

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

**IMUNOFENOTIPAGEM DO LINFOMA CANINO PELA TÉCNICA DA
IMUNOCITOQUÍMICA (CELL BLOCK)**

CARLA EMANUELA TERTULIANO CAIRES

**Belo Horizonte – MG
2018**

CARLA EMANUELA TERTULIANO CAIRES

**IMUNOFENOTIPAGEM DO LINFOMA CANINO PELA TÉCNICA DA
IMUNOCITOQUÍMICA (CELL BLOCK)**

**Dissertação apresentada à Escola
de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais, como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciência
Animal.**

**Área: Clínica e Cirurgia
Veterinárias. (Enfâse Oncologia)**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto
Baracat de Araújo.**

**Co-orientadores: Dra. Gleidice
Eunice Lavalle**

Prof. Dr. Rúbens Antônio Carneiro

**Belo Horizonte - MG
2018**

C136i Caires, Carla Emanuela Tertuliano, 1984-
Imunofenotipagem do linfoma canino pela técnica da imunocitoquímica (cell block) /
Carla Emanuela Tertuliano Caires. – 2018.
51 p. : il.

Orientador: Roberto Baracat de Araújo
Co-orientadores: Gleidice Eunice Lavalle, Rúbens Antônio Carneiro
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Imunocitoquímica – Teses. 3. Imunohistoquímica – Teses.
4. Imunofenotipagem – Teses. 5. Linfoma – Teses. 6. Oncologia veterinária – Teses.
I. Araújo, Roberto Baracat de. II. Lavalle, Gleidice Eunice. III. Carneiro, Rúbens Antônio.
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

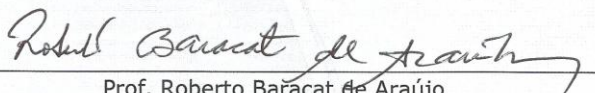
CDD – 636.708 96

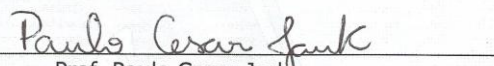
FOLHA DE APROVAÇÃO

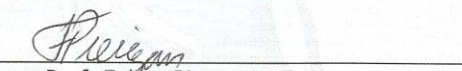
CARLA EMANUELA TERTULIANO CAIRES

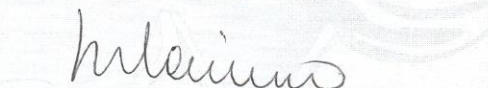
Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

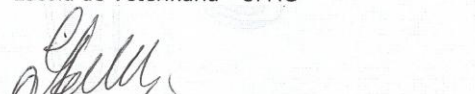
Aprovada em 28 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Roberto Baracat de Araújo
Presidente - Orientador


Prof. Paulo Cesar Jark
Universidade Brasil - SP


Prof. Felipe Pierezan
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Rubens Antônio Carneiro
Escola de Veterinária - UFMG


Dra. Gleidice Eunice Laval
Escola de Veterinária - UFMG

Agradecimentos

Um clínico que se dispõe a voltar à escola e a fazer um mestrado tem mais que vontade acadêmica, existe um sentimento de amor. Como era de se esperar todo amor tem suas etapas, vivi cada uma delas como cada pessoa que passou pelo mesmo caminho.

Agradeço à Deus e Nossa Senhora por estarem sempre guiando meus passos, encaminhando para que tudo tivesse acontecido no momento certo.

Agradeço a muitos, principalmente aos animais, que nos ensinam no silêncio.

Ao meu marido, agradeço por ser meu porto seguro, meu amigo, meu amor, meu companheiro.

Aos meus pais, pela fé e pela eterna dedicação, pelo abraço mais forte.

Às minhas irmãs, pelo carinho especial, pela esperança.

Aos meus sogros e cunhada, pelo apoio e carinho.

Aos meus tios, primos e avós, pela melhor risada.

Aos meus amigos da infância, pelo melhor brinde e tanto mais.

Ao meus amigos da graduação, pela confiança, pelas idéias e tanto mais.

Ao meus novos amigos, pela ajuda imensurável.

Aos amigos que fizeram da jornada mais leve, pelas palavras amigas, análises patológicas e amostragens.

Aos meus professores, pelo ensino, apoio, por despertar sentimentos diferentes.

Àquela que não se diz professora mas que é a maior delas ("mamys"), eterna gratidão e amizade.

À oncologia veterinária, pela esperança que algo a mais é possível.

Sumário

Sumário.....	6
Lista de Figuras	7
Lista de Tabela	8
RESUMO.....	9
Palavras-Chave.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. Epidemiologia.....	13
3.2. Classificação.....	14
3.2.1. Classificação anatômica.....	14
3.2.2. Classificação histológica.....	15
3.2.3. Classificação imunofenotípica	16
3.3. Estadiamento	16
3.4. Prognóstico	17
3.5. Diagnóstico.....	18
3.6. Cell block	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Animais	20
4.2 Amostras	21
4.3 Técnica PAAF	21
4.4 TécnicaCell block	21
4.5 Biópsia	23
4.6 Imunocitoquímica e Imunohistoquímica	23
4.7 Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
9. ANEXOS	47
Anexo 1- CEUA	47
Anexo 2 - Consentimento livre e esclarecido	48
Anexo 3 - Distribuição do número de animais com linfoma canino distribuídos de acordo com as regiões da Grande Belo Horizonte	49
Anexo 4: Tabela geral.....	51

Lista de Figuras

Figura 1: Estadimanento do LC, segundo a OMS (Owen, 1980)	17
Figura 2: Seringa de 10ml com material citológico e formação do grumo	22
Figura 3: Cassete com filtro de biópsia e material de origem citológica e bloco de parafina.....	22
Figura 4: Cell block corado com hematoxilina-eosina.....	23
Figura 5: Distribuição racial do LC	25
Figura 6: Gráfico com distribuição anatômica do LC e curva de sobrevida analisando as formas anatômicas do LC.....	26
Figura 7: Curva de sobrevida do LC. estadimanento.....	27
Figura 8: Curva de sobrevida do LC sub-estadio.....	27
Figura 9: Curva de sobrevida do LC. subtipos histológicos e utilização de corticóide	29
Figura 10: Média de sobrevida entre os diferentes imunofenótipos do LC	29
Figura 11: Imunohistoquímica (IHQ) e imunocitoquímica (ICQ) do LC.	30

Lista de Tabela

Tabela 1: Classificação do LC de acordo com imunofenótipo	24
Tabela 2: Anticorpo, fonte, clone, diluição, recuperação e tempo de incubação	24
Tabela 3: Tabela de contingência (Altman e Brand, 1994a;b)	24
Tabela 4: Porcentagem de distribuição de acordo com o estadio e sub-estadio.....	26
Tabela 5: Porcentagem de distribuição dos subtipos do LC	28
Tabela 6: Frequências absolutas das classificações de ambas técnicas (biópsia e cell block)	30
Tabela 7: Análise realizado por classe pelo método de Kappa.....	31

RESUMO

O linfoma canino é uma das neoplasias hematopoiéticas mais frequentes na rotina do médico veterinário. Os animais podem apresentar diferentes formas clínicas, estadio e sub-estadio. Considerada uma doença heterogênea, o linfoma é classificado a partir do seu imunofenótipo para em seguida ser sub-classificado. Conhecer o imunofenótipo é importante para o diagnóstico, para o prognóstico e tratamento. A imunofenotipagem na maioria dos casos é realizada pela imunohistoquímica (IHQ), através de um fragmento de tecido obtido pela biópsia. Para a realização da biópsia os pacientes precisam ser submetidos a cirurgia porém nem sempre apresentam condições clínicas. A busca por um diagnóstico precoce, pouco invasivo, e com menor custo tem sido motivada em diversas doenças. Uma modalidade ainda pouco explorada na medicina veterinária é a realização do cell block (CB), técnica que permite a embocagem do material de origem citológica para a realização de exames complementares, incluindo a imunocitoquímica (ICQ). O objetivo deste trabalho foi realizar a imunofenotipagem do linfoma canino através ICQ pela técnica do CB. Foram utilizadas 54 amostras de cães com linfoma de diferentes apresentações clínicas. As amostras da ICQ foram comparadas com as amostras de IHQ provenientes do mesmo tecido. A ICQ pela técnica do CB apresentou uma acurácia de 87,04%, e o valor de Kappa de 0,6986 (p. <0,001). Na análise específica por classe, as classificações de células T ou B tiveram altos valores de Kappa, acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Não foram identificados animais do imunofenótipo não T não B (nulo). A utilização do cell block foi considerada uma técnica válida para realização da imunofenotipagem do linfoma canino e auxílio diagnóstico. O CB poderá ser implantado na rotina diagnóstica oferecendo informação prognóstica e melhorando o diagnóstico definitivo de uma maneira rápida, simples, econômica e eficaz.

Palavras-Chave: Imunocitoquímica, Imunohistoquímica, Cell block, Imunofenotipagem, Linfoma Canino, CD3 e CD79a.

ABSTRACT

Canine lymphoma is one of the most frequent hematopoietic neoplasms in veterinary routine. Animals may have different clinical presentations, stage and sub-stage. Lymphoma is considered a heterogeneous disease, classified by immunophenotype and then sub-classified. Immunophenotype knowledge is important for diagnosis and prognosis. Immunophenotyping, in most cases, is done by means of immunohistochemistry (IHC), using a tissue fragment obtained from biopsy. Patients are often in poor condition to undergo surgery, so it is not always possible to obtain a tissue sample for biopsy. The search for an early, less invasive, and low-cost diagnosis has been motivated in several pathologies. A modality not yet explored in veterinary medicine is the cell block (CB), a technique that allows a re-embedding of material of cytological origin for complementary exams, including immunocytochemistry (ICQ). The objective of this study was to perform immunophenotyping of canine lymphoma through ICQ using CB technique. Fifty-four samples from dogs with different clinical presentations were used. ICQ samples were compared with IHC samples from the same tissue. ICQ from CB technique had 87.04% accuracy, and Kappa value of 0.6986 ($p < 0.001$). In class-specific analysis, such as T, B or mixed cell classification, ICQ had high values of Kappa, accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value. No animals of the non-T non-B immunophenotype (null) were identified. Cell block was designed for canine lymphoma immunophenotyping and to aid in diagnosis. CB can be implemented in the diagnostic routine, providing prognostic information and improving definitive diagnosis in a fast, simple, inexpensive and effective way.

Keywords: immunocytochemistry, immunohistochemistry, cell block, immunophenotyping, canine lymphoma, CD3, CD79a

1. INTRODUÇÃO

O linfoma canino é a neoplasias hematopoiéticas mais frequentes em cães (Rodaski e Piekarz, 2008). Surge de uma transformação neoplásica e subsequente proliferação de linfócitos em órgãos linfóides sólidos (Morris e Dobson, 2007), tais como linfonodos, baço e medula óssea, no entanto, eles podem surgir em qualquer tecido do corpo (Vail et al., 2013). A doença pode desenvolver-se em vários locais simultaneamente ou originar-se em um local e progredir para outros, embora isso não seja considerado metástase (Morris e Dobson, 2007).

A classificação do linfoma canino deve ser baseada na distribuição anatômica, nos critérios histopatológicos e também de acordo com seu imunofenótipo. A classificação pela distribuição anatômica compreende o linfoma multicêntrico, seguido dos tipos mediastinal, intestinal e cutâneo. A forma extra nodal irá ocorrer em qualquer local fora do sistema linfático (Vail et al., 2013). Existem vários esquemas de classificações histológicas do linfoma canino, a maioria está ligada ao modelo humano do linfoma não-Hodgkin, sendo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) a mais utilizada (Morris e Dobson, 2007). A classificação imunofenotípica leva em consideração o imunofenótipo, podendo ser classificada como de células T, de células B ou Nulo (nem de células B ou T) (Vail et al., 2013). A determinação da imunofenotipagem do tumor fornece informação útil quanto ao prognóstico. O imunofenótipo do linfoma é identificado pela expressão das moléculas em sua superfície, sendo que as células B apresentam reação positiva para CD79a e CD20 e para células T a reação é positiva para CD3 (Vail et al., 2013), sendo nulo quando não é observado imunorreatividade positiva para ambos os anticorpos (Daleck et al., 2009).

A forma mais rápida e mais fácil para confirmar o diagnóstico do linfoma é através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de um linfonodo ou outro tecido, alternativamente ou adicionalmente se houver dúvida sobre o diagnóstico citológico, pode-se obter um fragmento de tecido por biópsia para análise histopatológica (Morris e Dobson, 2007). Embora análise citológica possa ser satisfatória, a biópsia assume um papel importante no diagnóstico do linfoma quando as citologias são inconclusivas e tem a vantagem de proporcionar informações sobre as características estruturais do tecido, subclassificações e permitir a realização da imunofenotipagem (Dickinson, 2008). No entanto o paciente poderá não estar em condições ideais para ser submetido aos riscos de uma cirurgia para a coleta da biópsia, além dos custos inerentes ao procedimento (Fernandes et al., 2015).

A imunohistoquímica (IHQ) é o exame realizado através de amostras histopatológicas utilizada para auxiliar tanto na imunofenotipagem dos linfomas como na confirmação do diagnóstico. Outras técnicas como a imunocitoquímica (ICQ), citometria de fluxo (CF) e a reação de cadeia de polimerase (PCR) podem ser realizadas com o mesmo propósito (Withrow, 2013; Cowell et al., 2009). A IHQ é considerada como técnica padrão ouro, no entanto para sua realização é necessário um fragmento de tecido através da biópsia (Fernandes et al., 2015).

Uma abordagem diagnóstica ainda pouco explorada em medicina veterinária vincula-se à realização do cell block (CB) (Mulder et al., 1997; Sanchez e Selvaggi, 2006). Esse método otimiza potencialmente a amostra citológica por permitir a emblocagem em parafina, com posterior processamento, à semelhança do que é realizado com amostras histológicas (Masserdotti, 2006; Zanoni, 2012). A citoinclusão foi testada para tumores de mama e mostrou-se como um método acessível, rápido, baixo custo e com alta sensibilidade no diagnóstico

(Silveira et al., 2017). A imunocitoquímica (ICQ) tornou-se uma técnica auxiliar no diagnóstico de grande valia (Ramos-Vara et al., 2011).

A realização da técnica do CB como técnica auxiliar no diagnóstico do linfoma canino é de fundamental importância para ser implementada como ferramenta valiosa para imunofenotipagem. No entanto estudos adicionais são importantes para determinar a sensibilidade e especificidade do exame, em comparação com técnica padrão ouro (histopatologia e imunohistoquímica), permitindo uma melhor avaliação clínica dos benefícios e limitações dessa técnica.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados da imunofenotipagem do linfoma canino obtidos por imunocitoquímica através da técnica do cell block com a imunohistoquímica (padrão ouro) obtidos por biópsia, determinando a sensibilidade e especificidade desta abordagem diagnóstica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Epidemiologia

O linfoma canino (LC) é considerado a neoplasia hematopoiética mais frequente nos cães, e uma das mais comuns na rotina da oncologia, representa um grupo de doença heterogênea de comportamento variado, caracterizado pela transformação maligna dos linfócitos (Valli et al., 2006; Seelig et al., 2016; Zandvliet, 2016).

Os cães e os humanos compartilham do mesmo ambiente e estão sujeitos a riscos similares para o desenvolvimento do linfoma, o que o faz um modelo espontâneo de estudo para o linfoma do tipo não-Hodgkin, além de conviverem no mesmo ambiente, outras características são bastante similares, o que o torna cada vez mais interessante como modelo para estudo desta neoplasia (Vezzali et al., 2010; Richrds e Suter, 2015; Seelig et al., 2016).

O LC é mais frequente em cães de meia idade a idosos (Greenlee et al., 1990), mas pode ocorrer em animais mais jovens. Ocorre com maior frequência entre 7-8 anos de idade, sendo descrita uma variação entre 1 a 16 anos (Pastor et al., 2009; Vezzali et al., 2010; Villamil et al., 2010). A predisposição sexual não é definida (Pastor et al., 2009; Vail et al., 2013), embora pode-se encontrar relatos de predominância da LC em machos (Moreno et al., 2007; Merlo et al., 2008) assim como um menor risco de ocorrência da LC em fêmeas não castradas (Villamil et al., 2010).

Nenhuma etiologia sozinha pode explicar o desenvolvimento do LC (Pastor et al., 2009), sendo portanto de origem multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e imunológicos (Vail et al., 2013). Alguns autores correlacionam o aumento do risco de desenvolvimento desta neoplasia quando submetidas a exposição de agentes químicos, principalmente os derivados de petróleo (Gavazza et al., 2001), assim como uso de pesticidas como o 2,4-diclorofenóxidoacético ácido (Hayes et al., 1995), e também animais residentes em locais com aumento da poluição gerada por incineradores (Pastor et al., 2009). Existem outros estudos que avaliam mutações em genes e o aumento do risco de desenvolvimento do câncer. Um estudo realizado com o genes que codificam a glutathione-S-transferase encontrou uma correlação positiva nos cães com linfoma semelhante ao estudo realizado em humano (Ginn et al., 2014). A predisposição genética e racial é relatada. O Boxer é uma das raças mais predisposta mas o Bullmastiff, Bernese, Terrier Escocês e o Golden Retriever também apresentam risco de desenvolver o LC (Pastor et al., 2009; Villamil et al., 2010).

A incidência real do LC no Brasil é desconhecida uma vez que não existe um sistema único de levantamento epidemiológico no país. Monitorar a incidência desta neoplasia nos animais é importante uma vez que cães e tutores compartilham do mesmo ambiente e podem estar sujeitos aos mesmos riscos (Gavazza et al., 2001). Embora poucos, algumas unidades acadêmicas

nacionais apresentam dados epidemiológicos. Entre as neoplasias de células redondas o LC foi a segunda neoplasia mais frequente em Uberlândia, ocorrendo em 20% dos casos analisados (Coletto et al., 2007). Em um período de 14 anos, na região de Londrina, foram observados 186 casos (Moreno e Bracarense, 2007). Em Jaboticabal foi relatada a ocorrência de 60 casos de linfoma cutâneo no período entre 2007 e 2013 (Jark et al., 2014). Em São Paulo 2% dos casos de neoplasias foram o LC (Kimura et al., 2015). A incidência em outros países também é difícil de ser precisada, a estimativa anual descrita pode variar conforme a localização. Na Virgínia, Estados Unidos, para cada 100,000 novos cães atendidos, 8,15 são diagnosticados com linfoma multicêntrico, enquanto que na França são observados 6,95 para cada 100,000 animais, embora este valor poderá ser ainda maior (Pastor et al., 2009). Na Austrália um trabalho relatou 134 casos de LC em oito anos de observação (Yau et al., 2017).

3.2. Classificação

A classificação do LC pode ser realizado de diversas formas, pela apresentação anatômica, pelos critérios histopatológicos e ainda pelo imunofenótipo (Vail et al., 2013), no entanto os conhecimentos sobre o comportamento biológico, as características moleculares, genética e a resposta ao tratamento sugere que a classificação do LC necessita de mudanças (Valli et al., 2017).

3.2.1. Classificação anatômica

A classificação anatômica é baseada na distribuição da neoplasia pelo corpo, compreendendo a forma multicêntrica, mediastinal, intestinal, cutânea e a forma extra-nodal (Vail et al., 2013). O linfoma nodal ou multicêntrico é a forma mais comum, com incidência de 80%, caracterizada pelo aumento dos gânglios linfáticos, variando de linfadenomegalia solitária a múltiplos linfonodos envolvidos, pode ou não ter o envolvimento do baço, fígado, sangue periférico e medula óssea (Zandvliet, 2016). A maioria dos animais atendidos na rotina clínica possuem linfadenopatia generalizada, e menos de 8% apresentam-se no estágio clínico inicial (Dobson e Gorman, 1993). Alterações clínicas como perda de peso, letargia, anorexia e episódios de febre, observada em 20% a 40% dos cães, além de possíveis distúrbios de sangramento, tromboembolismo e lesões oculares (Jagielski et al., 2002; Morris e Dobson, 2007; Ponce et al., 2010; Vail et al., 2013).

O linfoma mediastinal caracteriza-se por um aumento dos linfonodos mediastinais e/ou timo. As queixas clínicas comuns desta apresentação incluem dispnéia, tosse ou regurgitação e até edema de cabeça e pescoço provocado pela compressão dos linfonodos mediastinais (este edema recebe o nome de síndrome pré-cava) (Zandvliet., 2016). A apresentação mediastinal ocorre em 5% dos casos de linfoma e geralmente são imunofenótipo T (Fournel-Fleury et al., 2002; Vail et al., 2013).

A forma intestinal nos cães é menos comum, os sinais clínicos são inespecíficos, semelhantes à apresentação clínica de outras doenças do trato gastrointestinal. Pode ocorrer massa abdominal palpável e linfonodos mesentéricos aumentados, além de peritonite secundária a obstrução completa e ruptura do intestino. Pode ainda apresentar-se de forma multifocal e difusa através da submucosa e lâmina própria do intestino. Ocorre entre 5% a 7% dos casos (Morris e Dobson, 2007; Vail, 2011; Vail et al., 2013).

O linfoma cutâneo pode ser solitário ou generalizado, classificado como epiteliotrópico pela presença de linfócitos neoplásicos na epiderme, podendo ser chamado de "micoses fungoides", sendo a forma mais comum desta apresentação clínica. Os sinais clínicos são alopecia crônica, despigmentação, descamação, eritema, com ou sem prurido, evoluindo para formação de crostas, úlceras, e formação de nódulos ou massas envolvendo junções muco-cutâneas ou na cavidade oral (Morris e Dobson, 2007). Linfócitos neoplásicos na derme é uma característica da forma não-epiteliotrópica do linfoma cutâneo canino. Distingue-se por apresentar nódulos múltiplos e firmes que podem estender da derme ao tecido subcutâneo, podendo ser alopecícos e ulcerados mas envolvimento oral e prurido são raros (Vontaine et al., 2010). Quando os linfonodos e órgãos abdominais estão envolvidos a apresentação clínica é bem agressiva (Morris e Dobson, 2007). A incidência da forma cutânea varia conforme os autores e o local onde o trabalho foi realizado, sendo encontrados relatos de 1,7% (Gavazza et al., 2008) a 12% dos casos de linfoma pesquisados (Ponce et al., 2010) e, em média, esta apresentação clínica ocorre em 5% dos casos (Vail et al., 2013).

O linfoma extra-nodal pode ocorrer em qualquer localização anatômica onde o linfócito ou seus precursores sejam encontrados, mas a classificação extra-nodal do LC pode variar conforme o autor. Para Vail et al. (2013) esta classificação abrange qualquer apresentação que estiver localizada fora do sistema linfático, segundo a revisão realizada por Zandvliet (2016) o linfoma extra-nodal compreende todas as apresentações fora da forma nodal (multicêntrico), sendo assim os sinais clínicos variam conforme a localização do tumor. Animais com linfoma cardíaco costumam apresentar intolerância ao exercício, tosse e arritmias. Quando localizados no sistema nervoso central o principal sinal clínico é convulsão. No linfoma ocular ocorre com frequência uveíte, glaucoma, hipópio e hifema. Já o linfoma renal pode apresentar características do doente renal (Zandvliet, 2016), ocorre em aproximadamente 3% dos casos (Vail et al., 2013).

3.2.2. Classificação histológica

Diversas classificações histológicas são descritas para o linfoma canino, como a classificação por Rappaport, Lukes e Collins, Kiel e Working formulation, porém a limitação em utilizá-las está na diferença entre os diagnósticos intra e inter-observador, ou seja na sua reprodutibilidade (Sayag et al., 2017). No entanto o modelo mais aceito é baseado na classificação das neoplasias hematopoiéticas humanas, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Valli et al. (2011) aplicaram este modelo de classificação e encontraram mais de 83% de concordância entre os patologistas veterinários. Embora adaptado ao cão, o modelo da OMS, utiliza principalmente a morfologia, o imunofenótipo, e as características genóticas, esta classificação representa uma evolução dos sistemas anteriores (Marconato, 2011; Sayag et al., 2017), além de propor uma subclassificação, com objetivo de criar uma associação entre o tipo celular e o prognóstico para auxiliar na correta decisão terapêutica (Valli et al., 2013).

Existem mais de 30 subtipos de linfoma, e muitos são semelhantes aos subtipos do linfoma não-hodgkin humano, nem todas estão bem estabelecidos no diagnóstico da medicina veterinária (Comazzi et al., 2014), todavia existem 5 principais subtipos, sendo eles linfoma difuso de grandes células B, linfoma de zona marginal, linfoma T periférico, linfoma de zona T, linfoma linfoblástico, estes representam mais de 80% dos diagnósticos na medicina veterinária (Valli et al., 2011).

Os linfomas de uma maneira geral são classificados como de grau intermediário e alto, apresentam uma taxa mitótica alta, progridem rapidamente, sendo mais responsivos à quimioterapia e representam a maioria dos casos. Os linfomas de baixo grau, são compostos por células menores e baixo índice mitótico. Tipicamente progridem de forma lenta, são pouco responsivos à quimioterapia e estão associados a maior sobrevida (Vail et al., 2013).

3.2.3. Classificação imunofenotípica

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais para detectar marcadores específicos em linfócitos na espécie canina possibilitou a imunofenotipagem dos tumores, portanto a classificação pelo imunofenótipo, leva em consideração o tipo de célula envolvida nesta neoplasia. Com relação ao seu imunofenótipo, o linfoma canino pode ser classificado como de células T (10% a 38% dos casos), de células B (60% a 80% dos casos) ou nulo (nem de células B ou T que representam menos de 5% dos casos) (Vail et al., 2013). A imunofenotipagem é considerada hoje a parte central da classificação do linfoma e pode ser realizada por diversas técnicas de acordo com a expertise dos laboratórios de patologia, porém a imunohistoquímica realizada a partir do fragmento de biópsia é considerada o padrão ouro da técnica (Valli et al., 2017). Baseada na classificação da OMS, o LC é definido em duas categorias T e B, e dentro de cada tipo são denominadas as sub-classificações (Marconato, 2011).

O imunofenótipo ainda não é utilizado como fator preditivo para o tratamento do linfoma canino como ocorre na medicina (Vail et al., 2013; Da Silva Cordeiro et al., 2014), no entanto com a obtenção do imunofenotipo e do sub-tipo, os novos trabalhos tendem a uma avaliação mais precisa quanto ao comportamento, resposta terapêutica e prognóstico diminuindo o vies da pesquisa (Sayag et al., 2017). A resposta ao tratamento para linfomas de alto grau com imunofenótipo T é diferente dos linfomas de alto grau com imunofenótipo B (Simon et al., 2006). Uma terapêutica específica deve ser buscada uma vez que o prognóstico dos animais com imunofenótipo B são melhores que animais de imunofenótipo T (Marconato, 2011).

3.3. Estadiamento

O estadiamento do linfoma foi proposto por Owen (1980) e é realizado segundo a OMS (fig. 1). Este estadiamento leva em consideração o envolvimento dos linfonodos, baço, fígado, sangue periférico e medula óssea, assim como o envolvimento de outros tecidos. Para a realização do estadiamento é necessário que seja realizado uma boa anamnese, exame físico, exames de imagens e laboratoriais (Zandivliet, 2016), já o sub-estadio é definido como presença (b) ou ausência de sinais clínicos (a), esta ligado diretamente ao prognóstico do paciente.

Os sinais clínicos referem-se a letargia, inapetência, perda de peso, poliúria, polidipsia, febre, uveíte entre outros (Vail et al., 2013; Barber e Weishaar, 2014), porém a classificação em sub-estadio (b), é realizado de maneira subjetiva pela maioria dos clínicos, necessitando de uma adequada definição destes parâmetros para correlacionar diretamente com o prognóstico (Barber e Weishaar, 2014).

Não é rotina na medicina veterinária a realização de punção aspirativa de medula óssea para estabelecer o estadiamento como ocorre na medicina humana. As alterações já presentes no sangue periférico não podem prever se existem infiltrações de células neoplásicas na medula

óssea. A presença de plaquetopenia, leucocitose ou linfocitose no sangue periférico podem sugerir infiltração de células neoplásicas na medula, portanto diante destas anormalidades a avaliação da medula óssea torna-se importante, impactando no estadiamento (Martini et al., 2015). De forma semelhante, na maioria dos casos, não é realizado biópsias ou punções aspirativas em baço ou fígado para confirmação do seu envolvimento no LC, são realizados exames de imagem para acompanhamento e definição do estadio IV (Marconato, 2011).

Estadiamento	Descrição	Sub-estadiamento
I	Um linfonodo ou um órgão linfóide	a - ausência de sinal clínico b - presença de sinal clínico
II	Mais de um linfonodo na mesma região	
III	Linfoadenopatia generalizada	
IV	Envolvimento de fígado e/ou baço (+III)	
V	Alteração em sangue periférico e medula óssea (+I/II ou III) e/ou outro órgão	

Figura 1: Estadiamento do LC, segundo a OMS (Owen, 1980)

3.4. Prognóstico

O prognóstico dos pacientes com LC pode ser correlacionado com diversos fatores, como localização anatômica, estadiamento e o sub-estadiamento, morfologia, tipo histológico, imunofenótipo, presença de hipercalemia e animais pré-tratados (Zandivliet, 2016). Animais com linfoma multicêntrico que apresentam estadio mais avançados (V), e ou que sejam do sub-estadio (b) apresentaram piores prognóstico. Existe uma diferença de 100 dias na sobrevivência entre os animais do sub-estadio (a) para o (b), enquanto que para idade e sexo não houve diferença em relação ao prognóstico (Greenlee et al., 1990; Jagielski et al., 2002; Martini et al., 2016).

O imunofenótipo tem uma importante relação com o prognóstico (Ponce, et al., 2004), no entanto a correlação entre o prognóstico e o imunofenótipo não deve ser baseada exclusivamente na imunomarcagem, pois a maioria dos casos dos animais com imunofenótipo B apresentam melhor prognóstico que animais com imunofenótipo T, Porém se este paciente for classificado como linfoma de zona T (linfoma indolente), mesmo com imunofenótipo T o seu prognóstico será favorável e com a alta sobrevivência (Greenlee et al., 1990; Martini et al., 2016). Quando a clínica, a citologia e o imunofenótipo não forem suficientes para o diagnóstico será necessário associar a análise da morfologia e as características da arquitetura para a avaliação correta do prognóstico (Sayag et al., 2017).

Os tipos histológicos podem ser correlacionados com diferentes comportamentos clínicos e prognósticos, sendo que alguns tipos como o linfoma de burkitt de células B, linfoma plasmocitóide de alto grau e linfobástico, ambos de células T, apresentam piores prognósticos (Ponce et al., 2004). A avaliação do índice mitótico também foi sugerido como fator prognóstico, pois os cães que apresentaram menor sobrevivência tinham acima de 21 mitoses em campo de 40x (Valli et al., 2013). Nem sempre a correlação entre o tipo morfológico e o prognóstico será clara devido as diferenças nos diagnósticos gerados por cada laboratório, e os diferentes critérios para aplicação da classificação morfológica, faz-se necessário a utilização do mesmo tipo de classificação, como a recente nomenclatura da OMS para que futuras pesquisas facilitem a comunicação entre si (Sueiro et al., 2004; Sayag et al., 2017).

Embora imunofenotipagem e o sub-estadiameamento sejam fatores prognósticos importantes (Vail et al., 2013), outros exames foram estudados como os marcadores imunohistoquímicos que avaliam a proliferação celular, AgNOR, PCNA e Ki-67 (Kiupel et al., 1999), porém o resultado destes marcadores podem variar conforme a graduação e o tipo histológico, gerando resultados discordantes entre outros estudos, portanto falham como marcadores prognósticos (Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2010). A hipercalcemia (valores aumentados do cálcio sérico) é observada em animais que apresentam poliúria e polidipsia, é descrita como uma síndrome paraneoplásica nos cães, e é considerada um fator prognóstico negativo (Dobson e Gorman, 1993), além de ter uma correlação com animais com imunofenótipo T, que por si já possuem um prognóstico pior (Fournel-Fleury et al., 2002).

A utilização prévia de corticóides foi associada a um prognóstico negativo (Gavazza et al., 2008; Marconato, 2011), e seu uso poderá predispor o paciente ao desenvolvimento da resistência a múltiplas drogas de acordo com alguns autores (Vail et al., 2013). A localização anatômica também tem uma importância prognóstica, animais com linfoma hepato-esplênico ou no sistema nervoso central, cutâneo e gastrointestinal possuem piores prognósticos (Vail et al., 2013).

3.5. Diagnóstico

Tradicionalmente o diagnóstico do LC é realizado por citologia, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de um linfonodo ou do tecido suspeito é a forma mais rápida e mais fácil para confirmar o diagnóstico. Adicionalmente ao diagnóstico citológico, principalmente nos casos de linfomas de baixo grau, que necessitam da avaliação da arquitetura do linfonodo, pode-se obter um fragmento por biópsia para análise histopatológica (Morris e Dobson, 2007; Marconato, 2011). Os linfonodos poplíteo e pré-escapular são preferíveis para a coleta por PAAF no linfoma multicêntrico mas a coleta pode ser realizada de acordo com apresentação clínica (Vail et al., 2013).

A PAAF é um método mais simples, mais rápido e menos invasivo (Zandvliet, 2016). Pode ser realizado normalmente por aspiração com auxílio de uma agulha de calibre fino (23 a 25 G), acoplado a uma seringa. Para linfonodos e massas de consistência macia, pode-se usar seringa de 10 ml ou agulhas sem seringas realizando uma punção por capilaridade (Carneiro e Horta, 2013).

Embora análise citológica possa ser satisfatória, a biópsia assume um papel importante no diagnóstico do linfoma e tem a vantagem de proporcionar informações sobre as características estruturais do tecido e ainda proporcionar a sub-classificação do linfoma (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2011). A biópsia incisional ou realizada por agulha de biópsia pode ser usada em massas ou órgão suspeito, mas na apresentação multicêntrica um linfonodo inteiro (usualmente o poplíteo) é preferível, incluindo a cápsula, desse modo oferecerá o máximo de informações (Morris e Dobson, 2007; Vail et al., 2013).

A imunohistoquímica (IHQ) é o exame que permite a determinação da imunofenotipagem do linfoma tanto em humanos quanto em animais, e também é utilizada para estabelecer um diagnóstico completo da neoplasia, principalmente para determinados subtipos do linfoma que só serão conclusivos com a realização deste exame. Habitualmente é realizada através de

amostras histopatológicas, considerada padrão ouro da técnica (Ruiz, et al., 2005; Thalheim et al., 2013; Seelig et al., 2016; Valli et al., 2016).

A imunocitoquímica (ICQ) também permite a determinação do imunofenótipo, assim como outras técnicas auxiliares, como a citometria de fluxo (CF) e a reação de cadeia de polimerase (PCR) (Cowell et al., 2009; Withrow, 2013; Thalheim et al., 2013). A informação sobre o imunofenótipo será um importante fator prognóstico da doença, sendo que os linfomas de alto grau de células T assumem um pior prognóstico em relação aos de célula B na maioria dos subtipos de LC (Cowell et al., 2009; Martini et al., 2016).

Na medicina veterinária o diagnóstico do linfoma canino por meio da citologia, na maioria dos casos, promove informações suficientes, mas hoje a imunofenotipagem é a parte central para a classificação do linfoma, e na ausência de outros recursos para realização da imunofenotipagem, é necessário que uma amostra de biópsia seja adquirida para realização da IHQ (Valli et al., 2017). Na maioria dos casos o paciente pode não apresentar condições cirúrgicas para ser submetido a um procedimento invasivo. O tempo gasto até o diagnóstico final pode ser superior uma vez que o paciente necessita de preparo para o procedimento cirúrgico, além do mais os custos inerentes ao procedimento são maiores quando comparamos com métodos menos invasivos que vão gerar o mesmo tipo de resultado (Marconato et al., 2013).

3.6. Cell block

Uma abordagem diagnóstica ainda pouco explorada em medicina veterinária vincula-se à realização do cell block (CB), método originariamente proposto no processamento de amostras para microscopia eletrônica (Mulder et al., 1997; Sanchez e Selvaggi, 2006). Esse método otimiza potencialmente a amostra citológica por permitir a emblocagem em parafina, com posterior processamento, à semelhança do que é realizado com amostras histológicas (Masserdotti, 2006; Zanoni et al., 2012). Quando comparado a citologia simples o CB permite a obtenção de mais informação, uma vez que melhora a eficácia diagnóstica porque combina uma análise semelhante à histopatologia (a arquitetura é parcialmente preservada), além de permitir a ICQ e técnicas moleculares (Mansy et al., 2006; Zanoni et al., 2012).

O CB é um processo de citoinclusão que foi introduzida pela primeira vez no final dos anos 1960 e início dos anos 1970 oferecendo algumas vantagens, incluindo organização arquitetônica equivalente ao exame histopatológico (Constantian, 1973). As células de interesse podem ser correlacionadas, de nível para nível e o conteúdo da amostra do tumor pode ser avaliado, de modo a determinar se a amostra é adequada para o teste molecular (Crapanzano, 2014).

Uma outra vantagem da utilização do CB está relacionada ao custo, que são menores que os da IHQ, já que este tipo de técnica foi utilizado para marcação de Her-2 e receptor de progesterona na neoplasia mamária com o mesmo resultado (Mansy et al., 2006; Bueno Angela et al., 2013). O CB já foi utilizado também para aumentar a eficácia das citologias guiadas por ultrassonografias em lesões pancreáticas (Qin et al., 2014).

A citoinclusão trata-se de um método acessível, rápido, de baixo custo e com alta sensibilidade no diagnóstico citomorfológico e IHQ (Silveira et al., 2017), a correlação entre a ICQ provenientes do CB com a IHQ de fragmentos de biópsia foi alta em neoplasias mamárias de

cadelas, sendo este um método confiável para alcançar um diagnóstico mais preciso (Bueno Angela et al., 2013).

A IHQ oferece informação útil em um tempo superior quando comparada a ICQ, além de ser mais trabalhosa. A diminuição do tempo de execução ocorre por exigir menos etapas no processamento, uma vez que a biópsia cirúrgica para a realização da ICQ não é necessária (Vail et al., 1997). O animal no momento do diagnóstico do linfoma nem sempre apresenta condições para um procedimento mais invasivo e tanto o clínico quanto o proprietário podem não querer submeter o paciente aos riscos de uma cirurgia para a realização da biópsia no intuito de realizar imunofenotipagem. Embora a imunofenotipagem por CB seja vantajosa ainda faltam estudos para determinar a sensibilidade e especificidade do exame quando comparado com técnica padrão ouro (histopatologia e imunohistoquímica), permitindo melhor avaliação clínica dos benefícios dessa técnica (Fernandes et al., 2015).

Na medicina existem várias metodologias diferentes de preparação para amostras de CB (HistoGel, Cellient automated cell block system ou o Cytoblock), sua utilização é defendida por apresentara possibilidade de processar a totalidade da amostra, sem perda de material, a concentração do material facilita a inclusão e a microtomia, assim como a conservação das amostras celulares em parafina e seu arquivo por longos períodos de tempo. Além da realização das técnicas complementares, esta técnica também é utilizada em biopsias de pequenas dimensões ou amostras que possuem características mucóides, evitando assim perda de amostra. (Ferro, 2014). Além do mais existe uma indicação que a utilização do CB deve ser utilizado junto com a citologia para melhorar a avaliação diagnóstica, uma vez que são técnicas complementares (Khan et al., 2012). No linfoma humano o CB é utilizado como a mesma finalidade, melhora o diagnóstico da citologia principalmente para os tipos Hodgkin linfoma, mediastinal, linfoma de grandes células B e linfoma B rico em células T que não são fáceis de serem diagnosticados pela citologia isoladamente (Mayall et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os critérios de inclusão foram cães com suspeita de linfoma e com citologia indicativa. Foram utilizados cães da rotina clínica atendidos pelo setor de oncologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais(UFMG). Foram incluídos cães com qualquer tipo de linfoma (cutâneo, linfoma multicêntrico e linfoma intestinal), independente da idade, sexo ou raça. Foram utilizados 25 animais.

Os animais foram estadiados de acordo com a OMS (Owen, 1980). O sub-estadiamento (a) definido como ausência de sinais clínicos no momento do diagnóstico e sub-estadiamento (b) definido como presença de sinais clínicos tais como letargia, inapetência, perda de peso, febre, perda de peso, poliúria, polidipsia, uveíte entre outros (Barber e Weishaar, 2014).

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-UFMG, protocolo nº 267/2016 - anexo 1). O responsável por cada animal assinou um "Termo de consentimento livre e esclarecido" (anexo 3) autorizando a participação nesses estudos.

4.2 Amostras

Foram utilizadas amostras do mesmo tecido para realização do CB e para a realização da biópsia, obtidas no momento da cirurgia ou imediatamente após o óbito. As amostras foram coletadas no mesmo momento e no mesmo local, sendo utilizadas 54 amostras, provenientes de 25 animais. As amostras foram processadas pelo laboratório de patologia comparada do instituto de ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LPC/ICB - UFMG)

4.3 Técnica PAAF

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) consistiu na obtenção de uma única amostra utilizando-se uma agulha de pequeno calibre (23 á 25 Gauges) com o comprimento adequado ao órgão alvo ou massa. Quando o linfoma era do tipo multicêntrico, o linfonodo foi o órgão puncionado, no linfoma cutâneo, a massa suspeita foi puncionada e no linfoma intestinal, a massa removida por exérese cirúrgica foi puncionada no momento de sua remoção. Para a coleta, a agulha pode ou não ser acoplada a uma seringa. Quando a seringa foi utilizada, a sucção foi efetuada três ou quatro vezes, com intensidade moderada para evitar muita aspiração de sangue. Quando o tamanho da massa permitia, a seringa foi redirecionada duas ou três vezes. Antes de retirar a agulha, a sucção foi cessada, para que não houvesse aspiração de sangue na retirada da seringa e assim evitar a contaminação da amostra. A seringa foi então separada da agulha e preenchida por ar, para posteriormente se acoplar novamente à agulha e expelido a amostra para a lâmina. Após a deposição do aspirado sobre a lâmina, realizou-se o esfregaço ou dependendo da viscosidade do material, a técnica do squash ou esmagamento, com intensidade controlada para evitar danos às células. Os esfregaços foram fixados ao ar e a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram coradas pelo método dopanótico rápido.

As amostras citológicas foram avaliadas pelo laboratório de patologia clínica da Universidade Federal de Minas Gerais. Os linfócitos foram avaliados quanto ao seu tamanho (pequeno, intermediário ou grande linfócito), de acordo com as características de malignidade (pleomorfismo, relação: citoplasma, anisocariose, características nucleares atípicas) e mitoses. A classificação citomorfológica do linfoma em baixo e alto grau foi baseada no tamanho do linfócito e no índice mitótico.

4.4 Técnica Cell block

A amostra de linfonodo ou tecido linfóide neoplásico foi puncionada com agulha de 22 gauges acoplada em uma seringa de 10mL, até ser obtida a quantidade mínima (visual) por animal. O material presente no bulbo da seringa e canhão da agulha foi fixado, imediatamente após, pela aspiração de 2ml de álcool 70°, aguardou-se de 30 segundos á 1 minuto, seguido da aspiração de 8ml de solução de formalina á 10%. A amostra permaneceu por um período de 24h no interior da seringa para fixação (fig. 2).

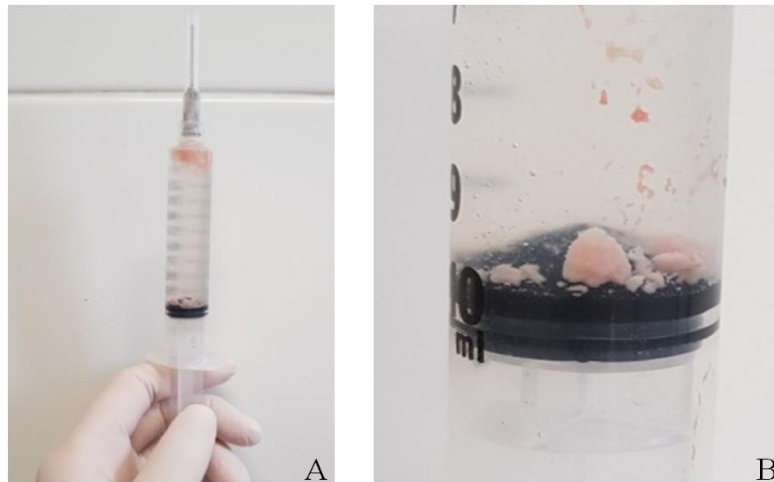


Figura 2: Seringa de 10ml com material citológico acrescido de álcool e formol (A). Formação do grumo (B)

Após este período, o material foi retirado com auxílio de uma pinça anatômica e colocado em cassete com filtro para biópsia de pequenos fragmentos (fig. 3). O material permaneceu por até uma semana em álcool 70°. Para facilitar a visualização dos pequenos fragmentos, uma pequena porção de eosina foi instilada sobre o material antes de iniciar o processo da tradicional técnica rotineira de inclusão em parafina, no entanto, por se tratar de uma amostra muito delicada, o tempo de permanência foi de 30 minutos para as seqüências de álcoois (80°, 90°, Absoluto I, Absoluto II), xilóis (I e II) e parafinas (I e II) (fig. 3). Foi realizado coloração de Hematxilina-Eosina (HE) (fig. 4).

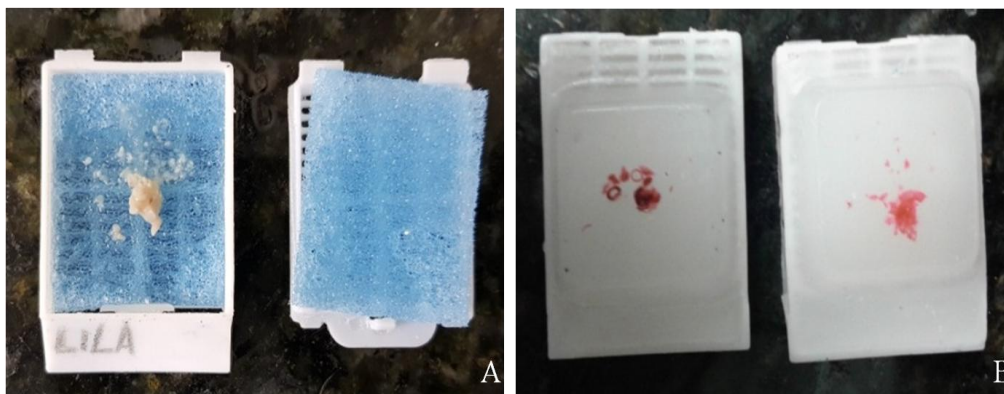


Figura 3: Cassete com filtro de biópsia e material de origem citológica (A). Bloco de parafina com material de origem citológica (B).

4.5 Biópsia

Os mesmos tecidos utilizados para o cell block (linfonodos ou tecidos neoplásicos) foram utilizados para a biópsia, sendo obtidos no momento da eutanásia ou por exérese cirúrgica, sendo considerados os mais acessíveis e mais facilmente removíveis como o linfonodo poplíteo (Morris e Dobson, 2007). Foram obtidas secções histológicas fixadas por 48 horas em formol neutro e tamponado a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina com posterior cortes de 4µm espessura e coradas pela técnica de HE. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios histológicos veterinários estabelecidos pela OMS (Valli et al., 2011).

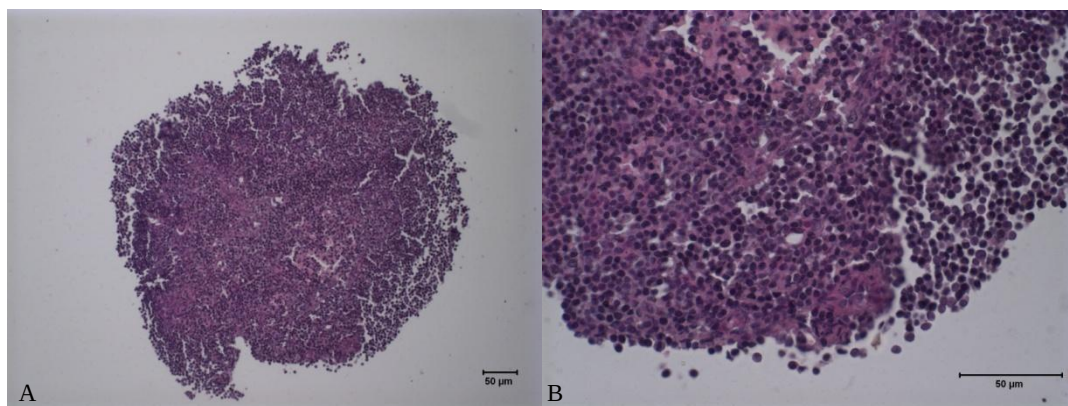


Figura 4: Cell block corado com hematoxilina-eosina na objetiva de 20x (A) e na objetiva de 60x (B)

4.6 Imunocitoquímica e Imunohistoquímica

As lâminas gelatinizadas contendo cortes de 4µm de espessura foram desparafinizadas em xilol e álcool, em seguida hidratadas para a imunomarcção, de acordo com a metodologia ABC (estreptavidina-biotina-peroxidase), utilizando os anticorpos isolados em lâminas separadas.

As reações de recuperação antigênica foram feitas em calor úmido pressurizado (Pascal®) com citratopH 6,0 a 125°C por 2 minutos, para o anticorpo antiCD3, com resfriamento de 20 minutos após a retirada das cubas da Pascal e para o anticorpo antiCD79a foi utilizada a recuperação antigênica em Banho Maria a 95°C por 20 minutos, com resfriamento de 20 minutos. Na sequência houve 3 lavagens de 5 minutos em PBS, seguido pelo bloqueio da peroxidase (3 vezes de 5 minutos) e da proteína endógena (15 minutos) a temperatura ambiente, com 3 lavagens em PBS entre o bloqueio da peroxidase e da proteína.

As amostras foram então recobertas pelos anticorpos primários com o tempo de incubação overnight em temperatura 8°C em geladeira, dentro da câmara úmida (tabela 2). No dia seguinte, após 16 horas de incubação as laminas foram lavadas 3 vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos, sendo realizada novamente 3 lavagens em PBS e aplicação do polímero, por mais 30 minutos. Foram utilizados todos os reagentes do Kit Novo Link – Leica® de acordo com as instruções do fabricante.

A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos (Novo Link - Leica), diluído 50µl de DAB para 1 ml de diluente, 15 minutos antes da aplicação também conforme instruções do fabricante. A contra coloração foi realizada com hematoxilina.

Para os casos marcado positivamente para CD3 e CD79a, foram observados na objetiva de 40x, a distribuição e a porcentagem das células marcadas, determinado tipo predominante e classificando como positivo para o reagente predominante nas células neoplásicas, conforme aTabela 1.

Tabela 1: Classificação do LC de acordo com imunofenótipo

Imunofenótipo	CD3	CD79a
B	+	-
T	-	+
Nulo	-	-

Tabela 2: Anticorpo, fonte, clone, diluição, recuperação e tempo de incubação

Anticorpo (Clone)	Fonte	Diluição	Recuperação Antigênica	Tempo (h) / Temperatura de Incubação
CD3 (Policlonal)	CL Davis	1:300	Pascal (125°C/2min) com tampão citratopH 6,0	16/ 8°C
CD79a (HM47/A9)	DBS	1:500	Banho maria (95°C/20min) com tampão citratopH 6,0	16/ 8°C

4.7 Análise estatística

Inicialmente construiu-se uma tabela de contingência para avaliar descritivamente as classificações fornecidas por ambas as técnicas. Calculou-se o índice de concordância Kappade Cohen e a acurácia (*Accuracy*) para essa tabela geral (*overall results*), considerando todas as classes. Em seguida, calculou-se o índice Kappa, a acurácia, a sensibilidade (*Sensitivity*), a especificidade (*Specificity*), o valor preditivo positivo (*PosPredValue*) e o valor preditivo negativo (*NegPredValue*) para cada uma das classes da tabela (i.e. T, B ou Erro de Processamento).

Tabela 3: Tabela de contigência (Altman e Brand, 1994a;b)

		Método teste	
		Positivo	Negativo
Padrão Ouro	Positivo	A	B
	Negativo	C	D

$$\text{Accuracy} = (A + D)/(A + B + C + D)$$

$$\text{Sensitivity (Sens)} = A/(A + C)$$

$$\text{Specificity (Spec)} = D/(B + D)$$

$$\text{Prevalence} = (A + C)/(A + B + C + D)$$

$$\text{PosPred Value} = (\text{sens} * \text{prevalence}) / ((\text{sens} * \text{prevalence}) + ((1 - \text{spec}) * (1 - \text{prevalence})))$$

$$\text{NegPred Value} = (\text{spec} * (1 - \text{prevalence})) / (((1 - \text{sens}) * \text{prevalence}) + ((\text{spec}) * (1 - \text{prevalence})))$$

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.4.2 (R Core Team, 2017). Os p.valores que acompanham os índices Kappa estão testando se os índices são iguais de zero (Hipótese nula). Caso o p.valor for menor que o nível de significância, a hipótese nula deve ser rejeitada. Para ambos os valores de Kappa a hipótese nula foi rejeitada a um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Foram analisados 25 animais provenientes de 16 bairros de Belo Horizonte e de 3 cidades da região metropolitana, demonstrados no mapa (anexo 3). Foram agrupados por região 36% (9/25) Noroeste, 16% (4/25) Pampulha, 12% (3/25) Oeste, 8% (2/25) Leste, 8% (2/25) Nordeste, 4% (1/25) Norte, 4% (1/25) Centro-Sul e 12% (3/25) região da grande BH.

Os cães apresentaram idades entre 1-16 anos, com média de idade de aproximadamente de 8 anos e desvio padrão de 3,5. De acordo com a distribuição por sexo 64% (16/25) fêmeas e 36% (9/25) eram machos. As raças observadas foram 28% (7/25) animais sem raça definida, 12% (3/25) Rottweiler, 8% (2/25) Golden Retriever, 8% (2/25) Pastor Alemão, 8% (2/25) Pastor Belga, 4% (1/25) Labrador, 4% (1/25) Akita, 4% (1/25) Basset Hound, 4% (1/25) Boxer, 4% (1/25) Bulldog Francês, 4% (1/25) Cocker, 4% (1/25) Pinscher, 4% (1/25) PitBull e 4% (1/25) Poodle (fig. 5).

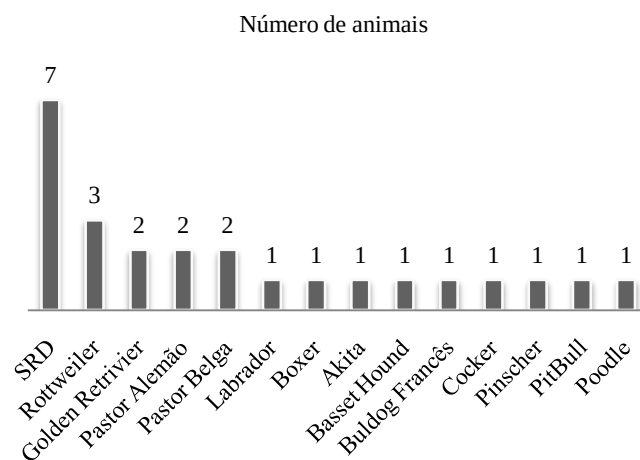


Figura 5: Distribuição racial do LC

De acordo com a classificação anatômica 52% (13/25) foram identificados como linfoma multicêntrico, 40% (10/25) linfoma cutâneo e 8% (2/25) linfoma intestinal. Foi realizado uma curva de sobrevida comparando o linfoma multicêntrico com os demais tipos anatômicos (p.0,0324), a mediana de sobrevida global para animais com linfoma multicêntrico foi de 207 dias, e para os demais tipos foi de 50 dias (figura 6 B).

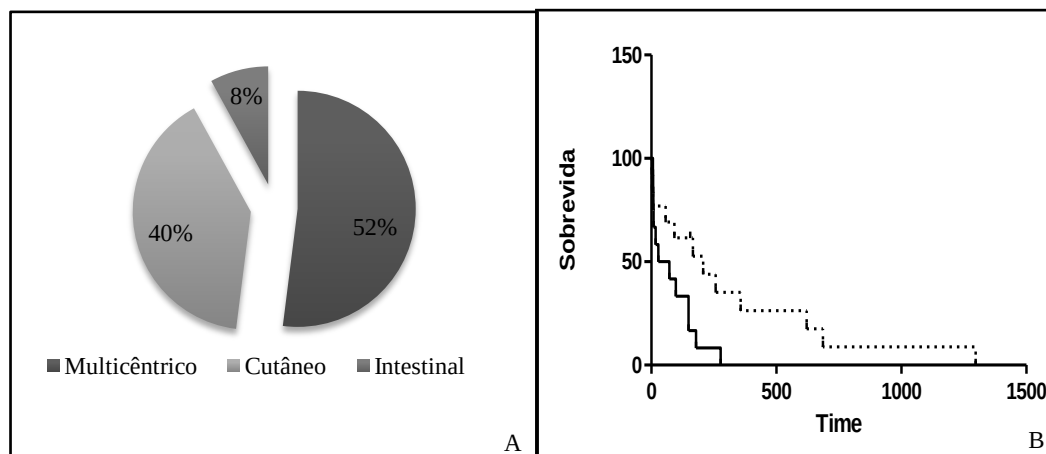


Figura 6: Gráfico com distribuição anatômica do LC (A). Curva de sobrevida analisando as formas anatômicas do LC (B), linha tracejada representando o linfoma multicêntrico e linha contínua representandoas formas cutânea e intestinal (p.0,0324)

De acordo com o estadiamento proposto pela OMS (Owen, 1980) (fig. 1), entre os animais com linfoma multicêntrico 15% (2/13) eram do estadio II, 23% (3/13) do estadio III, 46% (6/13) do estadio IV e 15% (2/13) do estadio V (tabela 4).

Tabela 4: Porcentagem de distribuição de acordo com o estadio e sub-estadio

Estadio	Porcentagem distribuição
I	0%
II	15%
III	23%
IV	46%
V	15%
Sub-estadio	
(a)	31%
(b)	61%

O estadiamento não se aplica para as outras formas de apresentação do LC. A análise da sobrevida foi agrupada entre 3 grupos de acordo com o estadio: Grupo I (estádios I e II), Grupo II (estádios III-IV) e Grupo III (estadio V). A mediana de sobrevida para os animais do grupo I, II e III foram respectivamente 257, 207 e 84 dias, não houve diferença estatística na curva de sobrevida ($p=0,25$) (figura 7A). A curva de sobrevida para os animais do estadio de I-IV apresentou uma mediana de 257 dias enquanto os animais do estadio V apresentou uma mediana de 84 dias ($p=0,089$) (figura 7B).

Analisando o sub-estadiamento foram encontrados 31% (4/13) sub-estadio(a) e 61% (9/13) sub-estadio(b). Não houve diferença estatística na curva de sobrevida para o sub-estadiamento, porém a mediana de sobrevida entre os animais do sub-estadio(a) foi de 257 dias e do sub-estadio(b) foi de 166 dias ($p=0,06$) (figura 11A).

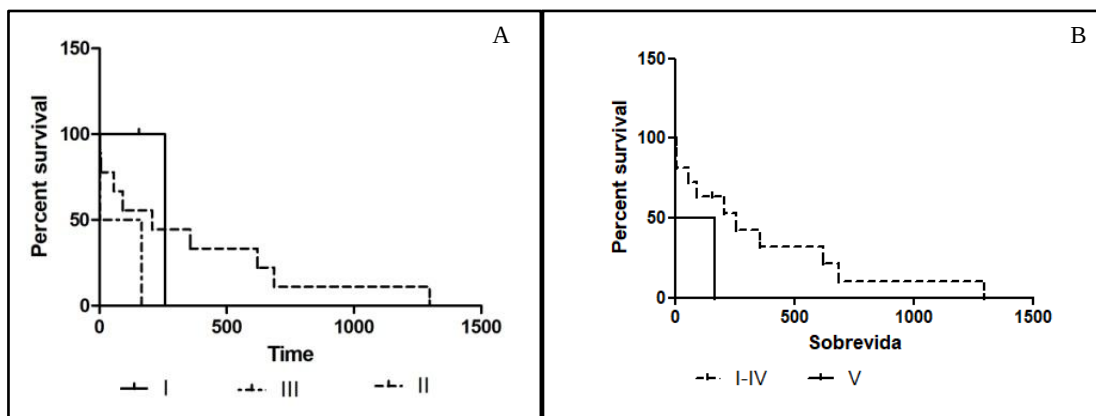


Figura 7: Curva de sobrevida do LC. Curva A compara animais do grupo I (estadio I), grupo II (estadio III-IV) e grupo III (estadio V) ($p=0,251$). Curva B compara animais do estadio de I-IV com estadio V ($p=0,089$).

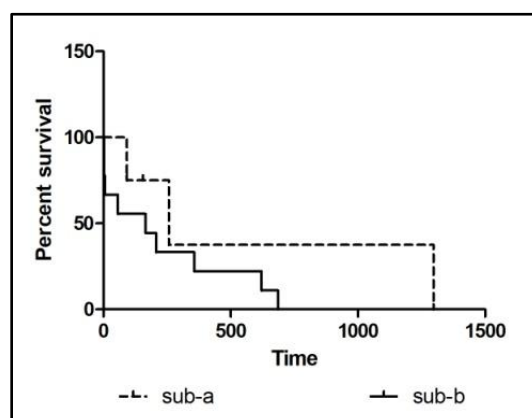


Figura 8: Curva de sobrevida do LC comparando animais do sub-estadio (a) e sub-estadio (b) ($p=0,215$).

Nas análises citológicas foram observados que 56% (14/25) eram linfomas de intermediário e grandes linfócitos, sendo considerados de alto grau, 4% (1/25) de pequenos linfócitos de baixo grau, 24% (6/25) foram sugestivos de linfoma cutâneo, 4% (1/25) foi sugestivo de linfoma sem definição da graduação, 4% (1/25) foi sugestivo de neoplasia de células redondas, 4% (1/25) foi inconclusiva, 4% (1/25) foi sugestivo de hiperplasia. A citologia foi considerada diagnóstica em 88% (22/25) dos casos.

Na análise histopatológica alguns subtipos foram identificados, porém não foi possível a identificação do imunofenótipo em alguns casos. Entre os casos, 36% (9/25) linfoma difuso de grandes células B, 12% (3/25) linfoma B rico em células T, 12% (3/25) linfoma de pequenas células, 12% (3/25) linfoma linfoblástico, 8% (2/25) linfoma difuso de grandes células, 8% (2/25) linfoma epiteliotrópico, 4% (1/25) linfoma não epiteliotrópico, 4% (1/25) linfoma de zona T e 4% (1/25) neoplasia de células redondas.

Tabela 5: Porcentagem de distribuição dos subtipos do LC

Classificação histológica do LC	
Subtipos	Frequência
Linfoma difuso de grandes células B	36%
Linfoma B rico em células T	16%
Linfoma de pequenas células	12%
Linfoma linfoblástico	8%
Linfoma difuso de grandes células	8%
Linfoma epiteliotrópico	8%
Linfoma não epiteliotrópico	4%
Linfoma de zona T	4%
Neoplasia de células redondas	4%

A curva de sobrevida comparando o linfoma difuso de grandes células B multicêntrico com o linfoma difuso de grandes células cutâneos (p.0,046) apresentou uma mediana de sobrevida de 50 dias para o linfoma cutâneo e 207 dias para o linfoma difuso de grandes células B.

Outra análise observada nos dados foram referentes a utilização de corticóide antes do tratamento definitivo, foi observado que 40% (10/25) dos animais fizeram uso do fármaco. Houve diferença estatística na curva de sobrevida entre os animais que usaram corticóide prévio ao tratamento dos que não utilizaram (p. 0,049) e a mediana de sobrevida foi de 166 dias para animais que não utilizaram corticóide e de 22,5 dias para animais que utilizaram corticóide.

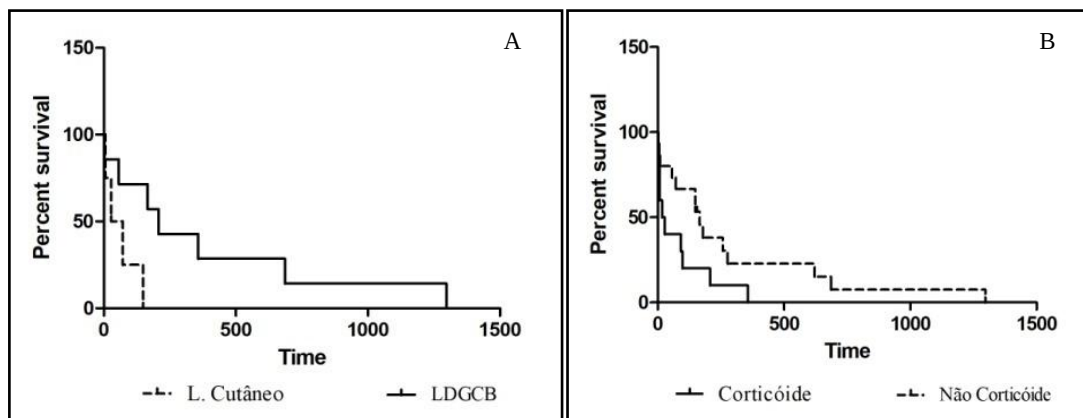


Figura 9: Curva de sobrevida do LC. Curva A compara o linfoma difuso de grandes células do tipo cutâneo com o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) do tipo multicêntrico (p. 0,046). Curva B compara animais que utilizaram previamente corticóide com os que n

De acordo com o imunofenótipo por animal, 64% (16/25) foram identificadas como do tipo B, 24% (6/25) do tipo T e 12% (3/25) não foi possível obter o imunofenótipo. A média de sobrevida entre os imunofenótipos foram de 249 dias para o imunofenótipo B, 122,5 dias para imunofenótipo T, não foi possível realizar curva de sobrevida.

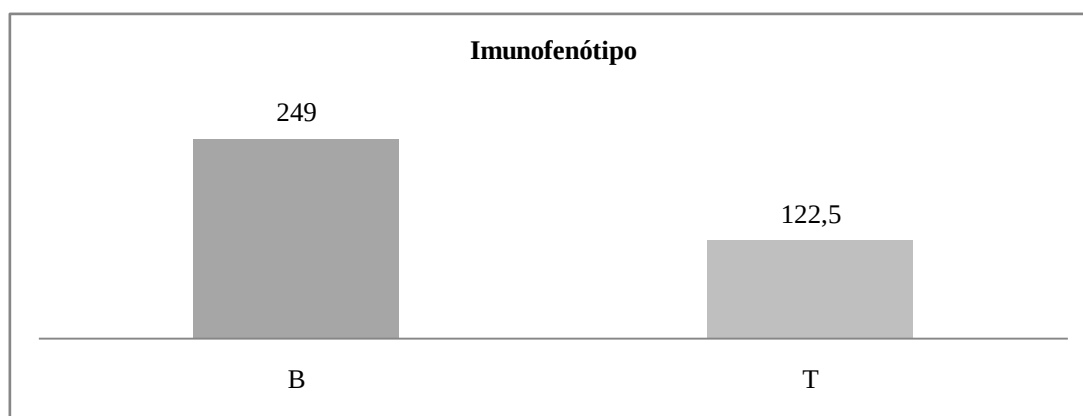


Figura 10: Média de sobrevida entre os diferentes imunofenótipos do LC

Na análise da imunohistoquímica (IHQ) realizada entre as amostras de tecido 70,37% (41/54) foram do tipo B, 14,81% (8/54) foram do tipo T e 9,26% (5/54) não foram diagnosticados por erros de processamento. Estes dados foram demonstrados no anexo 3.

Na análise da imunocitoquímica (ICQ) 66,67% (38/54) amostras foram identificadas como do tipo B, 14,81% (8/54) como do tipo T e 14,81% (8/54) não foram diagnosticados por erros de processamento (Tabela 6).

Os erros de processamento foram inclusos no cálculo da estatística caso contrário a concordância seria de 100%. Todos os caso identificados com de células B na IHQ também foram identificados como de células B na ICQ. O mesmo se repetiu para as amostras identificadas com de células T. Os erros de processamento inerentes ao processo estão presentes tanto no processamento da biópsia quanto do cell block.

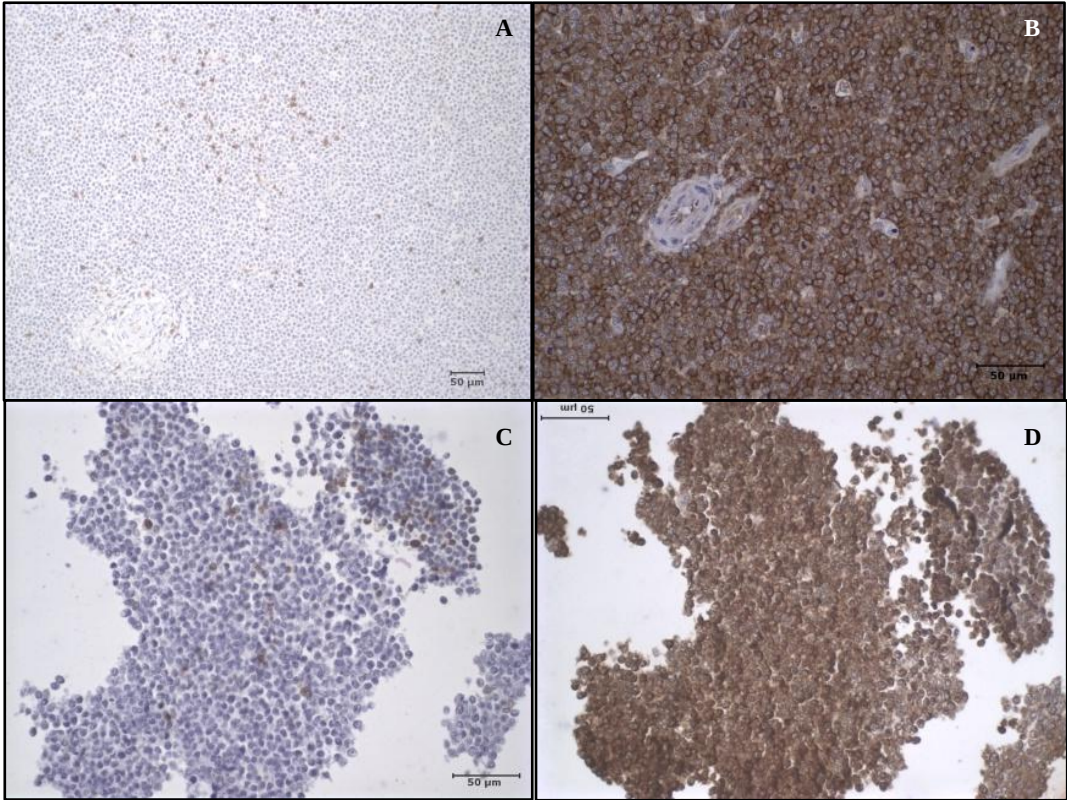


Figura 11: Imunohistoquímica (IHQ) e imunocitoquímica (ICQ) do LC. Peça cirúrgica negativo para CD3 no quadro A e positivo para CD79a no quadro B. Cellblock negativo para CD3 no quadro C e positivo para CD79a no quadro D com a mesma intensidade que quadro B.

Tabela 6: Frequencias absolutas das classificações de amabas técnicas (biópsia e cell block)

		Cell block (Class)			TOTAL
		B	T	EP*	
Biopsy (Class)	B	37	0	4	41
	T	0	7	1	8
	EP	1	1	3	5
	TOTAL	38	8	8	54

*Erro de processamento

Na análise específica por classe, as classificações de células T e B tiveram altos valores de Kappa, acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Tanto na análise da ICQ quanto da IHQ, algumas amostras não tiveram diagnóstico foram chamadas de erros de processamento. Os valores para os erros de processamento foram menores, mas estes não representam o objetivo do estudo. Os valores para acurácia foram de 87,04%, e o valor de Kappa sem peso foi de 0,6986 (p. <0,001) (Tabela 7).

Tabela 7: Análise realizado por classe pelo método de Kappa.

	Class: B	Class: T	Class: EP*
Accuracy	90,74%	96,30%	87,04%
Kappa	0,7652	0,8533	0,3923
Kappap.value	<0,001	<0,001	0,03257
PosPred Value	97,37%	87,50%	37,50%
NegPred Value	75,00%	97,83%	95,65%
Sensitivity	90,24%	87,50%	60,00%
Specificity	92,31%	97,83%	89,80%

* EP: Erro de processamento

6. DISCUSSÃO

O linfoma canino é uma das neoplasias mais frequentes na rotina dos atendimentos oncológicos. Constata-se que busca por métodos de diagnósticos rápidos devem ser motivada para que o paciente possa receber uma terapêutica precoce e ganho em qualidade de vida. Nos últimos anos ocorreram avanços no diagnóstico do LC e um ganho em relação ao prognóstico, porém não é ainda uma realidade na medicina veterinária utilizar de todos os recursos diagnósticos devido as limitações financeiras descritas por Zandvliet (2016) e Valli et al. (2017). Portanto o objetivo deste trabalho foi de obter meios que auxiliam na agilidade do método diagnóstico desta neoplasia para que seja utilizada com facilidade na rotina do clínico.

No Brasil ainda não existe um banco de dados epidemiológico unificado para algumas doenças presentes na medicina veterinária como é o caso das neoplasias. A análise destas informações ficam restritas a determinadas regiões que possuem centro de pesquisa. Poucos relatos foram feitos com dados de inquéritos epidemiológicos e dados demográficos sobre a incidência de neoplasias. Alguns autores como Zanini et al. (2013) e Kimura et al. (2015) na cidade de São Paulo, buscaram correlacionar a localização do animal com a incidência do LC e outras neoplasias. De acordo com os dados analisados neste trabalho a região noroeste de Belo Horizonte (Caiçara, Carlos Prates, Jardim Pinheiro, Santo André) foi a que apresentou uma maior frequência de animais acometidos. Como o número total de indivíduos foi pequeno seria interessante desenvolver um trabalho mais amplo para correlacionar a frequência do linfoma nas diversas regiões de Belo Horizonte.

Segundo Muller et al. (2005) o paciente veterinário em algumas situações é considerado como sentinela por compartilhar do mesmo ambiente que os humanos, deste modo a avaliação dos dados epidemiológicos poderiam ser considerados fonte de estudo para desenvolvimento de

ações na saúde pública e também na melhoria da saúde animal. Ainda de acordo com Vail et al. (2013) os cães com linfoma apresentam-se com mais frequência na meia idade a idosos, em torno dos 6 a 9 anos. A idade observada nos animais da pesquisa variou de 1 a 16 anos, com 8 anos de idade média semelhantes aos dados encontrados na literatura (Greenlee et al., 1990; Vezzali et al., 2010).

Em relação a predisposição sexual foi encontrado um predomínio de fêmeas (64%) em relação aos machos (36%), diferente da maioria dos dados relatados na literatura. Alguns autores (Pastor et al., 2009; Ponce et al., 2010; Vail et al., 2013) afirmam que não existe uma predisposição sexual para o LC e outros descrevem que existe uma predominância em machos em relação a fêmeas, semelhante ao que acontece nos humanos, onde mulheres tem menos predisposição ao desenvolvimento do linfoma em relação aos homens.

As fêmeas castradas demonstram um risco aumentado para o desenvolvimento do LC em relação as fêmeas inteiras, sugerindo que pode existir uma interação hormonal com o LC de acordo com Moreno et al. (2007) e Vilamil et al. (2010). Apesar do maior número de animais acometidos serem compostos por fêmeas, 80% delas eram castradas, o que poderia justificar esta maior ocorrência nas fêmeas que em machos. Outro dado encontrado em relação ao sexo está ligado a significativa parcela de fêmeas acometidas com linfoma cutâneo (70%), dado semelhante ao descrito por Chan et al. (2017).

Alguns trabalhos brasileiros relatam que as raças mais observadas com LC foram SRD, Rottweiler, Golden, Boxer e o Cocker podendo ocorrer variações conforme a localidade como é o caso de Uberlândia em que o predomínio foi da raça PitBull (Sueiro et al., 2004; Moreno et al., 2007; Kimura et al., 2011; Zanini et al., 2013; Coletto et al., 2017; Hernández, 2017). Dados semelhantes foram encontrados nesta pesquisa, em que 28% dos cães eram SRD, seguidos por Rottweiler e menor proporção de outras raças. Apesar de existir uma predisposição racial, Villamil et al. (2010) avaliaram aproximadamente um milhão de animais e a predominância foi do SRD, seguido pelas raças predisponentes conhecidas e aumento da incidência no Rottweiler, semelhante aos dados nacionais e do presente estudo.

A maioria dos animais eram do estadio IV (46%) seguidos pelo estadio III (23%), II (15%) e V (15%) sendo que o estadiamento do linfoma canino é realizado na forma multicêntrica conforme recomendado por Zandvliet (2016) e não se aplica para as demais apresentações clínicas. A maioria dos cães foram diagnosticados nos estadios III e IV. Segundo Valli et al. (2013) cerca de 80% dos animais encontram-se nestes estadios no momento do diagnóstico. O diagnóstico na medicina veterinária é realizado tardiamente, talvez pelos baixos sinais clínicos apresentados na fase inicial da doença. A mediana de sobrevida de acordo com o estadiamento para o grupo I, II e III respectivamente foram de 257, 207 e 84 dias (p. 0,25). Este resultado foi semelhante ao descrito por Valli et al. (2013) que adotaram os mesmos tipos de agrupamento, onde os autores encontraram uma mediana de 218 dias para o grupo II (animais do estadio III e IV), e em uma análise geral os animais do grupo I viveram mais que animais do grupo III. Apesar de não ter encontrado diferença estatística nesta pesquisa os resultados entre si são semelhantes. Uma outra curva de sobrevida foi realizada agrupando animais do estadio de I-IV com animais do estadio V, a mediana de sobrevida respectivamente foram de 257 e 84 dias (p. 0,08), demonstrando que animais do estadiamento V tem uma menor sobrevida, porém não houve diferença estatística entre os grupos, talvez pelo baixo número de indivíduos entre os mesmos.

Ao analisar o sub-estadiamento 31% eram do sub-estadio (a) com mediana de sobrevida de 257 dias e 61% do sub-estadio (b) com mediana de sobrevida de 166 dias. Embora não tenha sido encontrado diferença estatística ($p=0,06$), os animais que não tinham sinais clínicos relacionados ao sub-estadiamento tiveram 90 dias a mais de sobrevida. Segundo Jagielski et al. (2002) os cães com sub-estadio (b) tem pior prognóstico e menor sobrevida. A diferença de sobrevida entre as medianas encontradas por este autor foi de aproximadamente 170 dias (318 dias para (a), 118 dias para (b)).

Este tipo de análise tem importante valor prognóstico, seu impacto na sobrevida está ligado a agressividade, incapacidade de tolerar o tratamento e duração da remissão (Keller et al., 1993; Barber e Weishar, 2014).

Outro dado avaliado foi a utilização de corticosteróide antes de iniciar o tratamento com os demais quimioterápicos. De acordo com Price et al. (1991) a utilização prévia de glicocorticóides pode induzir a resistência aos quimioterápicos e diminuir a duração da remissão. Os animais deste trabalho que fizeram uso prévio desta substância apresentaram uma mediana de sobrevida inferior (22,5 dias) quando comparado aos animais que não utilizaram (166 dias). Segundo Gavazza et al. (2009) a utilização de corticosteróides prévios ao quimioterápico foi associado ao menor tempo de sobrevida semelhante aos desta pesquisa, a análise da curva de sobrevida demonstrou diferença estatística ($p=0,049$).

Uma outra inferência é feita sobre a utilização dos glicocorticóides durante a fase de indução dos quimioterápicos. Para Zandvliet et al. (2013) não é possível confirmar que sua utilização possa gerar resistência a múltiplos citostáticos. De uma maneira geral a utilização prévia de corticosteróide antes de estabelecer o diagnóstico definitivo deve ser contra-indicado e de acordo com Gavazza et al. (2008) um esforço maior deve ser feito para buscar o diagnóstico precocemente antes de iniciar qualquer terapia.

O LC pertence ao grupo das neoplasias de células redondas que são mais facilmente diagnosticadas pela citologia. De acordo com os dados deste trabalho a citologia foi considerada diagnóstica em 88% dos casos, concordando com Krick e Meuten (2016) onde 80 a 90% dos casos de linfoma são diagnosticados pela citologia. Em relação a graduação, 56% dos casos eram de alto grau e 4% eram de baixo grau, a alta prevalência de linfomas de alto grau em comparação com o de baixo grau também foi descrita por Fournel-Fleury et al. (1997) e por Gavazza et al. (2009). Nesta análise foi excluído os casos diagnosticados como linfoma cutâneo, neoplasia de células redondas, hiperplasias e as citologias inconclusivas. A graduação tem um importante fator prognóstico uma vez que o comportamento biológico será diferente em relação a resposta ao tratamento quanto a progressão da doença (Carter et al., 1986; Valli et al., 2013).

A citologia tem uma maior capacidade diagnóstica para o linfoma de alto grau (Fournel-Fleury et al., 1997) enquanto os linfomas de baixo grau são mais difíceis de serem diagnosticados por este método (Carter et al., 1986). Alguns tipos de linfoma de baixo grau, possuem um curso indolente (linfoma indolente) e em alguns casos para obter o diagnóstico será necessário uma avaliação da arquitetura do tecido pela análise histopatológica associada aos outros métodos diagnósticos (Valli et al., 2006). Em um dos casos a citologia não foi considerada diagnóstica, mas na análise histopatológica foi definido como linfoma indolente.

Algumas vantagens são descritas na utilização da citologia como diagnóstico, que é considerada um exame pouco invasivo, pode ser realizada dentro do consultório veterinário, não requer sedativos para sua confecção, não requer instrumental específico, é de baixo custo e pode

oferecer um diagnóstico rápido. Vantagens descritas tanto na medicina veterinária quanto em humanos conforme relatos de Costa et al. (2005) e Marconato et al. (2011).

Teske et al. (1996) relata que existe uma boa correlação entre a citologia e a histopatologia para o LC. De acordo com Valli et al. (2013) ainda não é possível a realização da sub classificação de acordo com os critérios da OMS com amostras citológicas sendo necessário amostras de tecido para esta avaliação mas o mesmo autor discute que algumas células apresentam características específicas na análise citológica e poderiam ser correlacionadas com alguns sub-tipos principalmente se forem associados ao imunofenótipo. Vale discutir que apesar de não se obter a sub-classificação com a citologia, a maioria dos casos oferecerá ao clínico e ao proprietário informações suficientes para iniciar o tratamento (Krick e Meuten, 2016), além do mais nem sempre o paciente terá condições clínicas para ser submetido a um procedimento cirúrgico e o tutor com restrições financeira não poderá arcar com um painel diagnóstico amplo.

A análise histopatológica revelou alguns sub-tipos do LC, foram identificados 36% do sub-tipo linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), este é o sub-tipo mais encontrado na medicina veterinária (Comazzi et al., 2012). De acordo com Valli et al. (2011) o LDGCB representa 40% dos casos corroborando com nosso dado, porém a frequência deste sub-tipo pode ser maior conforme apresentou o estudo realizado por Sueiro et al. (2004) em que encontrou uma incidência de 56%. A maioria dos LDGCB são do tipo multicêntrico, mas outros tipos também são descritos como é o caso do linfoma cutâneo, porém em menor proporção (Valli et al., 2011). Entre os nove casos identificados como LDGCB a maioria era do tipo multicêntrico (sete casos) e apenas dois casos era do tipo cutâneo.

Segundo Davies et al. (2017) este subtipo também pode ter uma variação prognóstica pois representa um grupo heterogêneo, seu estudo analisou somente os casos centroblásticos do LDGCB, do tipo multicêntrico, e encontraram uma sobrevida de 322 dias, enquanto Valli et al. (2013) encontraram 213 dias para o centroblástico e 308 dias para o imunoblástico. Analisando a curva de sobrevida nos casos de LDGCB do tipo multicêntrico a mediana foi de 207 dias e para o linfoma cutâneo 110 dias (p, 0,19). A mediana de sobrevida do tipo multicêntrico parece próxima ao encontrado por Valli et al. (2013) porém não houve uma separação entre os casos centroblásticos dos imunoblásticos. Embora o número de animais tenha sido pequeno e sem diferença estatística, parece também que a localização pode ser um importante fator prognóstico, uma vez que os casos do tipo multicêntrico possuem o dobro de sobrevida dos casos cutâneos sugerindo mais avaliações.

Para Valli et al. (2017) o diagnóstico do LDGCB é de fácil realização, exceto quando formas imaturas de linfócitos estão envolvidos dificultando a diferenciação entre os sub-tipos representados pelas grandes células, estes tipos de casos necessitariam de mais exames diagnóstico para a avaliação. Em 8% dos casos avaliados foram classificados como linfoma difuso de grandes células mas o imunofenótipo não pode ser avaliado por erros de processamento da amostra tanto no ICQ quanto na IHQ.

O linfoma B rico em células T (LBRCT), é caracterizado pela infiltração de células T não neoplásicas entre o linfoma de células B, foram encontrados 16% deste tipo de linfoma. Segundo Valli et al. (2011) é um sub-tipo considerado raro no cão e mais frequente no cavalo e no gato, acreditam ser uma variação do LDGCB. Vezzali et al. (2010) encontraram apenas um deste tipo em sua pesquisa com 171 casos enquanto Valli et al. (2011) encontraram nove em

300 casos com sobrevida média de 97 dias, podemos constatar que a frequência encontrada em nosso estudo foi alta, todos eram do tipo multicêntrico e tiveram uma sobrevida maior do que a relatado por outros autores.

Entre os casos identificados como linfoma de pequenas células a frequência observada foi de 12%. Destes, dois casos eram do tipo intestinal com imunofenótipo T e um do tipo cutâneo sem possibilidade de identificação do imunofenótipo. A maioria dos linfomas intestinais de pequenas células são vistos no felino e com menor frequência nos cães (Valliet al., 2017), mas pode ocorrer variação do tamanho do linfócito neoplásico envolvido, sendo necessário realização da IHQ para a diferenciação entre a doença inflamatória e o linfoma propriamente dito (Carrasco et al., 2015). Coyle et al. (2004) relata que a maioria dos linfomas intestinais são de imunofenótipo T que esta de acordo com os resultados deste trabalho.

O linfoma de pequenas células do tipo cutâneo identificado no estudo esta de acordo com o observado por Vezalli et al. (2011). O tamanho do linfócito no linfoma cutâneo pode ser variável, o que dificulta o diagnóstico pelo patologista, de acordo com Fontaine et al. (2009) mais de 50% dos casos de linfoma cutâneo do tipo epiteliotrópico podem ter uma população de linfócitos de tamanho variado.

O linfoma linfoblástico (8%), foram os casos de maior variabilidade em relação ao imunofenótipo. Um caso cutâneo do tipo T e um multicêntrico do tipo B. Segundo Valli et al. (2017) o linfoma linfoblástico é um dos sub-tipos que necessitam de imunofenotipagem para diagnóstico, é difícil de ser encontrado no cão e ocorre em menos de 1% para o imunofenótipo B e em torno de 3% para imunofenótipo T. São considerados linfomas agressivos e com de curta sobrevida, inferior a 120 dias e embora a frequência encontrada neste estudo tenha sido maior do que o relatado pelo autor acima citado, a sobrevida média deste sub-tipo foi de inferior ao seu relato.

O linfoma cutâneo (10 casos) teve uma grande variação de diagnóstico, somente 30% deles foram classificados conforme a sua infiltração na derme e na epiderme, os demais foram discutidos nos outros sub-tipos histológicos. A definição entre epiteliotrópico ou não epiteliotrópico não é de fácil execução e depende da epiderme (Fournel-Fleury et al., 2002). O linfoma epiteliotrópico (8%) foi o de maior frequência que o não epiteliotrópico, todos de imunofenótipo T e a forma não epiteliotrópico (4%) de imunofenótipo B. Chan et al. (2017) avaliaram um grande número de animais com linfoma do tipo epiteliotrópico e encontrou um predomínio de células T, linfomas cutâneos do tipo B também podem ser encontrados (Sueiro et al., 2004), dados semelhantes aos nossos.

Um caso (4%) de linfoma indolente foi identificado no estudo, sendo classificado como linfoma de zona T (LZT). A frequência observada é pequena quando comparada ao estudo de Valli et al. (2013) em que 19,6% foram de linfoma indolente, o que pode ser justificado pelo curto período de observação. Este é o único caso vivo. Possui um período de observação de 200 dias a partir do diagnóstico. Animal da raça Golden Retriever, macho de 10 anos de idade. De acordo com Valli et al. (2006) o sub-tipos LZT, linfoma zona marginal B, linfoma folicular B, linfoma de células do manto B são chamados de linfoma indolente e são caracterizados pela baixa taxa de mitose e progressão. A raça mais observada por Flood-Knapik et al. (2013) foi o Golden Retriever, com média de idade de 9,4 anos, semelhante aos dados observados neste estudo. Pelo curto período de observação não podemos comparar o tempo de sobrevida deste paciente. O diagnóstico do linfoma indolente foi difícil de ser concluído semelhante ao descrito por outros

autores (Valli et al., 2006; Flood- Knapik et al., 2013; Martini et al., 2016) sendo necessário a avaliação clínica, citológica, histológica e IHQ. Para concluir o diagnóstico do linfoma indolente é necessário que a arquitetura do tecido seja avaliada e associado a IHQ. O linfoma indolente é caracterizado na citologia como de pequenos linfócitos sendo de difícil diagnóstico, o resultado na maioria dos casos são inconclusivos ou sugere hiperplasia (Meuten, 2017).

Somente 4% dos casos não foram conclusivos como linfoma, o resultado histopatológico sugeriu neoplasia de células redondas. O diagnóstico de neoplasia de células redondas pode ser difícil quando estas estão pobremente diferenciadas, nestes casos será necessários a utilização de outros métodos diagnósticos para realização do diagnóstico definitivo, como por exemplo a utilização da IHQ (Fernandez et al., 2005; Avery et al., 2013). A IHQ foi realizada e o diagnóstico definitivo foi de linfoma de células B, outros também poderiam ser utilizados com esta finalidade como é o caso da imunocitoquímica.

A maioria dos animais eram do imunofenótipo B (64%) seguidos pelo imunofenótipo T (24%) e uma porcentagem não foi possível identificação do imunofenótipo (12%) por erros de processamento das amostras. Nenhum caso foi identificado como não T não B. De acordo com um trabalho brasileiro realizado por Sueiro et al. (2004) demonstraram que 72,7% eram de origem de células B, 21,8% de T e 5,4% nulo. Na literatura internacional Vail et al. (2013) fez um copilado de vários trabalhos e relata que a 60-80% dos casos são de células B, 10-38% de células T e 5% não T não B, a revisão apresentada por Zandvliet, 2016 relata que 70% são de origem B e 30% de origem T. Podemos dizer que em relação a proporção o predomínio foi de células B seguidos por T semelhante ao relato de Sueiro, Vail e Zandvliet, porém nenhum imunofenótipo nulo foi encontrado.

Conhecer o imunofenótipo do LC além do caráter diagnóstico apresenta um importante fator prognóstico, Ponce et al. (2004) afirmam que os animais de imunofenótipo T possuem um pior prognóstico tanto no cão quanto no homem com pior sobrevida, a exceção é descrita pelo sub-tipo "clear-T-cell linfoma", atualmente chamado de linfoma de zona T (linfoma indolente) (Martini et al., 2016; Valli et al., 2017) e já discutido anteriormente. Ponce et al. em 2004 começaram a discutir que a classificação do linfoma deve ser realizada inicialmente a partir do seu imunofenótipo, ou seja um grupo de doenças do sub-tipo B e um grupo dos sub-tipos T, semelhante ao que é visto hoje com a classificação da OMS sugerida por Valli et al. (2011).

Fourney-Fleury et al. (2002) analisaram somente animais de imunofenótipo T, e encontraram uma maior proporção (72%) de linfomas de alto grau e entre os casos de linfoma de baixo grau estavam presentes a forma cutânea, linfomas de pequenos linfócitos e o linfoma indolente. Os animais com linfoma T de alto grau tem piores resultados aos quimioterápicos descritos por Greenlee et al. (1990) e por Samon et al. (2006). A média de sobrevida entre os imunofenótipos foram de 249 dias para o imunofenótipo B e 122,5 dias para imunofenótipo T, embora não seja possível uma comparação com estes dados, Samon et al. (2006) demonstraram que a mediana de remissão para o linfoma T foi de 200 dias e o de células B foi de 266 dias. Ainda de acordo com Rebhum et al. (2011) relataram que LC de células T tem uma rápida resposta a quimioterapia mas de curta duração de remissão.

O imunofenótipo pode ser obtido por alguns tipos de exames mas o método ouro é realizado através da imunohistoquímica (IHQ) a partir de um fragmento de tecido (Valli et al., 2017). Algumas maneiras menos invasivas tem sido propostas com a mesma finalidade, a imunocitoquímica (ICQ) é um exemplo, uma técnica que utiliza material de origem citológica

(Ramos-Vara et al., 2011). Na medicina a ICQ é realizada por diversas técnicas, algumas delas são utilizadas na veterinária como a utilização do emblocado em parafina ou Cell block (CB) (Skoog e Tani, 2011; Priest et al., 2016).

Na medicina o CB tem sido defendido como uma técnica minimamente invasiva capaz de auxiliar no diagnóstico principalmente em tempos em que a uma medicina personalizada é discutida. O CB amplia o poder diagnóstico podendo ser realizado diversos tipos de marcadores, principalmente em amostras obtidas guiadas por ultra-sonografia (Crapazano et al., 2014) e também em neoplasias mamárias (Bueno Angela et al., 2013). Especificamente para os casos de linfoma o CB é defendido como auxílio diagnóstico principalmente para pacientes que não apresentam condições clínicas para ser submetidos a biopsia e também como processo inicial de análise, no entanto os resultados podem variar conforme a técnica utilizada e o tipo de neoplasia. A técnica descrita no trabalho de Mayall et al. (2003) parece menos eficiente que a técnica utilizada por Bueno Angela et al. (2013).

Na medicina veterinária o CB foi utilizado por Taylor et al. (2013) para a realização da ICQ na pesquisa de metástase em medula óssea. Na literatura podem ser encontrados diferentes técnicas para a confecção do CB, mas a técnica utilizada por Silveira et al. (2017) demonstraram uma maneira interessante de execução. Utilizando a mesma técnica da imunofenotipagem do linfoma foi realizada neste estudo em 54 amostras com resultados satisfatórios.

Este estudo comparou os resultados obtidos da IHQ com a ICQ o que resultou em uma acurácia de 87,04%. Os valores de sensibilidade e especificidade foram considerados altos, calculados separadamente para cada tipo de imunofenótipo ($p < 0,001$). Fernandes et al. (2016) utilizaram uma diferente técnica de CB para a imunofenotipagem do LC (citologia em meio líquido) mas não comparou seus resultado com o padrão ouro, embora afirmou que é possível realizar a ICQ do LC por este método. Nossa pesquisa realizou uma comparação cuidadosa entre as suas amostras coletadas no mesmo momento, no mesmo local e utilizando o mesma concentração de diluição de anticorpos. O alto resultado de sensibilidade e especificidade validam a utilização do CB para realização da imunofenotipagem do LC. Embora Silveira et al. (2017) tenham trabalhado com neoplasia mamária os nossos resultados corrobora com sua pesquisa.

Nenhuma discrepância foi encontrada entre as amostras em que o imunofenótipo foi identificado pela ICQ e confirmados pela IHQ, a concordância poderia ser de 100% caso não tivesse ocorrido erros de processamento (EP). Os EP foram observados em ambas análises. Estes erros foram considerados inerentes ao processo. Em situações em que múltiplos processos e diversas reações químicas são requeridas, os erros podem acontecer. Os testes podem ser repetidos algumas vezes até que se obtenha um resultado. Sendo assim a sensibilidade do teste para células B e T foram de 90,24% e 87,5% respectivamente, enquanto a especificidade foi de 92,31% e 97,83% respectivamente.

Outra técnica frequentemente citada na literatura para realização da imunofenotipagem é a citometria de fluxo (CF), defendida como um método pouco invasivo Marconato et al. (2013) comentaram que sua utilização associada a citologia aumenta a sensibilidade do diagnóstico, da mesma forma que Costa et al. (2005) defende o diagnóstico do linfoma não-Hodgkin humano associando as duas técnicas. Porém vantagens semelhantes são vistas no CB, é uma técnica capaz de aumentar a sensibilidade da citologia como confirmado Fernandes et al. (2016). De acordo com o trabalho realizado por Thalheim et al. (2013) a CF para imunofenotipagem do linfoma canino foi superior que a obtida por PAAR. A sensibilidade foi de 91% (células B) e de

100% (células T) na CF enquanto na PAAR o resultado foi de 67% (células B) e 75% (células T). A sensibilidade do CB foi de 90,24% e 87,5% para células B e T respectivamente demonstrando que é um método mais sensível que a PAAR, no entanto a sensibilidade da técnica realizada por CB pode ser ainda maior uma vez que o material conservado na parafina poderá ser retestado minimizando os erros de processamento que eventualmente ocorrem durante a confecção do da ICQ.

A CF é um método que requer amostras que tenham células viáveis e em quantidade adequada para seu processamento, enquanto a PAAR pode ser realizada com qualquer tipo de material. Tanto a PAAR quanto a CF necessitam de aparelhos e tecnologia específica para seu processamento. Para o processamento da CB não é necessário investimento em aparelhos específicos, uma vez que o seu processamento é o mesmo realizado para a IHQ, rotineira nos laboratórios de patologia. A amostra necessária para o processamento do CB requer uma quantidade mínima, obtida pela punção aspirativa, representando uma vantagem em comparação a CF. Outra vantagem esta ligada a possibilidade de realização de retestes com o material conservado em parafina no CB enquanto que para o CF fluxo erros podem ocorrer caso a amostra não esteja adequada necessitando de coleta.

Outro ponto importante de discussão está ligado a realidade econômica conforme discutido por Seelig et al. (2016). A obtenção do diagnóstico na medicina veterinária não se assemelha com a medicina humana, sendo que as instituições de pesquisa não contam com os mesmos recursos nem mesmo os laboratórios de patologia, e neste ponto o CB apresenta outra vantagem. Em relação aos laboratórios não é necessário um aparelho específico como o CF (associado aos seus custos de manutenção) e os custos inerentes aos anticorpos e reagentes são menores. A utilização de menos reagentes e anticorpo está ligada ao tamanho do tecido proveniente da IHQ comparado ao da pequena amostras da ICQ, logo o gasto com os reagentes estão ligados a quantidade de material. Em relação ao clínico a coleta da amostra requer material de baixo custo e presente na rotina do consultório (seringa, agulha, álcool e formol). Por fim em relação ao tutor, na maioria dos casos possui restrições financeiras e não permite que todo algoritmo de um diagnóstico seja realizado. Na literatura podem ser encontrados outros autores discutindo a questão financeira de diferentes formas como Skoog e Tani (2011), Fernandes et al. (2015), Priest et al. (2016) e Silveira et al. (2017).

A maior vantagem na utilização do CB para a imunofenotipagem esta relacionada ao paciente. Jagieskiet al. (2002) relatam que quanto menor for o tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento, melhores serão as respostas do paciente e neste ponto o CB oferece um resultado mais rápido que o da IHQ. De acordo com Silveira et al. (2017) o tempo utilizado para o processamento é menor, a amostra citológica não necessita passar por um período maior no formol para fixação e a até a etapa final de formação do bloco de parafina os processos exigem menos tempo quanto comparado aos de um fragmento de tecido. Além do mais o paciente não necessitará passar pelos riscos associados a cirurgia e anestesia. Deve-se levar em consideração que nem todo cão com linfoma no momento em que se apresenta para o diagnóstico poderá apresentar condições necessárias para a realização da biópsia (Valli et al., 2017).

De acordo com a expertise do laboratório de patologia comparada (LPC-ICB-UFMG) o tempo gasto entre a chegada da amostra, fixação, corte, produção do bloco de parafina, confecção das lâminas e início do processo da IHQ são gastos aproximadamente 10 dias. Deve-se associar a este tempo o período gasto para a programação cirúrgica do paciente. Ao passo que a confecção do CB demanda menos da metade do tempo, a amostra é coletada em consultório, sem necessidade de sedativo, e em 3 dias o resultado da ICQ poderá ser obtido.

As desvantagens estão relacionadas a confecção da amostra semelhante ao que ocorre com a IHQ, amostras necrosadas, com pouca quantidade de material, erros relacionados ao processo de realização do bloco de parafina, e todos os outros referentes a realização da técnica da ICQ/IHQ. Priest et al. (2016) endossaram e acrescentaram que as desvantagens gerais da ICQ relacionada a qualquer patologia estão ligadas as neoplasias pouco esfoliativas (alguns tipos de sarcomas), inabilidade de processamento da amostra pelos laboratórios e exclusivamente alguns tipos de linfoma somente a realização da citologia e ICQ não serão suficientes. O CB consegue conservar parte da arquitetura do tecido, porém em alguns casos dos linfomas indolentes a análise mais detalhada de toda a arquitetura do tecido associada a IHQ será requerida conforme sugere Flood-Knapick et al. (2013).

Embora Priest et al. (2016) citaram em sua revisão que o LZT não pode ser realizado exclusivamente pela citologia e ICQ, Valli et al. (2013) descreveram que este sub-tipo específico possui uma característica citoplasmática que poderia ser identificada na citologia, mas sugere que por segurança seja avaliado associando técnicas como a imunofenotipagem. Apesar da CF ser sugerida por Valli pode-se inferir que o CB poderá ser uma boa alternativa desde que associado a uma citologia de qualidade.

O imunofenótipo ainda não é utilizado como um fator preditivo na medicina veterinária como ocorre na medicina em que a utilização dos MABs, anticorpo monoclonal, é utilizado para o tratamento do linfoma não-Hodgkin de células B (Da Silva Cordeiro et al., 2014), porém com o avanço da pesquisa e com o desenvolvimento de novos anticorpos, o imunofenótipo poderá se tornar um fator preditivo na medicina veterinária e o CB possibilitará que a imunofenotipagem seja realizada de maneira menos invasiva e rápida.

7. CONCLUSÃO

A utilização do cell block (CB) é uma técnica válida para realização da imunofenotipagem do linfoma canino e auxílio diagnóstico, demonstrando ter uma alta acurácia, sensibilidade e especificidade.

O CB poderá ser implantado na rotina diagnóstica oferecendo informação prognóstica e melhorando o diagnóstico definitivo de uma maneira rápida, simples, econômica e eficaz, além de ser um método menos invasivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, D.G., BLAND, J.M. (1994a) "Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity," *British Medical Journal*, vol 308, 1552.
- ALTMAN, D.G., BLAND, J.M. (1994b) "Diagnostic tests 2: predictive values," *British Medical Journal*, vol 309, 102.
- AVERY, A. C.; OLVER, C.; KHANNA, C.; PAOLONI, C. M. Molecular diagnostics. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 8, p.131-142.
- BARBER, L. G.; WEISHAAR, K. M. Criteria for designation of clinical substage in canine lymphoma: a survey of veterinary oncologists. **Veterinary and comparative oncology**, v. 14, n. S1, p. 32-39, 2016.
- BUENO ANGELA, S. P.; VIERO, R. M.; SOARES, C. T. Fine needle aspirate cell blocks are reliable for detection of hormone receptors and HER-2 by immunohistochemistry in breast carcinoma. *Cytopathology*, v.24, n. 1, p.26-32, 2013.
- CARRASCO, V.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; WISE, A. G.; MAES, R.; MULLANEY, T.; KIUPEL, M., V. Distinguishing intestinal lymphoma from inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples. **Veterinary pathology**, v. 52, n. 4, p. 668-675, 2015.
- CARNEIRO, R. A; HORTA, R. S. Exame citológico das neoplasias. In: Caderno técnico de Medicina Veterinária e Zootecnia. n.70. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2013. p.27-35.
- CARTER, R. F.; VALLI, V. E.; LUMSDEN, J. H. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 50, n. 2, p. 154, 1986.
- 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) in Australia. *Veterinary dermatology*, 2017.
- COLETO, A. F.; SOUZA, R. R.; GUNDIM, L. F.; de ALMEIDA MOREIRA, T.; MEDEIROS, A. A.; BANDARRA, M. Linfomas em cães: aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 24, n. 1, 2017.
- COMAZZI, S.; GUSCETTI, F; MARCONATO, L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematological oncology*, v. 32, n. 2, p. 68-71, 2014.
- CONSTANTIAN, H. M.; De GIROLAMI, E. Urothelial tumors detected by cytology: New cell block technique. *J Urol*, v.109, n.2 , p.304-307, 1973.
- COSTA, F. P. S.; PEREIRA, F. G.; VASSALO, J.; FREITAS, L. L. L.; LORAND-METZE, I. A utilidade da citologia por punção com agulha fina aliada a imunofenotipagem no diagnóstico dos linfomas não-Hodgkin. *Rev. bras. hematol. hemoter.* v. 1, n. 27, p.16-20, 2005.
- COWEL, R. L. Os linfonodos In: Cowell, R.L; Meinkith, J.H.; Tyler, R.D.; De Nicola, D.B. *Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos*. 3ªed. São Paulo: Medvet, 2009. p.185-188.

COYLE, K. A.; STEINBERG, H. Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Pathology*, v. 41, n. 2, p. 141-146, 2004.

CRAPAZANO, J. P.; HEYMANN, J. J.; MONACO, S.; NASSAR, A.; SAQUI, A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *CytoJournal*.v.11, n.7, p.1-9, 2014.

DALECK, C. R.; CALAZANS, S. G.; De NARDI, A. B. Linfomas In: Daleck, C. R.; De Nardi, A.B; Rodaski, S. *Oncologia em cães e gatos*, São Paulo: Roca, 2008. p 482:487.

DA SILVA CORDEIRO, M. L.; DA SILVA, N. L. F.; Vaz, M. R. F.; DE FARIAS NOBREGA, F. F. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no Câncer. *Revista Saúde & Ciência Online*, v. 3, n. 3, p. 253-265, 2014.

DAVIES, O.; SZLADOVITS, B.; POLTON, G.; GARDEN, O. A.; LEO, C.; LARA-GARCIA, A. Prognostic significance of clinical presentation, induction and rescue treatment in 42 cases of canine centroblastic diffuse large B-cell multicentric lymphoma in the United Kingdom. *Veterinary and comparative oncology*, p.1-12, 2017.

DICKINSON, R. M. Canine lymphosarcoma: Overcoming diagnostic obstacles and introduction to the latest diagnostic techniques. *The Canadian Veterinary Journal*. v. 3, n.49, p.305-308, 2008.

DOBSON, J. M.; BLACKWOOD, L. B.; MCINESS, E. F.; BOSTOCK, D. E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T. M.; TOM, B. D. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, v. 42, n. 8, p. 377-384, 2001.

DOBSON, J. M.; GORMAN, N. T. Canine multicentric lymphoma 1: Clinico-pathological presentation of the disease. *Journal of Small Animal Practice*, v. 34, n. 12, p. 594-598, 1993.

FERRO, A. B. *Imunohistoquímica*. Adameu Borges Ferro, Outubro, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/4569>. Acesso em 09 de julho de 2018.

FERNANDES, N. C. C. A.; GUERRA, J. M.; RESSIO, R. A.; WASQUES, D. G.; ETLINGER-COLONELLI, D.; LORENTE, S.; NOGUEIRA, E.; DAGLI, M. L. Z. Liquid-based cytology and cell block Immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. *Veterinary and Comparative Oncology*. v. 14, n. S1, p.107-116, 2015.

FLOOD-KNAPIK, K. E.; DURHAM, A. C.; GREGOR, T. P.; SANCHEZ, M. D.; DURNEY, M. E.; SORENMØ, K. U. Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*, v. 11, n. 4, p. 272-286, 2013.

FONTAINE, J.; HEIMANN, M.; DAY, M. J. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases. *Veterinary dermatology*, v. 21, n. 3, p. 267-275, 2010.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of comparative pathology*, v. 117, n. 1, p. 35-59, 1997.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J. L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, P. J. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Veterinary Pathology*, v. 39, n. 1, p. 92-109, 2002.

- GAVAZZA, A.; LUBAS, G.; VALORI, E.; GUGLIUCCI, B. Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Veterinary research communications*, v. 32, n. 1, p. 291-293, 2008.
- GAVAZZA, A.; PRESCIUTTINI, S.; BARALE, R.; LUBAS, G.; GUGLIUCCI, B. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 15, n. 3, p. 190-195, 2001.
- GAVAZZA, A.; SACCHINI, F.; LUBAS, G.; GUGLIUCCI, B.; VALORI, E. Clinical, laboratory, diagnostic and prognostic aspects of canine lymphoma: a retrospective study. *Comparative Clinical Pathology*, v. 18, n. 3, p. 291-299, 2009.
- GINN, J.; SACCO, J.; WONG, Y. Y.; MOTSINGER-REIF, A.; CHUN, R.; TREPANIER, L. A. Positive association between a glutathione-S-transferase polymorphism and lymphoma in dogs. *Veterinary and comparative oncology*, v. 12, n. 3, p. 227-236, 2014.
- GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A. K.; CALVANO, S. E.; MATUS, R. E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A. I.; LIEBERMAN, P. H. Lymphomas in dogs a morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer*, v. 66, n. 3, p. 480-490, 1990.
- HAYES, H. M.; TARONE, R. E.; CANTOR, K. P. On the association between canine malignant lymphoma and opportunity for exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Research*, v. 70, n. 2, p. 119-125, 1995.
- HERNADEZ, G. V. Linfomas cutâneos em cães: estudo epidemiológico, morfológico, imunofenotípico e seroproteico. 2017. 86f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- JAGIELSKI, D.; LECHOWSKI, R.; HOFFMANN-JAGIELSKA, M.; WINIARCZYK, S. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998–2000). *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 49, n. 8, p. 419-424, 2002.
- JARK, P.; VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANAI, L. A.; TINUCCI-COSTA, M. Epidemiological Study of 60 cases of Cutaneous Lymphoma in Dogs in São Paulo State, Brazil. (Abstract) In: 39th World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Congress, Cape Town, South Africa, 16 - 19 Sep. 2014.
- KHAN, S.; OMAR, T.; MICHELOW, P. Effectiveness of the cell block technique in diagnostic cytopathology. *Journal of cytology/Indian Academy of Cytologists*, v. 29, n. 3, p. 177, 2012.
- KELLER, E. T.; MACEWEN, E. G.; ROSENTHAL, R. C.; HELFAND, S. C.; FOX, L. E. Avaliação de fatores prognósticos e quimioterapia de combinação sequencial com doxorubicina para linfoma canino. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 7, n. 5, p. 289-295, 1993.
- KIMURA, K. C.; CARNEIRO, C. S.; DOMENICO, DIAS, R. M.; R. A.; PEREIRA, J.; MATERA, J. M.; LUCAS, S. R. R.; STOPIGLIA, A. J.; KOGIKA, M. M.; TEDARDI, M. V.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; SASCO, A. J.; SALDIVA, P. H. N.; DAGLI, M. L. Z. Cartografia das neoplasias em cães das diferentes regiões da cidade de São Paulo, SP, Brasil: um levantamento (2002-2003) dos dados do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 52, n. 3, p. 257-265, 2015.
- KIMURA, K. C.; ZANINI, D. A.; NISHIYA, A. T.; DIAS, R. A.; DAGLI, M. L. Morphology and immunophenotypes of canine lymphomas: a survey from the service of animal pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 4, n. 3, p. 199-206, 2017.

- KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology*, v. 36, n. 4, p. 292-300, 1999.
- KRICK, E. L.; MEUTEN, D. Lymphoma and lymphoid leukemia prognoses. In: Meuten, D. J. *Tumors in domestic animals*. 5.ed. Ames, Iowa: John Wiley e Sons inc., 2017. Appendix p.961-964.
- MANSY, S. S; ABBAS, M.A; YEHA, H. A; ABDELRAZIK, M. S; GHANEM, L. Y; AMIN, T. M. Value of the Innovated Technique Agarose Cell block in Improving the Sensitivity of Urine Cytology in Cases of Bladder Carcinoma. *Ultrastructural Pathology*.v.30, n.5, p.379–385, 2006.
- MARCONATO, L. The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. *The Veterinary Journal*, v. 188, n. 1, p. 34-38, 2011.
- MARCONATO, L.; GELAIN, M. E.; COMAZZI, S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematological oncology*, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2013.
- MARCONATO, L.; STEFANELLO, D.; VALENTI, P.; BONFANTI, U.; COMAZZI, S.; ROCCABIANCA, P.; CANIATTI, M.; ROMANELLI, G.; MASSARI, F.; ZINI, E. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 238, n. 4, p. 480-485, 2011.
- MARTINI, V.; MARCONATO, L.; POGGI, A.; RIONDATO, F.; ARESU, L.; COZZI, M.; COMAZZI, S. Canine small clear cell/T-zone lymphoma: clinical presentation and outcome in a retrospective case series. *Veterinary and comparative oncology*, v. 14, n. S1, p. 117-126, 2016.
- MARTINI, V.; MELZI, E.; COMAZZI, S.; GELAIN, M. E. Peripheral blood abnormalities and bone marrow infiltration in canine large B-cell lymphoma: is there a link?. *Veterinary and comparative oncology*, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2015.
- MASSERDOTTI, C. Architectural patterns in cytology: correlation with histology. *Veterinary Clinical Pathology*, v.35, p.388-396, 2006.
- MAYALL, F.; DARLINGTON, A.; HARRISON, B. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of uncommon types of lymphoma. **Journal of clinical pathology**, v. 56, n. 11, p. 821-825, 2003
- MERLO, D. F.; ROSSI, L.; PELLEGRINO, C.; CEPPI, M.; CARDELLINO, U.; CAPURRO, C.; RATO, A.; SAMBUCCO, P. L.; SESTITO, V.; TANARA, G; BOCCHINI, V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 22, n. 4, p. 976-984, 2008.
- MORENO, K.; BRACARENSE, A. P.; BRACARENSE, R. L. Linfoma canino de células T: aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de 38 casos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. supl., p. 103-110, 2007. São Paulo, v. 44, suplemento, p. 103-110, 2007
- MORRIS, J; DOBSON, J. Hematopoietic System In: Morris, J; Dobson, J. *Small Animal Oncology*. Oxford: Blackwell Science, 2007. cap. 15 p.228-251.
- MULDER, A. B.; BLOM, N. R.; VANDER MEER, J.; RUUD, H. M.; SMIT, J. W. A simple procedure for in situ immunolabeling embedding and sectioning of layers of cultured endothelial and smooth muscle cells for both light and electron microscopy. *Biotechnic & Histochemistry*, v.72, p.45-48, 1997.

MULLER, A. M.; IHORST, G.; MERTELSMANN, R.; ENGELHARDT, M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Annals of hematology*, v. 84, n. 1, p. 1-12, 2005.

OWEN, Laurence Nightingale et al. TNM Classification of Tumours in Domestic Animal. 1980.

PASTOR, M.; CHALVET-MONFRAY, K.; MARCHAL, T.; KECK, G.; MAGNOL, J. P.; FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: Breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 23, n. 2, p. 301-310, 2009.

PASTOR, M.; CHALVELT-MONFRAY, K.; MARCHAL, T.; KECK, G.; MAGNOL, J. P.; FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: Breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 2, p. 301-310, 2009.

PONCE, F.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P.; TURINELLI, V.; LEDIEU, D.; BONNEFONT, C.; PASTOR, M.; DELIGNETTE, M. L.; FOURNEL-FLEURY, C. 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.

PRICE, G. S.; PAGE, R. L.; FISCHER, B. M.; LEVINE, J. F.; GERIG, T. M. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 5, n. 5, p. 259-262, 1991.

PRIEST, H. L.; HUME, K. R.; KILLICK, D.; KOZICKI, A.; RIZZO, V. L.; SEELIG, D.; SNYDER, L. A.; SPRINGER, N. L.; WRIGHT, Z. M.; ROBAT, C. The use, publication and future directions of immunocytochemistry in veterinary medicine: a consensus of the Oncology-pathology Working Group. *Veterinary and comparative oncology*, v. 15, n. 3, p. 868-880, 2017.

QIN, S. Y.; ZHOU Y.; LI, P., JIANG, H. X. Diagnostic Efficacy of Cell block Immunohistochemistry, Smear Cytology, and Liquid-Based Cytology in Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration of Pancreatic Lesions: A Single-Institution Experience. *PLoS ONE*. v.9, n.9, p. , 2014.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMOS-VARA, J. A.; AVERY, A. C.; AVERY, P. R. In: Raskin, R. Citologia clínica de cães e gatos: atlas colorido e guia de interpretação. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Cap. 17, p.395-437.

REBHUN, R. B.; KENT, M. S.; BORROFKA, S. A. E. B.; FRAZIER, S.; SKORUPSKI, K.; RODRIGUEZ, C. O. CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*, v. 9, n. 1, p. 38-44, 2011.

RICHARDS, K. L.; SUTER, S. E. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma?. *Immunological reviews*, v. 263, n. 1, p. 173-191, 2015.

RODASKI, S.; PIEKARZ, C. H. Epidemiologia e etiologia do câncer In: Daleck, C. R.; De Nardi, A.B; Rodaski, S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2008. p.7.

RUIZ, F. S.; ALESSI, A. C.; CHAGAS, C. A.; PINTO, G. A.; VASSALLO, J. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J. Bras Patol Med Lab*. v. 41, n.4, p.263-70, 2005.

SANCHEZ, N.; SELVAGGI, S. M. Utility of cell blocks in the diagnosis of thyroid aspirates diagnostic. *Cytopathology*, v.34, n.2, p.89-92, 2006.

SAYAG, D.; FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F. Prognostic significance of morphotypes in canine lymphomas: A systematic review of literature. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2017

SEELIG, D. M.; AVERY, A. C.; EHRHART, E. J.; LINDEN, M. A. The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Veterinary sciences*, v. 3, n. 2, p. 11, 2016.

SILVEIRA, T. L.; CAMPOS, L. M.; DUFLOTH, R. M.; MIOT, H. A.; FEO, H. B.; MONTOYA, L. M.; ROCHA, N. S. Cell block sensitivity for immunohistochemical detection of cytokeratin 5, oestrogen and progesterone receptors in canine primary mammary carcinoma. *Austral journal of veterinary sciences*, v. 49, n. 2, p. 99-104, 2017.

SIMON, D.; NOTLE, I.; EBERLE, N.; ABBREDERIS, N.; KILLICH, M.; HIRSCHBERGER, J. Treatment of Dogs with Lymphoma Using a 12-Week, Maintenance-Free Combination Chemotherapy Protocol. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 20, n. 4, p. 948-954, 2006.

SKOOG, L.; TANI, E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*, v. 22, n. 4, p. 215-229, 2011.

SUEIRO, F. A. R.; ALESSI, A. C.; VASSALLO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. *Journal of comparative pathology*, v. 131, n. 2, p. 207-213, 2004.

TAYLOR, B. E.; LEIBMAN, N. F.; LUONG, R.; LOAR, A. S.; CRAFT, D. M. Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. *Veterinary clinical pathology*, v. 42, n. 1, p. 85-91, 2013.

TESKE, E.; VAN HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. *Veterinary quarterly*, v. 18, n. 3, p. 112-115, 1996.

THALHEIM, L.; WILLIAMS, L. E.; BORST, L. B.; FOGLE, J. E.; SUTER, S. E. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 27, n. 6, p. 1509-1516, 2013.

VAIL, D. M. In: Dobson, J. M.; Lacelles, B. D. X. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. 3 ed. BSAVA: British Small Animal Veterinary Association, 2011. Cap. 19, p.285-288.

VAIL, D. M.; PINKERTON, M. E.; YOUNG, K. M. Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemias. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 32, p.608-638.

VAIL, D. M.; KRAVIS, L. D.; KISSEBERTH, W. C.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Application of rapid CD3 immunophenotype analysis and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) frequency to fine needle aspirate specimens from dogs with lymphoma. *Veterinary Clinical Pathology*, v26, n. 2, p. 69, 1997

VALLI, V. E.; BIENZLE, D.; MEUTEN, D. J. In: Meuten, D. J. *Tumors in domestic animals*. 5.ed. Ames, Iowa: John Wiley e Sons inc., 2017. Cap. 7, p.210-330.

VALLI, V. E.; KASS, P. H.; MYINT, M. S.; SCOOT, F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary pathology*, v. 50, n. 5, p. 738-748, 2013.

VALLI, V. E.; MYINT, M. S.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZKY, F.; DURHAM, A.; EHRHART, E. J.; JOHNSON, Y.; JONES, C.; KIUPEL, M.; LABELLE, P.; LESTER, S.; MILLER, M.; MOORE, P.; MOROFF, S.; ROCCABIANCA, P.; RAMOS-VARA, J.; ROSS, A.; SCASE, T.; TVDTEN, H.; VERNAU, W. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 198-211, 2011.

- VALLI, V. E.; VERNAU, W.; de LORIMIER, L. P.; GRAHAM, P. S.; MOORE, P. F. Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology* v. 43, n. 3, p. 241-256, 2006.
- VEZZALI, E.; PARODI, A. L.; MARCATO, P. S.; BETTINI, G. 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, 2010.
- VILLAMIL, J. A.; HENRY, C. J.; HAHN, A. W.; BRYAN, J. N.; TYLER, J. W.; CALDWELL, C. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *Journal of cancer epidemiology*, v. 2009, 2010.
- WITHROW, S. J. Why worry about cancer in pets? In: Withrow, S. L.; Macewen, E.G. 5 Ed. Small animal clinical oncology. Philadelphia: Saunders, 2013. p.xv.
- YAU, P. P. Y.; DHAND, N. K.; THOMSON, P. C.; TAYLOR, R. M. Retrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2001–2009). *Australian Veterinary Journal*, v. 95, n. 5, p. 149-155, 2017
- ZANDVLIET, M. Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, v. 36, n. 2, p. 76-104, 2016.
- ZANDVLIET, M.; RUTTEMAN, G. R.; TESKE, E. Prednisolone inclusion in a first-line multidrug cytostatic protocol for the treatment of canine lymphoma does not affect therapy results. *The Veterinary Journal*, v. 197, n. 3, p. 656-661, 2013.
- ZANINI, D. A.; KIMURA, K. C.; NISHIYA, A. T.; UBUKATA, R.; LEANDRO, R. M.; BRITO, C. P.; TROMBETTI, M.; LAGOA, A. C.; MACEDO, T. R.; RODRIGUES, L. C. S.; ROSEDO, J. A. S.; ARNDT, H. L.; DIAS, R. A.; DAGLI, M. L. Z. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. *Ciência Rural*, v. 43, n. 7, p. 1302-1308, 2013.
- ZANONI, D. S.; GRANDI, F.; ROCHA, N. S. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an “old and forgotten” method. *Veterinary clinical pathology*, v. 41, n. 3, p. 307-308, 2012.

9. ANEXOS

Anexo 1- CEUA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite **CEUA** que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 267/2016

Título do projeto: Avaliação do método de imunocitoquímica através da citoinclusão para imunofenotipagem do linfoma canino "CellBlock"

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Roberto Baracat de Araujo

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: **Decisão Final**

Aprovado na reunião do dia 28/11/2016.
Belo Horizonte, 02/12/2016.

Atenciosamente,

Sistema Solicite **CEUA** UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2 - Consentimento livre e esclarecido

Universidade Federal de Minas Gerais

Comitê de Ética no Uso de Animais

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu, _____, carteira de identidade _____, CPF _____ proprietário (a) do paciente _____, da raça _____, com a idade de _____, pelagem _____ diagnosticada com linfoma autorizo sua inclusão no Projeto de Pesquisa “Avaliação do método de imunocitoquímica através da citoinclusão para imunofenotipagem do linfoma canino”, no qual uma amostra de tecido será colhida do animal com a finalidade de realizar exames e seus comparativos. O material será colhido somente após a constatação de óbito do paciente.

_____ Local e data

_____ Assinatura do proprietário

Anexo 3 - Distribuição do número de animais com linfoma canino distribuídos de acordo com as regiões da Grande Belo Horizonte.



Fonte: <http://izamonteiro2009.blogspot.com.br/2009/02/mapa-de-belo-horizonte.html>

Anexo 4: Tabela geral

Animal	Idade	Sexo	Raça	Estadia- mento	Sub- estadiamento	CL. Anatômica	Uso prévio prednisona	Regiões BH	Imunofenótipo	Cl. Histop.	Citologia	sobrevida
1	4	Macho	Rottweiler	III	a	Multicêntrico	não	Pampulha	B	L. difuso de grandes células B	L. de intermediários e grandes linfócitos	1297
2	10	Macho	P.Alemão	IV	b	Multicêntrico	sim	Noroeste	B	L. difuso de grandes células B	L. de intermediários e grandes linfócitos	357
3	14	Fêmea	Pinscher	I	a	Cutâneo	não	Noroeste	T	L.epiteliotrópico	Não realizado	277
4	8	Fêmea	Labrador	IV	b	Multicêntrico	sim	Noroeste	B	L. difuso de grandes células B	L. de intermediários linfócitos	207
5	8	Fêmea	SRD	IV	b	Multicêntrico	não	Nordeste	B	L. B rico em células T	L. de intermediários e grandes linfócitos	621
6	5	Fêmea	P.Alemão	IV	b	Alimentar	não	Pampulha	T	L. de pequenas células	L. de intermediários linfócitos	9
7	6	Macho	B.hound	III	b	Cutâneo	não	Leste	T	L.epiteliotrópico	Linfoma cutâneo	179
8	4	Fêmea	SRD	III	b	Cutâneo	sim	Pampulha	B	L. não epiteliotrópico	Linfoma Cutâneo	8
9	9	Fêmea	Boxer	II	a	Multicêntrico	não	Norte	B	L. B rico em células T	L. de intermediários linfócitos	257
10	1	Macho	Rottweiler	IV	b	Alimentar	sim	Noroeste	T	L. de pequenas células	L. de intermediários e grandes linfócitos	98
11	5	Fêmea	Golden	IV	b	Multicêntrico	não	Nordeste	B	L. difuso de grandes células B	L. de intermediários e grandes linfócitos	686
12	10	Fêmea	SRD	V	a	Cutâneo	não	Oeste	B	L. difuso de grandes células B	Linfoma Cutâneo	149
13	8	Fêmea	Akita	IV	b	Multicêntrico	não	Noroeste	B	L. difuso de grandes células B	Hiperplasia	57
14	5	Macho	Poodle	IV	b	Cutâneo	sim	Pampulha	EP	L. difuso de grandes células	Linfoma cutâneo	6
15	12	Fêmea	Cocker	V	b	Multicêntrico	não	Noroeste	B	L. difuso de grandes células B	Linfoma de grandes linfócitos	2
16	10	Fêmea	SRD	V	a	Cutâneo	não	Oeste	B	Neoplasia de células redondas	Linfoma cutâneo	149

Anexo 4: Tabela geral

17	8	Macho	B.francês	III	b	Multicêntrico	não	Noroeste	B	L. B rico em células T	Linfoma de grandes linfócitos	6
18	4	Fêmea	SRD	I	b	Cutâneo	não	Oeste	B	L. difuso de grandes células B	Linfoma cutâneo	72
19	8	Fêmea	SRD	V	b	Cutâneo	sim	Grande Bh	B	L. difuso de grandes células B	Linfoma de pequenos linfócitos	28
20	11	Macho	Pitbull	I	b	Cutâneo	sim	Grande Bh	EP	L. de pequenas células	Neoplasias células redondas	7
21	12	Macho	P.Belga	IV	b	Multicêntrico	sim	Noroeste	B	L. B rico em células T	Sugestivo Linfoma	3
22	10	Macho	Golden	II	a	Indolente	não	Centro Sul	T	L. de zona T	L. de intermediários linfócitos	155
23	5	Fêmea	Rottweiler	V	b	Multicêntrico	não	Noroeste	EP	L. difuso de grandes células	L. de intermediários e grandes linfócitos	166
24	6	Fêmea	P.Belga	III	a	Multicêntrico	sim	Leste	B	L.linfoblástico	L. de intermediários e grandes linfócitos	92
25	16	Fêmea	SRD	IV	b	Cutâneo	sim	Grande Bh	T	L.linfoblástico	Linfoma de grandes linfócitos	17

Anexo 4: Tabela geral