.

Quadro 2. Classificação do tamanho de linfócito quando comparado ao tamanho de uma hemácia canina.

Referência	Tamanho da célula linfoide		
	Pequena	Média	Grande
Fornel-Fleury <i>et al.</i> (1997) e Comazzi, MacNeil (2017)	<2,0	2,0	>2,0
Valli <i>et al.</i> (2017)	<1,5	1,5	≥2,0
Raskin (2023)	1,0-1,5	2,0-2,5	>3,0

Quadro 3. Índice mitótico (IM) de acordo com a quantidade de mitoses por campo (cp) nas objetivas de 40x e 50x.

Referência	IM Baixo		IM Moderado		IM Alto	
	Objetiva		Objetiva		Objetiva	
	40x	50x	40x	50x	40x	50x
Fornel-Fleury <i>et al.</i> (1997) e Comazzi, MacNeil (2017)	-	0-1/5cp	-	2-4/5cp	-	≥5/5cp
Valli <i>et al.</i> (2017)	0-5/10cp	-	6-10/10cp	-	>10/10cp	-
Raskin (2023)	0-2/10cp	0-2/15cp	2-5/10cp	2-5/15cp	≥6/10cp	≥6/15cp

Um ponto controverso na literatura corresponde ao prognóstico correlacionado com o tipo histopatológico do tumor, estabelecido com a associação do tempo de sobrevida dos pacientes. Avaliando o linfoma cutâneo canino, Deravi *et al.* (2017) relataram mediana de sobrevida de 388 dias após o diagnóstico, não sendo considerada a classificação histológica do tumor. Nos linfomas cutâneos caninos epiteliotrópico e não epiteliotrópico, Azuma *et al.* (2022) relataram medianas de sobrevida de 141 e 374 dias, respectivamente. Outros estudos apresentaram sobrevidas entre três e cinco meses para o linfoma epiteliotrópico: 90 dias (Beale, 1993), 96 dias (Dettwiler *et al.*, 2023), 130 dias (Chan *et al.*, 2018) e 150 dias (Fontaine, 2010). Ainda no linfoma epiteliotrópico, Azuma *et al.* (2022) relataram medianas de sobrevida de 138 e 251 dias para a micose fungoide e reticulose pagetoide, respectivamente. Já no linfoma não epiteliotrópico, as medianas de sobrevida obtidas por Azuma *et al.* (2022) foram de 353 e 660 dias no linfoma de células T periféricas inespecífico e linfoma anaplásico de grandes células T, respectivamente.

Para associar as características dos subtipos de linfoma cutâneo com as respectivas sobrevidas médias, foram agrupados os achados de Mazaro *et al.* (2023) e Azuma *et al.* (2022) no quadro 4.

Quadro 4. Características clínicas e citológicas do linfoma cutâneo em cães, de acordo com Azuma *et al.* (2022) e Mazaro *et al.* (2023).

Variável	Linfoma Epiteliotrópico		Linfoma Não Epiteliotrópico			
	Micose Fungoide	Reticulose Pagetoide	Linfoma Anaplásico de Grandes Células T	Linfoma de Células T Periféricas Inespecífico	Linfoma de Células T Semelhante a Paniculite Subcutânea	Linfoma Difuso de Grandes Células B
Prevalência (1)*	60,86% (28/46)	6,52% (3/46)	14,04% (6/46)	19,56% (9/46)	-	-
Prevalência (2)*	34,2% (13/38)	10,5% (4/38)	23,95% (9/38)	10,5% (4/38)	10,5% (4/38)	5,2% (2/38)
Mediana de Sobrevida (1)*	138 dias	251 dias	660 dias	353 dias	-	-
Tamanho dos Linfócitos (2)*	Médios	Grandes	Grandes	Médios	Pequenos ou médios	Grandes
Citoplasma (2)*	Pequena a moderada quantidade de citoplasma homogêneo e eosinofílico	Moderada quantidade de citoplasma homogêneo, eosinofílico ou claro	Quantidade moderada ou abundante de citoplasma homogêneo eosinofílico ou pálido	Pequena quantidade de citoplasma homogêneo e eosinofílico	Pequena a moderada quantidade de citoplasma homogêneo e eosinofílico	Pequena a moderada quantidade de citoplasma homogêneo e eosinofílico
Núcleo (2)*	Redondo, oval, edentado, reniforme ou irregular	Redondos, ovais ou reniformes, cromatina frouxa ou vesicular	Redondos, ovais, edentados ou irregulares, com cromatina frouxa ou vesicular	Ovais ou redondos, cromatina frouxamente disposta	Redondo ou oval, com cromatina solta	Redondo, oval ou edentado, cromatina solta ou vesicular
Nucléolo (2)*	Únicos, pequenos e basofílicos	Únicos, pequenos e basofílicos	Únicos ou múltiplos, com características variáveis	Único, volume intermediário e basofílico	Único, pequeno ou médio e basofílico	Único, grande, eosinofílico ou basofílico
Mediana de Índice Mitótico (2)*	12	5	50	14	9	38

*(1): Azuma *et al.* (2022). (2): Mazaro *et al.* (2023).

Azuma *et al.* (2021) também avaliaram outros parâmetros que poderiam influenciar no tempo de sobrevida dos animais. Foi constatado que, animais que exibiram linfócitos neoplásicos na circulação, apresentaram reduzido tempo de sobrevivência global, bem como animais com trombocitopenia apresentaram tempo reduzido de sobrevida quando comparados aos animais com concentrações de plaquetas normais esperadas para a espécie.

2.5 Referências

ALBANESE, F. Cytology of Skin Tumours. In: ALBANESE, F. Canine and Feline Skin Cytology. 1st. ed. Springer International Publishing Switzerland, 2017. p. 291–490.

AMORIM, R. L.; TORRES NETO, R.; KIUPEL, M. Imuno-histoquímica no Diagnóstico Oncológico. In: DALECK, C.R., DE NARDI, A. B. Oncologia em cães e gatos. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

ANTOIGNONI, M. T.; MISIA, M. L.; BRACHELENTE, C. *et al.* Non Epitheliotropic B-cell Lymphoma with Plasmablastic Differentiation vs. Cutaneous Plasmacytosis in a 12-Years-Old Beagle: Case Presentation and Clinical Review. Vet. Sci, v. 8. 2021

ARAÚJO, M. R. *et al.*. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 32, n. 8, p. 772–780, 2012.

AVERY, A.C. Molecular diagnostics of hematologic malignancies in small animals. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v.42, p.97-110, 2009.

AZUMA, K. *et al.*. Outcomes and prognostic factors in canine epitheliotropic and nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 20, n. 1, p. 118–126, 2022.

BEALE KM, BOLON B. Canine cutaneous lymphosarcoma: epitheliotropic and non-epitheliotropic, a retrospective study. IN: IHRKE, P.J., MASON, I.S., WHITE, S.D. *Advances in veterinary dermatology*, vol. 2. New York: Pergamon Press, 1993.

BOSSCHERE, H.; DECLERCQ, J. Cutaneous nonepitheliotropic B-cell lymphoma in a Golden retriever. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2008

BURNETT, R.C.; VERNAU, W.; MODIANO, J.F. *et al.* Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.*, v.40, p.32-41, 2003.

CALAZANS, S. G.; DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C.R., DE NARDI, A. B. *Oncologia em cães e gatos*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

CAMPO, E.; SWERDLOW, S.H.; HARRIS, N.L. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011, 117, 5019–5032.

CERRONI, L. 2014. Section 1: Cutaneous NK/T-cell lymphomas, In: CERRONI, L. *Skin Lymphoma, The Illustrated Guide*. 4th. Oxford: Wiley Blackwell. p.11-184, 2014

CHAN, C. M.; FRIMBERGER, A. E.; MOORE, A. S. Clinical outcome and prognosis of dogs with histopathological features consistent with epitheliotropic lymphoma: a retrospective study of 148 cases (2003-2015). *Veterinary Dermatology*, v. 29, 2018

COMAZZI, S.; MAC NEIL, A. L. Cytology of lymphoid tissues. In: BARGER, A. M.; MACNEIL, A. L. *Small animal cytologic diagnosis*. CRC Press, 2017

CORTINA, B.; GUENTHNER, E.; SYPNIEWSKI, L. Subcutaneous B Cell Lymphoma in a Dog from the West Indies. *Case Reports in Veterinary Medicine*, 2020

DAY, M. J. Biology of Lymphocytes and Plasma Cels. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6 ed. Wiley-Blackwell, 2010

DE SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; DE BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural*, v. 36, n.2, p. 555-560, 2006

DERAVI, N.; BERKE, O.; WOODS, J. P.; BIENZLE, D. Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 191, p. 5-13, 2017

DETTWILER, M. *et al.*. Prognostic clinical and histopathological features of canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma. *Veterinary Pathology*, v. 60, n. 2, p. 162–171, 2023.

DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.; CHAULK, L.E.; HIBBARD, H.H. The prevalence of spontaneous neoplasms in a defined canine population. *Am. J. Public Health Nations Health* 1966, 56, 254–265.

DUARTE, A. R. *et al.*. Clinical and laboratorial evaluation of dogs with cutaneous lymphoma treated with lomustine. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 53, n. 1, p. 39–47, 2016.

FERNANDEZ, N. J.; WEST, K. H.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B.A. Immunohistochemical and Histochemical Stains for Differentiating Canine Cutaneous Round Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 42, n. 4, p. 437-445, 2005

FONTAINE J, HEIMANN M, DAY MJ. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases. *Vet Dermatol*. v. 21, p. 267–75, 2010

FONTAINE, J., BOVENS, C., BETTENAY, S., AND MUELLER, S.R. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: A review. *Vet Comp Oncol*. v. 7, p. 1–14, 2009

FOSS, F. M.; GIRARDI, M. Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *Hematol Oncol Clin N AM*. v. 31, p. 297-315, 2017

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P. *et al.* Cytohistological and Immunological Classification of Canine Malignant Lymphomas: Comparison with Human Non-Hodgkin's Lymphomas. *J. Comp. Path.* v. 117, p. 35-39, 1997

GILBERT, S., AFFOLTER, V.K., GROSS, T.L., *et al.* Clinical, morphological and immunohistochemical characterization of cutaneous lymphocytosis in 23 cats. *Vet Dermatol*. v. 15, p. 3–12, 2004

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J; WALDER, E.J. *et al.* Mesenchymal neoplasms and other tumors: lymphocytic tumors. In: GROSS, T.L; IHRKE, P.J; WALDER, E.J. *et al.* Skin diseases of the dog and cat. 2.ed. Iowa: Blackwell Science, p.709-892, 2005.

HENDRICK, M. J. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D. J. Tumors in Domestic Animals. 5 ed. John Wiley & Sons, 2017

HOUTANA, I. M.; GEINE-ROMANOVA, L. Retrospective Analysis of 101 Canine Lymphoma Cases Diagnosed in Surgical biopsies in Latvia (2011-2020). *Rural Sustainability Research*, v. 48, n. 343, p. 1–8, 2022.

HOWLADER, N., KRAPCHO, M., GARSHELL, J., MILLER, D. *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975–2012. National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2015. National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2015.

IPEK, V.; CANGUL, I. T.; AKKOC, A. Comparative evaluation of the cytological, histopathological and immunohistochemical findings of canine cutaneous and subcutaneous masses. *Acta Veterinaria*, v. 71, n. 1, 2021

JACOBSEN E. Anaplastic large-cell lymphoma, T-/Null-cell type. *The Oncologist*, v. 11, n. 7, p. 831-840, 2006

JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993

JAWED S.I., MYSKOWSKI P.L., HORWITZ S. *et al.* Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*. v. 70, n. 2, 2014

KOK, M. K.; CHAMBERS, J. K.; TSUBOI, M. *et al.* Retrospective study of canine cutaneous tumors in Japan, 2008-2017. *J. Vet. Med. Sci.* v. 81, n. 8., p. 1133-1143, 2019

KONDO, H.; KAGAWA, Y.; SHIROTA, K. *et al.* Canine non-epithliotropic CD4-positive cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Veterinary Medicine and Science*, v. 5, p. 206-209, 2019

LEE, S.; LEE, H. J.; SEO, K.; SONG, K. Cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with Sézary syndrome in a dog. *Korean J Vet Serv*, v. 44, n. 4, p. 309-313, 2021

LOBATO, B. A. L.; BRITO, J. A. G. S. M.; CARNEIRO, T. X.; XAIER, M. B. Late diagnosis of mycosis fungoides: a case report. *Rev Pan Amaz Saude*, v. 12, 2021

MAZARO, R. D.; LORENZETTI, D. M.; LEITE, S. M. G. *et al.* Epidemiological, anatomopathological, and immunophenotypical aspects of cutaneous lymphomas in dogs. *Pesq Vet Bras*, v. 43, 2023

MAZARO, R. D.; LUZ, F. S.; LORENZETTI, D. M. Reticulose pagetoide em um cão: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 71, n. 3. p. 883-888, 2019

MILLER W.H., GRIFFIN C.E., CAMPBELL K.L. *Mullerand Kirk's Small Animal Dermatology*, 7th edition, pp810–816. W.B. Saunders Co: Philadelphia. 2013

MOODLEY, N.; NOMBONA, P.; MOSAM, A.; Primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Dermatopathology*, v. 6, n. 2, p. 163-169, 2019.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T. Cutaneous lymphomas in companion animals. *Clinics in Dermatology*. V. 12, p. 499-505, 1994

NOLAND, E. L.; KELLER, S. M.; KIUPEL, M. Subcutaneous Panniculitis-Like T-cell Lymphoma in Dogs: Morphologic and Immunohistochemical Classification. *Veterinary Pathology*. v. 55, n. 6, p. 802-808, 2018

NOWOSH, V. MACIEIRA, D. B.; ALENCAR, N. X. Applicability of PCR-based clonality assay in dogs with multicentric lymphoma. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 69, n. 3, p. 761-765, 2017.

PONCE, F. *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. *Veterinary Pathology*, v. 47, n. 3, p. 414–433, 2010.

RASKIN, R. *Canine and Feline Citology, A Color Atlas and Interpretation Guide*. 4 ed. Elsevier, 2023.

SEELIG, D. M.; AVERY, A. C.; EHRHART, E. J.; LINDEN, M. A. The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Vet Sci*, v. 3, n. 11, 2016

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. *Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária*. 2 ed. Guanabara Koogan, 2011.

SUBAPRIYA, S.; PAZHANIVEL, N.; SHAFIUZAMA, M. *et al.* Immunohistochemical diagnosis of skin tumors in dogs. *The Pharma Innovation Journal*, n. 10, v. 5, p. 612-619, 2021

THALHEIM, L.; WILLIAMS, L. E.; BORST, L.B. *et al.* Lymphoma Immunophenotype of Dogs Determined by Immunohistochemistry, Flow Cytometry, and Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements. *J Vet Intern Med*, v. 27, p. 1509-1516, 2013

VAIL, D. M. PINKERTON, M. E. YOUNG, K. M. Hematopoietic Tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5 ed, St. Louis, Missouri: Elsevier, 2013, p. 608-678

VALLI V. E., KIUPEL M., BIENZLE D.; WOOD R.D. Hematopoietic system, p.102-268. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.3. 6th ed. Elsevier, St. Louis, 2016

VALLI, V. E.; BIENZLE, D.; MEUTEN, D. J. Tumors of the Hemolymphatic System. In: MEUTEN, D. J. *Tumors in Domestic Animals*. 5 ed. John Wiley & Sons, 2017

VALLI, V. E., KASS, P., SAN MYINT, M., AND SCOTT, F. Canine lymphoma: The effect of age, stage of disease, subtype of tumor, mitotic rate and treatment protocol on overall survival. *Vet Pathol*. v. 50, p. 738–748, 2013

VERMEER, M. Epidemiology of cutaneous lymphoma. *British Journal of Dermatology*. v. 184, p. 990–1003, 2021

VEZZALI, E. *et al.*. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-

Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 8, n. 1, p. 38–49, 2009.

VILAMIL, J. A.; HENRY, C. J.; BRYAN, J. N. *et al.* Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. *JAVMA*, v. 239, n. 7, 2011

WATTON, T. C.; PURZYCKA, K.; FITZGERALD, E. Computed tomographic findings and clinical features in dogs with canine cutaneous lymphoma: 10 cases (2007-2018). *JAVMA*, v. 259, n. 12, 2021

WEISER, G. Introdução aos leucócitos e ao leucograma. IN: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2 ed. Editora Roca, 2012

WITT, S.; WILLEKE, K.; KÖHLER, K.; BAUER, N. Non-epitheliotropic B-cell lymphoma with atypical spindle cell morphology in a Weimaraner dog. *Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere* 2018, 46, 119–125.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer as características morfológicas das células linfoides dos casos de linfoma cutâneo e inflamações linfocíticas em cães, correlacionando-as a clonalidade no PARR e o tempo de sobrevida dos pacientes com linfoma cutâneo.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar o tamanho das células linfoides no exame citológico a partir das classificações estabelecidas por Valli *et al.* (2017).

Identificar as características morfológicas nucleares e citoplasmáticas das células linfoides das amostras.

Estabelecer a clonalidade das células linfoides a partir da técnica de PARR, e apontar o imunofenótipo das neoplasias.

Comparar as características citológicas dos linfomas cutâneos com as de amostras de causas inflamatórias.

4. ARTIGO (LINFOMA CUTÂNEO CANINO: ASPECTOS CITOLÓGICOS, DE CLONALIDADE E TEMPO DE SOBREVIDA)

Resumo

O linfoma é uma neoplasia de linfócitos que representa cerca de 90% das neoplasias hematopoiéticas caninas. Quando se manifesta na derme, é denominado linfoma cutâneo, e corresponde a 13% dos casos de linfoma canino. Não foram encontrados estudos sobre a utilização da citologia no diagnóstico do linfoma cutâneo. O presente estudo avaliou as características clínicas e citológicas do linfoma e inflamações linfocíticas cutâneas em cães. Para tal, foram reavaliadas 40 amostras citológicas, sendo 28 com resultado citológico prévio de amostras sugestivas/compatíveis com linfoma cutâneo, três de amostras sugestivas/compatíveis com inflamação linfocítica e nove de amostras não conclusivas para inflamação linfocítica ou linfoma cutâneo. No exame de PARR, considerando todas as amostras, 73% resultaram em proliferação monoclonal e 28% em proliferação policlonal. Após comparação estatística entre o linfoma e a inflamação, as características clínicas mais associadas ao linfoma foram idade dos animais (mediana de 106 meses no linfoma x 29 meses nos casos de inflamação; $p = 0,0034$) e tamanho dos nódulos (5,0 x 1,5 cm; $p = 0,0013$). As características citológicas mais associadas ao linfoma foram nucléolos visíveis únicos/múltiplos ($p = 0,0195$), basofilia citoplasmática intensa ($p = 0,0080$) e maior concentração de figuras de mitose ($p = 0,0372$), além de fundo de lâmina basofílico ($p = 0,0289$) com maior concentração de vacúolos de gordura ($p = 0,0197$). Dos animais com linfoma, 52% foram submetidos à tratamento quimioterápico. A mediana de sobrevida desses animais foi de 60 dias. Nos animais sem tratamento quimioterápico a mediana de sobrevida foi de 28 dias. Nos animais submetidos à cirurgia a mediana de sobrevida foi de 148 dias. No total, a mediana de sobrevida foi de 52 dias. Conclui-se que o linfoma cutâneo canino apresenta menor sobrevida que o descrito na literatura e que a citologia, aliada às informações clínicas, é um método eficiente para diagnóstico, sendo necessário aprofundar o estudo das características celulares e seu impacto no comportamento biológico da doença.

Palavras- Chave: Cães; linfócitos; diagnóstico; neoplasia; citologia.

4.1 Introdução

Os linfócitos, células importantes no sistema de defesa do organismo, estão presentes em praticamente todos os tecidos do corpo (Calazans *et al.*, 2016; Junqueira; Carneiro, 2017). Com exceção dos órgãos linfoides, a presença de concentração significativa de linfócitos está associada às inflamações crônicas, principalmente imunomediadas. Esse processo deve ser diferenciado da neoplasia de linfócitos, denominada linfoma (Albanese, 2017). O linfoma faz parte das neoplasias hematopoiéticas, que incluem as leucemias, mastocitose sistêmica, histiocitose sistêmica e tumores de plasmócitos. Dessas afecções, o linfoma representa aproximadamente 90% dos casos caninos (Pinello; Dagli, 2022). O linfoma é caracterizado pela proliferação clonal de linfócitos neoplásicos B, T ou nulos (Calazans *et al.*, 2016). Apesar das neoplasias caninas serem subdiagnosticadas, estudos indicam que o linfoma representa 6% de todas as neoplasias da espécie, sendo uma das três neoplasias mais frequentes (Dorn *et al.*, 1996; Seelig *et al.*, 2016). Em cães, o linfoma mais comum é o que atinge os linfonodos palpáveis no exame físico, denominado linfoma multicêntrico. O segundo tecido mais acometido pelo linfoma é o tegumento, que representa de 10 a 15% dos casos da neoplasia na espécie (Vail *et al.*, 2013)

O linfoma cutâneo ocorre a partir da mutação e proliferação neoplásica de linfócitos em tecidos cutâneos (Watton *et al.*, 2021). De acordo com o tropismo das células neoplásicas para a epiderme observado no exame histopatológico, a neoplasia é classicamente dividida em epiteliotrópica e não epiteliotrópica. Também na histopatologia, as células linfoides neoplásicas podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho. Valli *et al.* (2017), comparando-as com o tamanho das hemácias presentes na amostra, definiram as células neoplásicas como pequenas quando menor que uma hemácia e meia; média quando igual a uma hemácia e meia, e grande quando maior que duas hemácias.

Na medicina veterinária, o diagnóstico inicial do linfoma geralmente é obtido por meio de exame citológico, que é um exame pouco invasivo, econômico e com resultado rápido. Entretanto, a citologia nem sempre é diagnóstica, principalmente nos casos de linfomas multicêntricos indolentes, como linfomas foliculares e difusos de pequenos linfócitos, e linfomas cutâneos de pequenos linfócitos que podem ser confundidos com inflamações linfocíticas. Nesses casos é imprescindível o uso de

ferramentas diagnósticas adicionais, que incluem o PARR, a citometria de fluxo e o exame histopatológico com marcação de IHQ (Ipek; Cangul; Akkoc, 2021). Para um estudo retrospectivo de citologia do linfoma, o PARR apresenta como vantagem a possibilidade de realização utilizando material biológico da amostra citológica armazenada. Nas amostras de linfoma, a tendência é que PARR resulte em proliferação monoclonal T ou B (Thalheim *et al.*, 2013).

Apesar da literatura se mostrar bem estabelecida quanto aos diferentes tipos de linfoma canino de acordo com sua classificação histopatológica, particularmente os multicêntricos, não foi encontrado na literatura estudos que associem as características morfológicas destas células no exame citológico com o prognóstico e tempo de sobrevivência, bem como a definição de características para auxiliar na diferenciação de linfomas cutâneos e inflamações linfocíticas. O objetivo do presente estudo foi estabelecer as características clínicas e citológicas do linfoma cutâneo e inflamações linfocíticas, analisando as possibilidades de diferenciação entre estes, assim como, estabelecer possíveis prognósticos de acordo com os achados clínicos e citológicos observados no linfoma cutâneo canino. Para tal, utilizou-se o PARR como teste ouro para o diagnóstico de linfoma/inflamação linfocítica.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Casos Clínicos

Dos casos da rotina de exames citológicos realizados entre 2016 e 2024 no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram selecionados aqueles com sugestão diagnóstica de linfoma cutâneo, inflamação linfocítica e não conclusivos para inflamação linfocítica ou linfoma cutâneo, excluindo amostras com menos de 10 células íntegras em média por campo. No total, foram incluídos no estudo 40 amostras de 40 animais, sendo 28 com resultado citológico de amostra sugestiva/compatível com linfoma cutâneo, três de amostra sugestiva/compatível com inflamação linfocítica e nove de amostra compatível com processo proliferativo linfocítico, não conclusivo para inflamação ou linfoma cutâneo.

Os dados das características físicas/clínicas dos animais foram obtidos nas fichas do sistema integrado utilizado pelo Hospital Veterinário da UFMG. Quando disponível, foi considerada a idade no dia da coleta de amostra para o exame

citológico. As lesões foram classificadas como nodular/nódulo quando disposta na forma vertical e como placa quando disposta horizontalmente. As lesões verticais foram denominadas nodulares quando $\leq 1\text{cm}$ e nódulos quando $>1\text{cm}$ (Albanese 2017). Quando múltiplas, foi considerado a lesão de maior tamanho. O tempo de sobrevivência foi determinado a partir da data do exame citológico até a data do óbito. Nos casos com data de óbito indisponível no sistema, foi realizado contato telefônico com o tutor do animal.

4.2.2 Avaliação Morfológica na Citologia

As amostras citológicas foram coletadas por clínicos experientes, utilizando punção por agulha (25x7) e, posteriormente, foram coradas com corante rápido (*Diff Quick*, Panótico). A concentração de células linfoides foi obtida a partir da contagem média de cinco campos de 430 μm , utilizando objetiva de 40x. As células foram classificadas como pequenas, médias e grandes, de acordo com o sistema de Valli *et al.* (2017), como demonstrado na figura 2. Posteriormente, as células foram avaliadas quanto a proeminência e quantidade de nucléolos, presença de binucleações ou multinucleações, intensidade de basofilia citoplasmática e eventuais alterações morfológicas adicionais de núcleo e citoplasma. A quantidade de mitoses foi determinada em 10 campos, *hot spot*, utilizando objetiva de 40x. Na avaliação de fundo de lâmina, utilizando objetiva de 4x foi observada a presença ou ausência de material amorfo basofílico e quantidade de vacúolos de gordura, e na objetiva de 40x foram descritas a quantidade de hemácias e de fragmentos citoplasmáticos, a partir das médias obtidas em cinco campos.

De acordo com as porcentagens de tamanho das células linfoides, as amostras foram distribuídas formando seis grupos: grupo de células pequenas (GP), pequenas e médias (GPM), médias (GM), pequenas, médias e grandes (GPMG), médias e grandes (GMG) e grandes (GG). No GP, GM e GG foram incluídas as amostras com $\geq 67\%$ de células linfoides pequenas, médias e grandes, respectivamente, isto é, com evidente predomínio de um tipo celular. Sem essa característica, foram incluídas no GPMG as amostras com todos os tipos celulares em concentrações $\geq 20\%$, e no GPM e GMG as amostras com $< 20\%$ de células grandes e pequenas, respectivamente.

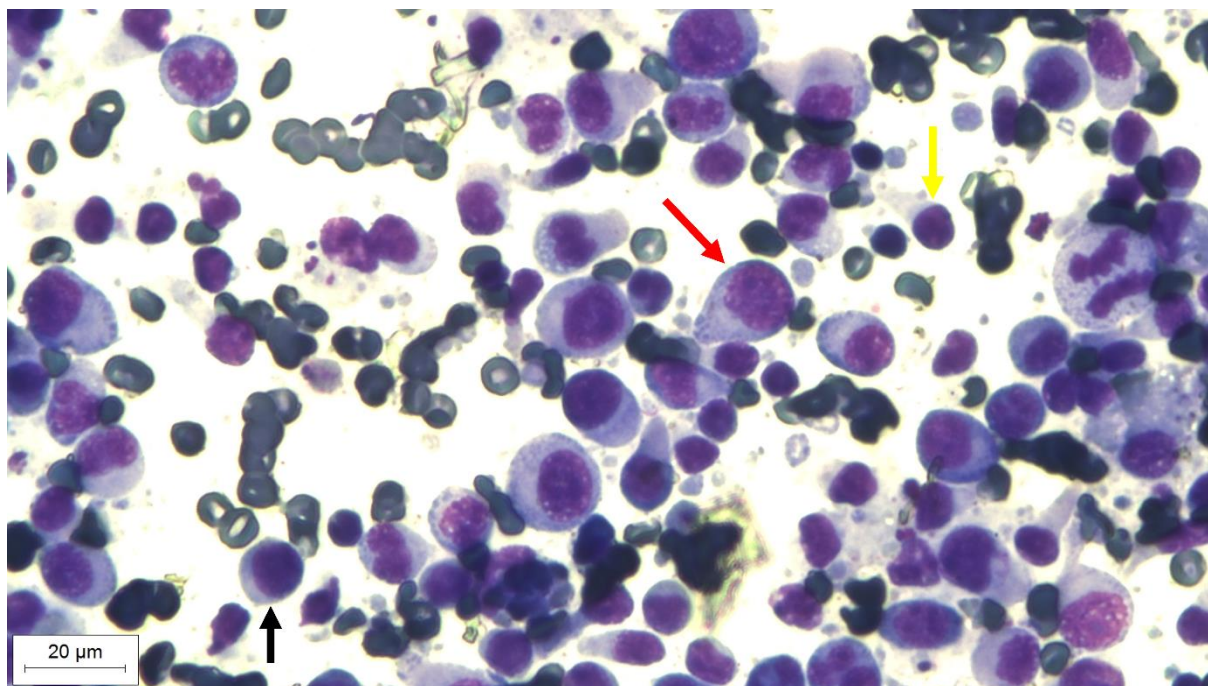


Figura 2. Representação de células pequenas (seta amarela), médias (seta preta) e grandes (seta vermelha) segundo critérios de Valli *et al.* (2017) na citologia de linfoma cutâneo canino.

4.2.3 Determinação da Clonalidade e Imunofenótipo

Todas as amostras foram submetidas a avaliação de clonalidade e imunofenótipo das células por meio do teste de PARR (VetPat – Tecsca Laboratórios). As amostras foram submetidas a extração utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, EUA), seguindo as informações do fabricante. As células foram recuperadas e submetidas à extração usando o Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Stratec, Alemanha), seguindo as diretrizes do fabricante. Após a extração, o DNA de cada amostra foi quantificado usando o Quantifluor® (Promega, EUA) (Nowosh *et al.*, 2017).

4.2.4 Histopatologia

Análises histopatológicas foram realizadas em três laboratórios diferentes, incluindo o Laboratório de Anatomia Patológica da UFMG, Laboratório Celulavet, Belo Horizonte, MG e Laboratório VETPAT, Campinas-SP. Os linfomas cutâneos foram classificados como epiteliotrópico e não epiteliotrópico.

4.2.5 Análise Estatística

Todas as análises realizadas na citologia foram descritas em tabela de Excel, separando em dois grupos de diagnóstico, linfoma cutâneo e inflamação linfocítica. Foi realizada a descrição de média, mediana e desvio padrão de todas as variáveis observadas de acordo com cada grupo. A estatística inferencial foi realizada usando o software GraphPadPrism v. 6.02 com um índice de significância de 5%.

O teste de Pearson foi usado para estimar a correlação das variáveis citológicas com o diagnóstico a partir da análise de clonalidade do PARR. As correlações significativas foram consideradas fracas ($r < 0,30$), moderadas ($0,30 \leq r < 0,7$) ou fortes ($r \geq 0,70$).

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar a normalidade das variáveis paramétricas. Foram utilizadas comparações da média (dados paramétricos com distribuição normal) ou mediana (dados não paramétricos ou com distribuição não normal) pelo teste t de student e Mann-Whitney, respectivamente.

Após separação dos casos de linfoma cutâneo com relação ao tamanho das células e determinação dos scores, o teste de logrank de Cox-Mantel foi utilizado para a análise de sobrevida e o teste Kruskal-Wallis *ad-hoc* Dunns para as demais análises.

4.3 Resultados

No exame de PARR, 73% (29/40) das amostras resultaram em proliferação monoclonal e 28% (11/40) em proliferação policlonal. Todas as três amostras citológicas sugestivas/compatíveis com inflamação linfocítica resultaram em proliferação policlonal. Já nas nove amostras com citologia não conclusiva para linfoma cutâneo ou inflamação linfocítica, 44% (4/9) resultaram em proliferação policlonal e 56% (5/9) em proliferação monoclonal. Os quatro casos com citologia inconclusiva e PARR policlonal e os três com citologia de inflamação foram considerados como de inflamação linfocítica, totalizando 18% (7/40) do total de casos. As características desses pacientes e de suas lesões estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas da inflamação linfocítica cutânea canina, diagnosticadas por meio de citologia, PARR e histopatologia.

Caso	Raça*	Idade (meses)	Gênero**	Citologia	Lesão			Diagnóstico		Histórico Clínico***
					Tipo	Nº	Tamanho (cm)	Histologia	PARR	
I-1	SRD	29	F	Inflamação	Nódulo	≥4	2,0	-	Policlonal	LSM
I-2	ShihTzu	63	F	Inflamação	Nodular	1	0,5	-	Policlonal	LSM
I-3	Border Collie	6	M	Inflamação	Nodular	1	0,5	-	Policlonal	LSM
I-4	Boxer	28	M	Inconclusivo	Nódulo	1	5,0	Dermatite	Policlonal	Cirurgia
I-5	Bulldogue Francês	7	M	Inconclusivo	Nódulo	1	1,5	Dermatite	Policlonal	Cirurgia
I-6	SRD	29	F	Inconclusivo	Nódulo	1	1,5	-	Policlonal	LSM
I-7	Bulldogue Francês	107	M	Inconclusivo	Nódulo	1	1,0	-	Policlonal	LSM

*SRD: Sem raça definida; **M: Macho; F: Fêmea; **LSM: Lesão sumiu com medicamento (anti-inflamatório).

Dos animais portadores de inflamação linfocítica cutânea, 71% (5/7) eram de raça definida, com mediana de idade de 29 meses (tabela 1). As lesões, todas classificadas como nodulares, em 86% (6/7) dos casos eram únicas e em 86% (6/7) dos casos com no máximo dois centímetros de diâmetro. Dois animais foram submetidos à cirurgia e posterior exame histopatológico, com resultado de dermatite. Os demais cinco animais foram tratados com medicamentos anti-inflamatórios, com as lesões sumindo após o tratamento. Até o último levantamento, apenas dois animais haviam ido à óbito: I-4 e I-5, com sobrevividas de 2550 e 880 dias, respectivamente. Os demais animais continuavam vivos no fechamento do estudo. As características observadas no exame citológico desses casos estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Características de amostras citológicas de inflamação linfocítica canina.

Caso	Grupo*	Fundo de Lâmina				Linfócitos ***	Características Celulares dos linfócitos		
		Basofilia**	Vacúolos Gordura*	Hemácias ***	Fragmentos Citoplasmáticos***		Citoplasma	Nucléolos	Mitoses ****
I-1	GP	Ausente	0	304	12	24	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0
I-2	GP	Ausente	0	354	0	10	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0
I-3	GP	Ausente	57	172	0	30	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0
I-4	GPMG	Ausente	4	468	192	116	Intensamente Basofílico	Únicos	9
I-5	GP	Ausente	0	114	72	42	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	1
I-6	GPMG	Presente	5	51	242	406	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0
I-7	GP	Presente	0	49	240	66	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0

*GP = grupo de células linfóides pequenas, GPMG = grupo de células linfóides pequenas, médias e grandes, **Média por campo, em objetiva de 4x; ***Média por campo, em objetiva de 40x, ****Em 10 campos de 40x.

Os linfócitos representaram de 40 a 90% das células inflamatórias das amostras citológicas dos casos policlonais, sendo que nos três casos com diagnóstico citológico de inflamação linfocítica (I-1 a I-3, tabela 2), os linfócitos representaram 40 a 60%, enquanto nos quatro casos não conclusivos para linfoma ou inflamação

linfocítica (I-4 a I-7), os linfócitos representaram 70 a 90%. Os três casos com diagnóstico citológico de inflamação linfocítica foram incluídos no GP, enquanto nos quatro casos não conclusivos para linfoma ou inflamação linfocítica, dois foram incluídos no GP e dois no GPM.

O fundo de lâmina das amostras citológicas de inflamações linfocíticas apresentou medianas com ausência de basofilia e vacúolos de gordura, e mediana de concentração de linfócitos de 42 células/campo (tabela 2). Em 86% (6/7) dos casos os linfócitos apresentaram basofilia citoplasmática discreta, nucléolo pouco proeminente e no máximo uma figura de mitose. Em um mesmo caso (I-4) foi observado basofilia citoplasmática intensa, nucléolo único proeminente e nove mitoses em 10 campos.

Dos 28 casos com diagnóstico citológico de linfoma cutâneo, 82% (23/28) resultaram em proliferação monoclonal no PARR e 18% (5/28) em proliferação policlonal. Dos cinco casos policlonais, em um também foi realizado exame histopatológico, que resultou em conclusivo para linfoma cutâneo epiteliotrópico. Esse caso, mais os 23 com diagnóstico citológico de linfoma cutâneo e PARR monoclonal, e ainda os cinco casos com citologia inconclusiva para linfoma ou inflamação linfocítica e PARR monoclonal, totalizaram 29 casos. Esses casos, definidos no presente estudo como linfoma cutâneo canino, estão descritos nas tabelas 3 e 5. Os quatro casos com diagnóstico citológico de linfoma e PARR policlonal estão descritos nas tabelas 4 e 6.

Tabela 3: Características clínicas de cães portadores de linfoma cutâneo diagnosticado por meio de citologia, PARR e histopatologia.

CASO	Raça	Idade (meses)	Gênero	Lesão			Diagnóstico			Histórico Clínico			Sobrevida (dias)
				Tipo	Número	Tamanho (cm)	Histologia	PARR	Fenótipo	Cirurgia	Quimioterapia (Sessões)	Medicamento	
L-1	Beagle	132	M	Nódulo	≥4	4,0	LCE	Policlonal	-	Sim	3	Lomustina	59
L-2	Basset Hound	194	M	Nódulo	3	5,0	LCE	Monoclonal	B	Sim	4	Citostal	179
L-3	SRD	144	F	Nódulo	1	6,0	LCE	Monoclonal	T	Sim	5	Lomustina, Citostal	117
L-4	Yorkshire	162	F	Nódulo	1	2,0	LCE	Monoclonal	T	Sim	2	Lomustina	365
L-5	SRD	36	F	Nódulo	1	3,0	LCNE	Monoclonal	T	Sim	16	Citostal	530
L-6	SRD	24	M	Nódulo	1	3,0	LCE	Monoclonal	T	Sim	1	Lomustina	28
L-7	SRD	105	M	Nódulo	1	-	-	Monoclonal	T	Não	0	-	30
L-8	ShihTzu	-	M	Placa	≥4	3,0	-	Monoclonal	T	Não	2	Lomustina	52
L-9	SRD	156	M	Placa	≥4	9,0	-	Monoclonal	T	Não	0	-	88
L-10	Poodle	48	M	Nódulo	3	-	-	Monoclonal	T	Não	1	Vincristina	7
L-11	Bull Terrier	36	F	Placa	3	5,0	-	Monoclonal	T	Não	0	-	7
L-12	SRD	96	F	Nódulo	1	-	-	Monoclonal	T	Não	0	-	24
L-13	SRD	96	F	Nódulo	1	-	-	Monoclonal	T	Não	0	-	62
L-14	Poodle	120	F	Nódulo	2	-	-	Monoclonal	T	Não	0	-	1
L-15	Rottweiler	21	F	Nódulo	≥4	10,0	-	Monoclonal	T	Não	0	-	1
L-16	SRD	108	F	Nódulo	1	5,0	-	Monoclonal	T	Não	0	-	1
L-17	Poodle	144	M	Placa	≥4	5,0	-	Monoclonal	T	Não	1	Lomustina	15
L-18	Poodle	168	F	Nódulo	1	5,0	-	Monoclonal	B	Não	4	Lomustina	180
L-19	SRD	120	M	Nódulo	1	2,0	LCNE	Monoclonal	T	Não	1	Lomustina	210
L-20	Yorkshire	100	M	Nódulo	2	-	LCNE	Monoclonal	T	Não	0	-	3
L-21	SRD	96	M	Nódulo	≥4	5,0	-	Monoclonal	T	Não	0	-	29
L-22	ShihTzu	144	F	Nódulo	2	10,0	-	Monoclonal	T	Não	7	Citostal, Epirubicina	60
L-23	Golden Retriever	64	F	Nódulo	3	0,7	-	Monoclonal	T	Não	7	Citarabina, Vincristina	58
L-24	Labrador	108	M	Nódulo	1	3,0	-	Monoclonal	B	Não	0	-	61
L-25	SRD	84	F	Nódulo	3	12,0	-	Monoclonal	T	Não	1	Lomustina	7
L-26	Poodle	168	F	Nódulo	≥4	-	-	Monoclonal	B	Não	4	Citostal	90
L-27	SRD	60	M	Nódulo	≥4	-	-	Monoclonal	T	Não	0	-	30
L-28	SRD	24	M	Nódulo	1	7,0	-	Monoclonal	B	Não	0	-	Sem contato
L-29	Poodle	156	M	Placa	≥4	-	-	Monoclonal	T	Não	0	-	Sem contato

F: Fêmea; M: Macho LCE: Linfoma cutâneo epitelotrópico; LCNE: Linfoma cutâneo não epitelotrópico

Dos animais com diagnóstico de linfoma cutâneo, 55% (16/29) eram de raça definida, com idade variando entre 21 e 168 meses e mediana de 100 meses (tabela 3). Foram descritas lesões únicas em 41% (12/29) dos casos, duas ou três lesões em 28% (8/29) e quatro ou mais lesões em 31% (9/29). A forma de nódulo foi descrita em 83% (24/29) dos casos e de placa em 17% (5/29). Das lesões com descrição de tamanho, 85% (17/20) apresentaram mais de dois centímetros de diâmetro e 15% (3/20) no máximo dois centímetros. Nos casos com exame histopatológico, 63% (5/8) resultaram em linfoma cutâneo epiteliotrópico e 38% (3/8) em linfoma cutâneo não epiteliotrópico. Nas amostras monoclonais, o imunofenótipo foi T em 82% (23/28) e B em 18% (5/28). Nos linfomas epiteliotrópicos, quatro resultaram em imunofenótipo T e um em imunofenótipo B, enquanto nos três casos não epiteliotrópicos todos resultaram em imunofenótipo T.

Em 52% (15/29) dos animais com linfoma cutâneo foi realizado tratamento quimioterápico, sendo utilizados cinco diferentes medicamentos: lomustina, citostal, vincristina, citarabina e epirrubicina, em uma a 16 sessões (tabela 3). O tempo de sobrevida, determinado em 93% (27/29) dos casos, variou de 1 a 530 dias, com mediana de 52 dias. Entre os 15 animais que receberam tratamento quimioterápico, a sobrevida variou de 7 a 530 dias, com mediana de 60 dias. Entre os 11 animais que não receberam tratamento quimioterápico e tiveram o tempo de sobrevida estabelecido, a sobrevida variou de 1 a 88 dias, com mediana de 27 dias. Nos animais submetidos à cirurgia, a sobrevida variou de 3 a 530 dias, com mediana de 148 dias e 88% (7/8) dos cães com no mínimo 28 dias de sobrevida. Nos animais não submetidos à cirurgia, a sobrevida variou de 1 a 180 dias, com mediana de 30 dias.

Tabela 4: Características clínicas dos pacientes e histórico clínico dos casos com diagnóstico citológico de linfoma cutâneo canino e resultado policlonal no PARR

Caso	Raça	Idade (meses)	Gênero	Lesão			Histórico Clínico			Sobrevida (dias)
				Tipo	Número	Tamanho (cm)	Cirurgia	Quimioterapia (sessões)	Medicamento	
E-1	Pastor Alemão	60	M	Placa	≥4	3,0	Não	1	Citarabina, Vincristina, Lomustina, Doxorubicina	8
E-2	SRD	120	F	Placa	≥4	5,0	Não	0	-	30
E-3	Lhasa Apso	108	M	Nódulo	≥4	-	Não	5	Citostal	90
E-4	Maltês	60	M	Nódulo	≥4	5,0	Não	0	-	15

F: Fêmea; M: Macho F: Fêmea; M: Macho

Os quatro casos com citologia sugestiva/compatível com linfoma cutâneo, mas PCR-PARR policlonal apresentaram mais de quatro lesões no momento da coleta de

amostra citológica, sendo dois com lesões nodulares e dois com lesões em placa (tabela 4). Nos três casos com descrição do tamanho das lesões, dois apresentaram cinco centímetros e um três centímetros. Em dois casos foi realizado tratamento quimioterápico, sendo um com cinco sessões de citostal e outro com uma sessão de Citarabina, Vincristina, Lomustina e Doxorubicina. A sobrevida variou de 8 a 90 dias, com mediana de 23 dias.

Tabela 5: Característica de fundo de lâmina e celulares de amostras citológicas com diagnóstico molecular de linfoma cutâneo canino

Caso	Citologia		Fundo de Lâmina				Linfócitos**	Características Celulares		
	Tamanho Celular	Conclusão	Basofilia*	Vacúolos Gordura*	Hemácias**	Fragmentos Citoplasmáticos**		Citoplasma	Núcléolos	Mitoses***
L-1	GPM	Linfoma	Presente	4	105	22	608	Moderadamente Basofílico	Únicos	11
L-2	GP	Linfoma	Presente	11	120	2	256	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	7
L-3	GPM	Inconclusivo	Presente	5	280	112	145	Moderadamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0
L-4	GP	Inconclusivo	Presente	44	228	180	324	Moderadamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0
L-5	GPMG	Linfoma	Presente	24	520	216	240	Intensamente Basofílico	Múltiplos	15
L-6	GG	Linfoma	Presente	0	536	188	104	Moderadamente Basofílico	Únicos	17
L-7	GPMG	Inconclusivo	Presente	34	452	68	41	Discretamente Basofílico	Únicos	0
L-8	GP	Inconclusivo	Presente	84	45	472	360	Intensamente Basofílico	Pouco Proeminentes	1
L-9	GG	Linfoma	Presente	238	84	120	191	Intensamente Basofílico	Múltiplos	14
L-10	GPMG	Linfoma	Ausente	16	612	65	43	Intensamente Basofílico	Múltiplos	7
L-11	GG	Linfoma	Presente	63	16	180	258	Intensamente Basofílico	Múltiplos	7
L-12	GP	Inconclusivo	Presente	128	268	224	184	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	0
L-13	GG	Linfoma	Presente	0	386	16	50	Moderadamente Basofílico	Pouco Proeminentes	5
L-14	GMG	Linfoma	Presente	111	150	88	102	Intensamente Basofílico	Pouco Proeminentes	3
L-15	GPMG	Linfoma	Presente	128	188	44	16	Intensamente Basofílico	Múltiplos	6
L-16	GMG	Linfoma	Presente	10	544	192	258	Intensamente Basofílico	Múltiplos	3
L-17	GPM	Linfoma	Presente	30	254	212	182	Intensamente Basofílico	Múltiplos	4
L-18	GPM	Linfoma	Ausente	0	488	120	312	Intensamente Basofílico	Únicos	3
L-19	GPM	Linfoma	Presente	28	272	140	284	Intensamente Basofílico	Múltiplos	11
L-20	GMG	Linfoma	Presente	7	516	10	258	Intensamente Basofílico	Pouco Proeminentes	12
L-21	GPM	Linfoma	Presente	16	218	72	111	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	7
L-22	GPM	Linfoma	Ausente	2	604	132	166	Intensamente Basofílico	Múltiplos	5
L-23	GPMG	Linfoma	Presente	664	40	18	32	Intensamente Basofílico	Únicos	0
L-24	GPM	Linfoma	Presente	108	240	75	180	Discretamente Basofílico	Múltiplos	0
L-25	GPMG	Linfoma	Ausente	8	664	89	42	Moderadamente Basofílico	Pouco Proeminentes	1
L-26	GG	Linfoma	Ausente	0	172	0	11	Intensamente Basofílico	Múltiplos	0
L-27	GMG	Linfoma	Ausente	5	588	278	366	Intensamente Basofílico	Múltiplos	15
L-28	GPMG	Linfoma	Ausente	0	828	274	228	Intensamente Basofílico	Únicos	0
L-29	GG	Linfoma	Presente	185	13	144	216	Discretamente Basofílico	Pouco Proeminentes	4

GP: Grupo pequenos; GPM: Grupo pequenos médios; GPMG: Grupo pequenos médios e grandes; GMG: Grupo médios grandes; GG: Grupo grandes. *Média por campo, em objetiva de 4x; **Média por campo, em objetiva de 40x.; ***Em 10 campos de objetiva de 40x.

Tabela 6: Característica de fundo de lâmina e celulares dos casos com sugestão citológica de linfoma cutâneo canino e resultado policlonal no PARR

Caso	Tamanho Celular	Fundo de Lâmina				Linfócitos	Características Celulares		
		Basofilia*	Vacúolos Gordura*	Hemácias**	Fragmentos Citoplasmáticos**		Citoplasma	Nucléolos	Mitoses***
E-1	GPMG	Presente	178	65	105	194	Intensamente Basofílico	Múltiplos	5
E-2	GPMG	Presente	42	120	206	114	Moderadamente Basofílico	Únicos	0
E-3	GP	Ausente	35	236	112	58	Moderadamente Basofílico	Múltiplos	4
E-4	GMG	Presente	23	504	152	476	Intensamente Basofílico	Únicos	17

GP: Grupo pequenos; GPMG: Grupo pequenos médios e grandes; GMG: Grupo médios grandes. *Média por campo, em objetiva de 4x; **Média por campo, em objetiva de 40x.; ***Em 10 campos de objetiva de 40x.

Nas amostras citológicas dos linfomas cutâneos, a média de concentração de células linfoides por campo variou de 11 a 608 células/campo, com mediana de 184 (tabela 5). De acordo com as concentrações dos tamanhos das células linfoides, 14% (4/29) das amostras foram incluídas no GP, 28% (8/29) no GPM, 0% no GM (0/29), 24% (7/29) no GPMG, 14% (4/29) no GMG e 21% (6/29) no GG. Foi observada uma fraca correlação negativa entre a concentração de células na amostra e o tamanho celular ($r = -0,313$). Nas amostras citológicas com diagnóstico de linfoma e PCR-PARR policlonal, a concentração de linfócitos variou de 58 a 476 células/campo, com mediana de 154 (tabela 6). Dois casos foram incluídos no GPMG, um no GP e um no GMG.

No exame citológico, as células linfoides dos linfomas cutâneos apresentaram basofilia citoplasmática discreta em 21% (6/29), moderada em 21% (6/29) e intensa em 59% (17/29) das amostras (tabela 5). Os nucléolos foram classificados como pouco proeminentes em 38% (11/29) das amostras, únicos em 21% (6/29) e múltiplos em 41% (12/29). Foram observadas até uma figura de mitose em 34% (10/29) das amostras, mais de uma e menos de 10 em 38% (11/29) e mais de 10 figuras de mitose em 28% (8/29), com mediana de 4 figuras de mitose/campo. Nas amostras citológicas com diagnóstico de linfoma e PARR policlonal (tabela 6), a basofilia citoplasmática foi classificada como moderada em dois casos e intensa nos outros dois, com dois casos apresentando nucléolos únicos e dois múltiplos. A mediana da quantidade de figuras de mitose foi de 4,5/campo. A análise estatística das características clínicas das inflamações linfocíticas e linfoma cutâneo estão descritas na tabela 7.

Tabela 7: Comparações de características clínicas encontradas em cães diagnosticados com inflamação linfocítica e linfoma cutâneo na análise citológica e PARR

Característica clínica	Inflamação		Linfoma		Estatística
	Média (\pm DP)	Mediana	Média (\pm DP)	Mediana	
Idade (meses)	38,4 \pm 35,7	29,0 ^a	104,1 \pm 50,0	106,5 ^b	p = 0,0034 (Mann-Whitney)
Número de nódulos	1,0 \pm 1,1	1,0 ^a	2,4 \pm 1,3	2,0 ^a	p = 0,0832 (Mann-Whitney)
Tamanho dos nódulos	1,7 \pm 1,6	1,5 ^a	5,2 \pm 3,0	5,0 ^b	p = 0,0013 (Mann-Whitney)

Entre os casos de linfoma e inflamação linfocítica foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a idade dos animais ($p = 0,0034$) e tamanho dos nódulos ($p = 0,013$), e não foi observada diferença estatística significativa entre o número de nódulos ($p = 0,0832$). A análise estatística das características citológicas das inflamações linfocíticas e linfoma cutâneo estão descritas na tabela 8.

Tabela 8: Comparações de características citológicas de cães diagnosticados com inflamação linfocítica e linfoma cutâneo na análise citológica e PARR

Característica citológicas	Inflamação		Linfoma		Estatística
	Média (\pm DP)	Mediana	Média (\pm DP)	Mediana	
Número de hemácias / campo	216 \pm 162,1	172,0 ^a	352,2 \pm 225,6	268,0 ^b	p = 0,3091 (Mann-Whitney)
Número de vacúolos de gordura / campo	9,4 \pm 21,1	0,0 ^a	67,3 \pm 130,1	16,0 ^b	p = 0,0197 (Mann-Whitney)
Material amorfo basofílico*	0,3 \pm 0,5	0,0 ^a	0,8 \pm 0,4	1,0 ^b	p = 0,0289 (Mann-Whitney)
Número de fragmentos citoplasmáticos / campo	108,3 \pm 112,8 ^a	72,0	141,8 \pm 110,8 ^a	120,0	p = 0,4795 (t-student)
Número de linfócitos / campo	99,0 \pm 139,9	42,0 ^a	192,0 \pm 133,1	184,0 ^a	p = 0,0544 (Mann-Whitney)
Basofilia citoplasmática**	1,3 \pm 0,8	1,0 ^a	2,4 \pm 0,8	3,0 ^b	p = 0,0080 (Mann-Whitney)
Nucléolos***	0,1 \pm 0,4	0,0 ^a	1,0 \pm 0,9	1,0 ^b	p = 0,0195 (Mann-Whitney)
Figuras de mitose****	1,4 \pm 3,4	0,0 ^a	5,4 \pm 5,4	4,0 ^b	p = 0,0372 (Mann-Whitney)

*Score: 0 – ausente, 1 – presente; **Score: 1- Discretamente basofílico, 2 – Moderadamente basofílico, 3 – Intensamente basofílico; ***Score: 0 – Pouco proeminentes, 1 – Únicos, 2 – Múltiplos; ****Em 10 campos de objetiva de 40x.

Para as comparações de fundo de lâmina na citologia de linfoma cutâneo e inflamações linfocíticas, houve diferença estatística significativa para as análises de número de vacúolos de gordura ($p = 0,0197$) e presença de material amorfo basofílico

($p = 0,0289$). Não houve diferença estatística significativa para o número de hemácias ($p = 0,3091$) e número de fragmentos citoplasmáticos ($p = 0,4795$).

Houve diferença estatística significativa para as avaliações de basofilia citoplasmática ($p = 0,0080$), nucléolos ($p = 0,0195$) e figuras de mitose ($p = 0,0372$). Apesar de não apresentar diferença estatística significativa, o número de linfócitos apresentou tendência a significância ($p = 0,0544$).

Também objetivou-se realizar comparações dos achados morfológicos celulares e de sobrevida entre os grupos de *score* de linfoma determinados no presente trabalho. Não houve diferença estatística significativa entre as avaliações de morfologia celular entre os grupos avaliados, para os parâmetros de basofilia citoplasmática ($p = 0,2192$), nucléolos ($p = 0,1813$), figuras de mitose ($p = 0,3951$) e tempo de sobrevida ($p = 0,1689$). Apesar de não apresentar diferença estatística significativa, o número de linfócitos ($p = 0,0500$) apresentou tendência a significância. Essas informações estão reunidas no Apêndice A.

As características de sobrevida nos diferentes grupos citológicos dos casos PARR monoclonal estão descritas na tabela 9, sendo que dois animais foram excluídos desta análise devido a impossibilidade de obtenção desta informação.

Tabela 9: Média, desvio padrão e mediana de dias de sobrevida de 27 casos de linfoma cutâneo canino de acordo com o tamanho celular predominante na amostra citológica

Grupo	n	Tempo de Sobrevida (dias)		% de Óbitos	
		Média (DP \pm)	Mediana	≤ 90 dias	> 90 dias
GP	4	155 (± 155)	166	50% (2/4)	50% (2/4)
GPM	8	91 (± 71)	61	63% (5/8)	38% (3/8)
GPMG	6	106 (± 209)	19	83% (5/6)	17% (1/6)
GMG	4	9 (± 14)	2	100% (4/4)	0% (0/4)
GG	5	55 (± 37)	62	100% (5/5)	0% (0/5)
Total	27	85,0 ($\pm 121,3$)	52,0	78% (21/27)	22% (6/27)

GP: Grupo pequenos; GPM: Grupo pequenos médios; GPMG: Grupo pequenos médios e grandes; GMG: Grupo médios grandes; GG: Grupo grandes. DP: Desvio-padrão.

A mediana de sobrevida dos animais com proliferação monoclonal foi de 52 dias, com 78% indo a óbito nos primeiros 90 dias e 22% sobrevida maior que 90 dias (tabela 7). Nos casos com baixa concentração de células linfoides grandes na citologia (GP e GPM), 58% (7/12) foram a óbito nos primeiros 90 dias. Nos casos com pelos

menos 20% de células grandes (GPMG, GMG e GG), 93% (14/15) foram a óbito nos primeiros 90 dias. Foi observada correlação negativa moderada entre a presença de células linfoides grandes (GPMG, GMG, GG) e a sobrevida ≥ 90 dias ($r = -0,321$). Nos casos com diagnóstico citológico de linfoma e PARR policlonal a mediana de sobrevida foi de 23 dias, com todos os quatro animais indo a óbito nos primeiros 90 dias.

A proporção de animais vivos dentro dos grupos de score em relação aos dias encontra-se representada na figura 3.

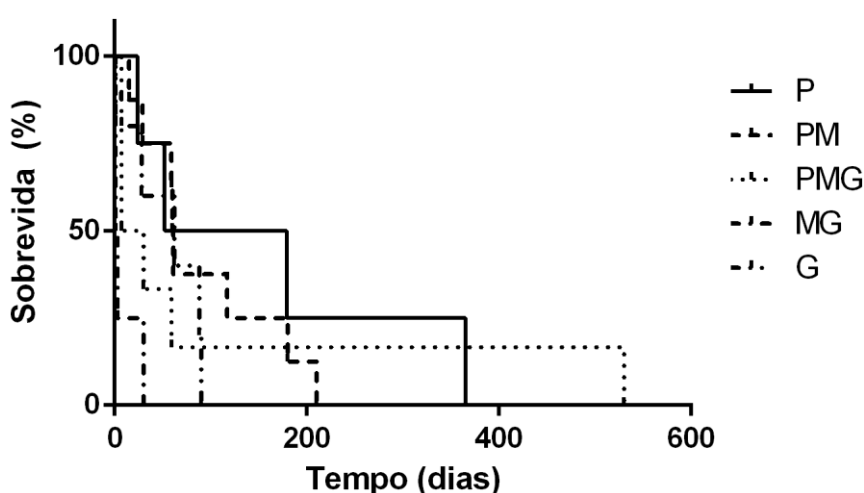


Figura 3. Proporção de animais vivos dentro de cada grupo de score de tamanho de linfócitos observado no exame citológico de cães portadores de linfoma cutâneo.

4.4 Discussão

Apesar da sua relevância na medicina veterinária de pequenos animais, este é possivelmente o primeiro estudo que avalia as características citológicas do linfoma cutâneo canino. Um achado importante deste estudo foi o pequeno tempo de sobrevida dos animais portadores da enfermidade, com mediana de sobrevida inferior a dois meses. Em outros estudos foram encontradas medianas de 388 dias para o linfoma cutâneo (Deravi *et al.*, 2017), 374 dias para o linfoma não epiteliotrópico (Azuma *et al.*, 2022) e de 90 a 150 dias para o linfoma epiteliotrópico (Beale, 1993; Fontaine, 2010; Chan *et al.*, 2018; Azuma *et al.*, 2022; Dettwiler, 2023). O menor tempo de sobrevida observado no presente estudo pode ser justificado pelas diferenças metodológicas empregadas, já que na literatura mencionada o diagnóstico foi baseado

no exame histopatológico. A mediana de sobrevida de 148 dias dos casos com exame histopatológico do presente estudo, sugere que o maior tempo de sobrevida relatado na literatura está principalmente relacionado às condições físicas do animal permitirem a realização do procedimento cirúrgico da biópsia. Um dado que reforça essa afirmação é o fato de que mais da metade dos casos com diagnóstico citológico de linfoma cutâneo e PARR monoclonal foram submetidos à quimioterapia, isto é, receberam tratamento e, não obstante, resultaram em mediana de sobrevida de 60 dias.

Outro resultado relevante do presente estudo foi o da eficiência do exame citológico no diagnóstico do linfoma cutâneo. Dos 28 casos com diagnóstico sugestivo/compatível com linfoma cutâneo, 82% resultaram em PARR monoclonal, isto é, confirmaram o diagnóstico da neoplasia. Dos cinco casos policlonais, apenas um apresentava exame histopatológico. Isto chama a atenção a uma importante limitação do presente estudo, que é a ausência de histopatologia na maioria dos casos. De qualquer modo, o caso com citologia sugestiva/compatível com linfoma, PARR policlonal e exame histopatológico, resultou em diagnóstico histopatológico de linfoma cutâneo epiteliotrópico. Apesar de utilizarmos o PARR como método ouro para a confirmação de linfoma / inflamação, o resultado do exame histopatológico, associado às características presentes no caso, típicas do linfoma cutâneo, como idade (132 meses), número de lesões (≥ 4), tamanho de lesão (4 cm), aspecto citológico sugestivo/compatível com linfoma, que incluiu 11 figuras de mitose/campo, e decisão clínica de tratamento quimioterápico, com óbito em 59 dias, determinaram a inclusão do caso, apesar do PARR policlonal, nos casos de linfoma.

Os outros quatro casos com diagnóstico citológico de linfoma e PARR policlonal foram excluídos dos casos de linfoma. Entretanto, estes casos também apresentaram clínica compatível com linfoma cutâneo, com lesões em número de quatro ou mais (quatro casos), em forma de placa (dois casos) e com tamanhos maiores que 2 cm (os três casos com informação de tamanho de lesão). Além disso, nas amostras citológicas de três casos a concentração de células linfoides grandes foi $\geq 20\%$, característica observada em apenas dois dos sete casos com diagnóstico citológico de inflamação / inconclusivo e PARR policlonal. O fato de a literatura relatar valores de sensibilidade diagnóstica do PARR variando entre 74 e 91% (Burnett *et al.*, 2003; Avery, 2009; Thalheim *et al.*, 2013), reforça a possibilidade dos quatro casos

policlonais serem de fato falsos negativos no PARR, já que com a inclusão destes casos, mais aquele policlonal com exame histopatológico de linfoma epiteliotrópico, resulta em 82% de concordância do PARR com a citologia no presente estudo. Apesar de excluí-los dos casos de linfoma, entendemos que os quatro casos policlonais também não podem ser assumidos como falsos positivos do exame citológico devido as características clínicas e citológicas.

Os linfomas não epiteliotrópicos são proliferações neoplásicas de células T ou B. Já linfomas epiteliotrópicos são neoplasias exclusivamente T (Valli, 2013; Jawed *et al.* 2014). Entretanto no presente estudo um mesmo caso (L-2), diagnosticado no exame histopatológico como linfoma cutâneo epiteliotrópico, resultou em clonalidade de células B no teste de PARR. Segundo Thalheim *et al.* (2013), o PARR é um teste molecular com maior acurácia para a determinação de clonalidade e menor acurácia para determinação do imunofenótipo, sendo que na literatura já foi relatado cerca de 30% de não concordância do imunofenótipo quando comparada a outros testes moleculares.

Entre as características clínicas, duas foram estatisticamente mais associadas ao linfoma ou inflamação: idade do animal e tamanho das lesões, com as inflamações ocorrendo principalmente em animais com menos de três anos (71%) e com lesões menores que 2 cm (86%), e o linfoma sendo diagnosticado predominantemente em animais com mais de três anos (89%) e com lesões maiores que 2 cm (85%). As lesões em placa, frequentemente associadas ao linfoma cutâneo (Vail *et al.*, 2013) foram observadas em 18% das amostras neoplásicas.

Na amostra citológica, foi observada uma tendência a maior concentração de linfócitos no linfoma em relação aos processos inflamatórios ($p = 0,05$), com os casos de linfoma apresentando fundo de lâmina tipicamente basofílico (76% vs 29% das inflamações) e com vacúolos de gordura (62% vs 14% com mais de 10 vacúolos/campo). Essa diferença pode ser justificada pela basofilia citoplasmática e vacúolos de gordura do fundo de lâmina serem resultantes da ruptura celular causada pela fragilidade celular dos linfócitos, que pode ser mais proeminente nos processos neoplásicos (Comazzi; MacNeill, 2017; Blauvelt; Messick, 2020). Outro achado associado à fragilidade celular do linfócito é a concentração de fragmentos celulares (Blauvelt; Messick, 2020) que, entretanto, não apresentou diferença significativa nas amostras de linfoma e inflamação.

Quanto a morfologia do linfócito neoplásico no exame citológico, as informações são escassas e, eventualmente, conflitantes. Para Raskin, 2023, o citoplasma dos linfócitos neoplásicos, além de escasso a moderado, apresenta basofilia citoplasmática discreta. Para Albanese, 2017, a intensidade da basofilia varia de discreto a intenso. No presente estudo, a intensidade da basofilia citoplasmática foi estatisticamente diferente entre os casos neoplásicos e inflamatórios, sendo definidas como intensa em 59 e 14% das amostras de linfoma e inflamação, respectivamente. Também foi observada diferença estatística nas características dos nucléolos das amostras de linfoma e inflamação, com presença de nucléolos múltiplos em 39% das amostras de linfoma e em nenhuma amostra de inflamação. Este resultado não surpreende, já que a presença de nucléolos múltiplos está relacionada à processos neoplásicos malignos (Meinkoth; Cowell; Tyler, 2020; Raskin, 2023).

A terceira característica morfológica que resultou em diferença estatística foi a concentração de figuras de mitose, com mais de uma figura sendo observada em 66 e 14% das amostras de linfoma e inflamação, respectivamente. A mitose ocorre durante a fase M do ciclo celular, em que decorre a duplicação e organização do DNA celular. A contagem de figuras de mitose em análises citológicas e histopatológicas é o método mais amplamente utilizado para determinar a proliferação celular em tumores, devido a facilidade e o custo econômico, apesar de não ser um método tão preciso e reprodutível quanto outros índices, como a determinação do Ki-67 (Donovan *et al.*, 2021). Em um estudo, foi encontrado um índice mitótico ≥ 7 /campo histopatológico para definir um pior prognóstico para o linfoma cutâneo canino (Dettwiler *et al.*, 2023). No presente estudo não foi observada correlação entre a contagem de figuras de mitose e a sobrevida dos pacientes.

Apesar de não haver diferença significativa do tempo de sobrevida entre os grupos, foi observada correlação negativa entre a presença de células linfóides grandes (GPMG, GMG, GG) e o tempo de sobrevida ≥ 90 dias. Entretanto, a baixa representatividade dos grupos de linfoma, outra importante limitação do presente estudo, pode ter influenciado na ausência de associação entre os tipos celulares e o tempo de sobrevida. A relativamente baixa incidência do linfoma cutâneo canino, que representou menos de 1% das neoplasias de pele caninas diagnosticadas em estudos realizados no Brasil e Japão e entre 1 e 2% das neoplasias cutâneas caninas da Suíça

e Estados Unidos, justifica o baixo número de casos do presente estudo (De Souza *et al.*, 2006; Villamil *et al.*, 2011; Graf *et al.*, 2018 e Kok *et al.*, 2019).

Apesar de algumas características clínicas e citológicas terem sido mais associadas à inflamação linfocítica ou linfoma cutâneo, entendemos que a interpretação conjunta dessas características ocasionalmente não permite o direcionamento para o diagnóstico citológico de neoplasia / inflamação. Isto fica evidenciado pelos 23% de casos com citologia conclusiva apenas para proliferação linfocítica, que resultaram em proporções quase iguais de PARR monoclonal ou linfoma (cinco casos) e de PARR policlonal ou inflamação (quatro casos). Nesses casos, ficou caracterizado a eventual limitação do exame citológico que, mesmo associado às informações clínicas, torna obrigatória a utilização de técnicas diagnósticas adicionais, como molecular, imunofenotipagem ou histopatologia.

Conclui-se que o linfoma cutâneo canino é uma doença com menor tempo de sobrevida ao relatado na literatura e que a citologia, associada às informações clínicas, é um método eficiente de diagnóstico dessa neoplasia, com possíveis associações das características celulares com o desfecho dos pacientes precisando ser mais estudadas. Além disso, as principais características clínicas que diferenciam o linfoma cutâneo e a inflamação linfocítica são idade e tamanho dos nódulos e características citológicas são número de vacúolos de gordura por campo e presença de material amorfo basofílico em fundo de lâmina, além de intensidade da basofilia citoplasmática, número e quantidade de nucléolos e número de figuras de mitose em 10 campos na objetiva de 40x.

4.5 Referências Bibliográficas

ALBANESE, F. Canine and Feline Skin Cytology. 1st. ed. Springer International Publishing Switzerland, 2017. .

AVERY, A.C. Molecular diagnostics of hematologic malignancies in small animals. Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract., v.42, p.97-110, 2009.

AZUMA, K. *et al.* Outcomes and prognostic factors in canine epitheliotropic and nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphomas. Veterinary and Comparative Oncology, v. 20, n. 1, p. 118–126, 2022.

BEALE K.M., BOLON B. Canine cutaneous lymphosarcoma: epitheliotropic and non-epitheliotropic, a retrospective study. IN: IHRKE, P.J., MASON, I.S., WHITE, S.D. Advances in veterinary dermatology, vol. 2. New York: Pergamon Press, 1993.

BLAUVELT, M.; MESSICK, J. B. The lymph nodes. In: VALENCIANO, A. C.; COWELL, R. L. Cowell & Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. 5ª ed. St Louis, Missouri: Elsevier, 2020.

BURNETT, R.C.; VERNAU, W.; MODIANO, J.F. *et al.* Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.*, v.40, p.32-41, 2003.

CALAZANS, S. G.; DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C.R., DE NARDI, A. B. Oncologia em cães e gatos. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

CHAN, C. M.; FRIMODERADAMENTE BASOFÍLICOERGER, A. E.; MOORE, A. S. Clinical outcome and prognosis of dogs with histopathological features consistent with epitheliotropic lymphoma: a retrospective study of 148 cases (2003-2015). *Veterinary Dermatology*, v. 29, 2018

COMAZZI, S.; MAC NEIL, A. L. Cytology of lymphoid tissues. In: BARGER, A. M.; MACNEIL, A. L. Small animal cytologic diagnosis. CRC Press, 2017

DE SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; DE BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural*, v. 36, n.2, p. 555-560, 2006

DERAVI, N.; BERKE, O.; WOODS, J. P.; BIENZLE, D. Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 191, p. 5-13, 2017

DETTWILER, M. *et al.* Prognostic clinical and histopathological features of canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma. *Veterinary Pathology*, v. 60, n. 2, p. 162–171, 2023.

DONOVAN, T. A.; MOORE, F. M.; BERTRAM, C. A.; LUONG, R.; BOLFA, P.; KLOPFLEISCH, R.; TVEDTEN, H.; SALAS, E. N.; WHITLEY, D. B.; AUBREVILLE, M.; MEUTEN, D. J. Mitotic figures – normal, atypical, and imposters: a guide to identification. *Veterinary Pathology*, v. 58, i. 2, p. 243-257, 2021

DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.; CHAULK, L.E.; HIBBARD, H.H. The prevalence of spontaneous neoplasms in a defined canine population. *Am. J. Public Health Nations Health* 1966, 56, 254–265.

FONTAINE J, HEIMANN M, DAY MJ. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases. *Vet Dermatol*. v. 21, p. 267–75, 2010

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P. *et al.* Cytohistological and Immunological Classification of Canine Malignant Lymphomas: Comparison with Human Non-Hodgkin's Lymphomas. *J. Comp. Path.* v. 117, p. 35-39, 1997

GRAF, R.; POSPISCHIL, A.; GUSCETTI, F.; MEIER, D.; WELLE, M.; DETTWILER, M. Cutaneous tumors in swiss dogs: Retropective data from the swiss canine cancer registry, 2008-2013. *Veterinary Pathology*, v. 55, i. 6, p. 809-820, 2018

IPEK, V.; CANGUL, I. T.; AKKOC, A. Comparative evaluation of the cytological, histopathological and immunohistochemical findings of canine cutaneous and subcutaneous masses. *Acta Veterinaria*, v. 71, n. 1, 2021

JAWED S.I., MYSKOWSKI P.L., HORWITZ S. *et al.* Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*. v. 70, n. 2, 2014

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica, Texto e Atlas*. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KOK, M. K.; CHAMBERS, J. K.; TSUBOI, M. *et al.* Retrospective study of canine cutaneous tumors in Japan, 2008-2017. *J. Vet. Med. Sci.* v. 81, n. 8., p. 1133-1143, 2019

MAZARO, R. D.; LORENZETTI, D. M.; LEITE, S. M. G. *et al.* Epidemiological, anatomopathological, and immunophenotypical aspects of cutaneous lymphomas in dogs. *Pesq Vet Bras*, v. 43, 2023

MEINKOTH, J. H.; COWELL, R. L.; TYLER, R. D. Cell types and criteria of malignancy. In: VALENCIANO, A. C.; COWELL, R. L. *Cowell & Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 5^a ed. St Louis, Missouri: Elsevier, 2020.

MILLER, A.G.; MORLEY, P. S.; RAO, S.; AVERY, A. C.; LANA, S. E.; OLVER, C.S. Anemia is associated with decrease survival time in dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern Med*, 23:116-122, 2009

MIZUTANI, N.; GOTO-KOSHINO, Y.; TAKAHASHI, M.; UCHIDA, K.; TSUJIMOTO, H. Clinical and histopathological evaluation of 16 dogs with T-zone lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 78, n. 8, 2016

NOWOSH, V.; MACIEIRA, D. B.; ALENCAR, N. X. Applicability of PCR-based clonality assay in dogs with multicentric lymphoma. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 69, n. 3, p. 765-765, 2017

PINELLO, K. C.; DAGLI, M. L. Z. Etiologia e epidemiologia das neoplasias hematopoiéticas em cães e gatos. In: JARK, P. C.; RODRIGUES, L. C. De S. *Neoplasias hematopoiéticas em cães e gatos*. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2022. cap. 1. p. 3-19.

RASKIN, R. E. General categories of cytologic interpretation. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J.; BOES, K. M. *Canine and feline cytopathology*. 4^a ed. St Louis, Missouri: Elsevier, 2024.

SEELIG, D. M.; AVERY, A. C.; EHRHART, E. J.; LINDEN, M. A. The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Vet Sci*, v. 3, n. 11, 2016

THALHEIM, L.; WILLIAMS, L. E.; BORST, L.B. *et al.* Lymphoma Immunophenotype of Dogs Determined by Immunohistochemistry, Flow Cytometry, and Polymerase Chain Reaction for Antigen Receptor Rearrangements. *J Vet Intern Med*, v. 27, p. 1509-1516, 2013

VAIL, D. M. PINKERTON, M. E. YOUNG, K. M. Hematopoietic Tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5 ed, St. Louis, Missouri: Elsevier, 2013, p. 608-678

VALLI, V. E., KASS, P., SAN MYINT, M., AND SCOTT, F. Canine lymphoma: The effect of age, stage of disease, subtype of tumor, mitotic rate and treatment protocol on overall survival. *Vet Pathol*. v. 50, p. 738–748, 2013

VALLI, V. E.; BIENZLE, D.; MEUTEN, D. J. Tumors of the Hemolymphatic System. In: MEUTEN, D. J. *Tumors in Domestic Animals*. 5 ed. John Wiley & Sons, 2017

VILLAMIL, J. A.; HENRY, C. J.; BRYAN, J. N. *et al.* Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. *JAVMA*, v. 239, n. 7, 2011

WATTON, T. C.; PURZYCKA, K.; FITZGERALD, E. Computed tomographic findings and clinical features in dogs with canine cutaneous lymphoma: 10 cases (2007-2018). *JAVMA*, v. 259, n. 12, 2021

APÊNDICE A - Comparação de características citológicas de cães diagnosticados com linfoma cutâneo com relação ao score de tamanho celular das células linfóides

	GP		GPM		GPMG		GMG		GG		Estatística
	Média	Mediana	Média	Mediana	Média	Mediana	Média	Mediana	Média	Mediana	
Sobrevida (dias)	155,0 ± 155,4	115,5 ^a	91,4 ± 71,0	60,5 ^a	105,7 ± 209,0	18,5 ^a	8,8 ± 14,2	2,0 ^a	55,0 ± 36,7	62,0 ^a	p = 0,1689 (longrank de Cox-Mantel)
Número de linfócitos / campo	281,0 ± 77,0	290,0 ^a	248,5 ± 160,4	181,0 ^a	91,7 ± 97,7	42,0 ^a	246,0 ± 108,7	258,0 ^a	138,3 ± 98,3	147,5 ^a	p = 0,0500 (Kruskal-Wallis ad-hoc Dunns)
Basofilia Citoplasmática*	1,5 ± 1,0	1,0 ^a	2,3 ± 0,9	2,5 ^a	2,4 ± 1,0	3,0 ^a	3,0 ± 0,0	3,0 ^a	2,3 ± 0,8	2,5 ^a	p = 0,2192 (Kruskal-Wallis ad-hoc Dunns)
Nucléolos**	0,0 ± 0,0	0,0 ^a	1,3 ± 0,9	1,5 ^a	1,3 ± 0,8	1,0 ^a	1,0 ± 1,2	1,0 ^a	1,2 ± 1,0	1,5 ^a	p = 0,1813 (Kruskal-Wallis ad-hoc Dunns)
Mitose***	2,0 ± 3,4	0,5 ^a	5,1 ± 4,3	4,5 ^a	4,1 ± 5,6	1,0 ^a	8,3 ± 6,2	7,5 ^a	7,8 ± 6,4	6,0 ^a	p = 0,3951 (Kruskal-Wallis ad-hoc Dunns)

GP: Grupo pequenos; GPM: Grupo pequenos médios; GPMG: Grupo pequenos médios e grandes; GMG: Grupo médios grandes; GG: Grupo grandes; *Score: 1- Discretamente basofílico, 2 – Moderadamente basofílico, 3 – Intensamente basofílico; **Score: 0 – Pouco proeminentes, 1 – Únicos, 2 – Múltiplos; ***Em 10 campos de objetiva de 40x.