

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL ULTRASSONOGRÁFICO E
ELASTOSSONOGRÁFICO EM CÃES ACOMETIDOS
POR LINFADENOPATIAS

ALEXANDRA FREY BELOTTA

Botucatu – SP
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL ULTRASSONOGRÁFICO E
ELASTOSSONOGRÁFICO EM CÃES ACOMETIDOS
POR LINFADENOPATIAS

ALEXANDRA FREY BELOTTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Animal para
obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Jaqueline
Mamprim

Botucatu – SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Belotta, Alexandra Frey.

Perfil ultrassonográfico e elastossonográfico em cães acometidos por linfadenopatias / Alexandra Frey Belotta. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Maria Jaqueline Mamprim
Capes: 50501038

1. Cães. 2. Leishmaniose. 3. Ultrassonografia veterinária. 4. Gânglios linfáticos.

Palavras-chave: Canino; Elastografia; Leishmaniose; Linfonodo; Ultrassom.

Autora: Alexandra Frey Belotta

Título: Perfil ultrassonográfico e elastossonográfico em cães acometidos por linfadenopatias.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Jaqueline Mamprim

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Noeme Sousa Rocha

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Sheila Canevese Rahal

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Redson Soares da Silva

Membro

Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof^a. Dr^a. Raquel Sartor Marcelino

Membro

FATEC – Botucatu

Data da defesa: 29 de junho de 2018.

Você é o seu melhor amuleto, a sua melhor chance, a sua melhor oportunidade. Quem não confia em si mesmo, não aprende a perceber que na vida tudo depende de como encaramos as situações e de como aproveitamos as oportunidades que aparecem.

Vinícius de Moraes

Aos meus estimados pais, Silvia e Celso, os responsáveis por minha trajetória até aqui.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profª. Drª. Maria Jaqueline Mamprim**, pela oportunidade de aprender com sua valiosa experiência ao longo dos últimos 8 anos, sendo um dos principais responsáveis por minha formação profissional e, acima de tudo, por confiar em meu trabalho. Meu eterno agradecimento!

À **Profª. Drª. Noeme Sousa Rocha**, pela imensa colaboração nesse estudo, por todos os ensinamentos práticos e teóricos, principalmente na área de Citopatologia Veterinária, pela acessibilidade e por “abrir as portas” da rotina do Serviço de Citologia.

À **Profª. Drª. Alessandra Melchert**, pela acessoria estatística realizada, pela colaboração no estudo e por todo o aprendizado.

Aos (ex) residentes do Setor de Patologia Veterinária, **Caio Fernando Monteiro Gimenez, Fabricio da Silva Trindade, Renata Belluci, Tatiane Velalva de Paula, Rayssa de Moura Barbosa** e, especialmente, à **Marcela da Costa Gomes**, colaboradora desse estudo, por todo o aprendizado, pela coleta e processamento do material proveniente dos linfonodos, e por sempre responderem prontamente e de forma atenciosa às minhas questões.

Às residentes e pós-graduandos do Setor de Diagnóstico por Imagem, em especial a **Fernanda Michelin, Clarice Megid Carrilho, Roberta Ferraz, Whitara Ferreira, Fernanda Gabriela Oliveira e Ísis Costa**, por encaminharem cães, pelo coleguismo e momentos de aprendizado.

Aos residentes dos Setores de **Enfermidades Infecciosas, Clínica Médica de Pequenos Animais e Cirurgia de Pequenos Animais**, por todos os animais encaminhados e auxílio fornecido.

Aos docentes membros da banca, **Profª. Drª. Noeme Sousa Rocha, Profª. Drª. Sheila Canevese Rahal, Prof. Dr. Alexandre Redson Soares da Silva e Profª. Drª. Raquel Sartor Marcelino**, pela disponibilidade, e pelas contribuições feitas à minha tese de doutorado.

Aos veterinários **Valéria Medina Camprigher, Cláudia Cilene Barbosa Gomiere, Mário Silva e Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez**, e ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru, por contribuírem com um dos estudos dessa tese e pelo excelente trabalho realizado com cães acometidos por leishmaniose e com todos os outros animais que são resgatados pelo CCZ.

Aos funcionários do Setor de Diagnóstico por Imagem, especialmente a **Gilda, Heraldo, Joãozinho e Marquinhos**, pela ótima companhia e convivência durante os últimos anos.

A todos os proprietários dos cães incluídos nesse estudo, pela confiança e disponibilidade.

À **Monique Mayer**, supervisora durante estágio no exterior e docente na Universidade de Saskatchewan, Canadá, e à toda a sua equipe, pela oportunidade de crescimento em minha área profissional e por todo o conhecimento transmitido.

Ao governo canadense, pela bolsa de estudos ELAP (Emerging Leaders in the Americas Program).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado concedida e pela bolsa de estudos no exterior por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Aos amigos que fiz no Canadá, em especial, **Natalia, Amanda, Eduardo, Norman, Jeffrey, Brian e Marilyn**, pessoas especiais que estarão para sempre em meu coração.

Ao meu namorado, **Koji Aoki**, pelo incentivo, amor e carinho.

A todos os meus amigos, em especial, **Shayra Peruch Bonatelli, Marcela Liebana, Carolina Lechinski de Paula, Carina Carvalho, Mariana Suemi Fugita**, por estarem comigo em todos os momentos, bons ou ruins, e por me ensinarem o verdadeiro significado da palavra amizade.

*Ao meu cãozinho **Melvin** (in memorian), por todos os bons momentos, por todo o amor e por ser um dos responsáveis pela escolha de minha profissão.*

*A toda minha família, em especial minha mãe **Silvia**, meu pai **Celso**, meu irmão **Felipe**, minhas **Tias Sandra e Susy**, por incentivarem em todas as minhas decisões, por vibrarem comigo em todas as minhas conquistas e pelo amor incondicional.*

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 1**

Tabela 1 - Estudos disponíveis na literatura veterinária com uso da elastossonografia para padronização ou detecção de lesão em diferentes órgãos.....	27
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Características ultrassonográficas ao modo-B, de linfonodos neoplásicos (LN) e não-neoplásicos (LNN) de cães.....	56
Tabela 2 - Características ultrassonográficas ao Doppler, de linfonodos neoplásicos (LN) e não-neoplásicos (LNN) de cães.....	57
Tabela 3 - Distribuição das frequências dos escores elastográficos, de linfonodos neoplásicos (LN) e não-neoplásicos (LNN) de cães.....	58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Estrutura interna do linfonodo, no cão. Adaptado de Willard-Mack (2006)..... 5
- Figura 2 – Ilustração da anatomia topográfica dos linfonodos, no cão. Adaptado de König e Liebich (2014)..... 7
- Figura 3 - Ilustrações referentes ao padrão de distribuição vascular em linfonodos. (A) Linfonodo normal, apresentando vaso hilar (1), com ramificações (2) e (3); (B), (C) e (D) Linfonodos com padrão vascular alterado: (4) vaso hilar deslocado; (5) vasos anômalos com angulação contrária ao eixo do linfonodo; (6) vasos pericapsulares e (7) vasos subcapsulares. Salwei et al. (2005)..... 21

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Imagens ultrassonográficas ao modo-B de linfonodos reativos (A) e (B) e neoplásicos (C) e (D) de cães. Observa-se evidente padrão heterogêneo tanto em linfonodo poplíteo reativo (A), como em linfonodo cervical superficial com linfoma (C). Também é possível se observar hiperecogenicidade de tecido adjacente em linfonodo inguinal superficial reativo (B) e em linfonodo inguinal superficial acometido por metástase de neoplasia mesenquimal maligna..... 59
- Figura 2 - Imagens ultrassonográficas ao Doppler de linfonodos de cães. (A) Imagem ao Doppler colorido e (B) Power Doppler, evidenciam fluxo com padrão hilar em mesmo linfonodo poplíteo reativo. Imagem ao Doppler colorido de linfonodo cervical superficial com linfoma (C), mostra fluxo com distribuição hilar e periférica, com vaso anômalo pericapsular associado (setas). Imagem ao Doppler colorido de linfonodo inguinal superficial, com metástase de neoplasia mesenquimal maligna: observa-se fluxo turbilhonado de padrão

- misto (D). Imagem ao Doppler pulsado de linfonodo poplíteo com linfoma, evidencia alto índice de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP); 0,92 e 2,37; respectivamente (E)..... 60
- Figura 3 - Imagens elastográficas de linfonodos poplíteos reativos (A) e (B), de linfonodo poplíteo com linfoma (C) e linfonodo submandibular com metástase de melanoma oral (D) de cães. Em (A) e (B), é possível observar mais de 80% da área total nodal com coloração amarela (intermediária) e vermelha (macia), com discretas áreas em azul (rígida), correspondendo a menos de 20% do linfonodo, correspondentes a escore 1. Em (C), observa-se de 50 a 80% da área total do linfonodo com coloração em azul e poucas áreas em vermelho ou amarelo, referentes a escore 3. Em (D), observa-se mais de 80% da área total do linfonodo em azul, poucas áreas em amarelo em discretas áreas em vermelho, correspondentes a escore 4..... 62

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Imagens ultrassonográficas ao modo-B de linfonodos superficiais de cães acometidos por *Leishmania* spp. O parênquima apresenta-se heterogêneo em todas as imagens e a irregularidade de contornos evidente em (A), (B), (C), (D) e (E). Em (A), é possível observar imagem nodular com aspecto em “alvo” no centro do parênquima. Em (B), (C), (D) e (F), há áreas focais hipoecogênicas em permeio ao parênquima. Em (D), a gordura de tecidos adjacentes apresenta-se hiperecogênica. Em (E), nota-se halo hipoecogênico em topografia de córtex externa do linfonodo. Em (C) e (D) os linfonodos poplíteos assumem formato mais alongado em comparação com os poplíteos em (A) e (B)..... 82
- Figura 2 - Imagens ultrassonográficas em modo-B (A), Doppler colorido (B), Power Doppler (C) e Doppler pulsado (D), referentes ao mesmo linfonodo poplíteo, em cão. Em (A), é possível notar o trajeto vascular hilar dilatado, mesmo sem o auxílio do Doppler. Em (B), observa-se discreta vascularização hilar ao Doppler colorido. Ao

- Power Doppler (C), verifica-se vascularização mais evidente, ainda com aspecto hilar. Ao Doppler pulsado (D), nota-se o traçado espectral arterial obtido em região hilar, e os índices de resistividade (IR); 0,62; e de pulsatilidade (IP); 1,1..... 83
- Figura 3 - Imagens elastográficas do mesmo linfonodo poplíteo de cão, obtidas em sequência, possibilitam caracterizar o escore 2 para as imagens (A), (B), (D), (E) e (F), que apresentam 50 a 80% da área total do linfonodo preenchida pelas cores vermelha (macio) ou amarela (intermediário). O escore 3 foi atribuído para o elastograma (C), uma vez que é possível observar de 50 a 80% da área total do linfonodo preenchido pela cor azul (rígido). O escore final atribuído ao linfonodo foi o 2, observado com maior frequência nas imagens..... 84
- Figura 4 - (A) Cão apresentando sinais clínicos decorrentes da leishmaniose: áreas alopécicas ao redor dos olhos, região ventral e membros, hiperqueratose do focinho, onicogribose e dermatite esfoliativa, com áreas de ulceração; (B) Punção do linfonodo cervical superficial esquerdo; (C) Esfregaço realizado com o material obtido do linfonodo. Coloração Panótico. Objetiva 60x; (D) A análise do esfregaço à microscopia de luz, é possível observar a presença de macrófago, no centro da lâmina, englobando microrganismos puntiformes, compatíveis com *Leishmania* spp..... 85

LISTA DE ABREVIACOES

CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina
DC	Doppler colorido
EC	Eixo curto
EL	Eixo longo
IP	Índice de pulsatilidade
IR	Índice de resistividade
LN	Linfonodos neoplásicos
LNN	Linfonodos não neoplásicos
LV	Leishmaniose visceral
PD	<i>Power Doppler</i>
PRF	Frequência de repetição de pulso
RECEL	Relação entre eixo curto e eixo longo
VDF	Velocidade diastólica final
VM	Velocidade média
VPS	Velocidade de pico sistólico

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
 CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO.....	02
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1. Linfonodos em cães.....	04
2.1.1. Anatomia e fisiologia.....	04
2.1.1.1. Anatomia topográfica.....	06
2.1.2. Enfermidades dos linfonodos.....	07
2.1.3. Métodos de avaliação dos linfonodos.....	08
2.1.3.1. Histopatologia.....	11
2.1.3.2. Citologia.....	12
2.1.3.3. Ultrassonografia.....	14
2.1.3.3.1. Ultrassonografia modo-B.....	15
2.1.3.3.2. Ultrassonografia Doppler.....	19
2.1.3.3.3. Elastossonografia.....	24
 CAPÍTULO 2	
TRABALHO CIENTÍFICO 1: ULTRASSONOGRAFIA E ELASTOSSONOGRAFIA NA DETECÇÃO DE MALIGNIDADE EM LINFONODOS DE CÃES.....	28
Resumo.....	32
Introdução.....	33
Materiais e métodos.....	35
Resultados.....	40

Discussão.....	42
Conclusões.....	48
Referências.....	49

CAPÍTULO 3

TRABALHO CIENTÍFICO 2: LINFONODOS CANINOS PARASITADOS POR <i>LEISHMANIA</i> SPP. APRESENTAM ALTERAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS E ELASTOGRÁFICAS?.....	63
Resumo.....	66
Introdução.....	67
Métodos.....	68
Resultados.....	71
Discussão.....	72
Conclusões.....	77
Referências.....	78

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL.....	87
CONCLUSÕES GERAIS.....	88
REFERÊNCIAS.....	89

BELOTTA, A.F. **Perfil ultrassonográfico e elastossonográfico em cães acometidos por linfadenopatias**. Botucatu, 2018. 103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A literatura veterinária possui escasso conteúdo a respeito do uso da ultrassonografia e elastossonografia para caracterização de lesões em linfonodos de cães. O objetivo do primeiro estudo foi comparar as características ultrassonográficas e elastossonográficas entre 50 linfonodos neoplásicos (LN) e 69 linfonodos não neoplásicos (LNN), em cães, com base no diagnóstico microscópico. A hipótese desse estudo é que seja possível distinguir lesões neoplásicas e não neoplásicas com tais técnicas de imagem. Variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos com teste t de student não pareado e, as variáveis categóricas, com teste U de Mann-Whitney. Linfonodos neoplásicos apresentaram dimensões significativamente maiores, relação entre eixo curto e eixo longo (RECEL) superior, maior frequência na perda da arquitetura interna, distribuição vascular predominante mista, índices de resistividade (IR) e de pulsatilidade (IP) superiores e maior rigidez à distribuição do escore elastográfico, em comparação com LNN. O objetivo do segundo estudo foi descrever as características ultrassonográficas e elastossonográficas de 25 linfonodos caninos parasitados por *Leishmania* spp. A hipótese desse estudo é que seja possível padronizar linfonodos contendo formas amastigotas de *Leishmania* spp por meio da ultrassonografia e elastografia. Houve aumento nas dimensões dos linfonodos, com RECEL próximo da normalidade. Observou-se alta prevalência de contornos irregulares, bordas nítidas e ausência de definição de tecido hilar. Alguns linfonodos apresentaram ecogenicidade heterogênea, devido à presença de áreas nodulares ou halo hipoecogênico periférico. A vascularização foi predominantemente hilar e os índices de resistividade e pulsatilidade médios obtidos foram 0,63 (\pm 0,07) e 1,16 (\pm 0,27), respectivamente. O escore elastográfico observado com maior frequência foi o 2, referente a tecido de elasticidade intermediária, tendendo a macio. Tais estudos sustentam a hipótese de que o exame ultrassonográfico e o elastográfico permitam a diferenciação entre lesões nodais neoplásicas e não neoplásicas e a caracterização de linfonodos acometidos pelas formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Palavras-chave: Canino, Elastografia, Leishmaniose, Linfonodo, Ultrassom.

BELOTTA, A.F. **Ultrasonography and sonoelastography of lymph nodes in dogs with lymphadenopathies.** Botucatu, 2018. 103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Applicability of ultrasonography and sonoelastography for characterization of lymph node lesions has not been established. The aim of the first study was to compare sonographic and sonoelastographic features between 50 neoplastic and 69 non-neoplastic lymph nodes of dogs, categorized according to microscopy. We hypothesize that sonography and sonoelastography allow the differentiation between neoplastic and non-neoplastic lymph node lesions. Quantitative variables were compared using Student's unpaired t test and categorical variables were assessed using non-parametric Mann-Whitney U test. Neoplastic nodes had larger size, and short-to-long axis, predominantly mixed vascular flow distribution (hilar and peripheral) on Color Doppler and on Power Doppler, higher resistivity and pulsatility indices, and higher stiffness (score predominantly 4) on elastographic chromatic scale in comparison with non-neoplastic lymph nodes. The aim of the second study was to describe sonographic and elastosonographic features of 25 canine lymph nodes parasitized with *Leishmania* spp. We hypothesize that sonography and sonoelastography allow standardization of lymph nodes with *Leishmania* spp. There was enlargement of the lymph nodes associated with maintenance of the shape. Most of the nodes had irregular contour, well-defined borders and absent hilar tissue definition. A minority of the nodes had heterogeneous uniformity due to focal hypoechoic areas or peripheric hypoechoic areas. Vascular flow distribution was predominantly hilar and mean resistivity and pulsatility indexes were 0.63 (\pm 0.07) and 1.16 (\pm 0.27), respectively. The most frequent elastographic score was 2, indicating an intermediate soft composition of the lymph node tissue.

Key words: Canine, Elastography, Leishmaniasis, Lymph node, Ultrasound.

CAPÍTULO 1

Introdução e Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO

Os linfonodos são importantes órgãos, responsáveis por auxiliar no sistema imune e na homeostase (ROGERS et al., 1993) e se localizam em centros linfáticos distribuídos em diversas regiões do corpo, superficiais e profundas (CARVALHO, 2009). O aumento dos linfonodos, nos cães, pode ser resultado de variadas enfermidades, sendo as principais delas, alterações inflamatórias e proliferativas, que englobam as hiperplasias e as neoplasias (FIGHERA e GRAÇA, 2016). Esses órgãos, portanto, podem ser classificados, de acordo com as alterações presentes, em neoplásicos ou não-neoplásicos. Os processos neoplásicos, por sua vez, podem ser primários, como os linfomas, ou secundários, como metástases de tumores primários que sejam drenados pelo linfocentro acometido (MILLS, 1989; COUTO, 2015).

Cães são frequentemente encaminhados à rotina clínica com aumento de um ou mais linfonodos (COUTO, 2015). A avaliação da causa da linfadenopatia é de grande importância para o planejamento terapêutico e obtenção de prognóstico, possibilitando até mesmo, em alguns casos, a conclusão diagnóstica da enfermidade à qual o animal está exposto (KINNS e MAI, 2007).

Diferentes técnicas diagnósticas podem ser utilizadas na avaliação das linfadenopatias. A palpação consiste em um bom método para identificar dimensões, contornos, formato e consistência na abordagem inicial do paciente (COUTO, 2015). Entretanto, apresenta baixa sensibilidade na detecção de processos malignos (BINDER et al., 1997), que podem levar à deposição local de células neoplásicas, sem necessariamente ocasionar o aumento do linfonodo acometido (WILLIAMS e PACKER, 2003).

As técnicas de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e biópsia, por agulha *tru-cut* ou excisional, possibilitam a análise microscópica das células e de fragmento tecidual do linfonodo, respectivamente. Embora o exame histopatológico seja o padrão-ouro no diagnóstico de afecções envolvendo o linfonodo, requer sedação ou mesmo anestesia geral e um maior tempo para diagnóstico da lesão (LANGENBACH et al., 2001). Já o exame citológico apresenta alta sensibilidade e especificidade diagnósticas, além de ser facilmente e rapidamente realizado, amplamente disponível e pouco oneroso (AMORES-FUSTER et al., 2014). Contudo, o exame citológico também é considerado invasivo, especialmente quando há a necessidade de examinar linfonodos profundos, sejam eles intratorácicos ou intra-abdominais (MAYER et al., 2010), além

de estar sujeito a outras limitações como a obtenção de material insuficiente e diagnóstico inconclusivo (COWEL et al., 2003).

Dentre as técnicas de imagem disponíveis, o exame ultrassonográfico apresenta inúmeras vantagens sobre as outras, incluindo a análise de parâmetros como formato, margens, arquitetura interna, distribuição da vascularização e análise dos índices hemodinâmicos (ESEN, 2006).

Na área médica, a aplicabilidade do exame ultrassonográfico convencional e Doppler para caracterização de lesões em linfonodos tem sido amplamente estudada (ADIBELLI et al., 1998; STEINKAMP et al., 2002; BRNIC e HEBRANG, 2003; 2004; ALVAREZ et al., 2006; LEBOULLEUX et al., 2007). O convencional (YANG et al., 2000; ROSÁRIO et al., 2005) e o Doppler (CHOI et al., 1995; NA et al., 1997; ARIJI et al., 1998; DRAGONI et al., 1999; YING et al., 2004; DANGORE-KHASBAGE et al., 2009; CHAMMAS et al., 2016) foram considerados eficazes na distinção entre processos neoplásicos e não neoplásicos em pacientes humanos. A elastossonografia, técnica disponível ainda em poucos equipamentos ultrassonográficos, é capaz de fornecer detalhes relacionados às propriedades mecânicas dos tecidos (FRULIO e TRILLAUD, 2013) e tem se mostrado eficaz na caracterização de malignidade em linfonodos, na área médica (BHATIA et al., 2011; KURT et al., 2013).

Na literatura veterinária, pouco foi relatado acerca das características ultrassonográficas de linfonodos hígidos (AGTHE et al., 2009; MAYER et al., 2010; SILVER et al., 2012), ou acometidos por diferentes alterações e/ou enfermidades (PUGH, 1994; NYMAN et al., 2005; SALWEI et al., 2005; NYMAN et al., 2006; SWARTE et al., 2011). Ao conhecimento do autor, há apenas um estudo disponível relacionado à técnica elastossonográfica para a caracterização de lesões nodais (SEILER e GRIFFITH, 2018).

Diante do exposto, os objetivos dos dois estudos aqui descritos foram, por meio das técnicas ultrassonográfica e elastossonográfica, comparar lesões neoplásicas e não neoplásicas de linfonodos de cães e padronizar linfonodos de cães contendo as formas amastigotas de *Leishmania* spp.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Linfonodos em cães

2.1.1. Anatomia e fisiologia

Os linfonodos são órgãos linfoides secundários que compõem o sistema linfático, juntamente com timo, baço e nódulos linfáticos (FRY e MCGAVIN, 2012). Têm como principais funções auxiliar no sistema imune e na homeostase, por meio da proteção do corpo contra antígenos e da remoção de fluidos intersticiais, retornando-os à corrente sanguínea, respectivamente (ROGERS et al., 1993).

Com relação à anatomia, são parcialmente envoltos por cápsula fibrosa, por onde vasos linfáticos aferentes adentram e se esvaziam no seio subcapsular. Possuem um hilo, por onde saem os linfáticos eferentes e por onde entram e saem os vasos sanguíneos (SEARCY, 2000). São compostos por porção mais externa, a córtex, que contém as trabéculas, bandas de colágenos que se estendem para o interior da cápsula e são envoltas por seios trabeculares; e porção mais interna, a medula, que possui cordões medulares com plasmócitos, macrófagos e linfócitos e os seios medulares, envoltos por macrófagos (CLARKE, 1998). O seio subcapsular é conectado aos seios medulares que eventualmente convergem para os linfáticos. A córtex é subdividida em superficial ou externa, onde localizam-se os folículos linfoides, e em córtex profunda ou paracórtex, que possui tecido linfoide difuso e vênulas de endotélio alto (Figura 1) (FRY e MCGAVIN, 2013).

As células linfoides nos linfonodos são classificadas, com bases morfológicas, como pequenos linfócitos, grandes linfócitos e plasmócitos. Há um predomínio de linfócitos B nos folículos do córtex superficial, enquanto no paracórtex, a maioria dos linfócitos são células T (SEARCY, 2000). Fisiologicamente, quando um antígeno é transportado para o linfonodo na linfa, há estímulo de linfócitos B, que se proliferam e aumentam de volume, conferindo um aspecto mais claro ao centro do folículo (centro germinativo) (FIGHERA e GRAÇA, 2016).

Os linfonodos recebem vasos linfáticos aferentes de áreas específicas do corpo. Linfonodos periféricos, como o poplíteo e inguinal superficial, drenam o membro pélvico. Os linfonodos centrais, tais como o traqueobronquial e os linfonodos mesentéricos (linfocentros), drenam os pulmões e o trato gastrointestinal, respectivamente (BEZUIDENHOUT, 2013). O termo linfocentro é usado em anatomia veterinária para um linfonodo ou um grupo de linfonodos que ocorrem constantemente

em uma mesma região e recebem vasos linfáticos da mesma região em todas as espécies (COUTO, 2015).

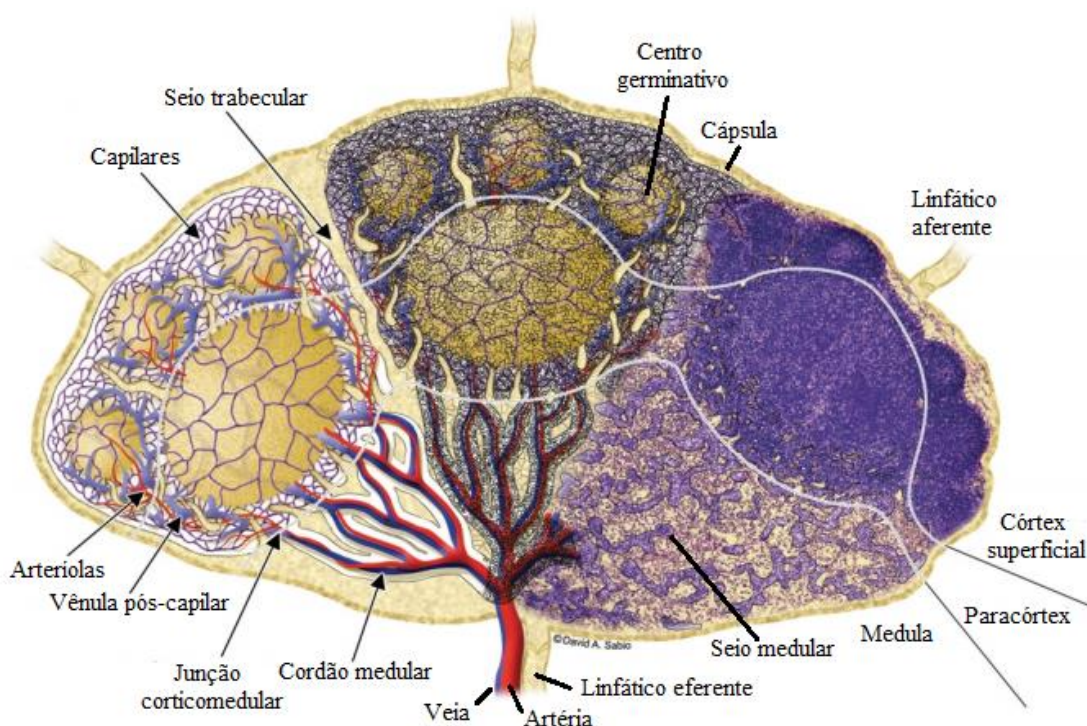


Figura 1. Estrutura interna do linfonodo, no cão. Adaptado de Willard-Mack (2006).

Os agentes nocivos, incluindo bactérias, vírus, células cancerígenas, antígenos, entre outros, são transportados via linfática, predominantemente pelos linfáticos aferentes, para os linfonodos. Em casos de septicemias ou bacteremias, podem entrar via hematogena (FRY e MCGAVIN, 2013). A seguir, a linfa circula através das áreas ricas em células fagocíticas mononucleares e chega aos linfáticos eferentes. Durante esse trajeto, os agentes nocivos são captados e processados pelas células e apresentados aos linfócitos para que haja a resposta imune (COUTO, 2015). Os linfócitos penetram no linfonodo pelas paredes de vênulas especializadas e, caso não encontrem antígenos que reconheçam, saem algumas horas após, por meio dos linfáticos eferentes. Células apresentadoras de antígenos auxiliam no reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos e, desse modo, os linfonodos atuam aumentando a capacidade de detecção e de apresentação de antígenos (SEARCY, 2000).

2.1.1.1. Anatomia topográfica

Os cães possuem, aproximadamente, 29 cadeias de linfonodos em cada lado de seu corpo (SAAR e GETTY, 1975). Esses linfonodos podem ser classificados, de acordo com a localização, em linfonodos superficiais e profundos. Linfonodos profundos são subdivididos em linfonodos torácicos, linfonodos abdominais viscerais e linfonodos aórtico-lombares (CARVALHO, 2009).

Os linfocentros referem-se a grupos de linfonodos localizados em determinada topografia, responsáveis por drenar determinada região (COUTO, 2015). O linfocentro que contém a cadeia de linfonodos cervicais superficiais, por exemplo, é frequentemente acometido por doenças que envolvem a cabeça, pescoço e mamas torácicas (SAAR e GETTY, 1975). Linfonodos axilares, por outro lado, são acometidos por enfermidades que envolvem membros torácicos, parede torácica e mamas craniais (BEZUIDENHOUT, 2013).

Os linfonodos superficiais que podem ser palpados ao exame físico incluem o mandibular, o pré-escapular (ou cervical superficial), o axilar (palpados em aproximadamente 50% dos cães), o inguinal superficial e o poplíteo (Figura 2). O facial e o retrofaríngeo podem ser palpados quando se tornam substancialmente aumentados (COUTO, 2015).

Os centros linfáticos da cavidade torácica incluem os linfonodos intercostais, esternais, traqueobrônquicos, pulmonares e mediastinais. Os linfonodos abdominais viscerais englobam os linfonodos hepáticos, esplênicos, gástricos, pancreatoduodenais, jejunais e cólicos (SAAR e GETTY, 1975). Já os linfonodos aórticos lombares contêm pequenos nodos adjacentes aos grandes vasos localizados desde o diafragma até as artérias ilíacas circunflexas profundas, que são os linfonodos lombares, e também os linfonodos ilíacos mediais (CARVALHO, 2009). Saar e Getty (1975) incluem os linfonodos renais no centro linfático lombar pois, de maneira geral, é difícil distingui-los dos lombares. Os renais, entretanto, localizam-se em região mais próxima dos vasos renais e apresentam maiores dimensões em relação aos lombares.

É essencial o conhecimento da localização de cada linfonodo e da região e órgãos que cada um deles é responsável por drenar, uma vez que a distribuição da linfadenopatia é de grande importância para o diagnóstico. Pacientes que apresentam linfadenopatia solitária ou regional devem receber avaliação detalhada da área drenada pelo linfonodo ou cadeia de linfonodos à procura da lesão primária que, provavelmente, se localizará nessa região (COUTO, 2015).

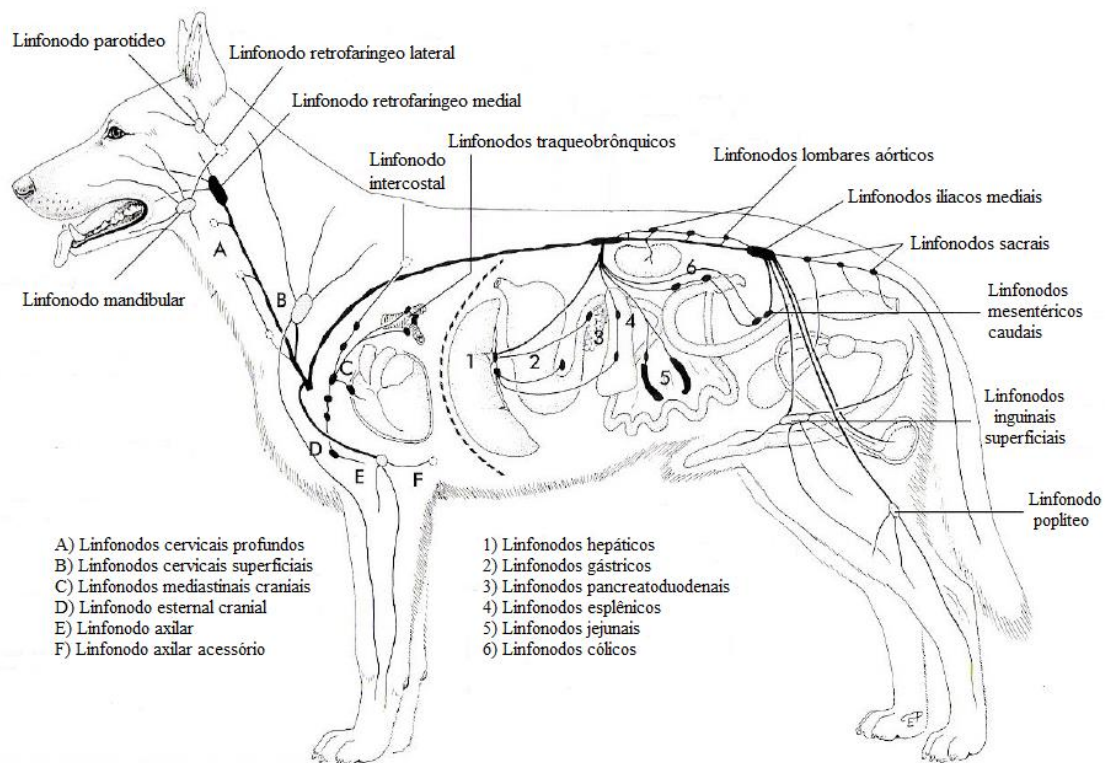


Figura 2. Ilustração da anatomia topográfica dos linfonodos, no cão. Adaptado de König e Liebich (2014).

2.1.2. Enfermidades dos linfonodos

Inúmeras afecções podem acometer os linfonodos, incluindo desordens do desenvolvimento (hipoplasia), alterações circulatórias (edema e hemorragia) e alterações degenerativas (necrose e atrofia). Entretanto, os principais distúrbios observados em cães são as linfadenites (alterações inflamatórias) e as alterações proliferativas, que englobam tanto as hiperplasias como as neoplasias (FIGHERA e GRAÇA, 2016).

Processos infecciosos são responsáveis pela maioria dos casos de aumento dos linfonodos. Entretanto, tumores do tecido linfóide também ocasionam linfadenomegalia clinicamente palpável (BARRETT et al., 2006). As neoplasias que acometem os linfonodos podem ser classificadas em primárias ou secundárias (metastáticas) e a infiltração do linfonodo por neoplasias hematopoéticas malignas constitui a principal causa de linfadenopatia generalizada em cães (COUTO, 2015).

As linfadenopatias inflamatórias e proliferativas podem ser classificadas em infecciosas e não-infecciosas. Inúmeros agentes bacterianos, riquetsianos, fúngicos, virais e parasitários podem causar linfadenopatia infecciosa. Dentre as causas de

linfadenopatias não-infecciosas, inclui-se inflamação localizada, reação pós-vacinal, reação a fármacos, distúrbios imunomediados, linfadenopatias dermatopáticas e causas idiopáticas (COUTO, 2015).

A hiperplasia linfoide pode ocorrer como uma resposta compensatória à infecção resultante de uma doença sistêmica, ocasionando aumento generalizado de linfonodos, ou pode estar restrita a um linfonodo regional, responsável por drenar uma área inflamada (FRY e MCGAVIN, 2013). Já as linfadenites são, na maioria das vezes, resultados de linfonodos regionais que drenam sítios inflamatórios e tornam-se infectados, como os linfonodos retrofaríngeos mediais na rinite aguda (NEMANIC et al., 2015) ou os linfonodos traqueobrônquicos na pneumonia (COUTO, 2015). O material drenado pode conter bactérias, produtos inflamatórios ou até mesmo parasitas (exemplo *Demodex canis* ou *Leishmania* spp.) (FRY e MCGAVIN, 2013).

Os linfomas multicêntricos são a forma mais comum de neoplasia primária de linfonodos em cães, levando à linfadenomegalia generalizada. Outras formas incluem a alimentar, a cutânea e a mediastínica (SEARCY, 2000). Amores-Fuster et al. (2015) relataram que o linfoma foi a enfermidade mais comumente diagnosticada no exame citológico de linfonodos de cães, em um laboratório no Reino Unido, durante um período de 24 meses. O mesmo pôde ser observado por Sapierzynski e Micun (2009), em uma população menor de cães, em que 56% das amostras citológicas de linfonodos foram diagnosticadas como linfomas.

No que diz respeito às metástases de tumores para linfonodos regionais, os carcinomas são a forma mais comum de disseminação metastática (FRY e MCGAVIN, 2013). Melanomas (WILLIAMS e PACKER, 2003), mastocitomas e sarcomas (KRICK et al., 2009), entre outros, também estão sujeitos a metástase para linfonodos, embora com menor frequência. A metástase de osteossarcoma para linfonodos regionais é rara e foi associada a pior prognóstico, com menor tempo de sobrevida (HILLERS et al., 2005).

2.1.3. Métodos de avaliação dos linfonodos

A linfadenopatia consiste em sinal clínico não-específico, frequentemente detectado em cães durante o exame físico (NYMAN et al., 2006). O exame dos linfonodos e esclarecimento da causa da linfadenopatia é essencial para o diagnóstico de determinadas enfermidades e para a distinção entre processos neoplásicos e não

neoplásicos, auxiliando diretamente no estadiamento, tratamento e prognóstico dos pacientes (KINNS e MAI, 2007).

A análise de linfonodos regionais é particularmente importante quando há a suspeita de neoplasias primárias ou metastáticas (NYMAN et al., 2006). Embora a palpação seja essencial para determinar o aumento de linfonodos superficiais na abordagem inicial do paciente, apresenta baixa sensibilidade na detecção de processos malignos (BINDER et al., 1997). Estudos realizados em mulheres com tumores de mama mostraram que até 38% dos linfonodos com dimensões normais à palpação podem apresentar células neoplásicas (DANFORTH et al., 1986; FREITAS et al., 1991). Em cães acometidos por melanoma na cavidade oral, 40% dos animais com linfonodos submandibulares de dimensões normais apresentaram evidência citológica de processo metastático (WILLIAMS e PACKER, 2003). O método de palpação, portanto, traz informações acerca da consistência, dimensões, formato e possibilidade de aderência do linfonodo no tecido subcutâneo do paciente (COUTO, 2015). Entretanto, mesmo quando os linfonodos estão aumentados, esse método é insuficiente para determinar a causa do aumento, crescimento extra-capsular e envolvimento vascular (ESEN, 2006). Métodos diagnósticos mais específicos fornecem informações mais detalhadas a respeito da arquitetura nodal e permitem maiores esclarecimentos da provável causa da linfadenopatia, especialmente quando há a suspeita de metástases de tumores locais (LANGENBACH et al., 2001; NYMAN et al., 2005).

O exame histológico permite a avaliação morfológica e fornece o diagnóstico definitivo das lesões de linfonodos (GRIFFITHS et al., 1984). Contudo, não é rotineiramente utilizado na prática clínica de pequenos animais, devido à necessidade de sedação e/ou anestesia, o que torna o exame citológico preferível, na abordagem inicial do paciente (MACNEILL, 2011).

A citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) demonstrou ser um método sensível e específico na avaliação de linfonodos regionais com suspeita de metástases em cães e gatos com tumores sólidos (LANGENBACH et al., 2001). Entretanto, é considerado um exame invasivo, principalmente na avaliação de linfonodos menos acessíveis como os linfonodos ilíacos mediais e inguinais superficiais (MAYER et al., 2010).

Os métodos de diagnóstico por imagem são de grande importância para o diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta ao tratamento e acompanhamento subsequente de tumores durante o tratamento, em pacientes com câncer (NYMAN et al.,

2004). No caso dos linfonodos, exames de imagem trazem informações adicionais, relacionadas às características dos linfonodos, que podem auxiliar na detecção de processos neoplásicos (NYMAN et al., 2005; NYMAN et al., 2006; MAYER et al., 2010).

O exame radiográfico simples e a tomografia computadorizada são benéficos na detecção da distribuição e do aumento de linfonodos intratorácicos e intra-abdominais, além de trazerem informações adicionais como possível comprometimento do parênquima pulmonar e pleura (COUTO, 2015). Entretanto, a radiografia simples não permite a avaliação do parênquima nodal e a tomografia computadorizada, embora forneça detalhes da densidade parenquimatosa, possui custo-benefício limitado frente a outras ferramentas diagnósticas, o que restringe seu uso para esse fim (FONSECA-PINTO, 2003). Técnicas contrastadas como as linfangiografias são úteis na avaliação de linfonodos que drenam neoplasias primárias altamente metastáticas, embora o uso seja limitado na rotina clínica de pequenos animais por dificuldades técnicas para realizá-las (COUTO, 2015).

A ultrassonografia é um método não-invasivo que pode ser utilizado para avaliar dimensões, formato, margens, hilo, estrutura interna e presença e distribuição da vascularização de linfonodos (NYMAN et al., 2007). Além do Color Doppler e do Power Doppler, trabalhos recentes têm demonstrado variações no índice de resistividade (IR) e no índice de pulsatilidade (IP) dos vasos de linfonodos, de acordo com o caráter (neoplásico ou não-neoplásico) da alteração (NYMAN et al., 2005). Diversos estudos demonstraram que a ultrassonografia apresenta sensibilidade diagnóstica superior à palpação na detecção de linfonodos aumentados em pacientes com suspeita de metástases em linfonodos regionais (ADIBELLI et al., 1998).

As técnicas de imagem convencionais não permitem a obtenção de informações relacionadas às propriedades mecânicas dos tecidos, que podem variar consideravelmente em diversas doenças, como nos processos infiltrativos malignos (FRULIO e TRILLAUD, 2013). Desse modo, a elastossonografia é de grande valor ao estimar a elasticidade do tecido a ser avaliado, por meio da mensuração da velocidade de propagação da onda através do parênquima, do grau de deformidade, ou do deslocamento do tecido frente a uma força aplicada (FRAQUELLI et al., 2007). Embora estudos adicionais sejam necessários para comprovação da aplicabilidade clínica da técnica de elastossonografia no diagnóstico de lesões nodais, resultados preliminares obtidos em pacientes humanos mostraram-se promissores (BHATIA et al., 2011; KURT

et al., 2013). Na literatura veterinária, há poucas informações a respeito do uso da elastografia em cães e gatos (ALDER et al., 2013; FELICIANO et al., 2014; GLINSKA-SUCHOCKA et al., 2014; HOLDSWORTH et al., 2014; FELICIANO et al., 2015a; FELICIANO et al., 2015b; MARONEZI et al., 2015; JEON et al., 2015; GLINSKA-SUCHOCKA et al., 2013; FELICIANO et al., 2016) e apenas um estudo até o momento avaliou sua eficácia na distinção de lesões neoplásicas e não-neoplásicas de linfonodos (SEILER e GRIFFITH, 2018).

2.1.3.1. Histopatologia

A biopsia com agulha *tru-cut* é amplamente empregada como método de estadiamento na área médica e tem sido utilizada com maior frequência na Medicina Veterinária (LANGENBACH et al., 2001). Estudos demonstraram sensibilidade e especificidade dessa técnica semelhantes às relatadas para a CAAF, embora maior quantidade de tecido seja obtida (MILSOM et al., 1994). Entretanto, deve ser realizada com anestesia local e contenção e, em alguns casos, com sedação profunda ou anestesia geral, dependendo da localização do linfonodo (MACNEILL, 2011).

A remoção do linfonodo inteiro é atualmente o padrão-ouro para avaliação de metástases nodais em pacientes humanos e fornece a maior quantidade de amostra em comparação com a biopsia por agulha *tru-cut* e CAAF (LANGENBACH et al., 2001). Ademais, a excisão de um linfonodo com suspeita de metástase remove uma região com potencial para câncer, podendo auxiliar no controle local e regional do tumor (MONSOUR et al., 1993).

Por meio do exame histológico, é possível avaliar a estrutura e organização tecidual do linfonodo, que consiste de múltiplos lóbulos linfoides, circundados por seios preenchidos por linfa e delimitados por uma cápsula (SAINTE-MARIE et al., 1990). O lóbulo linfoide é a unidade básica anatômica e funcional do linfonodo, sendo que vários lóbulos são arranjados lado a lado, ancorados pelo hilo por suas raízes vasculares e separados da cápsula pelo seio subcapsular (GRETZ et al., 1997). São envoltos por complexo sistema de seios linfáticos e subdivididos em córtex e paracórtex. O conhecimento detalhado da arquitetura lobular auxilia na interpretação das alterações nodais e no reconhecimento de variações da normalidade, que podem ocorrer de acordo com a localização anatômica, a idade, a dieta e a exposição à antígenos (WILLARD-MACK, 2006).

2.1.3.2. Citologia

A localização superficial de alguns linfonodos (submandibulares, cervicais superficiais, inguinais e poplíteos) permite fácil detecção do aumento e possibilita ainda o acesso para aspiração com agulha fina (MESSICK, 2013). De acordo com Messick (2013), é recomendado aspirar qualquer linfonodo que esteja aumentado e, no caso de linfonodos que drenem áreas acometidas por neoplasias, a punção é justificada mesmo que não haja linfadenomegalia.

A citologia é um exame menos invasivo quando comparado com a biopsia e, como consequência, fornece menor quantidade de células para análise (LANGENBACH et al., 2001). Contudo, esse exame tem valor altamente reconhecido na oncologia humana e sua sensibilidade e especificidade foram de 92% e 93%, respectivamente, quando o diagnóstico de lesões nodais foi comparado com o resultado obtido na avaliação histológica do linfonodo inteiro (WIERSEMA et al., 1997). Em estudo realizado em cães e gatos com possíveis metástases nodais de tumores sólidos, verificou-se sensibilidade superior do exame citológico, de 100%, em relação à biopsia com agulha *tru-cut*, a qual apresentou sensibilidade de 64% (LANGENBACH et al., 2001). A ausência de características celulares anormais não exclui a possibilidade de diagnóstico positivo para a suspeita e, portanto, nesse caso, o exame citológico deve ser repetido ou o exame histológico realizado para confirmação diagnóstica da lesão (MILLS, 1989).

Outras vantagens do exame citológico incluem o procedimento relativamente seguro, indolor, rápido, pouco oneroso, que não necessita de sedação e/ou hospitalização do paciente (MILLS, 1989; MORRICE e DENICOLA, 1993; PRASAD et al., 1996; COWEL et al., 2003; MESSICK, 2013).

Com relação à coleta, no caso de aumento generalizado de linfonodos, recomenda-se a aspiração de vários deles. Quando possível, deve-se evitar a punção dos linfonodos submandibulares, uma vez que esses tornam-se aumentados, reativos e/ou inflamados por drenar a cavidade oral que está frequentemente exposta a antígenos e a presença de mistura de células malignas, reativas e inflamatórias pode limitar a eficácia diagnóstica desse exame no diagnóstico de linfomas (COWEL et al., 2003; MESSICK, 2013). O tamanho do linfonodo também deve ser levado em consideração no momento da punção. Linfonodos muito aumentados tendem a apresentar áreas de hemorragia e necrose; caso esses linfonodos sejam aspirados, a agulha deve ser direcionada tangencialmente, evitando as regiões mais centrais (VERNAU, 2005). Múltiplas áreas

do interior do linfonodo devem ser aspiradas a fim de se obter uma amostra representativa (MACNEILL, 2011; MESSICK, 2013). De acordo com Amores-Fuster et al. (2015), o envio de maior número de amostras de linfonodos de cães contribuiu com o aumento de probabilidade diagnóstica, devido à melhor qualidade do material.

Os linfonodos esfoliam grande número de células, permitindo que os esfregaços levem a um diagnóstico com frequência de processos ou enfermidades que podem ser de natureza primária ou secundária. As principais causas de linfadenopatias em cães incluem neoplasias (primárias ou metástases), hiperplasias ou linfadenopatias reativas, linfadenites (neutrófilica, purulenta, eosinofílica, piogranulomatosa ou granulomatosa), estimulação imune e hematopoiese extramedular (COWEL et al., 2003).

De acordo com Messick (2013), no que diz respeito à interpretação da lâmina de citologia, a leitura baseia-se na proporção de diferentes células e no conhecimento de quais proporções são normais ou anormais para esses tipos celulares. Linfócitos pequenos, bem diferenciados, compõem de 75% a 85% do total da população de células nucleadas. Além de pequenos linfócitos, um linfonodo normal deve ter um baixo número (menos de 10% a 15%) de linfócitos, que possuem dimensão intermediária a grande (linfoblastos). Plasmócitos, em diversos estágios de desenvolvimento, são identificados em pequenos números em linfonodos normais e representam menos de 3% do total de células nucleadas, assim como os macrófagos. Ocasionalmente, uma baixa quantidade de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos podem ser observados e cada uma dessas células representa menos de 1% da população celular do linfonodo normal.

O exame citológico de linfonodos edemaciados, reativos ou hiperplásicos é, em grande parte dos casos, semelhante ao de linfonodos normais, e são classificados em hiperplásicos com base no histórico clínico de linfadenomegalia. Os linfonodos reativos são parecidos com hiperplásicos, mas apresentam pouco a moderado número de pró-linfócitos, linfoblastos e plasmócitos. Tanto o linfonodo hiperplásico como o linfonodo reativo representam a proliferação linfoide em resposta a estimulação antigênica (COWEL et al., 2003).

Já os linfomas são reconhecidos nos esfregaços sanguíneos pelo aumento anormal do número de linfoblastos ou pró-linfócitos (mais do que 50% do total de células nucleadas presentes), no caso de linfomas linfoblásticos, e do predomínio de pequenos linfócitos, associado à ausência de outros tipos celulares como os linfoblastos e pró-linfócitos, no caso de linfomas linfocíticos, que ocorrem com menor frequência e podem requerer diagnóstico histológico (COWEL, 2003; MESSICK, 2013).

As neoplasias metastáticas ou secundárias de linfonodos são identificadas pela detecção do aumento anormal de um tipo celular que deveria estar presente em baixo número, como os mastócitos, no caso de mastocitomas (KRICK et al., 2009), ou pelo reconhecimento de células que não deveriam estar presentes no linfonodo e possuem critério de malignidade, como células epiteliais, no caso dos carcinomas (CHANG et al., 2005). Células metastáticas no interior dos linfonodos, na maioria dos casos, são carcinomas e adenocarcinomas, semelhantes ao tumor de origem (COWEL, 2003).

O exame citológico também é de grande utilidade no diagnóstico de linfonodos acometidos por processos infecciosos, como a leishmaniose visceral (MYLONAKIS et al., 2005). Os tipos de linfadenopatias relatadas, associadas a leishmaniose, foram a hiperplasia reativa linfoide (FORUNEL-FLEURI et al., 1994) ou a linfadenite granulomatosa (histiocítica) (RASKIN, 2001). Dependendo da forma da doença, clínica ou subclínica, as formas amastigotas do parasita podem ser identificadas nas lâminas como estruturas arredondadas a ovais contidas nos macrófagos, com diâmetro de 2-5µm, com núcleo excêntrico, um kinetoplastida de coloração mais basofílica comparada com o núcleo, e uma membrana celular visível (MILONAKIS et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

2.1.3.3. Ultrassonografia

Linfonodos normais nem sempre são visibilizados pelo exame de ultrassom, devido à sua isoecogenicidade em relação ao tecido gorduroso adjacente (NYMAN et al., 2004). Entretanto, quando há estímulos como inflamação ou infiltração neoplásica, geralmente ocorre o aumento do linfonodo. A linfonodomegalia, por sua vez, pode estar associada a alterações no formato e estrutura interna que, quando identificados pela ultrassonografia, são de grande importância na diferenciação de lesões neoplásicas e não-neoplásicas (NYMAN et al., 2004).

Inúmeros estudos caracterizaram linfonodos normais e alterados em pacientes humanos por meio da ultrassonografia convencional (ROSÁRIO et al., 2005; ALVAREZ et al., 2006) e Doppler (CHANG et al., 1994; CHOI et al., 1995; DRAGONI et al., 1999; YANG e CHANG, 2000; LEBoulleux et al., 2007). Na literatura veterinária, ainda há escasso conteúdo a respeito, embora estudos relacionados ao uso da ultrassonografia modo-B (PUGH, 1994; KINNS e MAI; 2007), do Power Doppler (SALWEI et al., 2005) e da ultrassonografia convencional associada a diversas

modalidades Doppler (NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011) tenham sido publicados.

2.1.3.3.1. Ultrassonografia modo-B

Características ultrassonográficas obtidas ao modo-B como dimensões, formato, arquitetura hilar, ecogenicidade, presença de necrose intranodal, contornos e edema de tecidos moles adjacentes, auxiliam na detecção de linfonodos anormais em pacientes humanos (VASSALLO et al., 1993).

No que diz respeito à ultrassonografia modo-B para a avaliação de linfonodos em cães, um dos artigos disponíveis restringiu-se apenas à associação da heterogeneidade à malignidade em linfonodos abdominais (KINNS e MAI, 2007). Outros dois, compararam com maiores detalhes as características dos linfonodos neoplásicos e não-neoplásicos por meio do exame em escala de cinza, sendo um deles referente aos linfonodos superficiais (NYMAN et al., 2005) e o outro referente aos linfonodos profundos (SWARTE et al., 2011).

Para uma adequada avaliação ultrassonográfica dos linfonodos alterados, entretanto, deve-se ter conhecimento prévio das características ultrassonográficas obtidas em linfonodos normais. Os padrões de normalidade ultrassonográfica ao modo-B dos linfonodos jejunais (AGTHE et al., 2009), ilíacos mediais, inguinais superficiais (LLABRÉS-DÍAZ, 2004; MAYER et al., 2010), axilares e cervicais superficiais (SILVER et al., 2012) de cães foram descritos. Burns et al. (2008) também avaliaram os linfonodos retrofaríngeos mediais de cães saudáveis por meio da ultrassonografia convencional. Contudo, apenas as medidas foram analisadas e correlacionadas com a idade e o peso dos animais. Já Nyman et al. (2005), caracterizaram por meio do exame ultrassonográfico, linfonodos normais e alterados em cães. No grupo controle, embora os autores tenham incluído 100 linfonodos superficiais sem alterações citológicas e/ou histopatológicas, não descreveram quais foram os linfonodos avaliados e/ou forneceram grandes detalhes das características encontradas em cada linfonodo, de acordo com sua anatomia topográfica. Os autores afirmaram que os linfonodos submandibulares e poplíteos foram facilmente identificados por meio da ultrassonografia, enquanto os linfonodos cervicais superficiais foram visibilizados na maioria dos cães e os axilares, quando normais, em poucos cães, devido à localização mais profunda e ecogenicidade semelhante ao tecido circunjacente. Silver et al. (2012), por outro lado, detectaram facilmente, por meio da ultrassonografia, os linfonodos axilares em cães saudáveis.

Agthe et al. (2009) observaram que os linfonodos jejunais de cães sem sinais clínicos de doenças gastrointestinais apresentaram-se discretamente hipocogênicos em relação ao mesentério em 71% dos animais, isoecogênicos em 29% deles, e com a ecogenicidade uniforme em todos os cães com mais de seis anos. Entretanto, os autores verificaram que nos cães com idade inferior, os linfonodos não foram uniformes e apresentaram diversos padrões de ecogenicidade, como a presença de área hipocogênica periférica ou áreas nodulares hipocogênicas. Concluíram que a idade, portanto, pode influenciar as características ultrassonográficas dos linfonodos jejunais devido à contínua exposição do trato intestinal de animais jovens a antígenos. O mesmo padrão, de redução da ecogenicidade em região de córtex, foi notado na maioria dos linfonodos cervicais superficiais em cães saudáveis, embora não tenha sido determinada correlação entre esse fator e a idade dos animais (SILVER et al., 2012).

De acordo com Mayer et al. (2010), em cães clinicamente sadios, os linfonodos ilíacos mediais e inguinais superficiais apresentaram-se isoecogênicos ou hipocogênicos em relação aos tecidos adjacentes, com ecotextura homogênea ou corticomedular, com margens claramente definidas e regulares, e com formato fusiforme. Embora Llabrés-Díaz (2004) também tenham avaliado linfonodos ilíacos mediais em cães saudáveis e acometidos por tumores, os autores realizaram um estudo comparativo entre os grupos e não descreveram os padrões de normalidade encontrados no grupo controle.

É consenso geral, portanto, que os linfonodos em condições normais e em qualquer que seja sua localização, devem apresentar-se discretamente hipocogênicos ou isoecogênicos em relação ao tecido adjacente, com margens definidas e regulares (AGTHE et al., 2009; MAYER et al., 2010, SILVER et al., 2012). Em alguns linfonodos normais, é possível identificar região hilar hiperecogênica, devido à presença de vasos, tecido conjuntivo e seios linfáticos (VASSALLO et al., 1993). Embora haja poucas informações a respeito da descrição ultrassonográfica de cada linfonodo, segundo sua anatomia topográfica, os estudos disponíveis sugerem haver variações de formato e dimensões, de acordo com a localização (SILVER et al., 2012). No experimento de Nyman et al. (2005), por exemplo, observou-se que todos os linfonodos superficiais de cães saudáveis possuíam formato ovalado, com exceção dos poplíteos, que apresentaram formato mais arredondado em relação aos demais linfonodos periféricos. Os linfonodos axilares possuem formato ovalado e, os cervicais superficiais, formato fusiforme (SILVER et al., 2012). Dentre os linfonodos abdominais, os jejunais

são os que têm as maiores dimensões e formato mais alongado, geralmente com uma lobulação irregular caudal (BEZUIDENHOUT, 2013).

Há, na literatura veterinária, valores de referência para as dimensões dos linfonodos jejunais (AGTHE et al., 2009), ilíacos mediais, inguinais superficiais (MAYER et al., 2010), cervicais superficiais, axilares (SILVER et al., 2012) e retrofaríngeos, na espécie canina (BURNS et al., 2008). A mensuração do diâmetro máximo é mais fidedigna do que a mensuração do eixo longo na avaliação das dimensões dos linfonodos (D'ANJOU e CARMEL, 2015). Os valores médios descritos variam de 0,59 cm de espessura para os linfonodos ilíacos mediais esquerdos (MAYER et al., 2010) a 0,95 cm de espessura para os linfonodos cervicais superficiais esquerdos (SILVER et al., 2012). Por haver grande variabilidade de dimensões de acordo com os diferentes linfocentros, alguns autores mensuraram a relação entre os eixos curto e longo, que deve ser inferior a 0,5 em condições normais (MAYER et al., 2010). Linfonodos superficiais malignos, primários e metastáticos, tendem a apresentar formato arredondado, com relação entre eixo curto e eixo longo superior a 0,5 (NYMAN et al., 2004). Observou-se correlação positiva entre as dimensões dos linfonodos axilares, cervicais superficiais (SILVER et al., 2012), inguinais superficiais e ilíacos mediais (MAYER et al., 2010) e o peso corpóreo, comprimento do corpo, espessura torácica e comprimento do tórax. Correlação negativa, entretanto, foi observada entre as dimensões dos linfonodos axilares (SILVER et al., 2012) e jejunais e a idade, em cães saudáveis (AGTHE et al., 2009).

Os linfonodos acometidos por processos neoplásicos ou não neoplásicos podem apresentar alterações à avaliação ultrassonográfica convencional (KINNS e MAI, 2007). Dados relacionados às características ultrassonográficas convencionais de linfonodos superficiais e profundos em cães, são controversos no que diz respeito às dimensões (NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011), heterogeneidade parenquimatosa (KINNS e MAI, 2007) e presença de hilo hiperecogênico (SALWEI et al., 2005).

Modificações no formato ou na arquitetura nodal foram relatadas como importante critério na avaliação de linfonodos com alterações infiltrativas (WISNER et al., 1994; NYMAN et al., 2004). A infiltração neoplásica pode originar-se ou alcançar apenas parte do linfonodo e bloquear os canais linfáticos da região, ocasionando alargamento cortical focal, enquanto nos linfonodos reativos os patógenos se espalham por todo o linfonodo, levando a um alargamento difuso da cortical e favorecendo a

preservação do formato, apesar de possível aumento das dimensões (VASSALO et al., 1992).

Diferença significativa foi notada na relação eixo curto/eixo longo entre linfonodos normais e linfonodos malignos, uma vez que os linfonodos normais apresentaram formato ovalado, com índice em torno de 0.44, e grande parte dos linfonodos neoplásicos possuíram formato arredondado (LLABRÉS-DÍAZ, 2004), com índices próximos a 0.71 (linfonodos metastáticos) e 0.75 (linfomas) (NYMAN et al., 2005). Nyman et al. (2006), entretanto, verificaram diferença apenas nas dimensões entre linfonodos não-neoplásicos e neoplásicos primários (linfomas) e não entre não-neoplásicos e neoplásicos secundários (metastáticos), demonstrando que, em alguns pacientes, o linfonodo neoplásico pode encontrar-se com as dimensões dentro dos padrões de normalidade.

Kinns e Mai (2007) avaliaram linfonodos abdominais de cães e gatos, por meio da ultrassonografia modo-B, e verificaram correlação significativa entre heterogeneidade nodal e malignidade, apenas nos caninos. O mesmo foi observado por Llabrés-Díaz (2004) no que diz respeito a linfonodos ilíacos mediais de cães com linfoma multicêntrico e com metástase de glândulas apócrinas do saco anal. De acordo com Nyman et al. (2005), linfonodos superficiais neoplásicos tendem a ser hipocogênicos, com ecotextura heterogênea e reforço acústico, enquanto linfonodos superficiais reativos tendem a apresentar ecogenicidade e ecotextura mistas. Entretanto, o mesmo grupo de pesquisa realizou estudo posterior em que incluíram apenas lesões ultrassonográficas observadas nos linfonodos superficiais que tivessem confirmação diagnóstica por meio de exame histopatológico; concluíram que a heterogeneidade parenquimatosa estava presente tanto nos linfonodos superficiais neoplásicos como nos não-neoplásicos, sendo mais prevalente nos malignos (NYMAN et al., 2006). Swarte et al. (2011), por outro lado, compararam linfonodos profundos com lesões não-neoplásicas e neoplásicas e verificaram diferença significativa apenas nas dimensões dos linfonodos. Linfonodos neoplásicos profundos apresentaram-se maiores em relação aos superficiais, mas não houveram diferenças na ecogenicidade, presença de reforço acústico posterior, uniformidade, definição de hilo, formato, contornos, regularidade, presença de cavitações e ecogenicidade do mesentério adjacente, entre os grupos (SWARTE et al., 2011).

Pesquisas realizadas em pacientes humanos demonstraram que a presença de área nodal hilar poderia ser considerada sinal benigno, enquanto a ausência de detecção

do hilo seria um sinal maligno, devido à infiltração por metástase ou devido à presença de gordura na região (RUBALTELLI et al., 1990). O mesmo não foi observado em cães por Nyman et al. (2005) e Nyman et al. (2006), uma vez que não houve diferença significativa na imagem ultrassonográfica do hilo nodal entre linfonodos neoplásicos e não-neoplásicos. Salwei et al. (2005), por outro lado, embora não tenham realizado estudo comparativo, avaliaram 11 linfonodos de cães, com diagnóstico histológico de linfoma, e verificaram que 81,8% deles não apresentaram evidências de área central hiperecogênica e eram difusamente hipoeecogênicos. Entretanto, tal característica é controversa mesmo em pacientes humanos, já que Vassallo et al. (1992) verificaram que a hiperplasia linfoide por etiologias inflamatória ou infecciosa pode levar ao desenvolvimento de novos centros germinativos no interior do hilo e à ausência da região hilar hiperecogênica.

Também foi observado predomínio de linfonodos neoplásicos apresentando margens irregulares e aumento da ecogenicidade da gordura peri-nodal, quando comparado com linfonodos não-neoplásicos, em que houve predomínio de linfonodos com margens regulares e gordura peri-nodal normal, embora não tenha existido significância estatística (SWARTE et al., 2011).

2.1.3.3.2. Ultrassonografia Doppler

Tumores malignos estimulam o crescimento de novos vasos por meio da secreção de fatores estimulantes de angiogênese. Essa neovascularização apresenta trajeto irregular, com anastomoses de distribuições caóticas (ADIBELLI et al., 1998). A vascularização aberrante, juntamente com *shunts* arteriovenosos, áreas de necrose e outras alterações patológicas no interior de linfonodos malignos, podem levar a alterações qualitativas e quantitativas em sua perfusão (NYMAN et al., 2005). O Doppler colorido e o Power Doppler permitem a avaliação da presença e distribuição dos vasos intranodais (DRAGONI et al., 1999), enquanto a análise do traçado espectral, obtido com Doppler pulsado, pode sugerir a resistência intranodal e foi proposta como possível ferramenta para detecção de malignidade (CHOI et al., 1995). A avaliação da distribuição vascular nodal com uso do Power Doppler apresenta maior sensibilidade na captação de sinais Doppler mais fracos, vindos de vasos menores como arteríolas e capilares, que estão presentes com alta frequência no interior ou ao redor de linfonodos (STEINKAMP et al., 2002).

De acordo com Steinkamp et al. (2002), a análise dos padrões de perfusão típicos de cada linfonodo, incluindo área e intensidade de perfusão, por meio do Doppler colorido e Power Doppler, trazem informações adicionais que auxiliam na diferenciação entre linfonodos reativos, metastáticos e linfomatosos, garantindo um diagnóstico mais fidedigno. Ahuja e Ying (2003) concluíram ainda que o Power Doppler auxiliou corretamente no diagnóstico de 5% dos linfonodos acometidos por metástases e de 17% dos linfonodos sem metástases, uma vez que o exame em escalas de cinza não foi suficiente para sugerir o diagnóstico.

A distribuição da vascularização nodal é considerada benigna quando não há sinal de vascularização aparente, ou quando vascularização hilar é observada, com sinais vasculares que se ramificam radialmente do hilo, sem sinais na periferia do linfonodo, sendo esta denominada vascularização central e radial (YING et al., 2004). Alguns autores descreveram variações dos padrões de linfonodos benignos ao Doppler colorido como a presença de um vaso em um dos pólos do linfonodo, a presença de um vaso paralelo ao eixo longitudinal do linfonodo, ramos vasculares periféricos convergindo de vaso hilar e pequenos segmentos de vasos centrais, esparsos no linfonodo (CHAMMAS et al., 2004).

O padrão de vascularização em processos malignos, por outro lado, inclui sinais vasculares na periferia dos linfonodos, com ramificações que não se comunicam com o hilo, e sinais de vascularização mista, hilar e periférica (YING et al., 2004). Alguns autores concluíram que o Doppler colorido e o Power Doppler possuem limitações na diferenciação entre linfonodos reativos e linfonodos malignos (CHANG et al., 1994; ADIBELLI et al., 1998; WU et al., 1998a). Entretanto, os estudos foram restritos apenas a avaliações de linfonodos cervicais, com número amostral relativamente baixo.

A análise da distribuição vascular é complexa, uma vez que linfonodos malignos assumem variáveis apresentações, que podem mudar de acordo com a cronicidade do processo. Nos estágios iniciais de microinfiltração tumoral, a vascularização pode estar aumentada pela reação imune local e a arquitetura do linfonodo raramente é alterada, caracterizando uma vascularização com distribuição hilar (STEINKAMP et al., 2002). Conforme ocorre a progressão da infiltração neoplásica, o linfonodo se torna mais arredondado, sua arquitetura original deformada e a vascularização pode aumentar pela produção de fatores angiogênicos pelas células tumorais, ou diminuir pela compressão exercida pelo tecido neoplásico (VASSALLO et al., 1992). Vasos capsulares passam a

ser formados para nutrir o tumor e estes assumem um padrão mais tortuoso e anômalo (STEINKAMP et al., 2002).

A presença de vascularização anômala ou aberrante pôde ser identificada, com uso do Doppler colorido, no interior de 98% de linfonodos malignos de pacientes humanos (NA et al., 1997). De acordo com Na et al. (1997), alguns dos padrões anômalos de vascularização incluem vascularização hilar excêntrica ou ausente, vascularização radial caótica ou desorganizada, vascularização aberrante multifocal e vascularização periférica. Outros padrões anômalos encontrados em linfonodos acometidos por processos malignos incluem vasos internos tortuosos, vascularização exuberante, vasos subcapsulares e pericapsulares (Figura 3) (CHAMMAS et al., 2004). De acordo com Chammas et al. (2016), a presença de alteração no padrão de vascularização é o mais fidedigno fator ultrassonográfico preditivo de malignidade nodal.

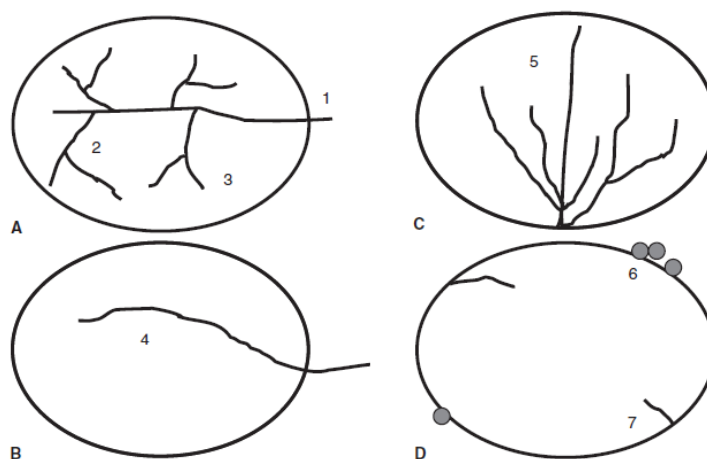


Figura 3. Ilustrações referentes ao padrão de distribuição vascular em linfonodos. (A) Linfonodo normal, apresentando vaso hilar (1), com ramificações (2) e (3); (B), (C) e (D) Linfonodos com padrão vascular alterado: vaso hilar deslocado (4); vasos anômalos com angulação contrária ao eixo do linfonodo (5); vasos pericapsulares (6) e vasos subcapsulares (7). Salwei et al. (2005).

O tipo de fluxo encontrado em linfonodos metastáticos pode variar de acordo com a neoplasia primária em questão. Linfonodos acometidos por metástases de carcinomas de células escamosas, por exemplo, tendem a apresentar vascularização

predominantemente periférica devido à presença de necrose central (WU et al., 1998a). Em outros tipos de metástases, áreas de necrose ou queratinização podem preencher todo o linfonodo, levando à ausência de vascularização à avaliação com Doppler colorido e com Power Doppler (STEINKAMP et al., 2002).

Já nos linfomas, os linfonodos costumam apresentar fluxo, tanto na região central como periférica, com maior intensidade de perfusão em comparação com linfonodos metastáticos e com linfonodos reativos, o que foi correlacionado à presença de múltiplos vasos sanguíneos de calibre considerável nessas regiões ao exame histológico (WU et al., 1998b).

Entretanto, mesmo linfonodos não-neoplásicos, acometidos por processos inflamatórios ou infecciosos, como a tuberculose, podem apresentar fluxo aberrante com localização excêntrica da vascularização hilar e vascularização radial deformada (STEINKAMP et al., 2002).

Com relação à distribuição vascular de linfonodos em cães, estudos sugerem que linfonodos não-neoplásicos apresentem fluxo predominantemente hilar, que linfonodos metastáticos tenham fluxo periférico e que a maioria dos linfonodos com linfoma tenham fluxo misto, tanto hilar como periférico (NYMAN et al., 2005). A maior parte dos linfonodos reativos apresenta vascularização hilar proeminente, devido ao aumento do diâmetro do vaso e do fluxo sanguíneo, em decorrência do processo inflamatório (NA et al., 1997). Já nos linfonodos neoplásicos, o aumento da vascularização nodal periférica é explicado pela deposição inicial de células tumorais nos seios marginais e medulares, que induzem à formação de vasos aberrantes na periferia dos ninhos tumorais por angiogênese tumoral e vascularização tumoral sinusoidal no interior dos ninhos tumorais (AHUJA et al., 2001).

De acordo com Salwei et al. (2005), o uso do Power Doppler permite a identificação, com maior conspicuidade, da relação entre os vasos pericapsular, subcapsular e a cápsula dos linfonodos. Os autores verificaram a presença de vasos pericapsulares em 63,6% dos linfonodos com linfoma em cães e, destes, metade também apresentavam vasos subcapsulares. Em pacientes humanos com linfoma, o mesmo não foi descrito (GIOVAGNORIO et al., 2002) e os autores sugerem que o fato possa ser explicado por determinadas diferenças no comportamento biológico entre as espécies, como o rápido desenvolvimento da linfadenopatia generalizada, no cão.

Linfonodos normais podem apresentar vascularização hilar simétrica ou ausência de vascularização (STEINKAMP et al., 2002). A captação de fluxo sanguíneo

que permita a mensuração do índice de pulsatilidade (IP) e do índice de resistividade (IR), portanto, nem sempre é suficiente (NYMAN et al., 2005). De acordo com Nyman et al. (2005), foi possível realizar a mensuração dos índices em aproximadamente metade dos cães que apresentaram linfonodos clinicamente saudáveis e em aproximadamente 80% dos cães com linfonodos reativos e malignos. As chances de captação de vascularização no interior do linfonodo, de acordo com pesquisas realizadas em pacientes humanos, aumentam conforme há o aumento de suas dimensões, motivo pelo qual aproximadamente 88% dos linfonodos reativos apresentam vascularização hilar proeminente (NA et al., 1997).

Os índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) demonstraram eficácia na detecção de malignidade nodal em pacientes humanos (NA et al., 1997), sustentando a teoria de que a resistência vascular de linfonodos inflamados diminui devido à vasodilatação, enquanto a resistência vascular de linfonodos neoplásicos aumenta devido à compressão pelas células tumorais sobre os vasos e/ou angiogênese tumoral (CHOI et al., 1995). *Shunts* arteriovenosos resultam em aumento dos índices de perfusão, uma vez que o fluxo sanguíneo nesses vasos é mais turbulento e, geralmente, apresentam maior velocidade em relação aos linfonodos normais (CHANG et al., 1994).

De acordo com Nyman et al. (2005), a distribuição da vascularização e o IP, juntamente com as dimensões dos linfonodos, foram os principais parâmetros que permitiram, com maior acurácia, a classificação dos linfonodos em não-neoplásicos, neoplásicos primários e neoplásicos metastáticos, em cães. Os autores verificaram diferença significativa no IP entre linfonodos superficiais não-neoplásicos e neoplásicos, tanto metastáticos como neoplásicos primários, e entre neoplásicos metastáticos e neoplásicos com linfoma e aumento significativo no IP e IR de linfonodos metastáticos em relação aos outros grupos de linfonodos, ou seja, linfonodos não-neoplásicos e com neoplasias primárias. Os valores médios de IP e IR observados no grupo de linfonodos metastáticos foram de 1,72 e 0,79, respectivamente. Não foram observadas diferenças no IP e IR entre linfonodos normais e reativos. Os valores de IR e IP obtidos pelos autores para linfonodos normais foram de 0,59 e 1,06, respectivamente. Valores superiores de IR e IP também foram observados em linfonodos mesentéricos e ilíacos mediais neoplásicos em comparação com linfonodos não-neoplásicos, em cães, e os índices de perfusão demonstraram alta sensibilidade e especificidade na detecção de malignidade para valores de IR e IP superiores a 0,67 e 1,02; respectivamente, para

linfonodos ilíacos mediais, e valores de IR e IP superiores a 0,76 e 1,23, respectivamente, para linfonodos mesentéricos (PRIETO et al., 2009).

2.1.3.3.3 Elastossonografia

A elasticidade é uma propriedade mecânica dos tecidos que previne o deslocamento tecidual sob pressão e varia de acordo com o tecido em questão (gordura, colágeno e assim por diante), ou de acordo com diferentes alterações presentes em um mesmo tecido (ALAM et al., 2008). Na década de 90, Ophir et al. (2000) descreveram uma nova técnica promissora de ultrassonografia, a elastossonografia em tempo real, capaz de mensurar as características da complacência tecidual. Essa técnica de imagem tem sido amplamente utilizada em pacientes humanos para caracterizar diferenças na rigidez entre tecidos alterados e tecidos normais (ARDA et al., 2006). Ela baseia-se no mesmo princípio da palpação manual, em que o examinador detecta a presença de tumor em determinado tecido por senti-lo mais rígido em relação ao tecido ao redor (HALL, 2003).

Diversas técnicas de elastografia foram desenvolvidas ao longo dos anos, como a elastossonografia e a elastografia por ressonância magnética (HUWART et al., 2006, ALAM et al., 2008). Três métodos de mensuração, quantitativa, qualitativa ou semi-quantitativa, da deformação tecidual podem estar disponíveis em equipamentos ultrassonográficos: a *ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) Elastography*, a *Transient Elastography* ou *Shear Wave Elastography* e a *Strain Elastography* (BAMBER et al., 2013). A *Strain Elastography* ou elastossonografia qualitativa em tempo real, é uma técnica relativamente recente, disponível em alguns equipamentos de ultrassom convencionais (BHATIA et al., 2010). Nesse tipo de elastografia em cores, ou qualitativa, o aumento da rigidez tecidual é disposto no monitor em escala de cores vermelho, amarelo, verde e azul (ALAM et al., 2008). Com esse método, é possível também realizar mensuração semi-quantitativa, por meio de um índice de tensão *Strain Ratio*, de forma comparativa em relação aos tecidos moles circundantes (BAMBER et al., 2013).

Na elastossonografia, uma imagem representativa da rigidez do tecido avaliado é obtida por meio do uso de um equipamento ultrassonográfico convencional, que possui um *software* específico e um transdutor convencional (OPHIR et al., 2000), após aplicação de uma força mecânica (compressão ou vibração) a esse tecido (HALL, 2003). A obtenção do elastograma funciona do seguinte modo: a princípio, a

elastografia recebe linhas de ecos de radiofrequência digitalizadas do tecido avaliado; leves compressões teciduais são, então, realizadas com o transdutor ao longo do eixo a fim de causar certo deslocamento tecidual; posteriormente, uma segunda linha de ecos de radiofrequência digitalizada é emitida do mesmo tecido (OPHIR et al., 2000). Por fim, os dados obtidos pelas duas linhas de ecos de radiofrequência são processados e a imagem elastográfica (elastograma) é disposta na tela do monitor (ALAM et al., 2008).

Embora não sejam métodos quantitativos, a elastografia qualitativa e a semi-quantitativa, conhecidas como *Strain Elastography*, possuem vantagens como a rapidez na execução, facilidade de reprodutibilidade e avaliação dos resultados em tempo real (BAMBER et al., 2013). Uma de suas limitações estaria relacionada ao fato de que alguns linfonodos malignos não são completamente infiltrados por células neoplásicas, gerando certa confusão uma vez que os escores de elasticidade e os *Strain Ratios* são adquiridos do linfonodo como um todo (TATAR et al., 2013). Ademais, Ying et al. (2012) concluíram que mesmo apresentando boa acurácia diagnóstica, a mensuração da elasticidade dos tecidos por meio de escores apresentou significativa variabilidade inter-observador.

A maioria dos estudos, contudo, têm demonstrado resultados promissores com relação à técnica de elastografia qualitativa na avaliação de tumores de mama (MUTALA et al., 2016), lesões de tireóide (ASTERIA et al., 2008) e linfonodos (BHATIA et al., 2011; KURT et al., 2013). Verificou-se, em pacientes humanos, que a elastografia qualitativa foi um bom exame para indicar a presença de malignidade em linfonodos superficiais, quando mais que 50% da área do linfonodo apresentava-se com aspecto rígido (BATHIA et al., 2010; DUDEA et al., 2013). Embora evidências preliminares sugiram que a elastossonografia possa auxiliar na detecção de linfonodos malignos, estudos adicionais são necessários para definir os critérios a serem utilizados na avaliação dos linfonodos (TATAR et al., 2013).

De acordo com Alam et al. (2008), elastogramas de linfonodos inflamatórios ou reativos, avaliados em pacientes humanos, quase não apresentam áreas rígidas, dispostas em azul ou, quando presentes, as áreas azuis dispersas ocupam menos de 45% da superfície nodal. Linfonodos não-neoplásicos revelam-se frequentemente nas cores amarela, verde e turquesa; a coloração vermelha é raramente visibilizada e a região cortical mostra-se mais rígida em relação à medular (WOJCINSKI et al., 2012). Contudo, nem todos os linfonodos não-malignos apresentam-se com essas características e processos infecciosos, como a tuberculose, podem gerar áreas rígidas

ou em mosaico de cores, devido à presença de fibrose, calcificação ou necrose (TENG et al., 2012).

Já nos linfonodos malignos, elastogramas caracterizam-se pela maior delimitação do linfonodo em relação aos tecidos moles circundantes, por sua maior rigidez (LYSHCHIK et al., 2007). Áreas azuis, referentes à maior rigidez, ocupam mais do que 45% da área do linfonodo e estão relacionadas à deposição de tecido maligno (ALAM et al., 2008). Alguns linfonodos neoplásicos podem ser identificados completamente rígidos, com coloração uniforme azul (DUDEA et al., 2013). Algumas variações, contudo, podem ocorrer: a deposição focal de tecido neoplásico pode produzir uma pequena área rígida, ocupando menos de 45% da área total do linfonodo; alguns linfomas podem ter aparência mais “macia”, com poucas áreas em azul; e linfonodos necróticos, com liquefação, podem criar um padrão de coloração azul, verde e vermelha (LENGHEL et al., 2012).

Devido às possíveis variações de interpretação, alguns autores passaram a utilizar um sistema de escores de elasticidade, de acordo com a porcentagem de cores presentes no elastograma, na tentativa de diferenciar linfonodos benignos de malignos (ALAM et al., 2008; BATHIA et al., 2010; TAN et al., 2010). Bathia et al. (2010) e Tan et al. (2010) propuseram um sistema composto por quatro escores de elasticidade: escore 1 ou macio, em que o elastograma tem predomínio das cores azul, verde ou amarelo, com menos de 10% de vermelho; escore 2 ou moderadamente macio, em que o elastograma tem predomínio das cores amarela ou verde, com 10% a 50% da área do linfonodo com coloração vermelha; escore 3 ou moderadamente rígido, em que o elastograma tem predomínio da cor vermelho, com 10% a 50% da área do linfonodo com as cores amarelo ou verde; escore 4 ou rígido, em que o elastograma tem predomínio da cor vermelho, com menos de 10% de área em amarelo ou verde. Com o uso desse sistema, o escore mediano de linfonodos benignos e malignos da região cervical de pacientes humanos foi, respectivamente, 2 e 3, havendo diferença significativa entre os dois grupos.

Embora na medicina seja uma técnica empregada em diversos estudos realizados nos últimos anos, na medicina veterinária há poucos relatos referentes ao uso da elastografia e grande parte dos estudos são restritos à introdução da técnica “ARFI” em cães e gatos e aos padrões de normalidade do baço (FELICIANO et al., 2015a; MARONEZI et al., 2015), próstata, testículos, fígado e rins (HOLDSWORTH et al., 2014; FELICIANO et al., 2015b; JEON et al., 2015) (Tabela 1).

Há alguns trabalhos publicados com o uso da elastografia “ARFI” e “Shear Wave” como método auxiliar no diagnóstico de neoplasias mamárias (GLINSKA-SUCHOCKA et al., 2013; FELICIANO et al., 2014), de neoplasias testiculares (GLINSKA-SUCHOCKA et al., 2014; FELICIANO et al., 2016) e da técnica “Strain” na tentativa de distinção, sem sucesso, de nódulos esplênicos benignos e malignos (ALDER et al., 2013).

Tabela 1. Estudos disponíveis na literatura veterinária com uso da elastossonografia para padronização ou detecção de lesão em diferentes órgãos.

Autor	Técnica	Órgão	Lesão/Normal
Alder et al. (2013)	" <i>Strain</i> "	Baço	Lesão
Glinska-suchoka et al. (2013)	" <i>Shear wave</i> "	Mama	Lesão
Feliciano et al. (2014)	" <i>ARFI</i> "	Mama	Lesão
Glinska-suchoka et al. (2014)	" <i>ARFI</i> "	Testículos	Lesão
Holdsworth et al. (2014)	" <i>Shear wave</i> "	Fígado, baço e rins	Normal
Feliciano et al. (2015a)	" <i>ARFI</i> "	Baço	Normal
Feliciano et al. (2015b)	" <i>ARFI</i> "	Próstata e testículos	Normal
Jeon et al. (2015)	" <i>Strain</i> "	Fígado, baço, rins e próstata	Normal
Maronezi et al. (2015)	" <i>ARFI</i> "	Baço	Normal
Feliciano et al. (2016)	" <i>ARFI</i> "	Testículos	Lesão
Seiler e Griffith (2018)	" <i>Strain</i> "	Linfonodos	Lesão

Recentemente, o primeiro estudo a avaliar linfonodos de cães e gatos com a elastografia foi realizado (SEILER e GRIFFITH, 2018). Embora os autores tenham observado diferenças significativas nos escores elastográficos entre lesões benignas e malignas, concluíram que a técnica apresentou limitações na aplicação clínica e na detecção de malignidade devido à sobreposição de escores nos dois grupos. Contudo, baixo tamanho de amostra foi incluído em cada grupo, além da possibilidade de variações no comportamento de lesões inerentes às diferentes espécies incluídas, canina e felina, poderem ter influenciado os resultados finais, o que ressalta a necessidade de maiores informações a respeito do uso da técnica para caracterização de lesões nesse órgão.

Apesar do crescente interesse do uso da elastossonografia, a ampla gama de equipamentos e técnicas existentes associadas à falta de padronização no modo de uso e à escassa evidência científica disponível, particularmente na medicina veterinária, tornam necessários estudos adicionais que elucidem sua aplicabilidade na rotina clínica.

CAPÍTULO 2

Trabalho Científico 1

Trabalho a ser enviado para a revista: Journal of Veterinary Internal Medicine

Instruções para os autores:

[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/\(ISSN\)1939-1676/asset/homepages/NewAuthorGuidelines.pdf?v=1&s=e92401745b009eb58aa66628c8c9dd83d695e9e7&isAguDoi=false](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/(ISSN)1939-1676/asset/homepages/NewAuthorGuidelines.pdf?v=1&s=e92401745b009eb58aa66628c8c9dd83d695e9e7&isAguDoi=false)

1 **Ultrassonografia e Elastossonografia na**
2 **Detecção de Malignidade em Linfonodos de Cães**

3 A.F. Belotta, M.C. Gomes, N.S. Rocha, A. Melchert, M.J. Mamprim

4

5 *Do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (Belotta, Mamprim) e*
6 *Departamento de Clínica Veterinária (Gomes, Rocha, Melchert), Faculdade de Medicina*
7 *Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,*
8 *Botucatu - SP, Brasil.*

9

10 **Cabeçalho:** Ultrassonografia de linfonodos em cães.

11 **Palavras-chave:** Canino, Elastografia, Neoplasia, Tecido linfoide, Ultrassom.

12 **Abreviações:**

13 CAAF Citologia aspirativa por agulha fina

14 DC Doppler colorido

15 EC Eixo curto

16 EL Eixo longo

17 IP Índice de pulsatilidade

18 IR Índice de resistividade

19 LN Linfonodos neoplásicos

20 LNN Linfonodos não-neoplásicos

21 PD Power Doppler

22 PRF Frequência de repetição de pulso

23 RECEL Relação entre eixo curto e eixo longo

24 VDF Velocidade diastólica final

25 VM Velocidade média

26 VPS Velocidade de pico sistólico

27

28 *O presente estudo foi realizado na Universidade Estadual Paulista, Botucatu -*
29 *São Paulo, Brasil.*

30 *O estudo foi financiado pela CAPES (“Coordenação de Aperfeiçoamento de*
31 *Pessoal de Nível Superior”).*

32 *Declaração de Conflito de Interesse: os autores não possuem conflitos de*
33 *interesse.*

34 *Declaração do uso de antimicrobianos fora da indicação da bula: os autores*
35 *declaram que não foram utilizados antimicrobianos fora da indicação da bula.*

36 *Autora para correspondência: A.F. Belotta, Departamento de Reprodução*
37 *Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,*
38 *Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu – SP, Brasil; e-*
39 *mail: alexandra.belotta.vet@gmail.com*

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **Introdução:** Os linfonodos são considerados órgãos sentinelas para diversas
52 enfermidades, neoplásicas e não neoplásicas. Contudo, métodos diagnósticos de lesões
53 nodais foram pouco estudados na medicina veterinária e o uso das técnicas de imagem
54 para caracterização de lesões não foi estabelecido na rotina clínica.

55 **Objetivos:** Comparar as características ultrassonográficas e elastossonográficas entre
56 linfonodos neoplásicos e não-neoplásicos, em cães.

57 **Animais:** 119 linfonodos, pertencentes a 55 cães.

58 **Métodos:** Estudo prospectivo observacional. Os linfonodos foram divididos em
59 neoplásicos (LN) e não-neoplásicos (LNN), tendo como padrão-ouro o diagnóstico
60 microscópico. Foram comparadas as características ultrassonográficas e o escore de
61 elasticidade. Variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos com teste t de
62 student não pareado e, as variáveis categóricas, com teste U de Mann-Whitney.

63 **Resultados:** Cinquenta LN e 69 LNN foram incluídos. Linfonodos neoplásicos
64 apresentaram dimensões dos eixos curto (EC) e longo (EL) significativamente maiores
65 ($P < 0,0001$), relação entre eixo curto e eixo longo (RECEL) superior ($P < 0,0001$),
66 distribuição vascular predominante mista (hilar e periférica), tanto pelo Doppler
67 colorido (DC) ($P < 0,005$), como pelo Power Doppler (PD) ($P < 0,0001$), índices de
68 resistividade (IR) e de pulsatilidade (IP) superiores ($P < 0,0001$) e maior rigidez à
69 distribuição do escore elastográfico ($P < 0,0001$), em comparação com LNN.

70 **Conclusões e importância clínica:** A ultrassonografia e a elastossonografia
71 possibilitaram a diferenciação entre LN e LNN em cães. Os resultados obtidos
72 fundamentam o uso dessas técnicas para a detecção de malignidade e,
73 consequentemente, para estabelecimento do prognóstico e terapia a ser instituída.

74

75 A distinção entre linfonodos neoplásicos e não neoplásicos no paciente canino
76 é de grande relevância não apenas para a implementação terapêutica mais adequada,
77 como também para a obtenção de prognóstico e para o estadiamento de tumores, em
78 animais com neoplasias (KINNS e MAI, 2007).

79 Diversos métodos diagnósticos estão disponíveis para a avaliação deste órgão,
80 como o exame histológico e a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), que
81 possibilitam a análise microscópica das células e de fragmento tecidual do linfonodo,
82 respectivamente (LANGENBACH et al., 2001). Ambos os exames, contudo,
83 apresentam limitações, como a necessidade de sedação ou anestesia, no caso de
84 biopsias (MACNEILL, 2011), e são considerados métodos invasivos, especialmente
85 quando há a necessidade de acessar linfonodos profundos (MAYER et al., 2010).

86 O exame ultrassonográfico convencional possibilita a análise das dimensões,
87 formato, margens, hilo e estrutura interna, enquanto o Doppler colorido (DC) e Power
88 Doppler (PD) permitem caracterizar a presença e distribuição da vascularização dos
89 linfonodos (NYMAN et al., 2005). O Doppler pulsado, por sua vez, fornece os índices
90 de perfusão de vasos intra-nodais (NYMAN et al., 2006).

91 Na área médica, diversos estudos utilizaram a ultrassonografia para
92 caracterização de lesões neoplásicas e não-neoplásicas de linfonodos (ADIBELLI et
93 al., 1998; DRAGONI et al., 1999; YANG et al., 2000; STEINKAMP et al., 2002;
94 BRNIC e HEBRANG, 2003; YING et al., 2004; ROSÁRIO et al., 2005; ALVAREZ et
95 al., 2006; LEBOULLEUX et al., 2007; DANGORE-KHASBAGE et al., 2009).
96 Embora alguns autores tenham afirmado que a técnica possa apresentar limitações
97 diagnósticas em relação aos exames citológico e histológico (CHANG et al., 1994;
98 ADIBELLI et al., 1998; STEINKAMP et al., 2002; BRNIC e HEBRANG, 2003),
99 outros concluíram que o exame convencional (YANG et al., 2000; ROSÁRIO et al.,

100 2005) e a ferramenta Doppler (CHOI et al., 1995; NA et al., 1997; ARIJI et al., 1998;
101 DRAGONI et al., 1999; YING et al., 2003; DANGORE-KHASBAGE et al., 2009;
102 CHAMMAS et al., 2016) são métodos viáveis e que podem auxiliar na distinção entre
103 linfonodos neoplásicos e não-neoplásicos.

104 A elastossonografia foi introduzida na década de 90 (OPHIR et al., 2000) em
105 alguns equipamentos ultrassonográficos, possibilitando a detecção de diferenças de
106 rigidez entre tecidos alterados e tecidos normais (ARDA et al., 2006). Existem
107 variados métodos de elastografia, como a “ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse)
108 Elastography”, a “Transient Elastography” ou “Shear Wave Elastography” e a “Strain
109 Elastography” (BAMBER et al., 2013). Evidências científicas preliminares
110 demonstraram que, além de ser amplamente empregada no estudo de tumores de
111 mama (MUTALA et al., 2016) e lesões de tireóide (ASTERIA et al., 2008), a técnica
112 “Strain” ou o exame elastográfico em escala de cores, associado a escores de
113 elasticidade, pode auxiliar na detecção de linfonodos neoplásicos (BATHIA et al.,
114 2010; DUDEA et al., 2013; TATAR et al., 2013).

115 Na literatura veterinária, alguns estudos foram realizados com o objetivo de
116 caracterizar linfonodos normais, linfonodos neoplásicos, e linfonodos não-neoplásicos,
117 por meio da ultrassonografia convencional (LLABRÉS-DÍAZ, 2004; KINNS e MAI,
118 2007) e Doppler (NYMAN et al., 2005; SALWEI et al., 2005; NYMAN et al., 2006;
119 SWARTE et al., 2011). Contudo, os resultados disponíveis, particularmente aqueles
120 obtidos ao modo-B, são controversos. A técnica elastossonográfica passou a ser
121 estudada em cães e gatos nos últimos anos, no entanto teve como objetivo a
122 padronização de órgãos como baço (FELICIANO et al., 2015a; MARONEZI et al.,
123 2015), próstata, testículos, fígado e rins (HOLDSWORTH et al., 2014; FELICIANO et
124 al., 2015b; JEON et al., 2015) em animais saudáveis, por meio da técnica “ARFI”. Um

125 estudo recente demonstrou resultados promissores a respeito do uso da
126 elastossonografia em escala de cores na diferenciação de linfonodos neoplásicos e não
127 neoplásicos (SEILER e GRIFFITH, 2018). Contudo, limitações como o baixo
128 tamanho amostral utilizado em cada grupo (21 linfonodos benignos e 30 linfonodos
129 neoplásicos), bem como a sobreposição de escores elastográficos dos dois grupos
130 levam à necessidade de novos estudos que avaliem a real aplicabilidade da técnica na
131 rotina clínica.

132 Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi comparar as características
133 ultrassonográficas - convencional, Doppler e elastográfico em escala de cores -, entre
134 linfonodos caninos com lesões neoplásicas e não neoplásicas. A hipótese é que seja
135 possível distingui-las por meio dos métodos de imagem supracitados.

136

137

Material e Métodos

138 *Animais*

139 Estudo observacional prospectivo. Foram incluídos 119 linfonodos,
140 superficiais e profundos, de 55 cães encaminhados ao Laboratório de Patologia,
141 Departamento de Clínica Veterinária, para exame microscópico (citológico e/ou
142 histopatológico), pelo período de 12 meses (Julho de 2016 a Junho de 2017). Os
143 critérios de inclusão para o estudo consistiram de cães, submetidos ao exame
144 citológico e/ou histopatológico de linfonodos e cujos proprietários permitissem a
145 avaliação ultrassonográfica e elastossonográfica do linfonodo em questão. Os critérios
146 de exclusão consistiram de linfonodos com diagnóstico inconclusivo ao exame
147 citológico e/ou linfonodos que apresentaram exame citológico compatível com lesão
148 não-neoplásica, em cães com diagnóstico de linfoma em outros linfonodos. Os
149 motivos pelos quais as punções dos linfonodos foram realizadas incluíram o aumento

150 nas dimensões do linfonodo ao exame físico, ou o estadiamento de linfonodos
151 regionais em área acometida por neoplasia.

152 O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação
153 Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi
154 autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ, UNESP,
155 Campus Botucatu, sob protocolo 136/2016. Termos de consentimento livre e
156 esclarecido foram assinados pelos proprietários anteriormente à inclusão dos cães no
157 estudo.

158

159 *Ultrassonografia*

160 O exame ultrassonográfico foi realizado por avaliador único, que não possuía
161 conhecimento prévio da alteração nos linfonodos, com equipamento MyLab Alpha[®]
162 (Esaote Healthcare do Brasil, São Paulo, SP) e transdutor multifrequencial linear (4-13
163 MHz). As imagens foram armazenadas no equipamento e posteriormente transferidas
164 por DICOM para análise em *software* MyLab Desk3 (Esaote Healthcare do Brasil).

165 Ao modo-B, foram mensuradas as dimensões máximas do eixo curto (EC) e do
166 eixo longo (EL) de cada linfonodo, e a relação entre os eixos (RECEL) foi calculada.
167 Foram avaliados também os contornos (regulares ou irregulares), a nitidez das bordas
168 (nítidas ou não), a ecotextura (homogênea ou heterogênea), a presença de nodulações e
169 de áreas hipoecogênicas, a definição do tecido hilar (definido ou não definido) e a
170 presença de tecido circundante hiperecogênico. A ecotextura do parênquima foi
171 considerada heterogênea quando era possível definir áreas nodulares, áreas de
172 calcificação ou qualquer outra alteração que levasse à diferença de ecogenicidade do
173 linfonodo.

174 Ao Doppler colorido e ao Power Doppler, o suprimento vascular, quando
175 presente, foi analisado em diferentes planos de forma qualitativa, quanto à intensidade
176 (discreta, moderada ou acentuada) e quanto à distribuição (hilar, periférica ou hilar e
177 periférica). A vascularização nodal, quanto à distribuição e/ou intensidade alteradas,
178 foi ainda classificada quanto ao tipo de vascularização anômala, sendo os tipos de
179 fluxos classificados em puntiforme (pontos de vascularização difusos e distribuídos
180 em ordem aleatória pelo parênquima), pericapsular (vascularização adjacente e externa
181 à cápsula do linfonodo), subcapsular (vascularização adjacente e interna à cápsula do
182 linfonodo, sem comunicação com o vaso hilar e suas ramificações), transcapsular
183 (fluxo com direção centrípeta, oposta à direção do fluxo hilar central), exuberante
184 (vascularização central e periférica intensa), caótico (vascularização não puntiforme,
185 com distribuição aleatória pelo parênquima nodal) ou hilar deslocado (deslocamento
186 do vaso hilar central), conforme descrito em estudos anteriores (NA et al., 1997;
187 STEINKAMP et al., 2002; SALWEI et al., 2005). O ganho do Doppler foi ajustado de
188 forma que fosse o mais alto possível, sem que houvesse, ao mesmo tempo, presença de
189 ruído, garantindo maior sensibilidade na detecção de vasos de menor calibre e menor
190 velocidade de fluxo. A frequência de repetição de pulso (pulse repetition frequency ou
191 PRF) foi mantida a menor possível, sem a formação de *aliasing*.

192 Com o Doppler pulsado, foram obtidos os traçados espectrais dos vasos
193 existentes no interior do linfonodo para análise quantitativa da perfusão nodal. A
194 frequência utilizada variou entre 4,2 e 7,1 MHz e o PRF e ganho do Doppler foram
195 ajustados conforme técnica supracitada, utilizada para avaliação com Doppler colorido
196 e Power Doppler. Após a obtenção de três picos arteriais consecutivos e similares, o
197 índice de resistividade (IR) foi calculado pelo próprio equipamento, após mensuração
198 da velocidade de pico sistólico (VPS) e da velocidade diastólica final (VDF). O índice

199 de pulsatilidade (IP) também foi calculado pelo próprio equipamento, após contorno
200 da onda espectral à mão livre e obtenção da velocidade média (VM) do vaso. Para
201 cada linfonodo, dois novos traçados espectrais foram obtidos para cálculo do IR e IP.
202 A média aritmética dos três valores de cada índice foi, posteriormente, calculada.

203

204 *Elastossonografia*

205 A elastossonografia foi realizada ativando-se a função ElaXto Sonoelastography
206 do equipamento ultrassonográfico MyLabAlpha^{®1}, após obtenção de imagem
207 ultrassonográfica bidimensional do linfonodo, no plano longitudinal. Uma região de
208 interesse contendo o linfonodo e tecido adjacente foi selecionada. Pequenos
209 movimentos verticais leves, rítmicos, de compressão e retração, foram realizados sobre
210 a região, com o transdutor em posição perpendicular ao linfonodo. O resultado pôde ser
211 visibilizado em modo duplicado na tela do monitor, com imagem elastográfica
212 localizada ao lado direito da imagem convencional. Cinco a dez imagens de cada
213 linfonodo foram salvas quando a escala de compressão se tornou verde, indicando que
214 as forças de compressão e descompressão exercidas sobre o linfonodo eram uniformes e
215 regulares.

216 O grau de deformidade do tecido avaliado foi fornecido por meio de escala
217 cromática qualitativa que variou de vermelho, relativo a componentes de alta tensão
218 elástica (macios), a azul, referente àqueles com baixa tensão (rígidos), com coloração
219 amarela para tecidos de tensão intermediária entre estes. A estimativa da distensão do
220 tecido foi avaliada por ultrassonografista que, cego ao diagnóstico do linfonodo em
221 questão, classificou, de forma subjetiva, as imagens elastográficas em um dos quatro
222 escores propostos por Tan et al. (2010):

223

- 224 1: 80% ou mais da área total analisada do linfonodo verde ou vermelha (macio);
225 2: 50 a 80% da área total do linfonodo verde ou vermelha (intermediário macio);
226 3: 50 a 80% da área total do linfonodo azul (intermediário rígido);
227 4: mais de 80% da área total do linfonodo azul (rígido).

228 Após a obtenção dos diversos escores para as variadas imagens elastográficas,
229 calculou-se o escore médio para cada linfonodo.

230

231 ***Citologia/histopatologia***

232 Os linfonodos foram puncionados com agulha hipodérmica por capilaridade e,
233 em alguns casos, com o auxílio de uma seringa e/ou citoaspirador (Citoaspirador de
234 Valleri). No caso de linfonodos profundos intra-abdominais, as punções foram guiadas
235 por ultrassom ou realizadas durante procedimento cirúrgico. Os exames histológicos
236 foram realizados, em alguns casos, após remoção do linfonodo durante procedimento
237 cirúrgico ou logo após a eutanásia. As amostras foram analisadas à microscopia por
238 patologista experiente e os linfonodos classificados em neoplásicos ou não-
239 neoplásicos, de acordo com o diagnóstico citológico ou histopatológico.

240

241 ***Análise estatística***

242 Após verificação da distribuição de normalidade com o teste de Kolmogorov-
243 Smirnov, a comparação das variáveis quantitativas, incluindo EL, EC, RECEL, IR e
244 IP, entre os dois grupos, foi realizada com o teste t de Student não pareado, teste
245 paramétrico utilizado para comparar variáveis contínuas, com distribuição normal. As
246 variáveis categóricas, incluindo regularidade de contornos, nitidez das bordas,
247 heterogeneidade, presença de áreas nodulares e de áreas hipocogênicas, definição do
248 tecido hilar, presença de hiperecogenicidade de tecidos adjacentes, presença,

249 intensidade e distribuição do fluxo sanguíneo, presença de fluxo anômalo e escore
250 elastográfico, foram analisadas com o teste U de Mann-Whitney, não-paramétrico,
251 utilizado para comparar as variáveis que não apresentaram distribuição normal entre os
252 grupos.

253

254

Resultados

255 Cães com linfonodos neoplásicos tiveram idade média de 9,2 anos (± 3) e peso
256 médio de 22 kg ($\pm 14,6$), enquanto cães com linfonodos não neoplásicos apresentaram
257 idade média de 7,6 anos ($\pm 3,8$) e peso médio de 20,2 kg ($\pm 11,8$). No grupo de LN
258 houve predomínio de cães sem raça definida (9/20, 45%), Dachshunds (3/20, 15%) e
259 Golden Retrievers (2/20, 10%). No grupo LNN houve predomínio de cães sem raça
260 definida (22/35, 62,8%), Pitt Bull (3/35, 8,5%) e Labrador (2/35, 5,7%).

261 Os linfonodos avaliados no estudo foram: poplíteos (41/119, 34,45%),
262 cervicais superficiais (40/119, 33,61%), submandibulares (22/119, 18,49%), inguinais
263 superficiais (12/119, 10,08%), mesentéricos (2/119, 1,68%), axilar (1/119, 0,84%) e
264 ilíaco medial (1/119, 0,84%). Desse modo, a maior parte dos linfonodos era superficial
265 (116/119, 97,48%) e, o restante, linfonodos profundos (3/119, 2,52%). Após análise
266 citológica e/ou histológica os linfonodos foram divididos em: LN (50/119, 42,02%) e
267 LNN (69/119, 57,98%). Dentre os LNN, os diagnósticos obtidos foram: linfonodo
268 reativo (40/69, 57,97%), linfadenite histiocitária por *Leishmania* spp. (15/69, 21,74%),
269 linfadenite eosinofílica (7/69, 10,14%), linfonodo edemaciado (3/69, 4,35%),
270 hiperplasia (2/69, 2,9%) e linfadenite neutrofílica associada a bactérias cocóides (2/69,
271 2,9%). Dentre os LN, a maior parte recebeu diagnóstico de neoplasia primária (39/50,
272 78%) e, o restante, de metástase de tumores locais (11/50, 22%). No que diz respeito
273 aos linfonodos metastáticos, a maior parte estava acometida por metástases de

274 carcinomas (7/11, 63,64%), sendo a maioria deles carcinomas mamários (5/7,
275 85,71%), um carcinoma sebáceo em prepúcio (1/7, 14,29%) e um carcinoma em
276 glândula anal (1/7, 14,29%). Os demais tumores compreenderam mastocitomas (2/11,
277 18,18%), neoplasia mesenquimal maligna (1/11, 9,09%) e melanoma oral (1/11,
278 9,09%).

279 Os resultados referentes às características ultrassonográficas modo-B estão
280 sintetizados na Tabela 1. Diferença significativa entre os grupos foi notada apenas nos
281 EL ($P < 0,0001$), EC ($P < 0,0001$) e RECEL ($P < 0,0001$). O comprimento médio dos
282 LNN foi de 2,59 cm ($\pm 0,88$) e dos LN 3,46 cm ($\pm 1,38$), enquanto a espessura média
283 foi de 1,15 cm ($\pm 0,37$) e 2,18 cm ($\pm 1,11$) para os grupos de LNN e LN,
284 respectivamente. A RECEL média foi de 0,47 cm ($\pm 0,14$) no grupo de LNN e 0,63 cm
285 ($\pm 0,16$) no grupo dos LN.

286 Com relação às características ultrassonográficas obtidas ao Doppler colorido,
287 Power Doppler e Doppler pulsado (Tabela 2), diferença significativa foi notada na
288 distribuição do fluxo entre os LNN e LN, com o Doppler colorido ($P < 0,005$) e com o
289 Power Doppler, sendo que a significância estatística aumentou com o uso do Power
290 Doppler ($p < 0,0001$) (Figura 2A e 2B). A distribuição vascular predominante no
291 grupo dos LNN foi do tipo hilar, enquanto no grupo dos LN o tipo predominante foi
292 de padrão misto, hilar e periférico (Figura 2C e 2D). A presença de fluxo anômalo
293 também diferiu significativamente entre LN e LNN, sendo que esse tipo de
294 vascularização foi observado com alta frequência nos LN (42/46, 91,3%). Dentre os
295 tipos de fluxo anômalo identificados no grupo de LN, observou-se vascularização
296 puntiforme (22/46, 47,83%), pericapsular (14/46, 30,43%) (Figura 2C), subcapsular
297 (7/46, 15,22%), transcapsular (7/46, 15,22%), exuberante (5/46, 10,87%), caótica

298 (7/46, 15,22%) e hilar deslocada (3/46, 6,52%). Um ou mais tipos de vascularização
299 anômala associados puderam ser encontrados em um mesmo linfonodo.

300 Os índices de resistividade e pulsatilidade médios também diferiram
301 significativamente entre os grupos ($p < 0,0001$) e o IR médio foi de 0,64 ($\pm 0,1$) para
302 linfonodos não-neoplásicos e 0,75 ($\pm 0,1$) para os neoplásicos. O IP médio foi de 1,22
303 ($\pm 0,41$) e 1,84 ($\pm 0,73$) para os grupos não-neoplásico e neoplásico, respectivamente
304 (Figura 2E). Não foram observadas diferenças significativas entre ambos os grupos
305 para as demais características ao Doppler, como presença e intensidade de
306 vascularização.

307 A distribuição do escore elastográfico variou significativamente entre os
308 grupos ($p < 0,0001$), com predomínio do escore 1, referente a tecido com elasticidade
309 macia, no grupo dos LNN (Figura 3, A e B) e predomínio do escore 4, relacionado à
310 elasticidade tecidual rígida, no grupo dos LN (Tabela 3) (Figura 3, C e D).

311

312

Discussão

313 Os resultados obtidos demonstraram que há diferenças no EC, EL, RECEL,
314 distribuição da vascularização, IR, IP e escore elastográfico entre linfonodos com
315 lesões não-neoplásicas e neoplásicas, confirmando a hipótese formulada de que tais
316 lesões são distinguíveis utilizando-se a ultrassonografia e elastografia.

317 A obtenção de diferença significativa nos EL, EC e RECEL entre os grupos de
318 linfonodos nesse estudo, à avaliação ultrassonográfica modo-B, está de acordo com
319 dados previamente relatados, referentes a linfonodos profundos não-neoplásicos e
320 neoplásicos, em cães (SWARTE et al., 2011). Entretanto, os valores médios do EL e
321 EC dos LN e LNN foram inferiores àqueles obtidos no estudo supracitado e a
322 diferença provavelmente está associada à avaliação de linfonodos predominantemente

323 superficiais. Essa hipótese também é sustentada por valores médios de comprimento
324 de linfonodos superficiais reativos observados em cães com linfoma e metástase
325 (NYMAN et al., 2005), próximos aos valores obtidos em nosso estudo. É possível,
326 portanto, que linfonodos profundos acometidos tanto por alterações neoplásicas como
327 não-neoplásicas, sofram maior aumento em comparação com os linfonodos
328 superficiais. Por outro lado, é possível que linfonodos com significativo aumento
329 tenham sido incluídos nos estudos que avaliaram linfonodos profundos, uma vez que
330 esses linfocentros se localizam próximos a importantes estruturas e o acesso para
331 diagnóstico de linfonodos com aumento discreto torna-se limitado.

332 A RECEL de ambos os grupos de linfonodos superficiais, neoplásicos e não-
333 neoplásicos desse estudo foi superior aos valores obtidos para linfonodos caninos
334 profundos (SWARTE et al., 2011) e inferior aos valores observados em linfonodos
335 superficiais (NYMAN et al., 2005), o que também indica maior tendência dos
336 linfonodos superficiais, não-neoplásicos e neoplásicos, apresentarem formato mais
337 arredondado em comparação com os linfonodos profundos. Ademais, o valor médio
338 inferior da RECEL obtido no grupo dos linfonodos não-neoplásicos em comparação
339 com os neoplásicos, indica maior tendência de linfonodos não-neoplásicos
340 apresentarem formato alongado e dos neoplásicos apresentarem formato arredondado,
341 o que também foi observado em estudos prévios em cães (NYMAN et al., 2004) e na
342 espécie humana (ESEN, 2006). O formato arredondado dos linfonodos neoplásicos
343 está relacionado à infiltração tumoral em parte do linfonodo, bloqueando os canais
344 linfáticos da região e causando espessamento cortical focal (NYMAN e O'BRIEN,
345 2007). Contudo, linfonodos metastáticos podem apresentar formatos variados, de
346 ovalado a arredondado (NYMAN et al., 2005) e, provavelmente, o baixo número de

347 linfonodos metastáticos incluídos nesse estudo contribuiu para um valor médio da
348 RECEL superior, no grupo de linfonodos neoplásicos.

349 A ausência de diferença significativa entre características como irregularidade
350 de contornos, nitidez das bordas, heterogeneidade, definição do tecido hilar,
351 hiperecogenicidade do tecido adjacente e presença de áreas nodulares e áreas
352 hipoecogênicas, está de acordo com estudo em cães em que linfonodos profundos
353 foram avaliados (SWARTE et al., 2011). Embora estudos anteriores não tenham
354 demonstrado diferença significativa para a regularidade de contornos entre os grupos,
355 observou-se maior prevalência de contornos irregulares em linfonodos neoplásicos
356 (NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011), o que não foi notado nesse estudo.

357 A nitidez das bordas nodais, em pacientes humanos, foi associada à
358 malignidade (ESEN, 2006). Em cães, embora um estudo tenha demonstrado alta
359 frequência dessa característica em linfonodos acometidos por linfoma (NYMAN et al.,
360 2005; SWARTE et al., 2011), não foi observada diferença estatística, assim como no
361 presente estudo.

362 A heterogeneidade de linfonodos localizados em região intra-abdominal tem
363 sido relacionada à malignidade (KINNS e MAI, 2007). Embora a heterogeneidade no
364 presente estudo tenha sido mais frequente em LN, devido à presença de trabeculações
365 internas hiperecogênicas (24%), áreas de microcalcificações (22%), áreas de
366 hipoecogenicidade (26%) e áreas nodulares (6%), não houve significância estatística,
367 assim como relatado por outros autores que avaliaram linfonodos profundos intra-
368 abdominais (SWARTE et al., 2011) e linfonodos superficiais em cães (NYMAN et al.,
369 2005).

370 Foi possível definir tecido hilar em aproximadamente 60% dos linfonodos, nos
371 dois grupos, não havendo, portanto, diferença entre eles, assim como descrito em

372 estudos em cães (NYMAN et al., 2005; NYMAN et al., 2006). Inicialmente, a
373 definição de tecido hilar era considerada característica de linfonodos não-neoplásicos
374 em pacientes humanos e, sua ausência, considerada sinal de malignidade, devido à
375 infiltração de tecido neoplásico (RUBALTELLI et al., 1990). Contudo, verificou-se,
376 posteriormente, que mesmo LNN poderiam levar à falta de definição do hilo, como no
377 caso de hiperplasia linfoide inflamatória ou infecciosa, devido à formação de novos
378 centros germinativos no interior do hilo, levando à sua ausência (VASSALLO et al.,
379 1992). Um estudo que caracterizou o padrão de contraste intravenoso por microbolhas
380 e o Power Doppler em linfonodos caninos com linfoma, demonstrou que 81,8% dos
381 linfonodos não apresentavam hilo definido ao modo-B, embora tal resultado torne-se
382 limitado frente à análise descritiva de um baixo tamanho de amostra utilizado pelos
383 autores (SALWEI et al., 2005).

384 Assim como anteriormente relatado para linfonodos profundos (SWARTE et al.,
385 2011), nesse estudo a hiperecogenicidade de tecidos adjacentes foi mais frequente no
386 grupo de LN, sem diferença estatística entre os grupos. A presença de nodulações foi
387 mais frequente em LNN, enquanto a presença de áreas hipoeecogênicas teve frequência
388 próxima em ambos os grupos. Não houve, entretanto, diferença significativa entre os
389 grupos para ambas as variáveis. As áreas hipoeecogênicas descritas em LNN podem
390 corresponder a áreas de inflamação e, nos LN, a áreas necróticas e de liquefação
391 (NYMAN e O'BRIEN, 2007).

392 A ultrassonografia com a ferramenta Doppler tem demonstrado resultados
393 promissores na distinção entre LN e LNN, em pacientes humanos e caninos
394 (STEINKAMP et al., 2002; NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011; CHAMMAS
395 et al., 2016). Do mesmo modo, os resultados aqui descritos revelaram diferenças
396 significativas na distribuição do fluxo vascular e nos índices de resistividade, IR e IP,

397 entre os grupos. Em relação à distribuição vascular, a significância tornou-se ainda
398 mais evidente com o uso do Power Doppler, em relação ao uso apenas do Doppler
399 colorido. Esse fato está relacionado à maior sensibilidade do Power Doppler para
400 captação de vascularização de calibre e velocidade inferiores, que emitem sinais
401 Doppler mais fracos, assim como detectado em humanos (STEINKAMP et al., 2002).
402 A distribuição de vascularização com padrão hilar, sem sinais de sua existência em
403 regiões mais periféricas, foi o tipo predominante nos LNN avaliados, enquanto nos LN
404 observou-se captação de sinal tanto hilar como periférico, similar ao descrito em cães
405 (NYMAN et al., 2005). Destaca-se, ainda, a existência de vascularização anômala em
406 aproximadamente 91,3% de linfonodos com neoplasia, incluindo vascularização com
407 aspecto puntiforme, subcapsular, pericapsular, transcapsular, exuberante, caótica e
408 hilar deslocada. A existência de vascularização anômala é característica de processos
409 neoplásicos mais crônicos, em que a neovascularização passa a ser formada para tentar
410 suprir regiões do linfonodo avasculares, pela compressão exercida pelo tecido
411 neoplásico (STEINKAMP et al., 2002).

412 A diferença observada nos IR e IP entre os grupos, com aumento do valor
413 médio nos LN, reflete a resistividade vascular nodal aumentada, também observada
414 em estudos prévios, em linfonodos superficiais e nos linfonodos mesentéricos e ilíacos
415 mediais, em cães (NYMAN et al., 2005; PRIETO et al., 2009). O fato observado
416 justifica-se pelo efeito compressivo realizado pelas células tumorais sobre os vasos,
417 angioneogênese tumoral e formação de *shunts* arteriovenosos, com fluxos turbulentos
418 e altos índices de perfusão (CHANG et al., 1994; CHOI et al., 1995). Um estudo em
419 pacientes humanos sugeriu que embora existam diferenças no IR e IP entre variadas
420 lesões nodais, apenas valores extremos em relação aos valores de corte são úteis no
421 diagnóstico diferencial das lesões e no direcionamento dos procedimentos

422 diagnósticos e terapêuticos a serem realizados (BRNIC e HEBRANG, 2003). Em cães,
423 contudo, os índices de perfusão demonstraram alta sensibilidade e especificidade na
424 detecção de malignidade em linfonodos mesentéricos e ilíacos mediais (PRIETO et al.,
425 2009).

426 No que diz respeito ao exame elastossonográfico, a atribuição de escores, por
427 meio de escala cromática qualitativa, mostrou-se eficaz no presente estudo para
428 distinção entre LN e LNN, sendo observada alta frequência do escore 1 (tendendo a
429 tecido macio) nos LNN, e maiores frequências de escores 3 e 4 (tendendo a tecido
430 rígido), nos LN. Embora algumas variações possam ocorrer, devido à presença de
431 áreas de liquefação e necrose, particularmente presentes em linfonodos linfomatosos,
432 linfonodos malignos em pacientes humanos também mostraram mais de 45% de sua
433 área total com aspecto rígido, devido à deposição de tecido neoplásico (ALAM et al.,
434 2008; BHATIA et al., 2010).

435 Os resultados observados estão de acordo com estudo realizado em cães, em
436 que houve predomínio de LN com escore tendendo a rígido e predomínio de LNN com
437 escore tendendo a macio (SEILER e GRIFFITH, 2018). Os autores descrevem,
438 contudo, importante proporção de linfonodos de ambos os grupos que apresentaram
439 sobreposição de escores elastográficos intermediários, resultado também verificado
440 nesse estudo, o que poderia limitar a aplicabilidade da técnica na rotina clínica para a
441 detecção de malignidade. Entretanto, em pacientes humanos, o mesmo foi notado ao
442 avaliar linfonodos metastáticos e LNN, e verificou-se alto poder diagnóstico ao
443 associar-se a elastossonografia, e sua alta especificidade, com a ultrassonografia
444 modo-B, e sua alta sensibilidade, em comparação com o uso isolado de cada técnica
445 (ALAM et al., 2008; WOJCINSKI et al., 2012), ressaltando a importância da técnica
446 como ferramenta auxiliar ao diagnóstico de lesões nodais.

447 Limitações do presente estudo incluem a dimensão amostral inferior de
448 linfonodos metastáticos, impedindo a comparação de características entre eles e
449 linfonodos linfomatosos, com adequado poder estatístico. Contudo, a baixa proporção
450 de linfonodos metastáticos, também observada em outro estudo em cães (NYMAN et
451 al., 2005), reflete a casuística da rotina clínica na presente instituição. A superior
452 proporção de linfonodos linfomatosos pode ter influenciado o valor médio de EC, EL
453 e RECEL no grupo LN, uma vez que linfonodos com linfoma frequentemente
454 assumem dimensões significativamente aumentadas e formato globoso (NYMAN et
455 al., 2005). O exame histopatológico, capaz de fornecer o diagnóstico definitivo das
456 lesões, foi utilizado como método diagnóstico em apenas cinco linfonodos (5/119;
457 4,2%) no presente estudo. Entretanto, tal limitação provavelmente teve mínima
458 influência sobre os resultados observados, uma vez que o exame citológico, que possui
459 alta sensibilidade e especificidade diagnósticas, pode apresentar sensibilidade superior
460 ao exame histopatológico (LANGENBACH et al., 2001).

461

462

Conclusões

463 A ultrassonografia, particularmente a técnica Doppler, por meio da
464 caracterização da distribuição do fluxo sanguíneo e dos índices de perfusão, e a
465 elastossonografia, por meio dos escores de elasticidade, permitiram a diferenciação de
466 lesões neoplásicas e não-neoplásicas de linfonodos de cães. Os resultados obtidos
467 fundamentam o uso de ambas as técnicas no auxílio e como alternativa a outros
468 métodos diagnósticos, agregando informações adicionais, ou ainda, no direcionamento
469 diagnóstico, nas situações em que a coleta de material para exames microscópicos é
470 fator limitante.

471

472

Agradecimentos

473

474

475

476

477

478

Referências

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro (processo FAPESP no 15 2012/02484-2).

1. Kinns J, Mai W. Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes. J Vet Radiol 2007;48:565-569.

2. Langenbach A, Mac Manus PM, Hendrick MJ, Shofer FS, Sorenmo KU. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. J Am Vet Med Assoc 2001;218:1424-1428.

3. MacNeill AL. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. Top Companion Anim Med 2011;26:62-76.

4. Mayer MN, Lawson JA, Silver TI. Sonographic characteristics of presumptively normal canine medial iliac and superficial inguinal lymph nodes. Vet Radiol Ultrasound 2010;51:638-641.

5. Nyman HT, Kristensen AT, Skovgaard IM, McEvoy FJ. Characterization of normal and abnormal canine superficial lymph nodes using gray-scale B-mode, color flow mapping, power, and spectral Doppler ultrasonography: a multivariate study. Vet Radiol Ultrasound 2005;46:404-410.

6. Nyman HT, Lee MH, McEvoy FJ, Nielsen OL, Martinussen T, Kristensen AT. Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features

497 of benign and malignant superficial lymph nodes in dogs. *Am J Vet Res* 2006;67:978-
498 984.

499 7. Adibelli ZH, Ünal G, Gül E, Uslu F, Koçak U, Abali Y. Differentiation of
500 benign and malignant cervical lymph nodes: value of B-mode and color Doppler
501 sonography. *Eur J Radiol* 1998;28:230-234.

502 8. Dragoni F, Cartoni C, Pescarmona E, Chiarotti F, Puopolo M, Orsi E, Pignoloni
503 P, Gregoris C, Mandelli F. The role of high resolution pulsed and color Doppler
504 ultrasound in the differential diagnosis of benign and malignant lymphadenopathy –
505 results of multivariate analysis. *Cancer* 1999;85:2485-2490.

506 9. Yang WT, Chang J. Patients with breast cancer: differences in color Doppler
507 flow and gray-scale US features of benign and malignant axillary lymph nodes.
508 *Radiology* 2000;215:568-573.

509 10. Steinkamp HJ, Wissgott C, Rademaker J, Felix R. Current status of power
510 Doppler and color Doppler sonography in the differential diagnosis of lymph node
511 lesions. *Eur Radiol* 2002;12:1785-1793.

512 11. Brnic Z, Hebrang A. Usefulness of Doppler waveform analysis in differential
513 diagnosis of cervical lymphadenopathy. *Eur Radiol* 2003;13:175-180.

514 12. Ying M, Ahuja A, Brook F. Accuracy of sonographic vascular features in
515 differentiating different causes of cervical lymphadenopathy. *Ultrasound Med Biol*
516 2004;30:441-447.

517 13. Rosário PWS, Faria S, Bicalho L, Alves MFG, Borges MAR, Purisch S,
518 Padrão EL, Rezende LL, Barroso AL. Ultrasonographic differentiation between
519 metastatic and benign lymph nodes in patients with papillary thyroid carcinoma. *J*
520 *Ultrasound Med* 2005;24:1385-1389.

- 521 14. Alvarez S, Añorbe E, Alcorta P, López F, Alonso I, Cortés J. Role of
522 sonography in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer: a
523 systematic review. *AJR* 2006;186:1342-1348.
- 524 15. Leboullex S, Girard E, Rose M, Travagli JP, Sabbah N, Caillou B, Hartl DM,
525 Lassau N, Baudin E, Schlumberger M. Ultrasound criteria of malignancy for cervical
526 lymph nodes in patients followed up for differentiated thyroid cancer. *J Clin*
527 *Endocrinol Metab* 2007;92:3590-3594.
- 528 16. Dangore-Khasbage S, Degwekar SS, Bhowate RR, Banode PJ, Bhake A,
529 Choudhary MS, Lohe VK. Utility of color Doppler ultrasound in evaluating the status
530 of cervical lymph nodes in oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*
531 *Endod* 2009;108:255-263.
- 532 17. Chang D, Yuan A, Yu C, Luh K, Kuo S, Yang P. Differentiation of benign and
533 malignant cervical lymph nodes with color Doppler sonography. *AJR* 1994;162:965-
534 968.
- 535 18. Choi MY, Lee JW, Jang KJ. Distinction between benign and malignant causes
536 of cervical, axillary, and inguinal lymphadenopathy: value of Doppler spectral
537 waveform analysis. *AJR* 1995;165:981-984.
- 538 19. Na DG, Lim HK, Byun HS, Kim HD, Ko YH, Baek JH. Differential diagnosis
539 of cervical lymphadenopathy: usefulness of color Doppler sonography. *AJR*
540 1997;168:1311-1316.
- 541 20. Ariji Y, Kimura Y, Hayashi N, Onitsuka T, Yonetsu K, Hayashi K, Ariji E,
542 Kobayashi T, Nakamura T. Power Doppler sonography of cervical lymph nodes in
543 patients with head and neck cancer. *Am J Neuroradiol* 1998;19:303-307.

- 544 21. Chammas MC, Macedo TAA, Lo VW, Gomes AC, Juliano A, Cerri GG.
545 Predicting malignant neck lymphadenopathy using color duplex sonography based on
546 multivariate analysis. *J Clin Ultrasound* 2016;0:1-8.
- 547 22. Ophir J, Garra B, Kallel F, Konofagou E, Krouskop T, Righetti R, Varghese T.
548 Elastographic imaging. *Ultrasound Med Biol* 2000;26:23-29.
- 549 23. Arda K, Ciledag N, Gumusdag PD. Differential diagnosis of malignant
550 cervical lymph nodes at real-time ultrasonographic elastography and Doppler
551 ultrasonography. *Hungarian Radiology Online* 2010;10:1-4.
- 552 24. Bamber JC, Cosgrove D, Dietrich CF, Fromageau J, Bojunga J, Calliada F,
553 Cantisani V, Correas JM, D'Onofrio M, Drakonaki EE, Fink M, Friedrich-Rust M,
554 Gilja OH, Havre RF, Jenssen C, Klauser AS, Ohlinger R, Saftoiu A, Schaefer F,
555 Sporea I, Piscaglia F. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of
556 ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology. *Ultraschall Med*
557 2013;34:169-184.
- 558 25. Mutala TM, Purity N, Aywak A. Comparison of qualitative and
559 semiquantitative strain elastography in breast lesions for diagnostic accuracy. *Cancer*
560 *Imaging* 2016;16:1-7.
- 561 26. Asteria C, Giovanardi A, Pizzocaro A, Cozzaglio L, Morabito A, Somalvico F,
562 Zoppo A. US-Elastography in the differential diagnosis of benign and malignant
563 thyroid nodules. *Thyroid* 2008;18:523-531.
- 564 27. Bhatia KSS, Cho CCM, Yuen Y, Rasalkar DD, King AD, Ahuja AT. Real-time
565 qualitative ultrasound elastography of cervical lymph nodes in routine clinical
566 practice: interobserver agreement and correlation with malignancy. *Ultrasound Med*
567 *Biol* 2010;36:1990-1997.

- 568 28. Dudea SM, Botar-Jid C, Dumitriu D, Vasilescu D, Manole S, Lenghel ML.
569 Differentiating benign from malignant superficial lymph nodes with sonoelastography.
570 Med Ultrason 2013;15:132-139.
- 571 29. Tatar IG, Kurt A, Hekimoglu B. Advantages and pitfalls in the evaluation of
572 cervical lymph nodes. Med Ultrason 2013;15:333-334.
- 573 30. Llabrés-Díaz FJ. Ultrasonography of the medial iliac lymph nodes in the dog.
574 Vet Radiol Ultrasound 2004;45:156-165.
- 575 31. Salwei RM, O'Brien RT, Matheson JS. Characterization of lymphomatous
576 lymph nodes in dogs using contrast harmonic and power Doppler ultrasound. Vet
577 Radiol Ultrasound 2005;46:411-416.
- 578 32. Swarte M, Alexander K, Rannou B, d'Anjou MA, Blond L, Beauchamp G.
579 Comparison of sonographic features of benign and neoplastic deep lymph nodes in
580 dogs. Vet Radiol Ultrasound 2011;52:451-456.
- 581 33. Nyman HT, Kristensen AT, Flagstad A, McEvoy FJ. A review of the
582 sonographic assessment of tumor metastases in liver and superficial lymph nodes. Vet
583 Radiol Ultrasound 2004;45:438-48.
- 584 34. Feliciano MAR, Maronezi MC, Crivellenti LZ, Crivellenti SB, Simões APR,
585 Brito MBS, Garcia PHS, Vicente WRR. Acoustic radiation force impulse (ARFI)
586 elastography of the spleen in healthy adult cats – a preliminary study. J Small Anim
587 Pract 2015;56(3):180-183.
- 588 35. Maronezi MC, Feliciano MAR, Crivellenti LZ, Simões APR, Bartlewski PM,
589 Gill I, Canola JCC, Vicente WRR. Acoustic radiation force impulse (ARFI)
590 elastography of the spleen in healthy dogs of different ages. J Small Anim Pract
591 2015;56(3):393-397.

- 592 36. Holdsworth A, Bradley K, Birch S, Browne WJ, Barberet V. Elastography of
593 the normal canine liver, spleen and kidneys. *Vet Radiol Ultrasound* 2014;55(6):620-
594 627.
- 595 37. Feliciano MAR, Maronezi MC, Simões APR, Uscategui RR, Maciel GS,
596 Carvalho CF, Canola JC, Vicente WRR. Acoustic radiation force impulse
597 elastography of prostate and testes of healthy dogs: preliminary results. *J Small Anim*
598 *Pract* 2015;56(5):320-324.
- 599 38. Jeon S, Lee G, Lee S, Kim H, Yu D, Choi J. Ultrasonographic elastography of
600 the liver, spleen, kidneys, and prostate in clinically normal Beagle dogs. *Vet Radiol*
601 *Ultrasound* 2015;56(4):425-431.
- 602 39. Seiler GS, Griffith E. Comparisons between elastographic stiffness scores for
603 benign versus malignant lymph nodes in dogs and cats. *Vet Radiol Ultrasound*
604 2018;59:79-88.
- 605 40. Tan R, Xiao Y, HE Q. Ultrasound elastography: its potential role in assessment of
606 cervical lymphadenopathy. *Acad Radiol* 2010;17(7):849-855.
- 607 41. Esen G. Ultrasound of superficial lymph nodes. *Eur J Radiol* 2006;58:345-59.
- 608 42. Nyman HT, O'Brien RT. The sonographic evaluation of lymph nodes. *Clin*
609 *Tech Small Anim Pract* 2007;22:128-37.
- 610 43. Ahuja A, Ying M, Yang WT, Evans R, King W, Metreweli C. The use of
611 sonography in differentiating cervical lymphomatous lymph nodes from cervical
612 metastatic lymph nodes. *Clin Radiol* 1996;51:186-190.
- 613 44. Rubaltelli L, Proto E, Salmaso R, Bortoletto P, Candiani F, Cagol P.
614 Sonography of abnormal lymph nodes in vitro: correlation of sonographic and
615 histologic findings. *AJR* 1990;155:1241-4.

616 45. Vassallo P, Edel G, Roos N, Naguib A, Peters PE. In-vitro high-resolution
617 ultrasonography of benign and malignant lymph nodes. A sonographic-pathologic
618 correlation. *Invest Radiol* 1993;28:698-705.

619 46. Prieto S, Gomez-Ochoa P, Blas I, Gascón M, Aceña C, Corda A, Sosa I,
620 Gregori T, Couto G. Pathologic correlation of resistivity and pulsatility indices in
621 canine abdominal lymph nodes. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50(5):525-529.

622 47. Alam F, Naito K, Horiguchi J, Fukuda H, Tachikake T, Ito K. Accuracy of
623 sonographic elastography in the differential diagnosis of enlarged cervical lymph
624 nodes: comparison with conventional B-mode sonography. *AJR* 2008;191:604-10.

625 48. Wojcinski S, Dupont J, Schmidt W, Cassel M, Hillemanns P. Real-time
626 ultrasound elastography in 180 axillary lymph nodes: elasticity distribution in healthy
627 lymph nodes and prediction of breast cancer metastases. *BMC Med Imaging*
628 2012;12(35):1-10.

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641 Tabela 1. Características ultrassonográficas ao modo-B, de linfonodos neoplásicos
 642 (LN) e não-neoplásicos (LNN) de cães.

Característica ao modo-B	LNN (n = 69)	LN (n = 50)	P
Eixo longo (cm)	2,59 ± 0,88**	3,46 ± 1,38**	< 0,0001
Eixo curto (cm)	1,15 ± 0,37**	2,18 ± 1,11**	< 0,0001
RECEL	0,47 ± 0,14**	0,63 ± 0,16**	< 0,0001
Contornos irregulares	40 (54,05%)	27 (54%)	0,974
Bordas nítidas	62 (83,78%)	41 (82%)	0,636
Heterogeneidade	37 (50%)	32 (64%)	0,339
Nodulações	15 (20,27%)	3 (6%)	0,512
Áreas hipoecogênicas	17 (22,97%)	13 (26%)	0,094
Definição de tecido hilar	43 (58,11%)	31 (62%)	0,81
Tecido adjacente hiperecogênico	20 (27,03%)	20 (40%)	0,24

643 * Diferença significativa entre os grupos (P < 0,05).

644 ** Diferença significativa entre os grupos (P < 0,0001).

645 RECEL, relação entre eixo curto e eixo longo.

646

647

648

649

650

651 Tabela 2. Características ultrassonográficas ao Doppler, de linfonodos neoplásicos
 652 (LN) e não-neoplásicos (LNN) de cães.

Característica ao Doppler	LNN (n = 69)	LN (n = 50)	P
Presença de vascularização ao DC	63 (91,3%)	43 (86%)	0,611
Intensidade da vascularização ao DC			
Discreta	31/63 (49,21%)	24/43 (55,81%)	0,461
Moderada	30/63 (47,62%)	18/43 (41,86%)	
Acentuada	2/63 (3,17%)	1/43 (2,32%)	
Distribuição da vascularização ao DC			
Hilar	49/63 (77,78%)*	19/43 (44,19%)*	0,004
Periférica	1/63 (1,59%)*	4/43 (9,3%)*	
Hilar e periférica	13/63 (20,63%)*	20/43 (46,51%)*	
Presença de vascularização ao PD	67 (97,1%)	46 (92%)	0,905
Intensidade da vascularização ao PD			
Discreta	17/67 (25,37%)	16/46 (34,78%)	0,813
Moderada	44/67 (65,67%)	20/46 (43,48%)	
Acentuada	6/67 (8,95%)	9/46 (19,56%)	
Distribuição da vascularização ao PD			
Hilar	47/67 (70,15%)**	9/46 (19,56%)**	< 0,0001
Periférica	0**	5/46 (10,87%)**	
Hilar e periférica	20/67 (29,85%)**	32/46 (69,56%)**	
Presença de fluxo anômalo	10/67 (14,92%)**	42/46 (91,3%)**	< 0,0001
IR	0,64 ± 0,1**	0,75 ± 0,1**	< 0,0001
IP	1,22 ± 0,41**	1,84 ± 0,73**	< 0,0001

653 * Diferença significativa entre os grupos (P < 0,05).

654 ** Diferença significativa entre os grupos (P < 0,0001).

655 DC, Doppler colorido; PD, Power Doppler; IP, índice de pulsatilidade; IR, índice de
 656 resistividade.

657

658

659

660 Tabela 3. Distribuição das frequências dos escores elastográficos, de linfonodos
 661 neoplásicos (LN) e não-neoplásicos (LNN) de cães.

Escore elastográfico	LNN (n = 62)	LN (n = 36)	P
1	25 (40,32%)**	0**	< 0,0001
2	22 (35,48%)**	6 (16,67%)**	
3	13 (20,97%)**	14 (38,89%)**	
4	2 (3,23%)**	16 (44,44%)**	

662 ** Diferença significativa entre os grupos ($P < 0,0001$).

663 1, tecido macio; 2, tecido intermediário tendendo a macio; 3, tecido intermediário
 664 tendendo a rígido; e 4, tecido rígido.

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

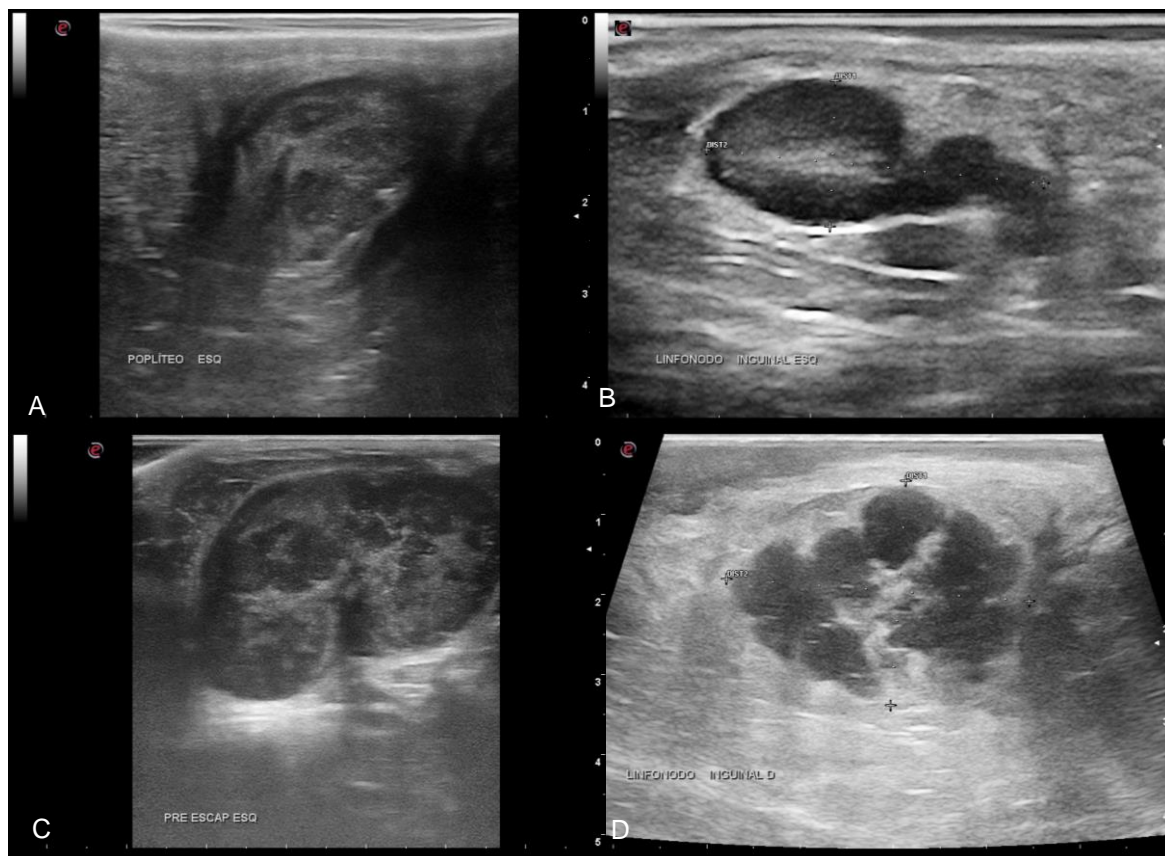
675

676

677

678

679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690



691 Figura 1. Imagens ultrassonográficas ao modo-B de linfonodos reativos (A) e (B) e
692 neoplásicos (C) e (D) de cães. Observa-se evidente padrão heterogêneo tanto em
693 linfonodo poplíteo reativo (A), como em linfonodo cervical superficial com linfoma (C).
694 Também é possível se observar hiperecogenicidade do tecido adjacente em linfonodo
695 inguinal superficial reativo (B) e em linfonodo inguinal superficial acometido por
696 metástase de neoplasia mesenquimal maligna. Os contornos de (A) e (D) são irregulares.

697
698
699
700
701

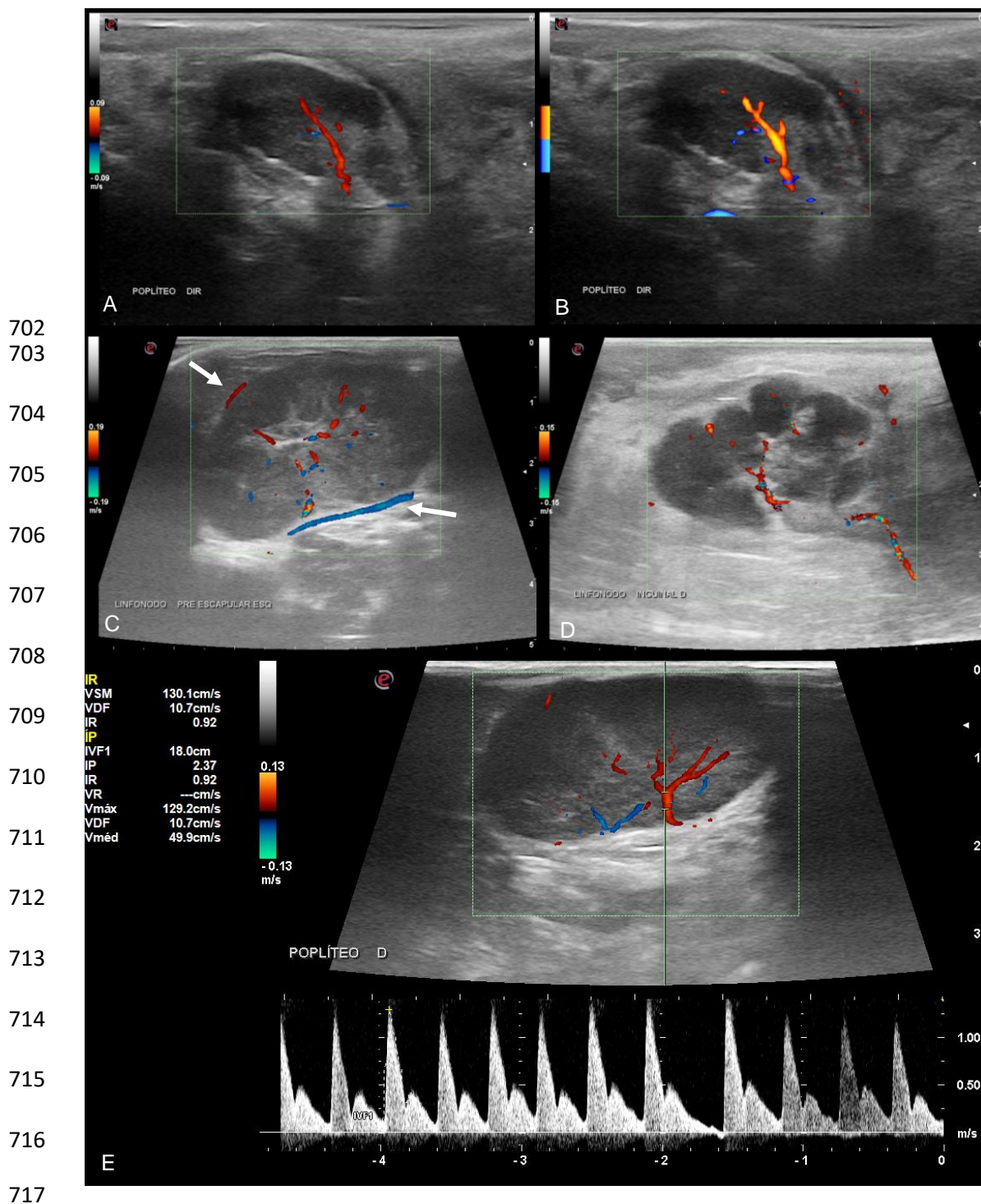


Figura 2. Imagens ultrassonográficas ao Doppler de linfonodos de cães. (A) Imagem ao Doppler colorido e (B) Power Doppler, evidenciam fluxo com padrão hilar em mesmo linfonodo poplíteo reativo. (C) Imagem ao Doppler colorido de linfonodo cervical superficial com linfoma, mostra fluxo com distribuição hilar e periférica, com vaso anômalo pericapsular associado (setas). (D) Imagem ao Doppler colorido de

723 linfonodo inguinal superficial, com metástase de neoplasia mesenquimal maligna:
724 observa-se fluxo turbilhonado de padrão misto. (E) Imagem ao Doppler pulsado de
725 linfonodo poplíteo com linfoma, evidencia traçado espectral de alta impedância e altos
726 índice de perfusão.

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

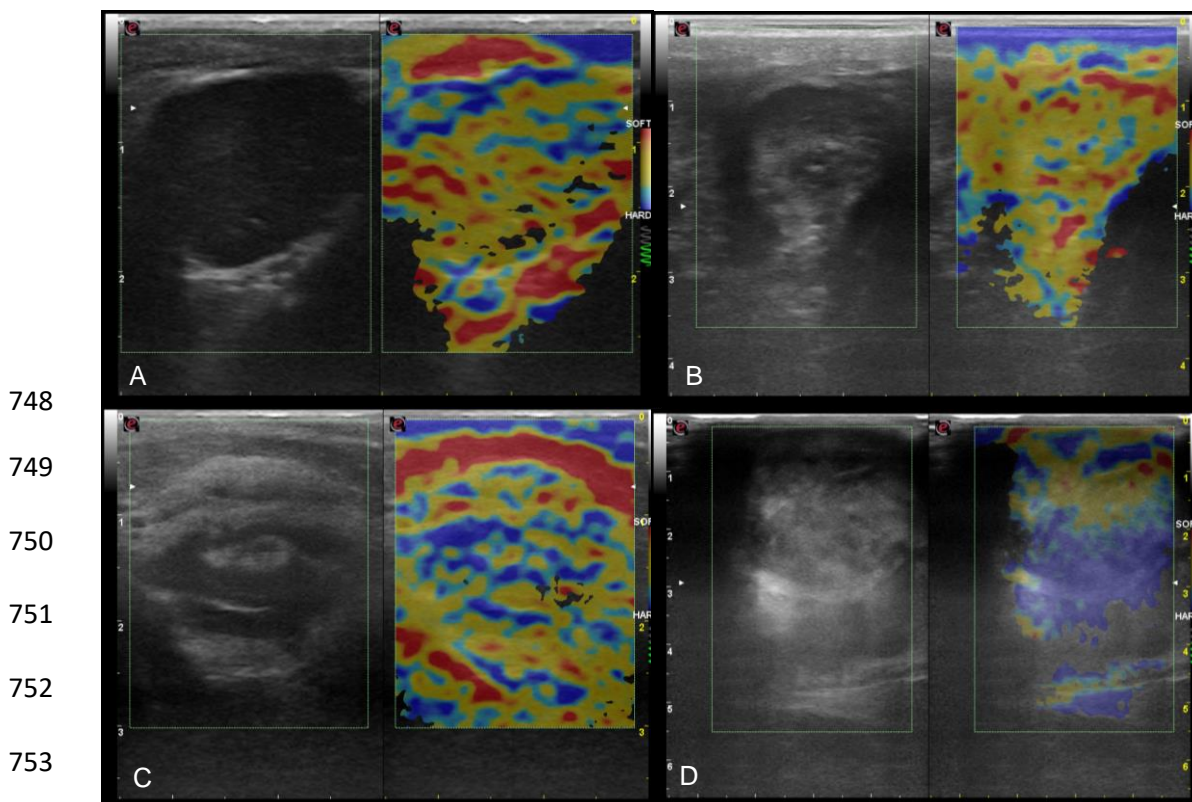
743

744

745

746

747



748

749

750

751

752

753

754 Figura 3. Elastogramas de linfonodos poplíteos reativos (A) e (B), de linfonodo
 755 poplíteo com linfoma (C) e linfonodo submandibular com metástase de melanoma oral
 756 (D) de cães. Em (A) e (B), é possível observar mais de 80% da área total nodal com
 757 coloração amarela (intermediária) e vermelha (macia), com discretas áreas em azul
 758 (rígida), correspondendo a menos de 20% do linfonodo, correspondentes a escore 1.
 759 Em (C), observa-se de 50 a 80% da área total do linfonodo com coloração em azul e
 760 poucas áreas em vermelho ou amarelo, referentes a escore 3. Em (D), observa-se mais
 761 de 80% da área total do linfonodo em azul, poucas áreas em amarelo em discretas
 762 áreas em vermelho, correspondentes a escore 4.

CAPÍTULO 3

Trabalho Científico 2

Trabalho a ser enviado para a revista: BMC Veterinary Research

Instruções para os autores:

<https://bmcvetres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research-article>

Linfonodos caninos parasitados por *Leishmania* spp. apresentam alterações ultrassonográficas e elastográficas?

Alexandra Frey Belotta^{1*}, Marcela Costa Gomes², Shayra Peruch Bonatelli¹, Carmel Rezende Dadalto¹, Noeme Sousa Rocha², Maria Jaqueline Mamprim¹

* Contato: alexandra.belotta.vet@gmail.com

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Introdução: O diagnóstico complexo e tardio da leishmaniose contribui para a disseminação da doença, principalmente entre cães portadores assintomáticos. Métodos de imagem podem auxiliar no diagnóstico da enfermidade, por meio da detecção de lesões nos órgãos envolvidos. Apesar do frequente envolvimento de linfonodos por alta carga parasitária em cães acometidos pela doença, os autores desconhecem estudos que tenham descrito características de imagem em tais órgãos. O objetivo desse estudo foi investigar as alterações ultrassonográficas e elastossonográficas identificadas em linfonodos parasitados por *Leishmania* spp., em cães naturalmente infectados.

Resultados: Foram avaliados 25 linfonodos de cães contendo as formas amastigotas de *Leishmania* spp., identificadas ao exame citológico. Ao modo-B, os linfonodos apresentaram valores médios para o eixo longo e eixo curto de 2,63 cm ($\pm 0,85$) e 1,19 cm ($\pm 0,32$), respectivamente, e, para a relação entre eixos curto e longo (RECEL), de 0,49. A maioria dos linfonodos apresentou contornos irregulares (15/25, 60%), bordas nítidas (21/25, 84%), ausência de definição de tecido hilar (16/25, 64%) e de hiperecogenicidade de tecidos adjacentes (20/25, 80%). Alguns linfonodos apresentaram ecogenicidade heterogênea (11/25, 44%), devido à presença de áreas nodulares ou halo periférico hipocogênico. Ao Doppler colorido e Power Doppler, a vascularização apresentou-se predominantemente hilar (20/25, 80%) e, ao Doppler pulsado, os índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) médios obtidos foram, respectivamente, 0,63 ($\pm 0,07$) e 1,16 ($\pm 0,27$). O escore elastográfico observado com maior frequência foi o 2 (11/23, 47,83%), referente a tecido de elasticidade intermediária, tendendo a macio.

Conclusões: Linfadenite parasitária por *Leishmania* spp. deve ser incluída como diagnóstico diferencial de lesões nodais em cães quando alterações ultrassonográficas tais como irregularidade de contornos associada à ausência de definição do tecido hilar e a valores de IR, IP e escore elastográfico próximos aos valores supracitados, forem identificados.

Palavras-chave: Cão, Doppler, Elastograma, Leishmaniose, Linfadenopatia, Saúde pública, Ultrassom.

Introdução

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) reconhece a leishmaniose como doença tropical negligenciada e como uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta, devido ao grande impacto causado em Saúde Pública. A leishmaniose visceral (LV), zoonose causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* spp., é responsável por alta morbidade e mortalidade humana em países emergentes, sendo superado apenas pela malária (DESJEUX, 1992). Embora seja considerada doença tropical, é endêmica também em diversos países banhados pelo Mediterrâneo (BÜKTE et al., 2003). Na América Latina, o cão é considerado o principal reservatório doméstico da LV humana, causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* e, aproximadamente, 90% dos casos da doença provêm do Brasil. A doença é transmitida entre ser humano e animais por meio da picada do mosquito da espécie *Lutzomyia longipalpis* (ASHFORD, 2000) e a distribuição geográfica da doença é, portanto, limitada pela distribuição do vetor (MAHMOUD, 2014).

A principal alteração na LV humana e canina está relacionada à proliferação e ao parasitismo dos macrófagos, com notáveis lesões observadas em baço, fígado, medula óssea e linfonodos (BOURDOISEAU et al., 1997). De forma geral, uma reação inflamatória crônica intensa composta por células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos) pode ser observada nesses órgãos (TAFURI et al., 2001).

A linfadenomegalia generalizada é a principal característica evidenciada ao exame físico de cães com LV (GIUNCHETTI et al., 2008). A citologia aspirativa por agulha fina de linfonodos é, portanto, o método diagnóstico mais utilizado para detectar formas amastigotas de *Leishmania* spp. (SARIDOMICHELAKIS et al., 2000). Alterações citológicas são observadas com maior frequência entre os cães sintomáticos em relação aos cães com infecções subclínicas (MYLONAKIS et al., 2005), embora altas cargas parasitárias já tenham sido detectadas no exame histopatológico de linfonodos de cães que não apresentavam qualquer outra sintomatologia clínica (LIMA et al., 2004).

O diagnóstico da enfermidade é, em muitos casos, complexo e tardio, devido aos sinais clínicos inespecíficos, ao longo período de incubação do agente e à dificuldade de se identificar o protozoário intracelular nos aspirados de tecidos (KOSHI et al., 2001). Com o objetivo de contribuir para a detecção precoce da doença e até mesmo para a avaliação da eficácia do tratamento instituído, o uso de outras ferramentas diagnósticas, incluindo técnicas de imagem, como a ultrassonografia, têm sido consideradas tanto na

espécie humana como canina (BÜKTE et al., 2003; MAHMOUD, 2014; BALTAZAR et al., 2016).

O exame ultrassonográfico convencional de linfonodos fornece importantes informações a respeito da arquitetura, dimensões, contornos, formato, ecogenicidade, ecotextura e hilo, enquanto o exame com Doppler possibilita caracterizar a presença e distribuição da vascularização dos linfonodos, além da obtenção dos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP), característicos da resistência vascular interna (NYMAN et al., 2005). A elastografia, técnica de imagem recentemente implantada nos equipamentos ultrassonográficos mais modernos, é capaz de comparar a elasticidade tecidual de um órgão ou lesão àquela de tecidos moles adjacentes, com a finalidade de detectar lesões, por meio da rigidez tecidual (ARDA et al., 2006). A ultrassonografia tem sido amplamente empregada em pesquisa para distinção de linfonodos benignos e malignos (NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011) e já possibilitou, inclusive, a caracterização de alterações relacionadas a processos infecciosos, como a tuberculose na espécie humana (STEINKAMP et al., 2002).

O Plano de Ação contra a Leishmaniose, criado com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade pela enfermidade nas Américas visa, dentre outros, aperfeiçoar o diagnóstico da enfermidade (WHO, 2018). Embora os linfonodos estejam entre os principais órgãos acometidos por lesões decorrentes da LV, ao conhecimento dos autores não há descrição do uso da ultrassonografia modo-B, Doppler e elastográfica, para a caracterização de linfonodos contendo as formas amastigotas de *Leishmania* spp., tanto na literatura humana como na veterinária. A hipótese do presente estudo é que hajam determinadas alterações ultrassonográficas, comuns aos linfonodos acometidos pela LV em cães, que possam auxiliar no diagnóstico da enfermidade.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar as alterações ultrassonográficas identificadas em linfonodos de cães parasitados por *Leishmania* spp., por meio do exame convencional, Doppler e elastográfico.

Métodos

Animais

Foram incluídos linfonodos de cães que apresentaram diagnóstico positivo para *Leishmania* spp. à citologia aspirativa por agulha fina (CAAF). O critério de exclusão consistiu de linfonodos pertencentes a cães com diagnóstico positivo para leishmaniose por outras técnicas, mas sem detecção das formas amastigotas à punção

aspirativa. O presente estudo é multi-institucional, sendo parte realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil, e parte realizada no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru. Dados de linfonodos de cães atendidos na FMVZ, UNESP, Botucatu, recrutados para outro estudo ultrassonográfico e elastográfico de linfonodos, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, foram incluídos no presente estudo. Ademais, cães com suspeita clínica e/ou diagnóstico sorológico positivo para *Leishmania* sp., pertencentes ao CCZ, Bauru, foram incluídos e, nesse caso, o exame ultrassonográfico dos linfonodos aumentados era realizado. Termos de Consentimento Livre e Esclarecido foram assinados e o estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ, UNESP, Campus Botucatu, sob protocolo 136/2016.

Citologia

Os cães foram submetidos à punção de um ou mais linfonodos superficiais e o material e lâminas foram processados, conforme técnica previamente descrita (MYLONAKIS et al., 2005). A coleta do material bem como o processamento das amostras e as análises foram realizados por citopatologistas experientes. Foram incluídos no estudo linfonodos com diagnóstico citológico de linfadenite parasitária por microorganismos compatíveis com *Leishmania* spp (Figura 1).

Ultrassonografia

Os exames ultrassonográficos foram realizados por examinador cego ao diagnóstico citológico. O exame ultrassonográfico foi realizado com equipamento MyLab Alpha[®] (Esaote Healthcare do Brasil, São Paulo, SP) e transdutor multifrequencial linear (4-13 MHz).

Ao modo-B, mensurou-se as dimensões dos linfonodos, em seu eixo mais curto (EC) e em seu eixo mais longo (EL), para posterior cálculo da relação entre EC e EL (RECL). A anatomia ultrassonográfica foi avaliada quanto à regularidade de contornos, nitidez das bordas, heterogeneidade (presença de nodulações ou áreas de inflamação ou necrose) e definição do hilo hiperecogênico. A vascularização nodal, quando presente, foi avaliada com relação à sua intensidade, sendo classificada em discreta, moderada ou acentuada e, a distribuição, foi classificada em hilar, periférica

ou hilar e periférica, por meio do Doppler colorido e Power Doppler. A vascularização anômala, quando presente, foi descrita quanto ao aspecto do fluxo em puntiforme, radial ou pericapsular. Ajustou-se o ganho do Doppler ao máximo, sem que houvesse a presença de artefato concomitante, permitindo a detecção de vasos de menor calibre e velocidade. A frequência de repetição de pulso (pulse repetition frequency ou PRF) foi ajustada de forma a ser mínima, sem a formação de *aliasing*. Após avaliação com Doppler colorido e Power Doppler, ativou-se o Doppler pulsado, e traçados espectrais de vaso preferencialmente em região hilar foram registrados após posicionamento do volume de amostra no vaso escolhido. A frequência utilizada variou entre 1,8 e 6,3 MHz e o PRF e ganho do Doppler foram ajustados conforme técnica supracitada, utilizada para avaliação com Doppler colorido e Power Doppler. Os índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) foram calculados pelo próprio equipamento, após a obtenção de três picos arteriais, sequenciais e regulares. Para cada linfonodo, foi realizada a média aritmética para o IR e IP após obtenção das três mensurações.

Elastografia

Posteriormente à avaliação ao modo-B e Doppler, ativou-se a função ElaXto Sonoelastography, para avaliação elastográfica. Imagem do linfonodo a ser avaliado, com tecidos moles ao redor, foi realizada em plano sagital e a tela do monitor dividida em duas partes. À esquerda, foi obtida imagem do linfonodo ao exame convencional e, à direita, imagem elastográfica. Para aquisição da elastografia, o transdutor foi posicionado de forma perpendicular e movimentos verticais leves, rítmicos, de compressão e retração foram realizados sobre o linfonodo. Apenas foram realizadas imagens no momento em que a escala de compressão estivesse verde, ou seja, quando os movimentos e pressão exercidos sobre o linfonodo estivessem uniformes e regulares.

As imagens elastográficas obtidas em escala de cores do vermelho (macio) ao azul (rígido), juntamente com as imagens convencionais e Doppler, foram armazenadas na extensão DICOM para análise posterior em software MyLab Desk3 (Esaote Healthcare do Brasil). Entre cinco a dez imagens elastográficas foram adquiridas para cada linfonodo e, para cada uma delas, foi atribuído um escore, de 1 (macio) a 4 (rígido), de acordo com a porcentagem de cores presentes no interior do linfonodo, conforme proposto por Tan et al. (2010), sendo: escore 1, 80% ou mais da área total analisada do linfonodo colorida em vermelho; escore 2, 50 a 80% da área total do linfonodo colorida em vermelho; escore 3, 50 a 80% da área total do linfonodo colorida

em azul; escore 4, mais de 80% da área total do linfonodo colorida em azul. Atribuiu-se, ao linfonodo avaliado, o escore observado com maior frequência, que correspondeu ao grau de deformidade do tecido nodal, por meio do uso da escala cromática elastográfica qualitativa.

Análise dos resultados

As variáveis qualitativas e quantitativas foram tabuladas no programa Microsoft Office Excel 2010[®]. Foram calculadas as frequências absoluta e relativa das variáveis qualitativas e a média e desvio-padrão das variáveis quantitativas e realizada análise descritiva dos resultados obtidos.

Resultados

Foram avaliados 25 linfonodos superficiais positivos para formas amastigotas de *Leishmania* spp., pertencentes a 10 cães, com idade média de 3,5 anos, peso médio de 26,7 kg, 50% machos e 50% fêmeas. Oito cães não possuíam raça definida, um pertencia à raça Cane Corso e o outro à raça Teckel. Cinco cães foram provenientes do Ambulatório de Citologia Veterinária da Instituição, e cinco cães foram encaminhados do CCZ de Bauru para exame citológico de linfonodos, sendo essa região endêmica de leishmaniose. Dos dez cães avaliados, dois (2/10, 20%) apresentaram sintomatologia inespecífica. Um deles apresentou alteração de enzimas renais, anemia e trombocitopenia e o outro havia apresentado epistaxe há um mês e estava em bom estado geral, sendo que a maior carga parasitária foi observada nesse cão. Os demais cães (8/10, 80%) apresentaram lesões cutâneas, como áreas de alopecia, predominantemente ao redor dos olhos, ponta de orelhas e cauda, descamação, hiperqueratose, onicogribose. Em todos os cães (10/10, 100%), foi observado aumento de linfonodos. Sete cães (7/10, 70%) apresentaram linfadenomegalia generalizada, dois cães apresentaram aumento simétrico de linfonodos poplíteos (2/10, 20%) e um cão (1/10, 10%) apresentou aumento simétrico dos linfonodos cervicais superficiais. Dos 25 linfonodos avaliados, 15 eram poplíteos (15/25, 60%), nove cervicais superficiais (9/25, 36%) e um submandibular (1/25, 4%).

Com relação às dimensões dos linfonodos, analisadas ao modo-B, o valor médio do eixo-longo foi 2,63 cm ($\pm 0,85$) e do eixo-curto foi 1,19 cm ($\pm 0,32$). Levando-se em conta os diferentes linfocentros analisados, os poplíteos apresentaram eixo-longo e eixo-curto medindo 2,4 cm e 1,21 cm, respectivamente, os cervicais superficiais

apresentaram eixo-longo e eixo-curto de 3,1 cm e 1,19 cm, respectivamente, e o linfonodo submandibular, eixo-longo e eixo-curto de 1,8 cm e 1 cm, respectivamente. A RECEL média foi de 0,49 ($\pm 0,14$), sendo que em 20 linfonodos (20/25, 80%) a RECEL foi inferior a 0,6 e, nos linfonodos restantes (5/25, 20%) a RECEL foi superior a 0,6. Na maioria dos linfonodos acometidos pela doença, os contornos apresentaram-se irregulares (15/25, 60%), com bordas nítidas (21/25, 84%), com ausência de definição de tecido hilar (16/25, 64%) e de hiperecogenicidade de tecidos adjacentes (20/25, 80%). A ecotextura foi considerada heterogênea na minoria dos linfonodos avaliados (11/25, 44%), devido à presença de áreas nodulares hipocogênicas (5/25, 20%), halo hipocogênico ao redor (4/25, 16%), área nodular hiperecogênica (1/25, 4%) ou área nodular “em alvo” (1/25, 4%) (Figura 2).

À análise com Doppler colorido, pôde-se identificar vascularização na maioria dos linfonodos (24/25, 96%), enquanto com Power Doppler, a vascularização foi identificada em todos. Ademais, o Power Doppler possibilitou a visualização de vasos mais calibrosos em oito linfonodos (8/25, 32%), em comparação com o Doppler colorido. A distribuição vascular foi considerada hilar em 20 linfonodos (20/25, 80%) e hilar e periférica em cinco (5/25, 20%), sendo que em três linfonodos a vascularização foi considerada hilar e periférica apenas com Power Doppler (Figura 3). Em três linfonodos (3/25, 12%), identificou-se fluxo anômalo, em dois deles com aspecto puntiforme e radial e em um deles com aspecto pericapsular. Os valores médios do IR e do IP obtidos foram 0,63 ($\pm 0,07$) e 1,16 ($\pm 0,27$), respectivamente.

Com relação ao exame elastográfico, em dois linfonodos não foi possível analisar a imagem elastográfica, pois a escala de compressão não se obteve imagem satisfatória. Para a maior parte dos linfonodos restantes, a distribuição do escore elastográfico foi 2 (11/25, 44%) (Figura 4). Os demais linfonodos apresentaram escores 1 (6/25, 24%) e 3 (6/25, 24%) e, a nenhum, foi atribuído o escore 4.

Discussão

Ao conhecimento do autor, não há na literatura dados relacionados às características ultrassonográficas de linfonodos acometidos por *Leishmania* spp. e acredita-se que a técnica possa auxiliar no diagnóstico, que nem sempre é facilmente realizado devido aos sinais clínicos apresentados, que podem ser inespecíficos (KOSHI et al., 2001), e à variável sensibilidade de detecção do microrganismo nos aspirados de tecidos, entre

cães sintomáticos e assintomáticos (KOSHI et al., 2001; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

Em nível de saúde pública, destaca-se a preocupação com cães assintomáticos, conforme observado em dois cães nesse estudo, e que tenham diagnóstico falso-negativo para a doença, pois são potenciais disseminadores da leishmaniose para outros animais (REALE et al., 1999). Muitas vezes animais são encaminhados à rotina de pequenos animais devido a outras enfermidades e a leishmaniose é incidentalmente detectada. Tal fato ressalta a importância da obtenção de maior conhecimento dos efeitos do microrganismo sobre os diferentes órgãos, incluindo a detecção de alterações com ferramentas de imagem, como a ultrassonografia, que podem aumentar as chances de diagnóstico nesses animais (BÜKTE et al., 2003; BALTAZAR et al., 2016), a despeito do uso isolado de outras técnicas.

Em estudos prévios, linfadenomegalia generalizada ou simétrica também foi observada com alta frequência em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (CIARAMELLA et al., 1997; GIUNCHETTI et al., 2008). A frequência com que as alterações cutâneas puderam ser identificadas no presente estudo, também estão de acordo com estudo prévio (CIARAMELLA et al., 1997), em que ao menos 56% dos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* apresentaram dermatopatias como dermatite esfoliativa seca, alopecia difusa e peri-orbital e onicogribose. A doença renal como manifestação única da doença, assim como evidenciado em um cão nesse estudo, também foi previamente relatada em cão que apresentou alterações renais ultrassonográficas, confirmadas por exame histopatológico (BALTAZAR et al., 2016) e em alguns animais que apresentaram falência renal (CIARAMELLA et al., 1997).

O eixo-longo médio dos linfonodos avaliados nesse estudo foi superior ao valor observado em linfonodos superficiais normais e linfonodos com lesões não-neoplásicas em cães (NYMAN et al., 2006). Embora o valor aqui observado tenha sido substancialmente inferior àquele relatado para linfonodos profundos com lesões não-neoplásicas (SWARTE et al., 2011), a análise das dimensões nodais deve ser feita com cautela, uma vez que diferentes linfocentros apresentam variados formatos, que influenciam nas dimensões finais (MAYER et al., 2010; SILVER et al., 2012).

Uma das razões pelas quais linfonodos profundos apresentaram eixo-longo médio superior, provavelmente está relacionada à inclusão de linfonodos com formato mais alongado em condições fisiológicas, como os jejunais (AGTHE et al., 2009).

Ademais, o eixo-curto dos linfonodos acometidos por *Leishmania* spp. no presente estudo manteve-se próximo ao de linfonodos profundos com lesões não-neoplásicas (SWARTE et al., 2011), o que seria esperado, uma vez que o diagnóstico citológico dos linfonodos do presente estudo foi compatível com linfadenite parasitária.

A RECEL, método quantitativo de análise do formato do linfonodo, é amplamente utilizada após mensuração dos eixos curto e longo durante o exame ultrassonográfico, reduzindo a subjetividade da avaliação qualitativa do formato (NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011). Nos linfonodos do presente estudo, a RECEL média foi de 0.49, próxima do valor obtido para linfonodos superficiais considerados normais, com base nos exames citológico ou histopatológico e inferior aos valores obtidos para linfonodos reativos, para linfonodos com linfoma ou para linfonodos com metástase (NYMAN et al., 2005), o que sugere que linfonodos acometidos por *Leishmania* spp. apresentem formato próximo da normalidade, ou seja ovalado, apesar do aumento nas dimensões.

A presença de contornos irregulares observada com considerável frequência nos linfonodos desse estudo (15/25, 60%), também parece ser condição característica da leishmaniose, uma vez que foi observada em apenas 3% de linfonodos superficiais normais e em 6,2% de linfonodos com lesões não-neoplásicas em cães (NYMAN et al., 2005). Contudo, a irregularidade de contornos em linfonodos profundos de cães, também foi detectada com frequência expressiva por outros autores, tendo maior prevalência em linfonodos neoplásicos, em torno de 66,7%, e menor prevalência em linfonodos hiperplásicos ou inflamatórios, com frequência de 50% (SWARTE et al., 2011).

As bordas da maior parte dos linfonodos avaliados (21/25, 84%) apresentaram-se bem definidas e facilmente distinguíveis dos tecidos moles adjacentes. A boa delimitação das bordas nodais foi notada com maior prevalência em linfonodos superficiais com linfoma, em cães (NYMAN et al., 2005) e pôde ser observada com alta frequência tanto em linfonodos profundos com lesões não-neoplásicas como aqueles com lesões neoplásicas, em outro estudo (SWARTE et al., 2011).

Características ultrassonográficas variáveis, portanto, referentes a linfonodos acometidos por lesões semelhantes, podem ser observadas em diferentes estudos e muitos dados ainda se contradizem, motivo pelo qual ainda são necessárias pesquisas adicionais para elucidar esses aspectos. Um dos motivos pelo qual diferentes resultados estão disponíveis, pode estar relacionado a variações existentes nos linfonodos,

conforme sua localização anatômica, o que não é levado em conta nesses trabalhos, e realça a importância de estudos sendo realizados na tentativa de padronizar diferentes linfocentros com variadas técnicas de diagnóstico por imagem (AGTHE et al., 2009; MAYER et al., 2010; SILVER et al., 2012).

No presente estudo, a região hilar hiperecogênica não pôde ser definida ao exame modo-B, na maioria dos linfonodos (16/25, 64%). De acordo com estudos realizados em linfonodos de pacientes humanos, a substituição por tecido adiposo (RUBALTELLI et al., 1990), bem como a hiperplasia linfoide por etiologias inflamatória ou infecciosa podem ocasionar a perda de definição hilar, no último caso devido ao desenvolvimento de novos centros germinativos no interior do hilo (VASSALO et al., 1992). Essa justificativa é bastante plausível no que diz respeito aos linfonodos acometidos por *Leishmania* spp. no presente estudo, uma vez que a hiperplasia reativa foi relatada como o principal diagnóstico no exame citológico de linfonodos acometidos pela doença (MYLONAKIS et al., 2005).

Embora a heterogeneidade de linfonodos intra-abdominais tenha sido associada à malignidade, em cães e gatos (KINNS e MAI, 2007), também foi relatada em linfonodos superficiais benignos, metastáticos e linfomatosos (NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011), em cães, sendo detectada com maior frequência nos linfonodos reativos (NYMAN et al., 2005). Do mesmo modo, no presente estudo, observou-se heterogeneidade em parte dos linfonodos (11/25, 44%), devido à presença de áreas nodulares com aspecto em “alvo”, áreas hipoeecogênicas focais, ou devido à presença de halo hipoeecogênico em região correspondente ao córtex externo do linfonodo. Áreas hipoeecogênicas focais correspondem a regiões de inflamação e não são específicas de algum tipo específico de lesão, sendo encontradas tanto em alterações não-neoplásicas como neoplásicas (NYMAN e O'BRIEN, 2007). A presença de halo hipoeecogênico em região nodal periférica, foi relatada nos linfonodos jejunais (AGTHE et al., 2009) e em linfonodos cervicais superficiais de cães saudáveis (SILVER et al., 2012), havendo correlação com a idade inferior a 6 anos, no caso dos linfonodos jejunais, e por consequência da contínua exposição do trato intestinal desses cães jovens a antígenos. A exposição dos linfonodos desse estudo aos microrganismos é a provável justificativa da alteração descrita.

A hiperecogenicidade de tecidos adjacentes foi identificada com baixa frequência nos linfonodos desse estudo (5/25, 20%), e está de acordo com outro estudo,

em que esse tipo de alteração foi notado com frequência elevada em linfonodos neoplásicos e com baixa frequência em linfonodos reativos (SWARTE et al., 2011).

A avaliação de linfonodos com Doppler colorido e Power Doppler é de grande importância e tem fornecido informações mais consistentes e menos divergentes, no campo veterinário, em relação ao modo-B. O Power Doppler é mais sensível para captação de vasos de menor calibre, que emitem sinais Doppler mais fracos (STEINKAMP et al., 2002), motivo pelo qual foi possível detectar vascularização em todos os linfonodos no presente estudo com essa ferramenta, o que não foi observado com o Doppler colorido. Com o Power Doppler, também foi possível identificar a vascularização com maior clareza e calibre em oito linfonodos (32%) em relação ao Doppler colorido. A distribuição vascular nesse estudo foi realizada, portanto, com os dois métodos, e o fluxo hilar foi detectado na maioria dos linfonodos (80%), fluxo esse observado com alta prevalência em linfonodos normais e reativos (NYMAN et al., 2005). Embora o fluxo anômalo seja característico de linfonodos neoplásicos (CHAMMAS et al., 2016), pôde ser notado em três linfonodos desse estudo, como vascularização central e periférica com aspecto puntiforme e radial e vascularização pericapsular. Alguns tipos de vascularização anômala, como fluxo hilar deslocado e fluxo radial deformado, foram relatados em linfonodos acometidos por processos infecciosos como a tuberculose em pacientes humanos, devido à importante vasodilatação (STEINKAMP et al., 2002), sendo a provável causa da vascularização anômala identificada nos três linfonodos desse estudo.

Os valores médios do IR e do IP obtidos nesse estudo encontraram-se entre os valores médios obtidos para linfonodos superficiais reativos e os valores médios obtidos para linfonodos neoplásicos primários, em cães (NYMAN et al., 2005), o que sugere que a resistividade vascular de linfonodos acometidos por *Leishmania* spp. seja superior à de linfonodos reativos sem o microrganismo, mas inferior à resistividade de linfonodos neoplásicos, característica que também pode auxiliar no diagnóstico da enfermidade. Essa resistividade vascular aumentada poderia ser justificada em decorrência de um tecido nodal com menor complacência, pela hiperplasia e hipertrofia das zonas cortical e medular, conforme previamente descrito (LIMA et al., 2004). Em apenas um linfonodo, não foi possível captar traçado espectral arterial adequado, que possibilitasse o cálculo dos índices, valor inferior àquele relatado em estudo prévio, em que não foi possível mensurá-los em aproximadamente 20% dos animais com linfonodos reativos e malignos (NYMAN et al., 2005).

Com relação aos elastogramas obtidos nos linfonodos do presente estudo, à maioria dos linfonodos foram atribuídos o escore 2 (47,82%), referente a tecido de elasticidade intermediária e tendendo a macia, corroborando com outro estudo que demonstrou o mesmo em linfonodos com lesões não-neoplásicas, em cães (SEILER e GRIFFITH, 2018). Ao restante dos linfonodos atribuiu-se os escores 1 (26,09%) e 3 (26,09%), referentes a tecido macio e tecido intermediário, tendendo a rígido, respectivamente. Os valores de escores elastográficos intermediários, 2 e 3, descritos para a maioria dos linfonodos (52,18%) avaliados nesse estudo, condizem com os índices de resistividade e pulsatilidade obtidos, que são intermediários aos valores obtidos em linfonodos reativos e aos valores obtidos em linfonodos neoplásicos, previamente relatados (NYMAN et al., 2005). Os valores obtidos corroboram também com estudo prévio, em que foi observado que a maior parte de linfonodos reativos obtiveram escores compatíveis com tecido de elasticidade macia (ALAM et al., 2008).

A ultrassonografia convencional e Doppler, bem como a elastossonografia, têm demonstrado resultados promissores, particularmente na diferenciação de linfonodos neoplásicos e não-neoplásicos (SWARTE et al., 2011; SEILER e GRIFFITH, 2018). A caracterização de lesões mais específicas, como a linfadenite parasitária por *Leishmania* spp. entretanto, ainda é desafiadora, ressaltando a importância de estudos como esse. As lesões descritas serão de grande importância para o auxílio ao diagnóstico na avaliação de linfonodos pertencentes a cães com suspeita para a enfermidade.

Conclusões

Os linfonodos parasitados por *Leishmania* spp. apresentam, como principais características ultrassonográficas, o aumento de dimensões associado à preservação de seu formato, contornos predominantemente irregulares, ausência de definição do tecido hilar e ecotextura heterogênea em alguns linfonodos devido à presença de áreas nodulares ou halo hipocogênico periférico. Os IR e IP apresentam-se superiores em relação aos valores de normalidade descritos e os escores de elasticidade predominantes são referentes a tecidos com característica macia.

Abreviações

CAAF: citologia aspirativa por agulha fina; IP: Índice de pulsatilidade; IR: Índice de resistividade; LV: leishmaniose visceral; OMS: Organização Mundial da Saúde; RECEL: Relação entre eixo curto e eixo longo.

Agradecimentos

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro (processo FAPESP nº2012/02484-2).

Aos veterinários Valéria Medina Camprigher, Cláudia Cilene Barbosa Gomiere, Mário Silva e Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez e ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru.

Contribuições dos autores

O estudo foi criado e delineado por AFB e MJM. Os dados foram coletados e analisados por AFB, MCG, SPB, CRD, NSR e MJM. O artigo foi inicialmente escrito por AFB e MJM e seu conteúdo posteriormente revisado criteriosamente por todos os autores, que aprovaram a versão final.

Comitê de ética e termo de consentimento

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ, UNESP, Campus Botucatu, sob protocolo 136/2016. Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos foram assinados pelos proprietários dos cães incluídos nesse estudo.

Conflitos de interesse

Os autores declararam não haver conflitos de interesse.

Referências

1. World Health Organization/Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. Washington, USA. 2018. Available at: www.paho.org/leishmaniasis.
2. Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q*. 1992;45:267-75.
3. Bükte Y, Nazaroğlu H, Mete A, Yılmaz F. Visceral leishmaniasis with multiple nodular lesions of the liver and spleen: CT and sonography findings. *Abdom Imaging*. 2004;29:82-84.

4. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30:1269-81.
5. Mahmoud MZ. Assessment of visceral leishmaniasis consequences using ultrasound. *O J Rad.* 2014;4:201-6.
6. Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol J. Himmunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest.* 1997;9:439-440.
7. Tafuri WL, De Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological Picture o fone case report from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001;3:203-12.
8. Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;121:23-33.
9. Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:82-6.
10. Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol.* 2005;34:243-7.
11. Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 2004;92:43-53.
12. Koshi A, Al-Azmi WM, Narayanan S, Grover S, Hira PR, Idris M, Madda JP. Leishmaniasis diagnosed by liver biopsy: management of two atypical cases. *J Clin Gastroenterol.* 2001;32:266-7.
13. Baltazar PI, Moura LS, Pessoa GT, Rodrigues RPS, Sanches MP, Diniz AN, Sousa FCA, Guerra PC, Neves WC, Giglio RF, Alves JJRP, Souza FAL, Braga JFV, Alves FR. Comparative B-mode and Doppler renal ultrasonography with histopathological findings in dogs positive for canine visceral leishmaniasis. *Microsc Res Tech.* 2016;79:637-45.
14. Nyman HT, Kristensen AT, Skovgaard IM, McEvoy FJ. Characterization of normal and abnormal canine superficial lymph nodes using gray-scale B-mode, color flow

- mapping, power, and spectral Doppler ultrasonography: a multivariate study. *Vet Radiol Ultrasound*. 2005;46:404-410.
15. Arda K, Ciledag N, Gumusdag PD. Differential diagnosis of malignant cervical lymph nodes at real-time ultrasonographic elastography and Doppler ultrasonography. *Hungarian Radiology Online*. 2010;10:1-4.
 16. Swarte M, Alexander K, Rannow B, d'Anjou MA, Blond L, Beauchamp G. Comparison of sonographic features of benign and neoplastic deep lymph nodes in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2011;52:451-6.
 17. Steinkamp HJ, Wissgott C, Rademaker J, Felix R. Current status of power Doppler and color Doppler sonography in the differential diagnosis of lymph node lesions. *Eur Radiol*. 2002;12:1785-93.
 18. Tan R, Xiao Y, He Q. Ultrasound elastography: its potential role in assessment of cervical lymphadenopathy. *Acad Radiol*. 2010;17:849-55.
 19. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2931-5.
 20. Ciaramella P, Oliva G, De Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141:539-43.
 21. Nyman HT, Lee MH, McEvoy FJ, Nielsen OL, Martinussen T, Kristensen AT. Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant superficial lymph nodes in dogs. *Am J Vet Res*. 2006;978-84.
 22. Mayer MN, Lawson JA, Silver TI. Sonographic characteristics of presumptively normal canine medial iliac and superficial inguinal lymph nodes. *Vet Radiol and Ultrasound*. 2010;51(6):638-641.
 23. Silver TI, Lawson JA, Mayer MN. Sonographic characteristics of presumptively normal main axillary and superficial cervical lymph nodes in dogs. *Am J Vet Res*. 2012;73:1200-1206.
 24. Agthe P, Caine AR, Posch B, Herrtage ME. Ultrasonographic appearance of jejunal lymph nodes in dogs without clinical signs of gastrointestinal disease. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009;50:195-200.

25. Rubaltelli L, Proto E, Salmaso R, Bortoletto P, Candiani F, Cagol P. Sonography of abnormal lymph nodes in vitro: correlation of sonographic and histologic findings. *AJR*. 1990;155:1241-1244.
26. Kinns J, Mai W. Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes. *Vet Radiol Ultrasound*. 2007;48:565-9.
27. Nyman HT, O'Brien RT. The sonographic evaluation of lymph nodes. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2007;22:128-37.
28. Steinkamp HJ, Wissgott C, Rademaker J, Felix R. Current status of power Doppler and color Doppler sonography in the differential diagnosis of lymph node lesions. *Eur Radiol*. 2002;12:1785-93.
29. Chammas MC, Macedo TAA, Lo VW, Gomes AC, Juliano A, Cerri GG. Predicting malignant neck lymphadenopathy using color duplex sonography based on multivariate analysis. *J Clin Ultrasound*. 2016;0:1-8.

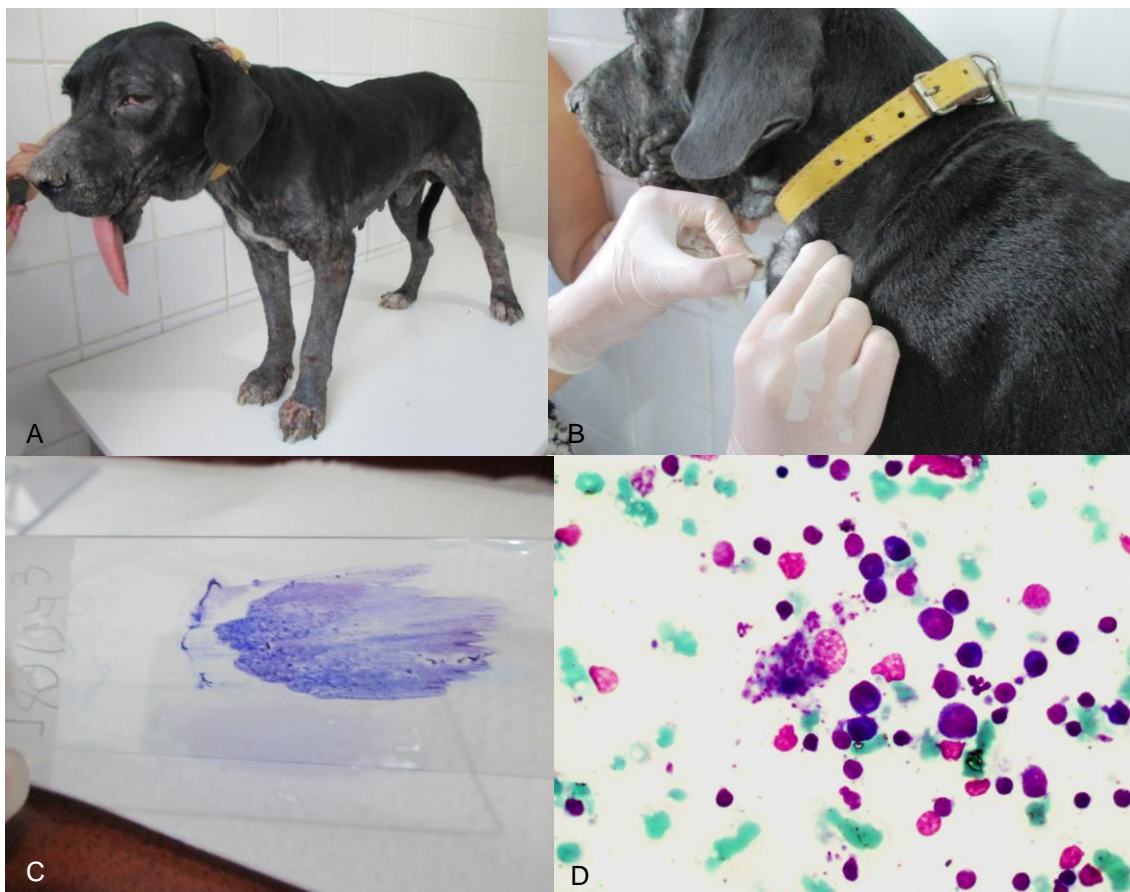


Figura 1. (A) Cão apresentando sinais clínicos decorrentes da leishmaniose: áreas alopécicas ao redor dos olhos, região ventral e membros, hiperqueratose do focinho, onicogrifose e dermatite esfoliativa, com áreas de ulceração; (B) Punção do linfonodo cervical superficial esquerdo; (C) Esfregaço realizado com o material obtido do linfonodo. Coloração Panótico. Objetiva 60x; (D) Análise do esfregaço à microscopia de luz, é possível observar a presença de macrófago, no centro da lâmina, englobando microrganismos puntiformes, compatíveis com *Leishmania* spp.

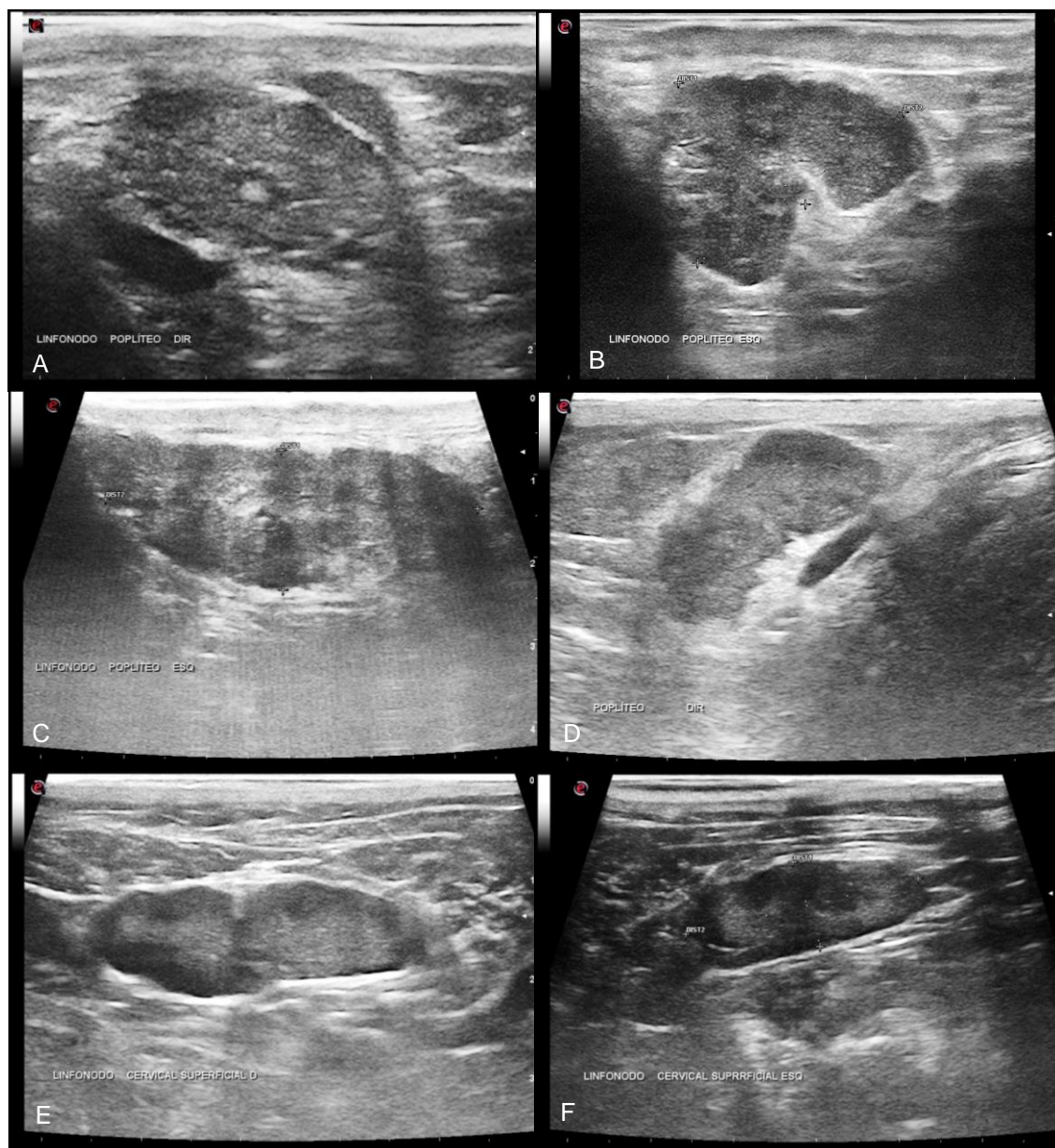


Figura 2. Imagens ultrassonográficas ao modo-B de linfonodos superficiais de cães acometidos por *Leishmania* spp. O parênquima apresenta-se heterogêneo em todas as imagens e a irregularidade de contornos evidente em (A), (B), (C), (D) e (E). Em (A), é possível observar imagem nodular com aspecto em “alvo” no centro do parênquima. Em (B), (C), (D) e (F), há áreas focais hipocogênicas em permeio ao parênquima. Em (D), a gordura de tecidos adjacentes apresenta-se hiperecogênica. Em (E), nota-se halo hipocogênico em topografia de córtex externa do linfonodo. Em (C) e (D) os linfonodos poplíteos assumem formato mais alongado em comparação com os poplíteos em (A) e (B).

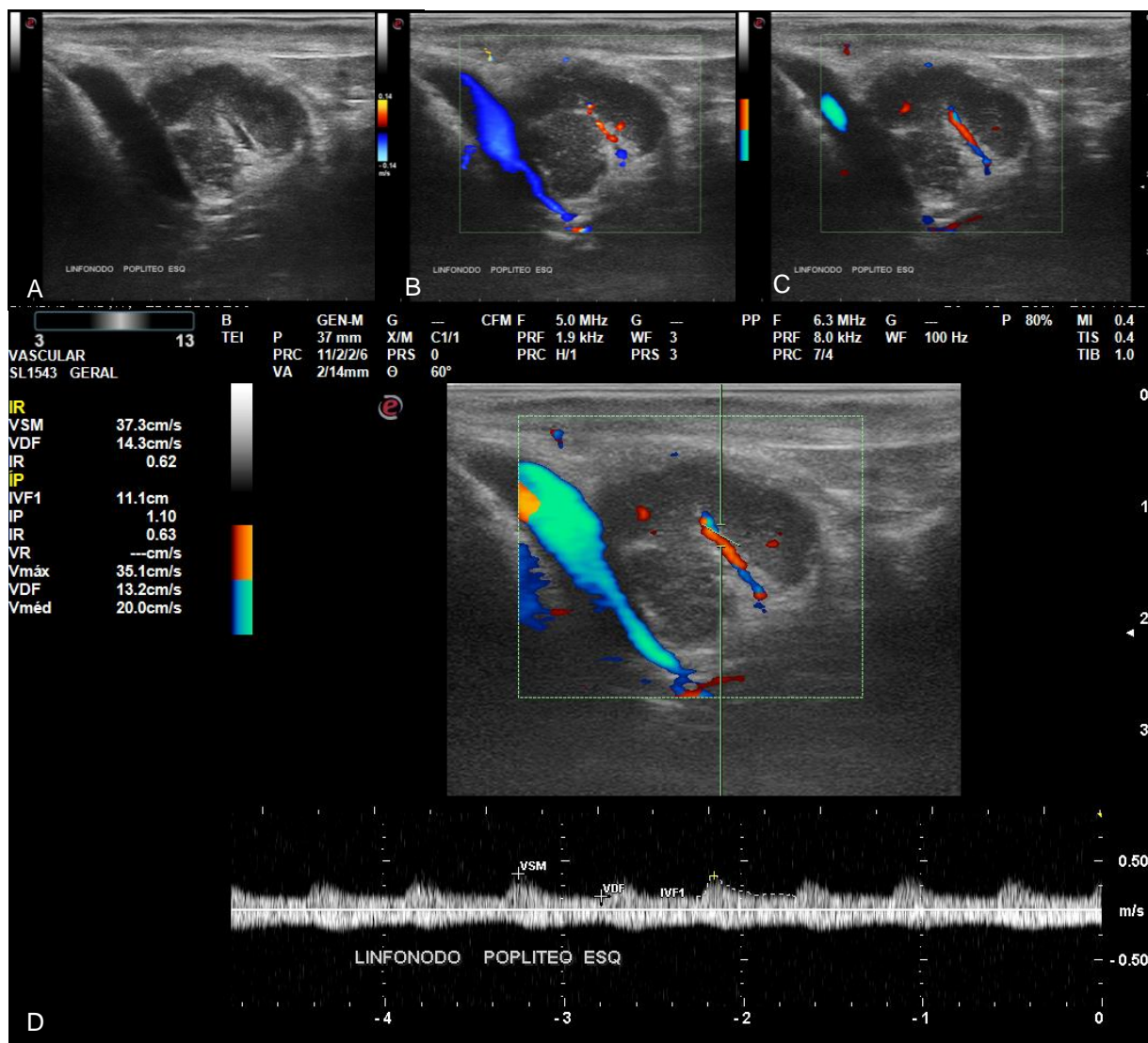


Figura 3. Imagens ultrassonográficas em modo-B (A), Doppler colorido (B), Power Doppler (C) e Doppler pulsado (D), referentes ao mesmo linfonodo poplíteo, em cão. Em (A), é possível notar o trajeto vascular hilar dilatado, mesmo sem o auxílio do Doppler. Em (B), observa-se discreta vascularização hilar ao Doppler colorido. Ao Power Doppler (C), verifica-se vascularização mais evidente, ainda com aspecto hilar. Ao Doppler pulsado (D), nota-se o traçado espectral arterial obtido em região hilar, e os índices de resisitividade (IR); 0,62; e de pulsatilidade (IP); 1,1.

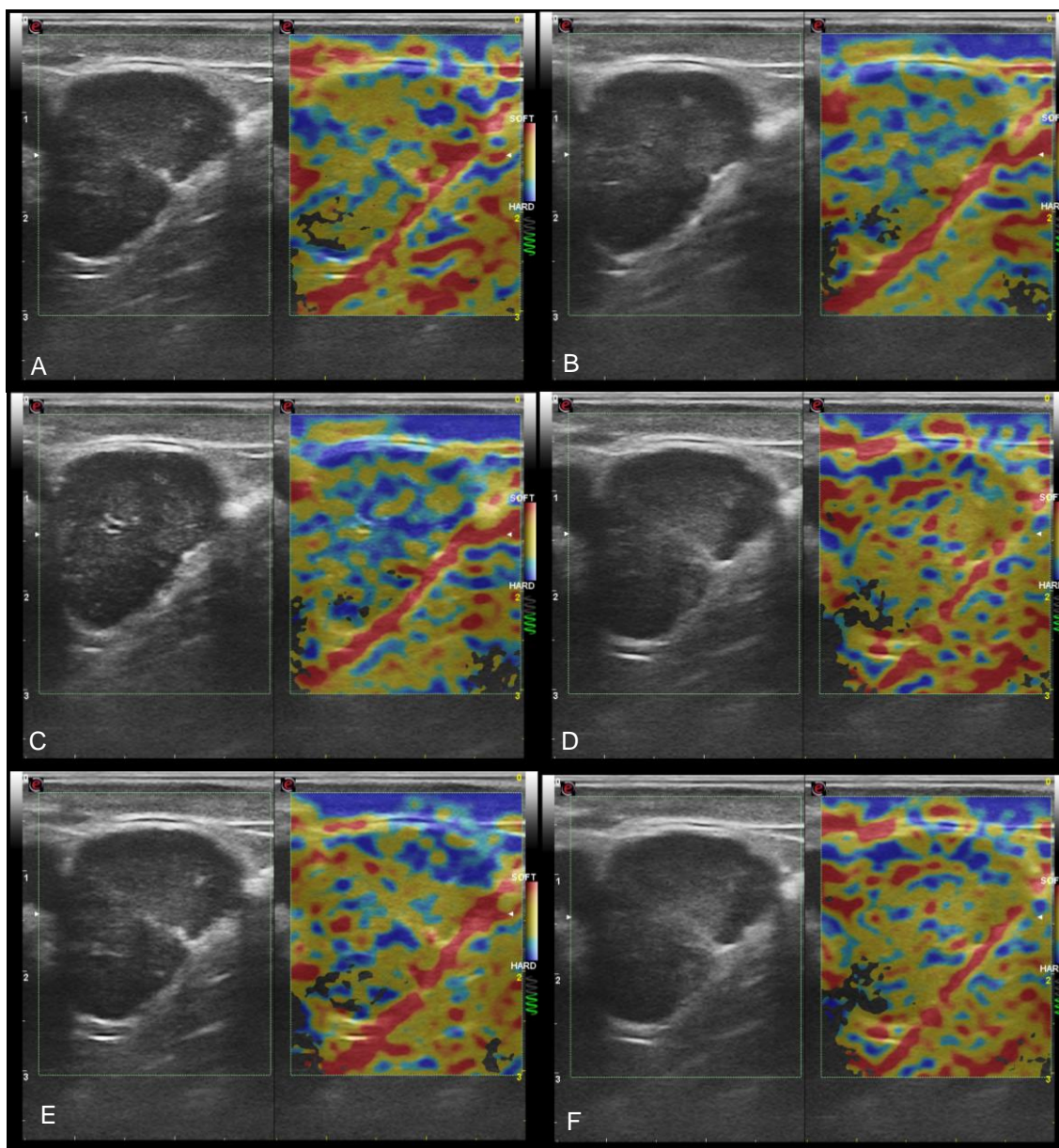


Figura 4. Elastogramas do mesmo linfonodo poplíteo de cão, obtidas em sequência, possibilitam caracterizar o escore 2 para as imagens (A), (B), (D), (E) e (F), que apresentam 50 a 80% da área total do linfonodo preenchida pelas cores vermelha (macio) ou amarela (intermediário). O escore 3 foi atribuído para o elastograma (C), uma vez que é possível observar de 50 a 80% da área total do linfonodo preenchido pela cor azul (rígido). O escore final atribuído ao linfonodo foi o 2, observado com maior frequência nas imagens.

CAPÍTULO 4

*Discussão geral, conclusões gerais
e bibliografia*

DISCUSSÃO GERAL

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a ultrassonografia é importante técnica diagnóstica capaz de auxiliar na distinção entre lesões neoplásicas e não-neoplásicas e na caracterização de lesões nodais específicas, como no caso do parasitismo por *Leishmania* spp.

Características relacionadas à vascularização, obtidas com a ferramenta Doppler, tanto no modo colorido e Power como no pulsado, apresentaram-se distintas entre linfonodos neoplásicos e não-neoplásicos e parecem ser mais eficazes para diferenciá-los em relação às características avaliadas ao modo-B, uma vez que apenas as dimensões nodais apresentaram diferenças significativas, o que também foi observado por outros autores (SWARTE et al., 2011). O escore elastográfico, obtido com a elastossonografia, também diferiu entre os grupos, assim como observado em estudos com linfonodos de pacientes humanos (BHATIA et al., 2011; KURT et al., 2013), e os resultados sugerem que a técnica possa ser aplicada na distinção de lesões neoplásicas e não-neoplásicas na rotina ultrassonográfica de pequenos animais.

Os linfonodos de cães acometidos por *Leishmania* spp. apresentaram características ultrassonográficas, ao modo-B e Doppler, compatíveis com aquelas observadas em linfonodos reativos (NYMAN et al., 2005). Contudo, deve-se ressaltar que a irregularidade de contornos foi característica notada com alta frequência nessas amostras e não é comumente observada, tanto em linfonodos não-neoplásicos como em malignos, de acordo com dados disponíveis na literatura (NYMAN et al., 2005; SWARTE et al., 2011). Ademais, os índices de resistividade e pulsatilidade médios foram superiores àqueles descritos para linfonodos reativos e alguns escores elastográficos mantiveram-se em nível intermediário, entre tecidos com consistência macia e rígida.

CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos no primeiro estudo, sob as condições realizadas, permitem as seguintes conclusões, com relação à distinção entre linfonodos com lesões neoplásicas e não-neoplásicas:

1. Ao modo-B, houve significativo aumento nas dimensões e RECEL de linfonodos neoplásicos;
2. Ao Doppler colorido e Power Doppler, a distribuição do fluxo sanguíneo foi predominantemente hilar em linfonodos não-neoplásicos e hilar e periférica em linfonodos neoplásicos;
3. Ao Doppler pulsado, o IR e o IP foram superiores nos linfonodos neoplásicos;
4. A distribuição do escore elastográfico variou entre eles, apresentando aspecto mais rígido nos linfonodos malignos.

O segundo estudo, embora preliminar, permitiu as seguintes conclusões a respeito de linfonodos parasitados por *Leishmania* spp.:

1. Ao modo-B, observou-se com alta frequência, linfonodos com formato alongado, contornos irregulares, bordas nítidas e ausência de definição de tecido hilar;
2. Ao Doppler colorido e Power Doppler, observou-se vascularização com aspecto predominantemente hilar;
3. Ao Doppler pulsado, o valor médio do IR e do IP foram de 0.63 (\pm 0.07) e 1.16 (\pm 0.27), respectivamente;
4. O escore elastográfico predominante foi o 2, referente a tecido de elasticidade intermediária, tendendo a macia.

REFERÊNCIAS

ADIBELLI, Z.H.; ÜNAL, G.; GÜL, E.; USLU, F.; KOÇAK, U.; ABALI, Y. Differentiation of benign and malignant cervical lymph nodes: value of B-mode and color Doppler sonography. *European Journal of Radiology*, v.28, p.230-234, 1998.

AGTHE, P.; CAINE, A.R.; POSCH, B.; HERRTAGE, M.E. Ultrasonographic appearance of jejunal lymph nodes in dogs without clinical signs of gastrointestinal disease. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.50, n.2, p.195-200, 2009.

AHUJA, A.; YING, M.; KING, A.; YUEN, H.Y. Lymph node hilus: gray scale and power Doppler sonography of cervical nodes. *Journal of Ultrasound in Medicine*, v.20, p.987-992, 2001.

AHUJA, A.; YING, M. Sonographic evaluation of cervical lymphadenopathy: is Power Doppler sonography routinely indicated? *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.29, n.3, p.353-359, 2003.

ALAM, F.; NAITO, K.; HORIGUCHI, J.; FUKUDA, H.; TACHIKAKE, T.; ITO, K. Accuracy of sonographic elastography in the differential diagnosis of enlarged cervical lymph nodes: comparison with conventional B-mode sonography. *American Journal of Roentgenology*, v.191, p.604-610, 2008.

ALDER, D.; BASS, D.; SPORRI, M.; KIRCHER, P.; OHLERTH, S. Does real-time elastography aid in differentiating canine splenic nodules? *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v.155, p. 491-496, 2013.

ALVAREZ, S.; AÑORBE, E.; ALCORTA, P.; LÓPEZ, F.; ALONSO, I.; CORTÉS, J. Role of sonography in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer: a systematic review. *American Journal of Roentgenology*, v.186, p. 1342-1348, 2006.

AMORES-FUSTER, I.; CRIPPS, P.; GRAHAM, P.; MARRINGTON, A.M.; BLACKWOOD, L. The diagnostic utility of lymph node cytology samples in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, v.56, n.2, 2015.

ARDA, K.; CILEDAG, N.; GUMUSDAG, P.D. Differential diagnosis of malignant cervical lymph nodes at real-time ultrasonographic elastography and Doppler ultrasonography. *Hungarian Radiology Online*, v.10, p.1-4, 2010.

ARIJI, Y.; KIMURA, Y.; HAYASHI, N.; ONITSUKA, T.; YONETSU, K.; HAYASHI, K.; ARIJI, E.; KOBAYASHI, T.; NAKAMURA, T. Power Doppler sonography of cervical lymph nodes in patients with head and neck cancer. *American Journal of Neuroradiology*, v.19, p.303-307, 1998.

ASTERIA, C.; GIOVANARDI, A.; PIZZOCARO, A.; COZZAGLIO, L.; MORABITO, A.; SOMALVICO, F.; ZOPPO, A. US-Elastography in the differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. *Thyroid*, v.18, n.5, p. 523-531, 2008.

BAMBER, J.C.; COSGROVE, D.; DIETRICH, C.F.; FROMAGEAU, J.; BOJUNGA, J.; CALLIADA, F.; CANTISANI, V.; CORREAS, J.M.; D'ONOFRIO, M.; DRAGONAKI, E.E.; FINK, M.; FRIEDRICH-RUST, M.; GILJA, O.H.; HAVRE, R.F.; JENSSEN, C.; KLAUSER, A.S.; OHLINGER, R.; SAFTOIU, A.; SCHAEFER, F.; SPOREA, I.; PISCAGLIA, F. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology. *Ultraschall in der Medizin*, v.34, p.169-184, 2013.

BARRETT, T.; CHOYKE, P.L.; KOBAYASHI, H. Imaging of the lymphatic system: new horizons. *Contrast Media and Molecular Imaging*, v.1, p.230-245, 2006.

BEZUIDENHOUT, A.J. The lymphatic system. In: EVANS, H.E. *Miller's Anatomy of the Dog*. 4ed. Philadelphia: WB Saunders, 2013. 535-562p.

BHATIA, K.S.S.; CHO, C.C.M.; YUEN, Y.; RASALKAR, D.D.; KING, A.D.; AHUJA, A.T. Real-time qualitative ultrasound elastography of cervical lymph nodes in routine clinical practice: interobserver agreement and correlation with malignancy. *Journal of Ultrasound in Medicine and Biology*, v.36, n.12, p.1990-1997, 2010.

BINDER, M.; KITTLER, H.; STEINER, A.; DORFFNER, R.; WOLFF, K.; PEHAMBERGER, H. Lymph node sonography versus palpation for detecting recurrent

disease in patients with malignant melanoma. *European Journal of Cancer*, v.33, p.1805-1808, 1997.

BRNIC, Z.; HEBRANG, A. Usefulness of Doppler waveform analysis in differential diagnosis of cervical lymphadenopathy. *European Radiology*, v.13, p.175-180, 2003.

BURNS, G.O.; SCRIVANI, P.V.; THOMPSON, M.S.; ERB, H.N. Relation between age, body weight, and medial retropharyngeal lymph node size in apparently healthy dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.49, n.3, p.277-281, 2008.

CARVALHO, C.F. Ultrassonografia Doppler de linfonodos. In: CARVALHO, C.F. *Ultrassonografia Doppler em Pequenos Animais*. 1ed. São Paulo: Roca, 2009. cap.12, p.178-183.

CHAMMAS, M.C.; LUNDBERG, J.S.; JULIANO, A.G.; SAITO, O.C.; MARCELINO, A.S.Z.; CERRI, G.G. Linfonodos cervicais: um dilema para o ultrassonografista. *Radiologia Brasileira*, v.37, n.5, p.357-364, 2004.

CHAMMAS, M.C.; MACEDO, T.A.A.; LO, V.W.; GOMES, A.C.; JULIANO, A.; CERRI, G.G. Predicting malignant neck lymphadenopathy using color duplex sonography based on multivariate analysis. *Journal of Clinical Ultrasound*, v.44, n.9, p.587-594, 2016.

CHANG, S.; CHANG, C.; CHANG, T.; WONG, M. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.227, n.10, p.1625-1629, 2005.

CHANG, D.; YUAN, A.; YU, C.; LUH, K.; KUO, S.; YANG, P. Differentiation of benign and malignant cervical lymph nodes with color Doppler sonography. *American Journal of Roentgenology*, v.162, p.965-968, 1994.

CHOI, M.Y.; LEE, J.W.; JANG, K.J. Distinction between benign and malignant causes of cervical, axillary, and inguinal lymphadenopathy: value of Doppler spectral waveform analysis. *American Journal of Roentgenology*, v.165, p.981-984, 1995.

CLARKE, C.J. Lymphoreticular system. In: DAVIDSON, M.; ELSE, R.; LUMSDEN, J. *Manual of Small Animal Clinical Pathology*. 1ed. Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association, 1998. cap.6, 227-231p.

COUTO, C.G. Hematology and immunology. In: COUTO, C.G.; NELSON, R.W. *Small Animal Internal Medicine*. 5ed. St. Louis: Mosby, 2015. cap.12, 1165-1173p.

COWEL, R.L.; DORSEY, K.E.; MEINKOTH, J.H. Lymph node cytology. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.33, p.47-67, 2003.

DANFORTH, D.N.; FINDLAY, P.A.; MCDONALD, H.D.; LIPPMAN, M.E.; REICHERT, C.M.; D'ANGELO, T.; GORRELL, C.R.; GERBER, N.L.; LICHTER, A.S.; ROSENBERG, S.A. Complete axillary lymph node dissection for stage I-II carcinoma of the breast. *Journal of Clinical Oncology*, v.4, p.655-662, 1986.

DANGORE-KHASBAGE, S.; DEGWEKAR, S.S.; BHOWATE, R.R.; BANODE, P.J.; BHAKE, A.; CHOUDHARY, M.S.; LOHE, V.K. Utility of color Doppler ultrasound in evaluating the status of cervical lymph nodes in oral cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v.108, n.2, p.255-263, 2009.

D'ANJOU, M.A.; CARMEL, E.N. Abdominal cavity, lymph nodes and great vessels. In: PENNINCK, D.; D'ANJOU, M.A. *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. 2ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2015. cap.15, 455-459p.

DRAGONI, F.; CARTONI, C.; PESCARMONA, E.; CHIAROTTI, F.; PUOPOLO, M.; ORSI, E.; PIGNOLONI, P.; GREGORIS, C.; MANDELLI, F. The role of high resolution pulsed and color Doppler ultrasound in the differential diagnosis of benign and malignant lymphadenopathy – results of multivariate analysis. *Cancer*, v.85, p. 2485-2490, 1999.

DUDEA, S.M.; BOTAR-JID, C.; DUMITRIU, D.; VASILESCU, D.; MANOLE, S.; LENGHEL, M.L. Differentiating benign from malignant superficial lymph nodes with sonoelastography. *Medical Ultrasonography Journal*, v.15, n.2, p.132-139, 2013.

ESEN, G. Ultrasound of superficial lymph nodes. *European Journal of Radiology*, v.58, p.345-359, 2006.

FELICIANO, M.A.R.; MARONEZI, M.C.; PAVAN, L.; CASTANHEIRA, T.L.; SIMÕES, A.P.R.; CARVALHO, C.F.; CANOLA, J.C.; VICENTE, W.R.R. ARFI elastography as a complementary diagnostic method for mammary neoplasia in female dogs – preliminary results. *Journal of Small Animal Practice*, v.55, p.504-508, 2014.

FELICIANO, M.A.R.; MARONEZI, M.C.; CRIVELLENTI, L.Z.; CRIVELLENTI, S.B.; SIMÕES, A.P.R.; BRITO, M.B.S.; GARCIA, P.H.S.; VICENTE, W.R.R. Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography of the spleen in healthy adult cats – a preliminary study. *Journal of Small Animal Practice*, v.56, n.3, p.180-183, 2015a.

FELICIANO, M.A.R.; MARONEZI, M.C.; SIMÕES, A.P.R.; USCATEGUI, R.R.; MACIEL, G.S.; CARVALHO, C.F.; CANOLA, J.C.; VICENTE, W.R.R. Acoustic radiation force impulse elastography of prostate and testes of healthy dogs: preliminary results. *Journal of Small Animal Practice*, v.56, n.5, p.320-324, 2015b.

FELICIANO, M.A.R.; MARONEZI, M.C.; SIMÕES, A.P.R.; MACIEL, G.S.; PAVAN, L.; GASSER, B.; SILVA, P.; USCATEGUI, R.R.; CARVALHO, C.F.; CANOLA, J.C.; VICENTE, W.R.R. Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography of testicular disorders in dogs: preliminary results. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, n.2, p.283-291, 2016.

FIGHERA, R.A.; GRAÇA, D.L. Sistema Hematopoético. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. *Patologia Veterinária*. 2ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap.6, p.316-348.

FONSECA-PINTO, A.C.B.C. *Radiologia convencional e tomografia computadorizada na avaliação do tórax de cadelas com neoplasias mamárias malignas*. 2003. 103f. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; GUELFY, J.F. *Color atlas of cancer cytology of the dog and the cat*. 1ed. St. Louis: Mosby, 1994. 243-267p.

FRAQUELLI, M., RIGAMONTI, C.; CASAZZA, G.; CONTE, D.; DONATO, M.F.; RONCHI, G.; COLOMBO, M. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut*, v.56, n.7, p.968-973, 2007.

FREITAS, R.; COSTA, M.V.; SCHNEIDER, S.V.; NICOLAU, M.A.; MARUSSI, E. Accuracy of ultrasound and clinical examination in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, v.17, n.3, p.240-244, 1991.

FRULIO, N.; TRILLAUD, H. Ultrasound elastography in liver. *Diagnostic and Interventional Imaging*, v.94, p.515-534, 2013.

FRY, M.M.; MCGAVIN, M.D. Bone marrow, Blood Cells and the Lymphatic System. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2013. cap.13, p. 775-780.

GIOVAGNORIO, F.; GALLUZZO, M.; ANDREOLI, C.; DE, C.M.; DAVID, V. Color Doppler sonography in the evaluation of superficial lymphomatous lymph nodes. *Journal of Ultrasound in Medicine*, v.21, p. 403-408, 2002.

GLINSKA-SUCHOCKA, K.; JANKOWSKI, M.; KUBIAK, K.; SPUZAK, J.; DZIMIRA, S.; NICPON, J. Application of shear wave elastography in the diagnosis of mammary gland neoplasm in dogs. *Journal of Veterinary Sciences*, v.16, n.3, p.477-482, 2013.

GLINSKA-SUCHOCKA, K.; JANKOWSKI, M.; KUBIAK, K.; SPUZAK, J.; DZIMIRA, S. Sonoelastography in differentiation of benign and malignant testicular lesions in dogs. *Journal of Veterinary Sciences*, v.17, n.3, p.487-491, 2014.

GRETZ, J.E.; ANDERSON, A.O.; SHAW, S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunological Reviews*, v.156, p.11-24, 1997.

GRIFFITHS, G.L.; LUMSDEN, J.H.; VALLI, V.E.O. Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, v.13, n.1, p.13-17, 1984.

HALL, T.J. Beyond the basics: elasticity imaging with US. *Radiographics*, v.23, p.1657-1671, 2003.

HILLERS, K.R.; DERNELL, W.S.; LAFFERTY, M.H.; WITHROW, S.J.; LANA, S.E. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.226, n.8, p.1364-1367, 2005.

HOLDSWORTH, A.; BRADLEY, K.; BIRCH, S.; BROWNE, W.J.; BARBERET, V. Elastography of the normal canine liver, spleen and kidneys. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.55, n.6, p.620-627, 2014.

HUWART, L.; PEETERS, F.; SINKUS, R.; ANNET, L.; SALAMEH, N.; TER BEEK, L.C.; HORSMANS, Y.; VAN BEERS, B.E. Liver fibrosis: non-invasive assessment with MR elastography. *NMR in Biomedicine*, v.19, n.2, p.173-179, 2006.

JEON, S.; LEE, G.; LEE, S.; KIM, H.; YU, D.; CHOI, J. Ultrasonographic elastography of the liver, spleen, kidneys, and prostate in clinically normal beagle dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.56, n.4, p.425-431, 2015.

KINNS, J.; MAI, W. Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.48, n.6, p.565-569, 2007.

KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. Immune system and lymphatic organs (organa lymphopoetica). In: KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals – Textbook and Color Atlas*. 6ed. Stuttgart: Schattauer, 2014. cap.13, 451-464p.

KRICK, E.L.; BILLINGS, A.P.; SHOFER, F.S.; WATANABE, S.; SORENMO, K.U. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.7, n.2, p.130-138, 2009.

KURT, A.; TATAR, I.G.; IPEK, A.; HEKIMOGLU, B. B-mode and elastosonographic evaluation to determine the reference elastography values for cervical lymph nodes. *International Scholarly Research Notices: Radiology*, v.2013, p.1-5, 2013.

LANGENBACH, A.; MCMANUS, P.M.; HENDRICK, M.J.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K.U. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.218, n.9, p.1424-1428, 2001.

LLABRÉS-DÍAZ, F.J. Ultrasonography of the medial iliac lymph nodes in the dog. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.45, n.2, p.156-165, 2004.

LYSHCHIK, A.; HIGASHI, T.; ASATO, R.; TANAKA, S.; ITO, J.; HIRAOKA, M.; INSANA, M.F.; BRILL, A.B.; SAGA, T.; TOGASHI, K. Cervical lymph node metastases: diagnosis at sonoelastography – initial experience. *Radiology*, v.243, p.258-267, 2007.

LANGENBACH, A.; MCMANUS, P.M.; HENDRICK, M.J.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K.U. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.218, n.9, p.1424-1428, 2001.

LEBOULLEUX, S.; GIRARD, E.; ROSE, M.; TRAVAGLI, J.P.; SABBAH, N.; CAILLOU, B.; HARTL, D.M.; LASSAU, N.; BAUDIN, E.; SCHLUMBERGER, M. Ultrasound criteria of malignancy for cervical lymph nodes in patients followed up for differentiated thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.92, n.9, p.3590-3594, 2007.

LENGHEL, L.M.; BOLBOACA, S.D.; BOTAR-JID, C.; BACIUT, G.; DUDEA, S.M. The value of a new score for sonoelastographic differentiation between benign and malignant cervical lymph nodes. *Medical Ultrasonography*, v.14, p.271-277, 2012.

MACNEILL, A.L. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Topics in Companion Animal Medicine*, v.26, n.2, p.62-76, 2011.

MARONEZI, M.C.; FELICIANO, M.A.R.; CRIVELLENTI, L.Z.; SIMÕES, AP.R.; BARTLEWSKI, P.M.; GILL, I.; CANOLA, J.C.C.; VICENTE, W.R.R. Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography of the spleen in healthy dogs of different ages. *Journal of Small Animal Practice*, v.56, n.6, p.393-397, 2015.

MAYER, M.N.; LAWSON, J.A.; SILVER, T.I. Sonographic characteristics of presumptively normal canine medial iliac and superficial inguinal lymph nodes. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.51, n.6, p.638-641, 2010.

MESSICK, J.B. The lymph nodes. In: COWEL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. Diagnostic cytology and hematology of the dog and the cat. 4ed. St Louis: Mosby Year Book Inc, 2013. 179-192p.

MILLS, J.N. Lymph node cytology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.19, n.4, p.697-717, 1989.

MILSOM, J.W.; CZYCRO, C.; HULL, T.L.; STRONG, S.A.; FAZIO, V.W. Preoperative biopsy of pararectal lymph nodes in rectal cancer using endoluminal ultrasonography. *Diseases of the colon and rectum*, v.37, p.364-368, 1994.

MONSOUR, P.D.; SAUSE, W.T.; AVENT, J.M.; NOYES, R.D. Local control following therapeutic nodal dissection for melanoma. *Journal of Surgical Oncology*, v.54, p.18-22, 1993.

MORRICE, W.B.; DENICOLA, D.B. Advantages and disadvantages of cytology and histopathology for the diagnosis of cancer. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, v.8, p.222-227, 1993.

MUTALA, T.M.; PURITY, N.; AYWAK, A. Comparison of qualitative and semiquantitative strain elastography in breast lesions for diagnostic accuracy. *Cancer Imaging*, v.16, n.12, p.1-7, 2016.

MYLONAKIS, M.E.; PAPAIOANNOU, N.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Clinical Pathology*, v.34, n.3, p.243-247, 2005.

NA, D.G.; LIM, H.K.; BYUN, H.S.; KIM, H.D.; KO, Y.H.; BAEK, J.H. Differential diagnosis of cervical lymphadenopathy: usefulness of color Doppler sonography. *American Journal of Roentgenology*, v.168, p.1311-1316, 1997.

NEMANIC, S.; HOLLARS, K.; NELSON, N.C.; BOBE, G. Combination of computed tomographic imaging characteristics of medial retropharyngeal lymph nodes and nasal passages aids discrimination between rhinitis and neoplasia in cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.56, n.6, p.617-627, 2015.

NYMAN, H.T.; KRISTENSEN, A.T.; FLAGSTAD, A.; MCEVOY, F.J. A review of the sonographic assessment of tumor metastases in liver and superficial lymph nodes. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.45, n.5, p.438-448, 2004.

NYMAN, H.T.; KRISTENSEN, A.T.; SKOVGAARD, M.; MCEVOY, F.J. Characterization of normal and abnormal canine superficial lymph nodes using gray-scale B-mode, color flow mapping, power, and spectral Doppler ultrasonography: a multivariate study. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.46, n.5, p.404-410, 2005.

NYMAN, H.T.; LEE, M.H.; MCEVOY, F.J.; NIELSEN, O.L.; MARTINUSSEN T.; KRISTENSEN, A.T. Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features in benign and malignant superficial lymph nodes in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.67, p.978-984, 2006.

NYMAN, H.T.; O'BRIEN, R.T. The sonographic evaluation of lymph nodes. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v.22, p.128-37, 2007.

OPHIR, J.; GARRA, B.; KALLEL, F.; KONOFAGOU, E.; KROUSKOP, T.; RIGHETTI, R.; VARGHESE, T. Elastographic imaging. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.26, p.23-29, 2000.

PRASAD, R.R.A.; NARASIMHAM, R.; SANKARAN, V.; VELIATH, A.J.V. Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of superficial lymphadenopathy: an analysis of 2418 cases. *Diagnostic Cytopathology*, v.15, n.5, p.382-386, 1996.

PRIETO, S.; GOMEZ-OCHOA, P.; BLAS, I.; GASCÓN, M.; ACEÑA, C.; CORDA, A.; SOSA, I.; GREGORI, T.; COUTO, G. Pathologic correlation of resistivity and pulsatility índices in canine abdominal lymph nodes. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.50, n.5, p.525-529, 2009.

PUGH, C.R. Ultrasonographic examination of abdominal lymph nodes in the dog. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.35, n.2, p.110-115, 1994.

RASKIN, R.E. Lymphoid system. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. *Atlas of Canine and Feline Cytology*. 1ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. cap.4, 93-134p.

ROGERS, K.S.; BARTON, C.L.; LANDIS, M. Canine and feline lymph nodes. Part I. Anatomy and Function. *Compendium on the Continuing Education for the Practising Veterinarian*, v.15, p.397-408, 1993.

ROSÁRIO, P.W.S.; FARIA, S.; BICALHO, L.; ALVES, M.F.G.; BORGES, M.A.R.; PURISCH, S.; PADRÃO, E.L.; REZENDE, L.L.; BARROSO, A.L. Ultrasonographic

differentiation between metastatic and benign lymph nodes in patients with papillary thyroid carcinoma. *Journal of Ultrasound in Medicine*, v.24, p.1385-1389, 2005.

RUBALTELLI, L.; PROTO, E.; SALMASO, R.; BORTOLETTO, P.; CANDIANI, F.; CAGOL, P. Sonography of abnormal lymph nodes in vitro: correlation of sonographic and histologic findings. *American Journal of Roentgenology*, v.155, p.1241-1244, 1990.

SAAR, L.I.; GETTY, R. Carnivore lymphatic system. In: GETTY, R. Sisson and Grossman's *The Anatomy of Domestic Animals*. 5ed. Philadelphia: WB Saunders, 1975. 1551-1559p.

SAINTE-MARIE, G.; BELISLE, C.; PENG, F.S. The deep cortex of the lymph node: morphological variations and functional aspects. *Current Topics in Pathology*, v.84, p.33-63, 1990.

SALWEI, R.M.; O'BRIEN, R.T.; MATHESON, J.S. Characterization of lymphomatous lymph nodes in dogs using contrast harmonic and power Doppler ultrasound. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.46, n.5, p.411-416, 2005.

SAPIERZYNSKI, R.; MICUN, J. Lymphadenomegaly in dogs-cytological study. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v.12, p.263-268, 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v.73, n.1, p.82-86, 2005.

SEARCY, G.P. Hemopoietic System. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. 3ed. Philadelphia: Mosby, 2000. cap.13, 341-349p.

SEILER, G.S.; GRIFFITH, E. Comparisons between elastographic stiffness scores for benign versus malignant lymph nodes in dogs and cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.59, p.79-88, 2018.

SILVER, T.I.; LAWSON, J.A.; MAYER, M.N. Sonographic characteristics of presumptively normal main axillary and superficial cervical lymph nodes in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.73, p.1200-1206, 2012.

STEINKAMP, H.J.; WISSGOTT, C.; RADEMAKER, J.; FELIX, R. Current status of power Doppler and color Doppler sonography in the differential diagnosis of lymph node lesions. *European Radiology*, v.12, p.1785-1793, 2002.

SWARTE, M.; ALEXANDER, K.; RANNOU, B.; D'ANJOU, M.; BLOND, L.; BEAUCHAMP, G. Comparison of sonographic features of benign and neoplastic deep lymph nodes in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.52, n.4, p.451-456, 2011.

TAN, R.; XIAO, Y.; HE, Q. Ultrasound elastography: its potential role in assessment of cervical lymphadenopathy. *Academic Radiology*, v.17, n.7, p.849-855, 2010.

TATAR, I.G.; KURT, A.; HEKIMOGLU, B. Advantages and pitfalls in the evaluation of cervical lymph nodes. *Medical Ultrasonography*, v.15, n.4, p.333-334, 2013.

TENG, D.K.; WANG, H.; LIN, Y.Q.; SUI, G.Q.; GUO, F.; SUN, L.N. Value of ultrasound elastography in assessment of enlarged cervical lymph nodes. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v.13, p.2081-2085, 2012.

VASSALO, P.; WERNECKE, K.; ROOS, N.; PETERS, P.E. Differentiation of benign from malignant superficial lymphadenopathy: the role of high-resolution US. *Radiology*, v.183, p.215-220, 1992.

VASSALLO, P.; EDEL, G.; ROOS, N.; NAGUIB, A.; PETERS, P.E. In-vitro high resolution ultrasonography of benign and malignant lymph nodes. A sonographic-pathologic correlation. *Investigative Radiology*, v.28, p.698-705, 1993.

VERNAU, W. Lymph node cytology of dogs and cats. In: 50° Congresso Nazionale Multisala SCIVA, 2005, Rimini, Italia.

WIERSEMA, M.J.; VILMANN, P.; GIOVANNINI, M.; CHANG, K.J.; WIERSEMA, L.M. Endosonography guided fine-needle aspiration biopsy: diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology*, v.112, p.1087-1095, 1997.

WILLARD-MACK, C.L. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicologic Pathology*, v.34, p.409-424, 2006.

WILLIAMS, L.E.; PACKER, R.A. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.222, p.1234-1236, 2003.

WISNER, E.R.; NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. Ultrasonographic examination of cervical masses in the dog and cat. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v.35, p.310-315, 1994.

WOJCINSKI, S.; DUPONT, J.; SCHMIDT, W.; CASSEL, M.; HILLEMANN, P. Real-time ultrasound elastography in 180 axillary lymph nodes: elasticity distribution in healthy lymph nodes and prediction of breast cancer metastases. *BMC Medical Imaging*, v.12, p.35, 2012.

WU, C.H.; CHANG, Y.L.; HSU, W.C.; KO, J.Y.; SHEEN, T.S.; HSIEH, F.J. Usefulness of Doppler spectral analysis and power Doppler sonography in the differentiation of cervical lymphadenopathies. *American Journal of Roentgenology*, v.171, p.503-509, 1998a.

WU, C.H.; HSU, M.M.; CHANG, Y.L.; HSIEH, F.J. Vascular pathology of malignant cervical lymphadenopathy: qualitative and quantitative assessment with power Doppler ultrasound. *Cancer*, v.83, p. 1189-1196, 1998b.

YANG, W.T.; CHANG, J. Patients with breast cancer: differences in color Doppler flow and gray-scale US features of benign and malignant axillary lymph nodes. *Radiology*, v.215, p.568-573, 2000.

YING, M.; AHUJA, A.; BROOK, F. Accuracy of sonographic vascular features in differentiating different causes of cervical lymphadenopathy. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.30, n.4, p.441-447, 2004.

YING, L.; HOU, Y.; ZHENG, H.; LIN, X.; XIE, Z.; HU, Y. Real-time elastography for the differentiation of benign and malignant superficial lymph nodes: a meta-analysis. *European Journal of Radiology*, v.81, p.2576-2584, 2012.

ZHANG, P.; ZHANG, L.; ZHENG, S.; YU, C.; XIE, M.; LV, Q. Acoustic radiation force impulse imaging for the differentiation of benign and malignant lymph nodes: a systematic review and meta-analysis. *Plos One*, v.17, p.1-13, 2016.