

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DO LINFOMA MULTICÊNTRICO
INDOLENTE DE ZONA T EM CÃES**

Guilherme Malvezi Caetano de Lima

Médico Veterinário

2020

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DO LINFOMA MULTICÊNTRICO
INDOLENTE DE ZONA T EM CÃES**

Discente: Guilherme Malvezi Caetano de Lima

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Coorientador: Prof. Dr. Paulo César Jark

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Clínica Veterinária**

2020

L732c Lima, Guilherme Malvezi Caetano de
Caracterização epidemiológica e imunoistoquímica do linfoma multicêntrico de zona T em cães / Guilherme Malvezi Caetano de Lima. -- Jaboticabal, 2021
30 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Mirela Tinucci Costa
Coorientador: Paulo Cesar Jark

1. Oncologia veterinária. 2. Linfoma de Zona T. 3. Imunoistoquímica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO LINFOMA MULTICÊNTRICO INDOLENTE DE ZONA T EM CÃES

AUTOR: GUILHERME MALVEZI CAETANO DE LIMA

ORIENTADORA: MIRELA TINUCCI COSTA

COORIENTADOR: PAULO CÉSAR JARK

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR JARK (Participação Virtual)
UNICASTELO / Descalvado/SP

Dra. SABRINA MARIN RODIGHIERI (Participação Virtual)
Universidade Positivo / Curitiba/PR

Pesquisador Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO (Participação Virtual)
Laboratório VetPat / Campinas/SP

Jaboticabal, 21 de dezembro de 2020

Dados curriculares do autor

Guilherme Malvezi Caetano de Lima, nascido em 05 de julho de 1983, no município de Londrina, estado do Paraná. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em fevereiro de 2001. Durante o curso participou do Projeto de Iniciação Científica relacionado à Patologia Animal (2002-2003) e foi monitor da Disciplina: Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais (2004). Em dezembro de 2005 obteve o título de Médico Veterinário. Ingressou na Residência em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em fevereiro de 2006, sob a orientação do Prof. Msc. Marcelo Sávio Paiva do Amaral, concluindo-a em fevereiro de 2007. Após este período seguiu trabalhando em clínicas e hospitais veterinários particulares. Em fevereiro de 2016 iniciou a Pós Graduação em Oncologia de Cães e Gatos na ANCLIVEPA-SP, concluindo-o em dezembro de 2017. Iniciou o mestrado junto ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, em agosto de 2018 sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa e coorientação do Prof. Dr. Paulo César Jark, etapa ainda em curso.

Epígrafe

“A perseverança é a mãe da boa sorte.”

Miguel de Cervantes

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Vilcio e Luiza de Lima, à minha esposa Lúcia e ao meu filho Felipe.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Deus por permitir que minha caminhada na medicina veterinária chegasse até aqui.

Agradeço e dedico tudo isso aos meus pais, Vilcio e Luiza de Lima, por sempre me proporcionarem todas as ferramentas possíveis para a construção do meu caráter, do meu caminho, da minha vida e à minha irmã, Bruna de Lima, por ser uma companheira, amiga, conselheira e apoiadora dos meus sonhos.

À minha companheira, namorada, amiga e esposa Lídia, por sempre estar ao meu lado, me encorajando e acreditando em mim, mesmo nos momentos mais difíceis durante essas duas décadas de caminhada lado a lado. TE AMO!!

Ao meu filho Felipe, que me mostrando um diferente tipo de amor, de zelo, de cuidado, me tornou PAI.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, uma pessoa e profissional inspiradora, que sempre com muita atenção e carinho me direcionou nessa caminhada. Obrigado pelos ensinamentos técnicos e pessoais. Admiro muito a senhora.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Jark, jovem brilhante, médico veterinário exemplar e professor admirável que nesse período foi muito mais que meu coorientador. Foi amigo, conselheiro, psicólogo e teve muita paciência me conduzindo durante esse período da minha vida acadêmica. Você é demais, buddy!

Ao Dr. Felipe Sueiro, que sempre muito solícito deu dicas e opiniões pertinentes e por abrir as portas do laboratório VETPAT para o desenvolvimento do nosso projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Seleção dos casos.....	10
3.2. Marcadores Imunoistoquímicos.....	11
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSSÃO.....	18
7. CONCLUSÕES.....	23
8. REFERÊNCIAS.....	26



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



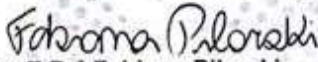
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização epidemiológica e imuno-histoquímica do linfoma multicentrico indolente de zona T em cães**", protocolo nº 017222/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mirela Tinucci Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de dezembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/01/2019 a 01/08/2020
Espécie / Linhagem	<i>Canis familiaris</i> (cão doméstico)
Nº de animais	20 amostras de linfonodos em bloco parafinado (arquivo do Laboratório de Patologia Animal VETPAT)
Peso / Idade	Variados
Sexo	Variados
Origem	Variada

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO LINFOMA MULTICÊNTRICO INDOLENTE DE ZONA T EM CÃES

RESUMO - O presente projeto de pesquisa teve como objetivo principal a caracterização epidemiológica e imunoistoquímica, com a avaliação da viabilidade de transposição dos marcadores atualmente utilizados em citometria de fluxo para a técnica de imunoistoquímica, de linfomas indolentes de zona T de cães, em amostras incluídas em parafina. Para tal, foram utilizadas 39 amostras de linfoma indolente de zona T. Os dados epidemiológicos foram compilados dos prontuários dos cães acometidos e catalogados em uma planilha eletrônica para análise e as respectivas amostras de tecido foram submetidas à imunoistoquímica, empregando-se os anticorpos anti-CD3, CD45, CD79a e Ki67. Nos resultados da avaliação epidemiológica, a raça mais acometida foi o Golden Retriever (44%), seguido pelo Shih-tzu (13%), quanto ao gênero, 18 animais eram machos e 21 eram fêmeas e a média de idade dos animais acometidos foi de 8 anos e 10 meses. Através de formulários enviados via Google Forms® aos veterinários responsáveis por cada caso, foi possível obter o *follow up* de 23 animais, sendo que a alteração clínica mais relatada foi a linfadenomegalia generalizada (n=12;52%). Sete (30%) animais apresentavam linfocitose no momento do diagnóstico. A marcação imunoistoquímica do CD45 foi negativa em todas as amostras, tal qual nos exames de citometria de fluxo. O índice de proliferação celular Ki67 nos linfomas de zona T variou de 5-40%, com uma média de 12,7% ($\pm 7,5$). A sobrevida global foi de 256 dias (± 179) e a sobrevida específica de 334 dias (± 226), embora 14/23 animais estivessem vivos até término do estudo com acompanhamento de até 565 dias. O perfil epidemiológico do linfoma de zona T no estudo foi semelhante ao encontrado em trabalhos americanos com alta prevalência em cães da raça Golden Retriever. A perda de marcação para CD45 e baixo valor de Ki67 pode ser utilizada na rotina na diferenciação entre linfomas de zona T e linfomas de alto grau de imunofenótipo T, uma vez que são doenças com prognósticos e tratamentos distintos.

Palavras-chave: cão, linfoma de zona T, Golden Retriever, imunoistoquímica.

EPIDEMIOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF MULTICENTRIC INDOLENT T-ZONE LYMPHOMA IN DOGS

ABSTRACT – The present research project aims for the epidemiological characterization and evaluation of the viability of transposing currently used markers in flow cytometry to a immunohistochemical technique for multicentric indolent T-zone lymphoma in dogs, in samples immersed in paraffin. Therefore, there were 39 samples of indolent T-zone lymphoma. The epidemiological data were compiled from the affected dogs' records and catalogued in an electronic spreadsheet to be analyzed and the corresponding tissue samples went through the immunohistochemical exam applying antibodies anti-CD3, CD45, CD79a e Ki67. According to the results of the epidemiological evaluation, Golden Retriever was the most affected breed (44%), followed by Shih-tzu (13%); regarding the gender, 18 animals were male and 21 female, the average age of the affected animals was 8 years and 10 months. Through forms sent via Google Forms® to the responsible veterinarians for each case, it was possible to obtain a follow-up of 23 animals in which the most reported clinical alteration was generalized lymph adenomegaly (n = 12/52%). Seven animals (30%) presented lymphocytosis at diagnosis. The immunohistochemical mark of CD45 was negative in all samples, as well as in the flow cytometry. The Ki67 cell proliferation rate in T-zone lymphomas varied 5-40%, with an average of 12,7% ($\pm 7,5$). The overall survival was 256 days (± 179) and the specific survival was 334 days (± 226), although 14/23 animals were alive until the end of the research with a follow-up of 556 days. The epidemiological profile of indolent T-zone lymphoma in the study was similar to the ones found in American studies with high prevalence in Golden Retriever dogs. The mark loss to CD45 and low value of Ki67 can be used in the routine of differentiation between T-zone lymphomas and high-grade lymphomas of immunophenotype T since they are diseases with different prognoses and distinct treatments.

KEY WORDS: dog, T-zone lymphoma, Golden Retriever, immunohistochemistry.

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1. Marcação, clone, diluição, recuperação antigênica e fabricante dos marcadores utilizados para a caracterização imunoistoquímica do Linfoma de Zona T de cães.....	11
TABELA 2. Padrão racial dos cães diagnosticados com Linfoma de Zona T.....	14
TABELA 3. Principais sinais clínicos, alterações de exame físico e laboratoriais em cães diagnosticados com Linfoma de Zona T.....	15
TABELA 4. Análise estatística do marcador de proliferação celular Ki67 em Linfomas de Zona T e Linfomas de Alto Grau.....	17
TABELA 5. Análise estatística de Sobrevida Global, Específica e Tempo Livre da Doença de cães diagnosticados com Linfoma de Zona T.....	17

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodos caninos imunomarcados com CD45, visualizados em objetiva de 40x . (a) Linfoma de Zona T. (b) Linfoma de Alto Grau.....16

FIGURA 2. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodos caninos imunomarcados com Ki67, visualizados em objetiva de 40x . (a) Linfoma de Zona T. (b) Linfoma de Alto Grau.....16

ANEXO

Página

ANEXO 1. Questionário enviado aos Veterinários colaboradores através da Plataforma Google Forms®	24
--	----

1. INTRODUÇÃO

O linfoma é considerado a principal neoplasia hematopoiética em cães, todavia, na Medicina Veterinária, ainda há inúmeras dificuldades em se categorizar os diferentes subtipos e com isso antecipar seu comportamento biológico. A maioria dos linfomas caninos são considerados de alto grau e há uma estimativa de que os linfomas de baixo grau representam menos de 30% da casuística.

O linfoma de zona T é o linfoma indolente mais comum na espécie canina, representando em torno de 15% de todos os linfomas, com notável predileção por cães da raça Golden Retriever. Tem um curso clínico lento, assim como sua resposta ao tratamento quimioterápico, mas mesmo assim os cães acometidos apresentam uma longevidade importante.

Devido ao curso clínico ser lento e pouco agressivo, em comparação aos demais linfomas T, deve-se adotar um tratamento direcionado a ele. Desta forma, é premente que se estabeleça o diagnóstico adequado do linfoma de zona T, tendo em vista que ao exame citológico o linfoma de zona T pode ser confundido com uma reação paracortical hiperplásica, tornando-se imprescindível o exame histopatológico, além de outros métodos.

Ao exame histopatológico, mesmo em estágios mais avançados, o linfoma de zona T pode ser não reconhecido como uma neoplasia devido seu tipo celular ser semelhante à célula madura e a escassez de figuras de mitose, tornando a imunoistoquímica uma ferramenta importante na diferenciação de um processo reacional.

Um achado importante é que à citometria de fluxo os linfomas de zona T não apresentam expressão do marcador pan-leucocitário CD45, comum a maioria dos demais linfomas. No entanto, o exame de citometria de fluxo é pouco acessível no Brasil se comparado ao exame imunoistoquímico, realizado a partir de material incluso em blocos parafinados.

Desta forma, a partir de um banco de amostras do linfoma de zona T, pretende-se avaliar a expressão de marcadores empregando-se a imunoistoquímica para facilitar a identificação desse tumor, contribuir com o direcionamento do tratamento dos pacientes, dar maiores subsídios para o estabelecimento do

prognóstico dos animais e, adicionalmente, adquirir informações sobre o perfil epidemiológico dos mesmos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O linfoma é considerado a neoplasia hematopoiética mais frequente em cães e representa um modelo de estudo para oncologia comparada do linfoma não Hodgkin humano por haver similaridades em relação aos tipos histológicos e imunofenótipos mais frequentes. Valli et al. (2013) relatam que a prevalência estimada de linfoma em cães é de 7 a 24% entre todos os cânceres e pode representar 83% de todas as neoplasias hematopoiéticas. Outros relatos apontam para uma incidência média entre 20 a 107 casos para cada 100.000 cães, o que representa entre 12 a 18% de todos os tipos de cânceres nessa espécie (Sayag et al., 2017).

Linfoma é um termo genérico usado para se referir a uma doença de caráter heterogêneo que abrange vários subtipos, com prognóstico variado, de acordo com o grau de malignidade (Ponce et al., 2010). Embora o diagnóstico do linfoma, de uma maneira ampla, pareça ser relativamente simples, descrever seus diferentes subtipos e antecipar seu comportamento biológico pode ser desafiador (Aresu et al., 2013). Sua classificação é baseada na apresentação clínica, morfologia celular, graduação, imunofenótipo e, eventualmente, na sua análise genômica (Sayang et al., 2017)

Assim como em humanos, diversos sistemas de classificação histopatológica, baseados nos achados morfológicos e imunofenotípicos, foram propostos nas últimas décadas na tentativa de caracterizar os linfomas de cães. O objetivo principal dessas classificações é poder correlacionar os achados histopatológicos e imunofenotípicos com o comportamento biológico da neoplasia, visando obter informações a respeito do prognóstico e selecionar tratamentos individualizados para essa neoplasia (Vezalli et al., 2009).

Na oncologia humana, a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para linfomas não Hodgkin tem evoluído com o passar dos anos e esse sistema foi adaptado para a medicina veterinária (Valli et al., 2002), se tornando o de maior aplicabilidade, por correlacionar critérios citomorfológicos, imunofenotípicos e de apresentação clínica. Desta forma, permite a comparação entre os linfomas humanos e caninos, facilitando assim os estudos da oncologia comparada (Vezalli et al., 2009).

Na medicina humana o objetivo comum dos oncologistas tem sido estabelecer uma classificação para linfoma que possa estimar as respostas a quimioterapia. Logo, no grupo de linfomas não-Hodgkin humano, há várias doenças distintas, com sua própria relevância prognóstica, associada com respostas características à terapia e para cada qual um tratamento específico é recomendado (Jaffe et al., 2001).

A maioria dos linfomas caninos é considerada de alto grau, apresentando comportamento biológico agressivo, boa resposta a poliquimioterapia, porém normalmente não duradouras, o que torna o prognóstico desses linfomas reservado com sobrevidas médias de 6 a 12 meses. Embora os linfomas de alto grau representem cerca de 80-90 % dos casos de linfomas em cães, estudos recentes têm demonstrado que cerca de 10-20% dos linfomas em cães são de baixo grau, caracterizados por progressão lenta, baixo índice mitótico e tempos de sobrevida mais longos (Flood-Knapik et al., 2011).

Linfomas de células T são um grupo heterogêneo de neoplasias de células precursoras (imaturas) e periféricas (maturas). Apresentam uma grande variedade quanto a apresentação clínica, imunofenotípicas e morfológicas, tornando-os difíceis de diferenciar de condições reativas e tumores de células não-T. Logo, a utilização de uma variedade de metodologias, incluindo a avaliação histológica, citometria de fluxo, citogenética e estudos moleculares são necessários para o diagnóstico de linfomas do tipo T (Gorkzyka et al., 2002).

Os subtipos histopatológicos de linfomas indolentes que são descritos em cães, segundo a classificação da OMS, incluem o linfoma de zona marginal, linfoma folicular e o linfoma de células do manto, todos de imunofenótipo B, e o linfoma de zona T, originado de linfócitos T (Flood-Knapik et al., 2011; Valli et al., 2013).

Embora a incidência desses linfomas em cães possa variar de 14,5 a 19,6%, são poucas as informações na literatura a respeito desse grupo de doenças nessa espécie (Ponce et al., 2010; Valli et al., 2013), além de haver poucos dados brasileiros sobre o assunto. Em um recente estudo conduzido por Jark et al. (2020) com 203 casos de linfomas multicêntricos no Brasil, foi observado que 11,8% eram linfomas de baixo grau, sendo o linfoma de zona T o tipo mais prevalente entre os indolentes.

Clinicamente os linfomas indolentes normalmente envolvem os linfonodos periféricos e o baço. Na apresentação multicêntrica/nodal é mais comum o envolvimento de apenas um linfonodo ou uma região, embora a apresentação generalizada também possa acontecer. Em relação a forma esplênica a apresentação nodular é mais frequente que o envolvimento difuso (Valli et al., 2013).

O linfoma de zona T é definido como um linfoma nodal de células T, no qual as células neoplásicas se expandem para a região paracortical e medular, porém, sem alterar a arquitetura do linfonodo nos processos iniciais (Valli et al., 2011). A relativa alta frequência do linfoma de zona T em cães se contrapõe a sua incidência em humanos, no qual os linfomas foliculares parecem ser os mais frequentes. Devido sua relativa raridade, pouco se sabe sobre seu curso clínico e tratamento em pessoas (Flood-Knapik et al., 2011).

O linfoma de zona T é assim chamado devido a sua similaridade histológica com a doença de mesmo nome em humanos. Histologicamente o linfoma de zona T humano é caracterizado pela infiltração do tecido linfoide afetado por uma população uniforme de células de tamanho pequeno a médio, com um citoplasma abundante e claro, com expansão da zona T existente. Em pessoas, o linfoma de zona T não é uma classificação distinta, mas uma variação rara de uma categoria mais ampla de linfomas de células T chamada de linfomas T periféricos não especificados (PTCL-NOS), que inclui um número de outras neoplasias sem uma categoria distinta (Seelig et al., 2014).

Na forma nodal/multicêntrica, o linfoma de zona T é considerado o principal linfoma indolente em cães. Valli et al. (2011) identificaram em um estudo 16,4% de linfomas indolentes, sendo 12,7% linfoma de zona T e 3,7% linfoma de zona marginal. Flood-Knapik et al. (2012) constataram em 60 cães que receberam o

diagnóstico de linfoma indolente que o linfoma de zona T foi o subtipo mais comumente encontrado (61,7%), seguido pelo linfoma de zona marginal (25%).

Os linfomas de zona T em cães apresentam características epidemiológicas específicas por serem altamente prevalentes em Golden Retrievers e, devido sua natureza indolente, uma sobrevida longa é estimada (Martini et al., 2015; Seelig et al., 2014). Em um estudo americano sobre a doença 44,4% dos casos de linfomas de zona T ocorreram em cães dessa raça (Seelig et al., 2014). Embora nos EUA a alta prevalência de linfoma de zona T seja relatada em Golden Retrievers, o mesmo não foi percebido em estudo europeu recente, sugerindo existirem diferenças na epidemiologia e fatores genéticos associados ao desenvolvimento de LZT (Comazzi et al., 2018).

Em relação ao diagnóstico de linfomas multicêntricos em cães, a citologia é a ferramenta de triagem, por ser de baixo custo e menos invasiva. Apesar da maioria dos linfomas caninos ser de alto grau e, portanto, mais fácil de ser identificado através do exame citológico, o diagnóstico de linfoma indolente pode ser um desafio para o cito patologista pela similaridade com processos reacionais. O exame citológico evidencia um padrão com alta prevalência de células linfoides pequenas, com citoplasma claro e frequente aparência de espelho de mão (*hand-mirror shape*), aspecto considerado sugestivo, embora não conclusivo, de linfoma de zona T. Contudo, uma reação de hiperplasia paracortical não pode ser descartada baseando-se apenas na avaliação citológica (Martini et al., 2013). Portanto, a busca por outros métodos confiáveis de diagnóstico é necessária (Seelig et al., 2014).

Uma das técnicas amplamente utilizadas para diagnóstico de linfomas indolentes nos EUA é a citometria de fluxo, uma vez que é uma técnica rápida que requer uma coleta de amostra minimamente invasiva e, como consequência, pode ser mais aceita por tutores e clínicos em comparação à técnica de histopatologia. Além disso, muitos anticorpos têm sido reconhecidos para o processamento de amostras caninas, portanto, atualmente a citometria de fluxo é frequentemente utilizada para a imunofenotipagem dos linfomas caninos (Martini et al., 2013).

Os linfomas de zona T apresentam características particulares nos exames de citometria de fluxo, como a perda do marcador de pan-leucocitário CD45, como relatado por Seelig et al. (2014) em 20 casos classificados histologicamente como

neoplasias de células T com perda da expressão de CD45 e definidos como linfomas de zona T. Nenhum caso CD45+ recebeu o mesmo diagnóstico histopatológico. Da mesma forma, Martini et al. (2015) constaram em uma população de 40 cães com linfoma de zona T que todos também foram negativos para a expressão de CD45 empregando a imunistoquímica. A perda de expressão de CD45 em 96,2% dos cães com diagnóstico de linfoma de zona T também foi observado por Martini et al. (2013).

CD45 é uma proteína tirosina fosfatase transmembrana que é usada para identificar populações de leucócitos. Esse antígeno desempenha várias funções biológicas vitais, incluindo a regulação de diferentes estágios de maturação, ativação e proliferação de linfócitos (Dahlke et al., 2004). A perda de expressão do CD45 permite a célula T evadir-se da deleção no timo ou do sinal de apoptose na periferia, levando a uma eventual transformação neoplásica (Seelig et al., 2014). A redução ou a ausência de expressão de CD45 é frequentemente observada em casos pediátricos de leucemia linfóide aguda, em que é associado com prognóstico favorável (Fogle et al., 2015). Acredita-se que a perda da expressão de CD45 em cães com linfoma de zona T esteja relacionada a mecanismos de resistência a apoptose, uma vez que a molécula de galectina se liga no receptor CD45 durante os processos de indução de morte celular programada (Martini et al., 2015). Outros estudos demonstram que a perda completa de expressão de CD45 está associada a malignidade em desordens proliferativa de células T em humanos (Fogle et al., 2015).

Em contrapartida, em um estudo para caracterizar o imunofenótipo de linfomas esplênicos indolentes de células B em cães, desenvolvido por Stein et al. (2019), foi observado a expressão do marcador pan-leucocitário CD45 em todas as 38 amostras testadas, sendo 28 de linfoma de zona marginal e 10 de linfoma de zona do manto, indicando que linfomas indolentes do tipo B não perdem a expressão deste marcador. Porém, a perda do marcador CD45 é comumente reportada em linfoma de células B imaturas e em leucemias linfóides agudas em pacientes pediátricos e adultos humanos (Parachini-Winter et al., 2018).

Além de perfil de marcação aberrante para a molécula CD45, os linfomas de zona T apresentam outras marcações alteradas para marcadores de linfócito T,

como a co-expressão de CD4 e CD8, ou até a ausência de marcação para ambas as moléculas no exame de citometria de fluxo que auxiliam o diagnóstico. (Seelig et al., 2014). Seelig et al. (2014) observaram em 20 cães com linfoma de zona T que 9 (45%) animais eram CD8+, 3 (15%) eram CD4+ e 8 (40%) eram CD4- e CD8-. Em outro estudo, Martini et al (2015) observaram em uma população de 51 cães com linfoma de zona T que, 20 (39,2%) casos eram CD8+, 17 (33,3%) eram CD4 e CD8 negativos, 8 (15,7%) eram CD4+, 4 CD4 e CD8 positivos e 2 (3,9%) casos se apresentaram como CD45-, porém positivos para CD4 e CD8.

Apesar do perfil de marcação dos linfomas de zona T estarem bem consagrados na citometria de fluxo, não há muitas informações a respeito desses marcadores nas reações de imunohistoquímica. Histopatologia e imunohistoquímica são mandatórias para esclarecer a diferença entre linfomas de baixo-grau e reações hiperplásicas em linfonodos (Martini et al., 2013).

A imunohistoquímica é uma técnica que permite a visualização e a localização de um antígeno *in situ*, em cortes histológicos processados de forma rotineira, ou seja, em material fixado em formol e incluído em parafina, bem como em tecidos de congelação e preparados citológicos. Anticorpos para uma proteína específica são aplicados no tecido, geralmente seguido por um anticorpo secundário de uma espécie diferente do paciente ou do anticorpo primário. (Amorim et al., 2016; Avery et al., 2013).

A vantagem desta técnica é a visualização da reação com o antígeno pesquisado e sua localização no tecido, o que difere dos métodos que tem a capacidade de determinar a presença do antígeno e quantificá-lo (p.ex., citometria de fluxo, *Western blot*), sem, contudo, conhecer o tipo celular que o expressa (Amorim et al., 2016).

A imunohistoquímica é particularmente importante na subclassificação dos linfomas. A classificação dos linfomas da OMS de 2008 descreve mais 40 enfermidades proliferativas (linfoma e leucemia) em humanos. Todas as subclassificações se iniciam com o fenótipo (células B versus T) e os anticorpos utilizados para determinar a origem B ou T do linfoma em amostras fixadas em formalina são o anti-CD3 (identifica células T) e diversos anticorpos que identificam células B, incluindo CD79a, Pax5 e CD20 (Avery et al., 2013).

Além do imunofenótipo, a proliferação celular relacionada com as neoplasias têm sido amplamente estudada por mostrar boa correlação com o comportamento biológico destes tumores, além de adicionar informações que orientam o tratamento e o prognóstico. Há muitos métodos para a avaliação da proliferação celular, entre estes estão as técnicas histoquímicas para a contagem de AgNORs (Argyrophil Nucleolar Organizer Regions) ou ainda a avaliação imunoistoquímica, utilizando-se a marcação do antígeno Ki67 (MIB-1) (Suzano et al., 2008).

Utilizando-se a imunoistoquímica é possível determinar a taxa de proliferação celular através de anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos de antígenos expressados por células em proliferação. A identificação de algumas proteínas presentes somente em células em proliferação trouxe novas perspectivas nos estudos da proliferação celular, onde a grande vantagem é que a atividade proliferativa pode ser mensurada sem a perda da integridade tecidual, o que possibilita a análise histológica simultânea e a diferenciação entre as células tumorais e não tumorais (Bacchi e Gown., 1993).

O Ki67 é uma proteína nuclear não histona ligada a replicação, expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 (repouso) e tem sido reportada como um importante marcador prognóstico de linfoma não-Hodgkin humano. O anticorpo monoclonal do camundongo (denominado clone MIB-1) contra o antígeno KI67 tem sido aplicado como um marcador de proliferação celular útil em muitas neoplasias no homem e nos animais (Kiupel et al., 1999).

A proporção de células em proliferação no linfoma não-Hodgkin, como estabelecido *in situ* pela expressão do antígeno Ki67, tem valor prognóstico na oncologia humana e é fortemente relacionada com os diferentes graus de malignidade (Fournel-Fleury et al., 1997). Da mesma forma, na espécie canina a quantificação do antígeno Ki67 nos diferentes grupos de linfomas pode resultar em aumento da acurácia das classificações da doença. Alguns autores relatam correlações positivas entre a proporção de células marcadas positivamente pelo Ki67, morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade das neoplasias (Fournel-Fleury et al., 2002; Suzano et al., 2008).

A avaliação do índice de Ki67 em linfomas não-Hodgkin em cães pode ser importante para determinar a variabilidade individual da fração de crescimento em

diferentes subtipos de linfomas, além de apresentar boa correlação na classificação de linfomas em alto e baixo grau em cães (Fournel-Fleury et al., 1997). Em linfomas indolentes, a média de marcação de Ki67 foi de 20,95% (± 17.3) e de 17,6% (± 12.1) em linfomas de zona T. Entretanto, o Ki67 não mostrou ter valor prognóstico em linfomas de alto grau em cães (Flood-Knapik et al., 2012).

Apesar de atualmente o perfil por citometria de fluxo estar bem caracterizado no diagnóstico dos linfomas de zona T, a disponibilidade da realização desse exame no Brasil ainda não é rotina na maioria dos locais devido a custo e logística (uma vez que após a coleta da amostra para citometria de fluxo, o processamento deve ser realizado em um período máximo de 24-48 horas). Desta forma, um perfil diagnóstico que possa ser realizado através da imunohistoquímica pode auxiliar no diagnóstico do linfoma de zona T e colaborar com o oncologista no direcionamento do tratamento dos pacientes.

Diferentes estudos tem mostrado a importância da utilização da histopatologia e da imunohistoquímica para confirmar o diagnóstico do linfoma de zona T e caracterizar a doença de forma mais precisa e, deste modo, evitar *overtreatment* (Martini et al., 2013). Além das diferenças em relação as formas de tratamento, os linfomas de zona T apresentam prognósticos melhores quando comparados aos linfomas de alto grau, sendo assinaladas em cães, médias de sobrevida de 33,5 meses, em que cães tratados com protocolo de poliquimioterapia a base de CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) tiveram uma sobrevida média de 15,4 meses, enquanto cães que foram tratados com clorambucil e prednisona não atingiram a média (mais de 50% ainda estavam vivos) (Flood-Knapik et al., 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais FCAV – Jaboticabal, sob o protocolo nº 017222/18 e desenvolvido em parceria com o Laboratório VETPAT, situado em Campinas – SP, tendo como colaborador o Dr. Felipe Sueiro.

3.1. SELEÇÃO DOS CASOS

Foram levantados 39 registros histopatológicos e imunoistoquímicos de linfoma multicêntrico de zona T entre janeiro de 2017 e dezembro de 2019 dos arquivos do laboratório VETPAT – Campinas.

Dos 39 blocos parafinados utilizados para os exames imunoistoquímicos, 28 estavam armazenados no laboratório VETPAT. Os demais blocos enviados por laboratórios de patologia animal apenas para análise imunoistoquímica no laboratório VETPAT já haviam sido devolvidos aos laboratórios de origem. Desta forma, considerando os 39 registros histopatológicos e imunoistoquímicos inicial, foi possível a realização do exame imunoistoquímico para o marcador anti-CD45 em 28 amostras e, para o marcador de proliferação celular Ki67, o exame de imunoistoquímica foi realizado em 37 amostras. Para os marcadores anti-CD3 e anti-CD79a, todas as amostras foram testadas.

Adicionalmente, foram selecionadas 21 amostras de linfomas de alto grau que tiveram o marcador de proliferação celular Ki-67 avaliados, a fim de se ter um parâmetro comparativo entre o índice de proliferação de linfomas indolentes e de alto grau.

Aos Veterinários responsáveis pelos casos de cães com o diagnóstico de linfoma de zona T, foram solicitados os dados de resenha dos respectivos cães como raça, sexo, idade e procedência dos animais, assim como as seguintes informações dos prontuários dos cães: sinais clínicos, local e número de linfonodos acometidos, alterações clínicas presentes, envolvimento de outros órgãos,

linfocitose no momento do diagnóstico, tratamento empregado, curso clínico da doença, sobrevida e tempo livre da doença

Esses dados foram enviados via formulário da plataforma Google Forms® (Anexo 1).

A sobrevida global (relacionada ou não a doença) e a específica (relacionada apenas a doença) foi considerada desde o dia do diagnóstico até a data do óbito, ou se ainda vivo, do último contato informado pelo veterinário. O tempo livre da doença foi definido a partir da remissão da doença até a data do último contato com o veterinário responsável pelo caso quando o animal permanecia vivo.

Por fim, os dados obtidos foram arranjados em planilhas, tabulados e submetidos a análise estatística.

3.2 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

O imunofenótipo e o índice de proliferação celular foram obtidos por meio do exame de imunistoquímica, conforme a técnica descrita por Flood-Knapik et al. (2012). Os marcadores imunistoquímicos para os propostos estabelecidos foram extrapolados dos atualmente utilizados na técnica de citometria de fluxo, sendo eles: marcador para linfócitos do tipo B CD79a, marcador de linfócitos do tipo T CD3, marcador pan-leucócitos CD45 e marcador de proliferação celular Ki67, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1. Marcação, clone, diluição, recuperação antigênica e fabricante dos marcadores utilizados para a caracterização imunistoquímica do Linfoma de Zona T de cães.

Marcadores	Marcação	Clone	Diluição	Recup. Antigênica	Fabricante
CD3	Linfócitos T	F7.2.38	1:300	Citrato	DAKO
CD45	Pan-leucocitário	MCA20356	1:300	Citrato	BIO-RAD
CD79a	Linfócitos B	JCB 117	1:100	EDTA	DAKO
Ki67	Proliferação celular	MIB-1	1:300	EDTA	DAKO

Nas reações de imunistoquímica foram utilizados o sistema de detecção livre de biotina (REVEAL®). Resumidamente, os cortes de tecido com 3µ estendidos em

lâminas foram desparafinizados, reidratados e, então, incubados por vinte minutos em uma solução a 5% de peróxido de hidrogênio e metanol absoluto (Synth®), seguindo as instruções do fabricante, para bloqueio da peroxidase endógena. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor (Panela de Pressão, Pascal - Dako North America, Carpinteria, CA) a 90°C, por 30 minutos. Após essa etapa, os cortes foram lavados por três vezes em solução tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M (pH 7,2), por 5 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (Reagente do kit Reveal Spring Biosciences, Pleasanton, CA – Cod SPD-125®). Ato contínuo, os cortes foram recobertos com o anticorpo primário na diluição padronizada e, então incubados a 27°C por 2 horas, em temperatura ambiente. Depois os cortes foram novamente lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário (Kit/Flex da Dako®), conforme instruções do fabricante, em temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas, e a reação revelada pelo substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB Novolink, Leica Biosystems, Newcastle, UK).

A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem das lâminas em água destilada, e feita a contra-coloração com hematoxilina de Harris (Easypath, São Paulo – SP) (1-2 minutos). Cada reação foi acompanhada por controle positivo e negativo. Uma amostra de linfoma canino sabidamente marcada pelo anticorpo utilizado foi usado como controle positivo. O controle negativo foi obtido a partir da substituição dos anticorpos primários por solução diluente.

A interpretação dos resultados das reações foi realizada sob microscopia de luz, na objetiva de 40x. O marcador Ki67 foi avaliado de forma quantitativa, em porcentagem a partir da contagem de 500 células em campos com maior número de células marcadas (*hotspot*). A porcentagem de Ki 67 nos linfoma de zona T foi comparada com os valores obtidos em um grupo de linfomas de alto grau.

Os demais marcadores foram avaliados de forma qualitativa e compartimentais junto ao tecido linfoide, avaliando a sua marcação ou não nas amostras processadas pela técnica de imunistoquímica.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada estatística descritiva para apresentação dos resultados clínico-patológicos, bem como tempo livre da doença, tempo de sobrevida global e tempo de sobrevida médio.

Para análise da porcentagem do Ki67 nos dois grupos de linfoma, as variáveis foram submetidas a análise de variância para um delineamento inteiramente ao acaso e com nível de significância de 5%. Nas comparações das médias, utilizou-se o teste t (nível de significância = 0,05). Para essas análises foi utilizado o programa computacional GraphPad Prism v. 8.0.1.

5. RESULTADOS

Dos 39 cães com diagnóstico de linfoma de zona T, 29 (74%) eram originários da região Sudeste brasileira, sendo dois do estado de Minas Gerais, sete do estado do Rio de Janeiro e 20 do estado de São Paulo. A região Sul do Brasil foi representada com 7 casos, sendo um do estado do Paraná, dois de Santa Catarina e quatro do Rio Grande do Sul. Região Centro Oeste (Goiás) e Norte (Amazonas), apresentaram um caso cada e, por fim, um caso era oriundo do Distrito Federal (Brasília).

Dezoito desses cães eram machos (46%) e 21 fêmeas (54%). No momento do diagnóstico, a idade média dos animais acometidos foi de 8 anos e 10 meses, variando entre 6 e 15 anos.

Dentre as 39 amostras, 12 raças diferentes foram relatadas. A raça com o maior número de casos foi o Golden Retriever, compreendendo 17 (44%) animais, seguido pelo Shih-tzu (n=5; 13%), Boxer (n=3; 8%), Buldogue Francês (n=3; 8%), Pinscher (n=2; 5%), Teckel (n=2; 5%), Sem raça definida (n=2; 5%) e demais raças (Cocker Spaniel, Chihuahua, Lhasa-apso, Schnauzer e Pit Bull) com um animal de cada, conforme a Tabela 2.

TABELA 2. Padrão racial dos cães diagnosticados com Linfoma de Zona T

Raça	N	%
Golden Retriever	17	44
Shih-tzu	5	13
Boxer	3	8
Buldogue Francês	3	8
Pinscher	2	5
Teckel	2	5
Sem Raça Definida	2	5
Cocker Spaniel	1	3
Chihuahua	1	3
Lhasa-apso	1	3
Schnauzer	1	3
Pitbull	1	3

Foram recebidas 23 respostas dos 39 questionários enviados, pela plataforma Google Forms®, sobre os dados clínicos dos animais envolvidos no projeto.

Como previsto, a alteração clínica mais comumente relatada foi a linfadenomegalia, sendo esta generalizada em 12 (52%) cães, regional em sete (30%) e localizada, em quatro (17%) pacientes. Os linfonodos mandibulares foram os mais acometidos, sendo esta informação relatada em 17 casos (74%). Outras alterações clínicas como apatia (n=3; 13%), dispneia (n=1; 4%), febre (n=1; 4%), hiporexia (n=1; 4%), anorexia (n=1; 4%), diarreia (n=1; 4%) e emagrecimento (n=1; 4%) também foram relatadas. O envolvimento de outros órgãos como o baço (n=2; 9%), pulmões (n=1; 4%), pele (n=1; 4%) e trato gastrintestinal (n=1; 4%) foi relatado em quatro (17%) animais e sete (30%) animais apresentavam linfocitose no momento do diagnóstico (Tabela 3).

TABELA 3. Principais sinais clínicos, alterações de exame físico e laboratoriais em cães diagnosticados com Linfoma de Zona T.

Variável Clínica		N	%
Linfadenomegalia	Generalizada	12	52
	Regional	7	31
	Nodal	4	17
Sinais Clínicos	Dispneia	3	13
	Apatia	1	4
	Febre	1	4
	Hiporexia	1	4
	Anorexia	1	4
	Diarreia	1	4
	Emagrecimento	1	4
Alteração Laboratorial	Linfocitose	7	30

Todas as amostras foram imunomarcadas pelo anticorpo anti-CD3 e negativas para o marcador de linfócito B (CD79a), confirmando o imunofenótipo T das amostras analisadas.

O marcador pan-leucocitário CD45 foi testado em 28 das 39 amostras e todas foram negativas para este marcador (Figura 1).

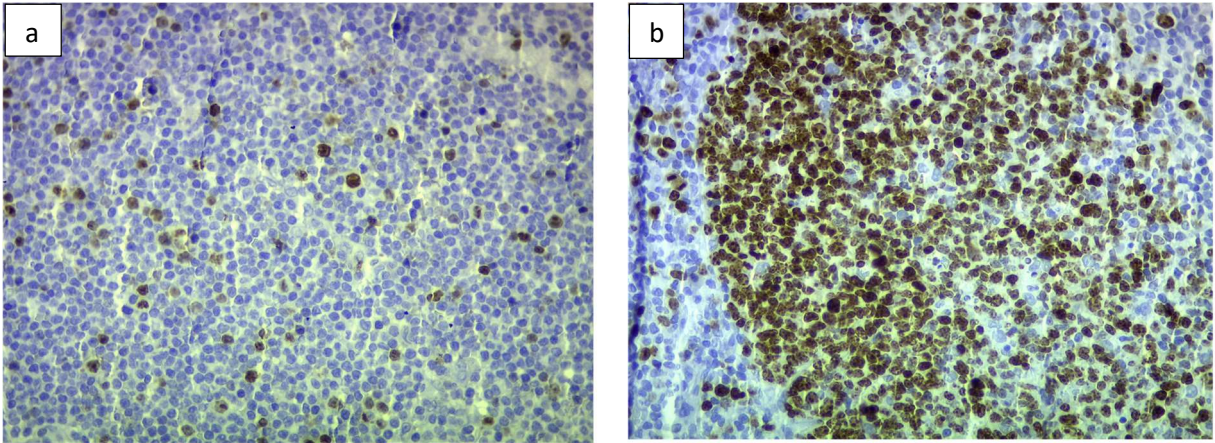


Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de amostras de linfoma de cães imunomarcados com CD45, visualizados em objetiva de 40x . (a) Linfoma de Zona T. (b) Linfoma de Alto Grau.

O marcador de proliferação celular Ki67 foi avaliado em 37 (95%) dos 39 casos de linfoma indolente de zona-T selecionados, apresentando um índice de marcação médio de 12,64% ($\pm 7,49$). Este mesmo marcador de proliferação, avaliado nos 21 casos de linfomas de alto grau, apresentou índice de marcação médio de 76,90% ($\pm 13,27$) (Figura 2 e Tabela 4).

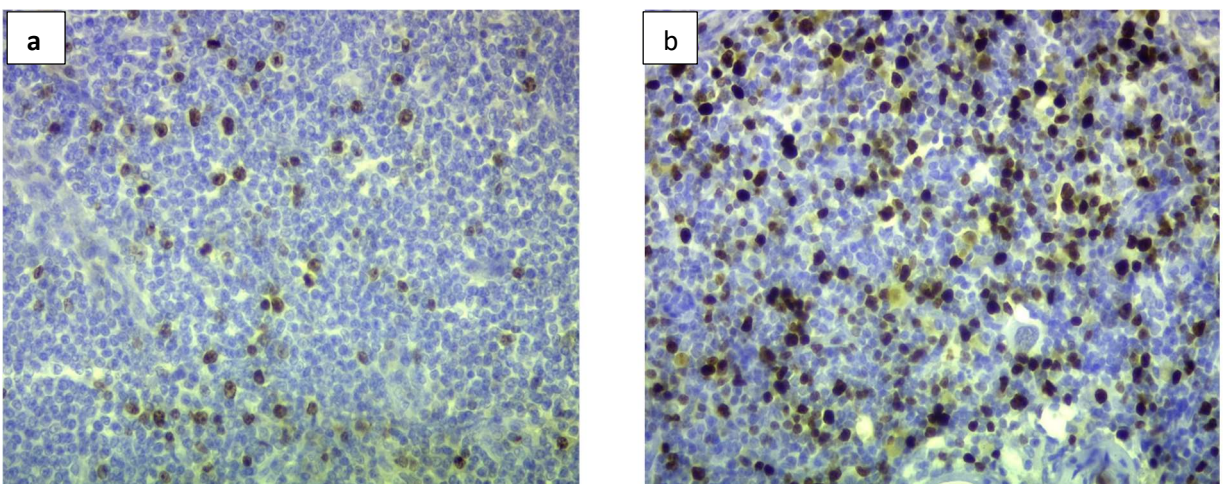


FIGURA 2. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodos tumorais caninos imunomarcados com Ki67, visualizados em objetiva de 40x. (a) Linfoma de Zona T. (b) Linfoma de Alto Grau.

TABELA 4. Análise estatística do marcador de proliferação celular Ki67 em Linfomas de Zona T e Linfomas de Alto Grau

Ki67 (%)	Média (±)	Mediana
Linfomas de Zona T	12,6 (7,49)	10 (5-40)
Linfomas de Alto Grau	76,90 (13,27)	80 (45-90)

O tratamento quimioterápico foi realizado em 16 (70%) dos 23 casos. Vários protocolos quimioterápicos foram utilizados, sendo o clorambucil e prednisona o tratamento mais frequente (n=7, 44%). Outros protocolos como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) e lomustina fizeram parte do tratamento de quatro (25%) e cinco (31%) cães, respectivamente.

Oito cães morreram ou foram eutanasiados até o final do estudo. Quatro cães vieram a óbito, supostamente por causas relacionadas a evolução da doença. Outros três cães morreram por causas não relacionadas a doença e um cão veio a óbito por causa desconhecida.

A média da sobrevida global dos 8 cães que vieram a óbito foi de 256 dias (± 179) enquanto a média de sobrevida específica, levando em consideração apenas os cães que vieram a óbito em decorrência da doença, foi de 334 dias (± 226). O tempo livre da doença avaliado ao fim da pesquisa, em maio de 2020, foi de 565 dias (± 285) (Tabela 5).

TABELA 5. Análise estatística de Sobrevida Global, Específica e Tempo Livre da Doença de cães diagnosticados com Linfoma de Zona T

Dias		Média (±)	Mediana
Sobrevida	Sobrevida Global	236 (179)	196 (107-610)
	Sobrevida Específica	334 (226)	310 (107-610)
Tempo Livre da Doença		565 (285)	478 (163-1012)

6. DISCUSSÃO

O linfoma de células T compreende um amplo espectro de doenças com comportamento biológico variável e distintas respostas ao tratamento. Em meio a este grupo está incluso o linfoma de zona T. Estima-se que o linfoma de zona T é relativamente comum, compreendendo entre 3-12% dos linfomas caninos e 60% dos linfomas indolentes em cães. Entretanto, até o momento, poucos estudos têm descrito as apresentações clínicas de cães com linfoma de zona T (Flood Knapik et al., 2012; Martini et al., 2013; Seelig et al., 2014).

No presente estudo, a média de idade dos cães no momento do diagnóstico foi de 8,8 anos, condizente com a observada em outros linfomas de células T e, corrobora com dados anteriores de Valli et al. (2006) e Mizutani et al (2016), que mostraram que a média de idade de cães com esta doença foi de 8,9 e 8 anos, respectivamente e parece não haver predileção de gênero para o linfoma de zona T.

O presente estudo mostrou que o Golden Retriever (n=17, 44%) também foi a raça mais acometida dentre os cães diagnosticados com linfoma de zona T. De modo igual, um estudo norte-americano mostrou que, nove dos 22 cães acometidos eram da mesma raça, totalizando 45% dos casos (Seelig et al., 2014). Corroborando, Mizutani et al. (2016) relataram que três quartos dos cães acometidos por linfoma de zona T no Japão eram da raça Golden Retriever (n=9, 56%) e Shih-tzu (n=3, 19%). Também Harris et al. (2017) observaram maior prevalência da raça Golden Retriever (n=4, 33%) em 12 cães diagnosticados com linfoma de zona T nos Estados Unidos. No Brasil, Jark et al. (2020) relataram um total de 18 animais diagnosticados com linfoma de zona T, onde 8 (44,4%) eram da raça Golden Retriever.

Observando essas informações em conjunto, pode-se inferir que algum fator genético contribua para aumentar o risco de linfoma de zona T nessa raça. Fato que se repete, em cães criados em países diferentes, como no caso de, Golden Retrievers brasileiros, norte-americanos e japoneses, que poderiam descender de uma mesma linhagem genética. Todavia, nenhum cão da raça Golden Retriever foi

diagnosticado com linfoma de zona T em um estudo conduzido na Itália, por Martini et al. (2015).

A segunda raça mais frequentemente acometida em nosso estudo foi o Shih-tzu, compreendendo um total de 5 animais (17%). Resultado condizente com os de Seelig et al. (2014) e Mizutani et al. (2016), que apontam o Shih-tzu a segunda raça mais acometida por linfoma de zona T após o Golden Retriever. Outros estudos também incluem os Shih-tzu entre as raças mais acometidas. Flood-Kanpik et al. (2013) e Harris et al. (2017) os listam como a terceira raça mais acometida e a quarta para Martini et al. (2015). Esses resultados evidenciam que esta raça também deve receber maior atenção quanto ao diagnóstico de linfoma, já que são comumente acometidas por linfomas indolentes.

Na abordagem clínica inicial, a alteração mais relatada segundo as respostas obtidas através do questionário da plataforma Google Forms® foi a linfadenomegalia generalizada (n=12, 52%), seguida pelas linfadenomegalia regional (n=7, 31%) e nodal (n=4, 17%). Valli et al. (2006), também observaram linfadenomegalia em todos os 10 (100%) casos de linfoma de zona T, sendo 4 (40%) de forma generalizada, 4 (40%) envolvendo apenas um linfonodo e 2 (20%) com o envolvimento de 2 linfonodos. Mizutani et al. (2016) também relataram que a linfadenomegalia generalizada foi encontrada em todos os casos de linfoma de zona T (n=16, 100%) envolvidos na pesquisa. Da mesma forma, Harris et al. (2017) observaram que 8 cães (75%) com o diagnóstico de linfoma de zona T na língua apresentavam linfadenomegalia (um ou mais linfonodos) no momento da avaliação clínica inicial. Desta forma, a linfadenomegalia se mostra uma alteração clínica prevalente neste tipo de linfoma.

A linfocitose no momento do diagnóstico do linfoma de zona T não se mostrou prevalente neste estudo, foi uma alteração laboratorial relatada em sete (30%) das 23 respostas da plataforma Google Forms®. Contudo, Flood-Knapik et al. (2013) relataram linfocitose em 47,5% dos cães no momento do diagnóstico de linfoma de zona T e Seelig et al. (2014) em 53%, indicando que esta alteração, juntamente com a linfadenomegalia, são achados consistentes em linfomas de zona T, além de

indicarem um estadiamento mais avançado da doença e, entretanto, parece não indicar um curso mais agressivo da doença.

No presente estudo, as 39 amostras de linfonodos acometidos por linfoma foram testadas para os marcadores anti-CD3 e anti-CD79a e, todas foram positivas para anti-CD3 e negativas para anti-CD79a. Anteriormente, Valli et al. (2006), já haviam registrado reatividade na citometria de fluxo com o mesmo marcador em 90% (n=9 das amostras de linfoma de zona T).

No estudo em tela, foi constatado que 28 (100%) amostras submetidas ao exame imunoistoquímico para o marcador anti-CD45 testaram negativo, corroborando com estudos que obtiveram resultados semelhantes, porém, utilizando a citometria de fluxo para este marcador (Seelig et al., 2014; Mizutani et al., 2016; Hughes et al., 2016).

O linfoma de zona T parece exibir um fenótipo único em que os linfócitos T neoplásicos não expressam o antígeno pan-leucocitário CD45, permitindo um diagnóstico confiável pela imunofenotipagem. CD45 é uma fosfatase tirosina com uma função complexa na regulação da sinalização através de receptores de células T e na regulação da ativação de receptores de citocinas. Um possível mecanismo interligando a ausência do CD45 com linfoma de células T é a ligação de superfície do CD45 pela galectina em ambos os linfócitos T, imaturos (tímico) e ativados, induzindo a apoptose. A perda da expressão do CD45 deve permitir as células T evitarem a deleção no timo ou a evasão da apoptose, acarretando em uma eventual transformação neoplásica (Seelig et al., 2014).

Apesar da perda da expressão de CD45 ser uma característica dos linfomas de zona T, recentemente, Parachini-Winter et al. (2018) publicaram um caso de linfoma T periférico de alto grau, em cão, com perda de CD45 na análise de citometria de fluxo, evidenciando a necessidade da avaliação conjunta dos dados clínicos, morfológicos, índices de proliferação e achados de imunofenotipagem para conclusão diagnóstica.

Apesar do Ki67 ser um marcador imunoistoquímicos já bem consolidado na medicina veterinária, existem poucos dados da sua aplicação em linfomas no que se refere a valores de corte, principalmente em linfomas indolentes. O presente estudo

revelou uma diferença significativa entre os valores de Ki67 no linfoma de alto grau 76,90%, ($\pm 13,27$) e baixo grau 12,64% ($\pm 7,49$). Índices que corroboram aos que Flood-Knapik et al. (2012) observaram na média de marcação de Ki67, também através de imunistoquímica, em 20,95% ($\pm 17,3$) dentre 50 linfomas indolentes testados, envolvendo linfomas foliculares, linfomas de zona marginal e linfomas de zona T. Nesse estudo, a média de marcação Ki67 em linfomas de zona T foi 17,6% ($\pm 12,1$), menores que as médias de linfomas de zona do manto e linfomas foliculares que apresentaram as médias de marcação de 20% ($\pm 9,6$) e 59,9% ($\pm 28,5$).

O índice de proliferação dado pela reatividade de Ki67 no linfoma de zona T no presente estudo foi baixo em comparação aos de alto grau, o que corrobora com a provável mecanismo da doença, relacionado principalmente ao atraso na apoptose ao invés do aumento da proliferação celular.

O estabelecimento de referências consistentes a respeito dos valores de corte da porcentagem de marcação de Ki67 entre linfomas indolentes e linfomas de alto grau é de grande importância, principalmente na rotina de patologistas veterinários. Muitas vezes pode não ser possível diferenciar linfomas de alto e de baixo grau apenas pela análise morfológica das amostras, sendo essa informação fundamental no estabelecimento de diagnóstico assertivo, para que o clínico oncologista possa definir um melhor plano terapêutico e prognóstico da doença.

Nesta pesquisa, a sobrevida global foi de 8 meses e a sobrevida específica foi de 10 meses, tempo inferior em relação a outros relatos, podendo indicar que o diagnóstico pode ter sido feito num momento mais tardio da doença, já que o linfoma de zona T apresenta maior sobrevida quando comparado a outros linfomas do tipo T, evidenciando o caráter indolente da doença. Sobrevida média de 21 meses foi reportada por Seelig et al. (2014) e 22.5 e 33 meses foram registradas nos estudos de Valli et al. (2006) e Flood-Knapik et al. (2013) respectivamente. Martini et al. (2015) observaram sobrevida global de 760 dias (15-1150 dias) e sobrevida específica de 180 dias (15-760 dias) em 26 cães diagnosticados com linfoma de zona T.

Em nosso estudo, apenas uma pequena porcentagem de animais veio a óbito (8/23) tanto por causas relacionadas a doença (n=4, 50%) quanto por outras causas

(n=4, 50%). Dessa forma, o estabelecimento de uma sobrevida global e específica pode não representar a realidade existente, já que a maioria dos animais (15/23, 65,2%) permaneceram vivos até o final do estudo, evidenciando a característica de sobrevida longa de cães com linfoma de zona T.

Uma das limitações do presente estudo foi o fato de termos concebido realizar uma análise retrospectiva com a dependência de respostas do questionário formulado para obtenção de dados, pois a baixa adesão de colegas pode ter prejudicado uma análise mais concreta. Embora esta prática seja comum em países de primeiro mundo, no Brasil ainda é incipiente.

7. CONCLUSÕES

Os resultados destes estudos, nas condições metodológicas empregadas mostram que:

- Na população amostral brasileira estudada, o Golden Retriever foi a raça de cães mais acometida pelo linfoma de zona T.
- A imunistoquímica foi útil para evidenciar a perda da marcação do anticorpo anti-CD45 nos linfomas de zona T, se mostrando uma boa ferramenta diagnóstica.
- O baixo índice de proliferação de Ki67 em linfomas de zona T quando comparado à linfomas de alto grau é um auxiliar no diagnóstico diferencial.
- Cães com linfomas de zona T deste estudo também apresentaram sobrevida mais longa, comprovando a sua natureza indolente.

Portanto, conhecer o perfil epidemiológico de cães em território brasileiro e a caracterização imunistoquímica, pode auxiliar no estabelecimento do diagnóstico dos animais acometidos pelo linfoma de zona T e facilitar o direcionamento do tratamento dos pacientes, uma vez que esse tipo de linfoma apresenta caráter menos grave, necessitando de terapias menos agressivas.

Anexo 1

Questionário enviado aos Veterinários colaboradores através da Plataforma Google Forms®

- Seção 1 de 2

1. Identificação da Clínica Veterinária (Nome e Cidade)

R: _____

2. Identificação do Médico Veterinário Responsável (Nome completo)

R: _____

3. Nome do Paciente

R: _____

4. Raça

R: _____

5. Idade

R: _____

6. Sexo

- Macho
- Fêmea

7. Data do diagnóstico (dia/mês/ano)

R: _____

- Seção 2 de 2

8. Acometimento dos Linfonodos

- Único
- Região de Linfonodo
- Generalizado

9. Qual linfonodo e/ou região acometida?

R: _____

10. Havia envolvimento de outros órgãos?

- Sim
- Não

11. Se 'SIM', qual órgão estava acometido?

R: _____

12. Havia linfocitose no momento do diagnóstico?

- Sim
- Não
- Não sabe informar

13. O paciente apresentava alguma alteração sistêmica (febre, vômito, diarreia, apatia, anorexia, etc.) relacionada à doença?

- Sim
- Não

14. Se 'Sim', quais alterações estavam presentes?

R: _____

15. Qual foi a opção terapêutica utilizada?

- Sem tratamento, somente acompanhamento
- Quimioterapia

16. Qual protocolo quimioterápico foi utilizado?

R: _____

17. O animal está vivo?

- Sim
- Não
- Não sabe informar

18. Se 'Não', qual foi o motivo do óbito?

- Relacionado à doença
- Não relacionado à doença
- Não sabe informar

19. Qual a data do óbito do animal?

R: _____

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amorim RL, Neto RT, Kuipel M (2016) Imuno-histoquímica no diagnóstico oncológico. In.: Daleck CR.; De Nardi AB (Eds) **Oncologia em Cães e Gatos**. 2 ed, Rio de Janeiro – RJ: ROCA, p. 217-237.
2. Aresu L (2016) Canine Lymphoma, More Than a Morphological Diagnosis: What We Have Learned about Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 3, Article 77.
3. Aresu L, Martini V, Rossi F et al. (2015) Canine indolent and aggressive lymphoma: Clinical spectrum with histologic correlation. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 13, n.4, p.348-362
4. Avery PR et al. (2014) Flow Cytometric Characterization and Clinical outcome of CD4+ T-Cell Lymphoma in Dogs: 67 Cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 28, n.2, p.538-546.
5. Bacchi CE, Gown AM (1993) Detection of cell proliferation in tissue sections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.26, p.677-687.
6. Caniatti M et al. (1996) Canine Lymphoma: Immunocytochemical Analysis of Fine-Needle Aspiration Biopsy. **Veterinary Pathology**. v.33, n.2, p.204-212.
7. Comazzi S et al. (2018) Breed associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study. **BioMed Central Veterinary Research**. 14:232.
8. Cozzi M et al. (2018) Canine nodal marginal zone lymphoma: Descriptive insight into the biological behavior. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.16, n.2, p.246-252.

9. Dahlke MH et al. (2004) The Biology of CD45 and its USE as a Therapeutic Target. **Leukemia & Lymphoma**. v.45(2), p.229-236.
10. Flood-Knapik KE et al. (2012) Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. V.11, n.4, p.272-286.
11. Fogle JE et al. (2015) CD 45+ and CD45- lymphocyte populations identified by flow cytometry from dogs with lymphoma exhibits similar morphology and the same clonal (B cell or T cell) lineage. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 168, n.3-4, p.242-248.
12. Fournel-Fleury C et al. (1997) Growth fraction in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of Ki67 antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 61-72.
13. Fournel-Fleury C et al. (2002) Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. **Veterinary Pathology**, v.39, n.1, p.92-109.
14. Gelain ME et al. (2008) Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 121, n. (3-4), p.179-188.
15. Gorczyca W et al. (2002) An Approach to Diagnosis of T-cell Lymphoproliferative Disorders by Flow Cytometry. **Cytometry**. v. 15, n.50(3), p.177-190.
16. Goto-Koshino Y et al. (2014) Differential expression of CD45 isoforms in canine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 160, n. 1-2, p.118-122.

17. Harris LJ et al. (2018) Clinicopathologic features of lingual canine T-zone lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 16, n.1, p.131-139.
18. Jaffe ES et al. (2001) World Health Organization Classification of Tumors- Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, **International Agency for Research on Cancer Press**.
19. Jark PC et al. (2020) Histopathological and immunophenotypically characterization of canine multicentric lymphoma in Brazil: a study of 203 cases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, n.3, p.787-793.
20. Kiupel M, Teske E, Bostock D (1999) Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**. v.36, p.292-300.
21. Martini V et al. (2014) Canine small clear cell/t-zone lymphoma: clinical presentation and outcome in a retrospective case series. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, n. S1, p.117-126.
22. Martini V et al. (2015) Flow-cytometry detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.13, n.3, p.281-287.
23. Martini V et al. (2017) Loss of CD45 cell surface expression in canine T-zone lymphoma results from reduced gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.03.006>

24. Moore AS (2016) Treatment of T cell lymphoma in dogs. **Veterinary Record**. v. 179, p.277-281.
25. Moore EL et al. (2018) Patients characteristics, prognostic factors and outcome of dogs with high-grade primary mediastinal lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 16, n.1, p. E45-E51.
26. Parachini-Winter C et al. (2018) A case of canine high-grade T-cell lymphoma immunophenotypically consistent with T-zone lymphoma. **Veterinary Clinical Pathology**. v.47, n.4, p.643-648.
27. Ponce F et al. (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**. v.167, n.2, p.158-166.
28. Ponce F et al. (2010) A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Veterinary Pathology**. v.47, n.3, p.414-433.
29. Sayag D et al. (2018) Prognostic significance of morphotypes in canine lymphomas: A systematic review of literature. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 16, n.1, p.12-19.
30. Seelig DM, et al. (2014) Canine T-zone lymphoma: unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.28, n.3, p.878-886.
31. Stein L et al. (2019) Immunophenotypic Characterization of Canine Splenic Follicular-Derived B-cell Lymphoma. **Veterinary Pathology**. v.56, p.350-357.

32. Valli VE et al. (2006) Canine Indolent Nodular Lymphoma. **Veterinary Pathology**. v.43, n. 3, p.241-246.
33. Valli VE et.al. (2011) Classification of canine malignant lymphoma according to the World Health Organization criteria. **Veterinary Pathology**. v.48, n.1, p. 198-211.
34. Valli VE, Kass PH, Myint M, Scott F (2013) Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. **Veterinary Pathology**. v.50, n.5, p.738-748.
35. Vezzalli E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini G (2010) Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. **Veterinary Comparative Oncology**. v.8, n.1, p.38-49.
36. Williams MJ et al. (2008) Canine Lymphoproliferative Disease Characterized by Lymphocytosis: Immunophenotypic Markers of Prognosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.22, n.3, p. 596-601.