



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**O PAPEL DA CITOMETRIA DE FLUXO NA AVALIAÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM  
CÃES COM LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES**

Marta Filipa Pimenta Rainho Monteiro

**Coimbra, julho de 2019**



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**O PAPEL DA CITOMETRIA DE FLUXO NA AVALIAÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM  
CÃES COM LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES**

**Coimbra, julho de 2019**

**Marta Filipa Pimenta Rainho Monteiro**

**Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

**Constituição do Júri**

Presidente do Júri: Profª Doutora Liliana  
Montezinho

Arguente: Profª Doutora Felisbina Queiroga

Orientador: Profª Doutora Ana Catarina  
Figueira

**Orientador Interno**

Profª Doutora Ana Catarina Figueira

**Orientadores Externos**

Dr. Luis Feo  
Hospital ARS Veterinaria

Dr. Joaquim Henriques  
Hospital Veterinário Berna

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina  
Veterinária da EUVG

*“All our dreams can come true if we have the courage to pursue them.”* **(Walt Disney)**

## Agradecimentos

Chega ao fim mais uma etapa da minha vida e, como tal, não poderia terminar sem expressar algumas palavras de agradecimento àqueles que me acompanharam durante todo este processo.

Em primeiro lugar, quero agradecer às instituições que me acolheram durante o estágio curricular e a todos aqueles que me auxiliaram na escrita da presente dissertação. Deste modo, não posso deixar de manifestar os meus agradecimentos ao Hospital ARS Veterinária pela receção calorosa e simpatia durante os primeiros 3 meses de estágio. Pretendo também, agradecer a toda a equipa do Hospital Veterinário Berna por toda a disponibilidade, amabilidade e acompanhamento diário durante a segunda parte do meu estágio contribuindo, assim, para a minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador externo, Dr. Joaquim Henriques, pela ajuda e conhecimentos transmitidos na área da oncologia, despertando ainda mais o meu interesse.

Não posso deixar de agradecer à minha orientadora interna, Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Catarina pela atenção, disponibilidade e apoio durante a escrita da presente dissertação.

Agradeço aos meus pais por todo o apoio incondicional e incentivo para nunca desistir e acreditar nas minhas capacidades. Por me terem dado a oportunidade de concretização do meu desejo de criança, ser Médica Veterinária, e por acompanharem o meu percurso de forma tão presente. Obrigada à minha mãe pela preocupação diária e por todas as mensagens, chamadas de apoio e “boa sorte” ao longo destes anos e ao meu pai pela tranquilidade transmitida, mesmo quando o mundo parecia desabar.

Não posso deixar de referir o espírito incansável do meu avô que esteve sempre presente e me preparou almoços para que não perdesse um minuto do meu estudo. Quero também agradecer à minha avó e à “minha Lete” por todo o carinho, acompanhamento e presença ao longo do meu crescimento.

E porque “ter uma família unida e feliz é o melhor incentivo para enfrentar qualquer desafio”, serei eternamente grata pelo apoio e encorajamento transmitidos pela minha família.

A ti, Rodrigo, pelo permanente incentivo, preocupação e paciência nos momentos bons e menos bons. Obrigada por acreditares em mim sempre, por seres o meu apoio incondicional e teres estado sempre presente, mesmo estando longe.

Aos meus colegas e amigos, pela amizade, apoio e espírito de entreajuda.

Às minhas “focas” Mariana Canha e Mariana Fonseca, que sempre me acompanharam durante estes longos 6 anos. Obrigada pelas horas de estudo, de brincadeira e riso. Sem vocês, não seria a mesma coisa.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer ao meu melhor amigo (de 4 patas), companheiro e cobaia, Cookie Tomaz, por me ensinar que “A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana”.

Obrigada a todos!

## Índice geral

|                                                                                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Agradecimentos .....                                                                  | v    |
| Índice geral .....                                                                    | vi   |
| Índice de figuras .....                                                               | vii  |
| Índice de gráficos .....                                                              | viii |
| Índice de tabelas .....                                                               | ix   |
| Lista de abreviaturas, símbolos e siglas .....                                        | x    |
| Página de título .....                                                                | 1    |
| Resumo .....                                                                          | 2    |
| Abstract .....                                                                        | 3    |
| Introdução .....                                                                      | 4    |
| LINFOMA NO CÃO .....                                                                  | 6    |
| 1. Classificação .....                                                                | 6    |
| 1.1. Classificação anatômica e sinais clínicos .....                                  | 7    |
| 1.1.1. Estadiamento segundo Organização Mundial de Saúde .....                        | 7    |
| 1.2. Classificação por imunofenótipo .....                                            | 8    |
| 1.2.1. Linfoma B Difuso de Células Grandes (DLBCL) .....                              | 10   |
| 1.2.1.1. Caracterização do tumor .....                                                | 10   |
| 2. Diagnóstico .....                                                                  | 11   |
| 2.1. Citometria de Fluxo .....                                                        | 12   |
| 2.1.1. Aplicações da Citometria de Fluxo .....                                        | 13   |
| 2.1.2. Utilidade da Citometria de Fluxo em Linfoma no cão .....                       | 14   |
| 3. Tratamento .....                                                                   | 14   |
| 4. Doença Residual Mínima .....                                                       | 15   |
| a. Infiltração linfoide neoplásica da medula óssea por Citometria de Fluxo .....      | 17   |
| b. Infiltração linfoide neoplásica do sangue periférico por Citometria de Fluxo ..... | 18   |
| c. Infiltração linfoide neoplásica em linfonodos por Citometria de Fluxo .....        | 18   |
| 4.1. Limitações da Citometria de Fluxo para detecção da Doença Residual Mínima .....  | 19   |
| Conclusão .....                                                                       | 20   |
| Referências Bibliográficas .....                                                      | 21   |

## **Índice de figuras**

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Imagem histológica do linfoma B difuso de células grandes na espécie canina ..... | 10 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Índice de gráficos

**Gráfico 1** - Classificação imunofenotípica de linfoma no cão ..... 9

**Gráfico 2** – Incidência de linfoma na espécie canina ..... 9

## Índice de tabelas

|                                                                                      |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Tabela 1</b> - Estadiamento de linfoma segundo Organização Mundial de Saúde ..... | 8 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---|

## Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

% - Percentagem

< - Inferior a

> - Superior a

≥ - Igual ou superior a

CD – Do inglês “*Cluster of Differentiation*”

CF – Citometria de Fluxo

DLBCL - Linfoma B Difuso de Células Grandes; Do inglês “*Diffuse Large B Cell Lymphoma*”

DRM - Doença Residual Mínima

Ig - Imunoglobulina

IgH - Do inglês “*Immunoglobulin Heavy Chain*”

LBCL – Linfoma B Difuso; Do inglês “*Large B Cell Lymphoma*”

MCL - Do inglês “*Mantle Cell Lymphoma*”

MHC - Do inglês “*Major Histocompatibility Complex*”

MO - Medula óssea

NMZL - Do inglês “*Nodal Marginal Zone Lymphoma*”

OMS – Organização Mundial de Saúde

PARR - Do inglês “*Polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements*”

PTCL, NOS - Do inglês “*Peripheral T-cell Lymphoma, Not Otherwise Specified*”

RECIST – Do inglês “*Response evaluation criteria in solid tumors*”

SP - Sangue periférico

T-LBL - Do inglês "*T-cell Lymphoblastic lymphoma*"

TZL - Do inglês "*T-zone Lymphoma*"

VCOG - Do inglês "*Veterinary Cooperative Oncology Group*"

## **O Papel da Citometria de Fluxo na Avaliação da Doença Residual Mínima em Cães com Linfoma B Difuso de Células Grandes**

Marta F. Monteiro <sup>a</sup>, Joaquim Henriques <sup>b</sup>, Ana C. Figueira <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal  
([mfilipa.monteiro@live.com.pt](mailto:mfilipa.monteiro@live.com.pt)) ([acfigueira@gmail.com](mailto:acfigueira@gmail.com))

<sup>b</sup> Hospital Veterinário Berna, Avenida de Berna 35, 1050-038, Lisboa, Portugal  
([joaquim.henriques@onevetgroup.pt](mailto:joaquim.henriques@onevetgroup.pt))

<sup>c</sup> Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, Avenida José R. Sousa Fernandes 197, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([acfigueira@gmail.com](mailto:acfigueira@gmail.com))

## Resumo

O linfoma representa um grupo heterógeno de neoplasias com origem na alteração maligna das células linfoides. Dependendo do tipo de células afetadas e do grau de desenvolvimento da doença, o linfoma pode apresentar diferentes comportamentos biológicos e prognósticos.

Em cães, o linfoma é o tumor hematopoiético mais comum, apresentando várias semelhanças com o linfoma não-Hodgkin em humanos. Cerca de 70% dos casos de linfoma no cão têm origem em células B, sendo o linfoma B difuso de células grandes um dos subtipos mais comuns.

Apesar do linfoma B difuso de células grandes constituir uma neoplasia de alto grau, tem-se verificado melhorias na abordagem terapêutica e consequentemente no prognóstico. Não obstante, a maioria dos cães que são submetidos a quimioterapia e atingem remissão completa, eventualmente apresentam uma recidiva tumoral.

A avaliação do número de células neoplásicas que permanecem num paciente durante ou após ser submetido a tratamento, ou seja, o grau de doença mínima residual, permite correlacionar com a possibilidade de remissão clínica ou recidiva tumoral. Um aumento da quantificação da doença mínima residual durante o tratamento quimioterápico é indicativo de uma inadequada eficácia do mesmo. Por sua vez, caso se verifique o aumento da quantificação da doença mínima residual após tratamento, é possível inferir acerca de uma possível recidiva.

A deteção da doença mínima residual em animais com linfoma B difuso de células grandes é feita com recurso a várias técnicas, no entanto, a citometria de fluxo demonstrou ser relevante em cães com a referida patologia.

Em Medicina Veterinária, a citometria de fluxo tem-se revelado de grande utilidade na análise e caracterização imunofenotípica do linfoma maligno na espécie canina. Quanto ao linfoma B difuso de células grandes, esta técnica tem permitido avaliar a infiltração neoplásica em amostras de sangue periférico, medula óssea e linfonodos.

**Palavras-chave:** Linfoma no cão, Linfoma B difuso de células grandes, Doença mínima residual, Citometria de fluxo

## **Abstract**

Lymphoma represents a heterogeneous group of neoplasms arising from the transformation of malignant lymphoid cells. Depending upon the type of cells affected and the degree of the development of the disease, lymphoma is associated with different behaviour and prognosis.

In dogs, lymphoma is considered the most common hematopoietic malignant neoplasm, presenting several similarities with non-Hodgkin's lymphoma, in humans. About 70% of lymphoma cases may have originated in B cells with diffuse large B-cell lymphoma is one of the most common subtypes.

Although diffuse large B-cell lymphoma is a high-grade neoplasia, improvements have been observed nowadays in treatment and therefore in its prognosis. However, most patients that undergo chemotherapy and achieve complete remission then might eventually relapse.

The quantification of minimal residual disease which is the neoplastic cells that remain in a patient after or under a chemotherapy treatment, allows to correlate with clinical remission or relapse. If the quantification of minimal residual disease found to be high under therapy that indicates an inadequate treatment response. Otherwise if the quantification of minimal residual disease found to be high after therapy it could represent an eventual relapse.

The quantification of minimal residual disease in animals with diffuse large B-cell lymphoma is performed by several different techniques, however, flow cytometry has demonstrated to be relevant in dogs with this specific neoplasm.

In veterinary medicine, flow cytometry has shown to be very useful in the immunophenotypic analysis and characterization of lymphoma within dogs. About the diffuse large B cell lymphoma, these technique has allowed the evaluation of neoplasm infiltration in the peripheral blood, bone marrow and lymphnodes.

**Key-words:** Canine lymphoma, Diffuse large B cell lymphoma, Minimal residual disease, Flow cytometry

## Introdução

Linfoma designa um conjunto heterogêneo de neoplasias caracterizadas pela proliferação neoplásica de células linfoides com distintas características morfológicas e imunofenotípicas (Poggi et al., 2013). Dependendo do tipo de células afetadas e do seu grau de envolvimento, esta malignidade linfóide pode ter diferentes comportamentos biológicos e prognósticos (Ilchyshyn, 2016).

O linfoma representa uma das neoplasias mais diagnosticadas no cão (Yamazaki et al., 2010), constituindo cerca de 20% de todas as neoplasias caninas e aproximadamente 83% dos tumores hematopoiéticos (Poggi et al., 2013). Afeta cães de todas as raças e idades e o tratamento passa pela quimioterapia (Valli et al., 2013; Valli et al., 2011).

O linfoma multicêntrico é a forma mais frequentemente diagnosticada, sendo que 70% dos casos tem origem em células B (Chalfon et al., 2019). O Linfoma B Difuso de Células Grandes – *Diffuse Large B Cell Lymphoma* (DLBCL) constitui um dos tumores mais investigados em Medicina Veterinária por ser o linfoma de células B mais comum e um dos mais agressivos que afeta a espécie canina (Aresu, 2016).

Apesar da precocidade diagnóstica permitir a seleção de tratamentos mais efetivos, o diagnóstico clínico de linfoma constitui um processo complexo (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014). A avaliação citológica é um dos métodos padrão de diagnóstico desta neoplasia por ser um procedimento simples, minimamente invasivo, rápido e barato (Poggi et al., 2013). Contudo, nos últimos anos, a imunofenotipagem por Citometria de Fluxo (CF) surgiu como um método auxiliar útil para melhorar o diagnóstico citológico de linfoma na espécie canina (Gelain, Mazzilli, Riondato, Marconato, & Comazzi, 2008; Poggi et al., 2013). Relativamente ao Linfoma B de Células Grandes – *Large B Cell Lymphoma* (LBCL), a citometria de fluxo demonstrou igualmente utilidade no diagnóstico e na quantificação da infiltração neoplásica (Riondato et al., 2017).

Segundo Sato et al., 2011, o linfoma no cão constitui um dos tumores mais responsivos a tratamento quimioterápico, com uma taxa de resposta inicial de 69 a 94%. A quimioterapia constitui, deste modo, a abordagem terapêutica ideal para esta neoplasia, sendo o protocolo CHOP a primeira linha de tratamento (Sato et al., 2013).

Apesar da evolução em termos de tratamento e, consequentemente, de prognóstico, muitos dos animais com linfoma B de células grandes submetidos a uma primeira linha de quimioterapia e que atingem a remissão clínica, eventualmente apresentam recidiva (Chalfon et al., 2019). A avaliação da Doença Residual Mínima (DRM) permite obter informação sobre o número de células neoplásicas linfóides, que sobrevivem a terapias anticancerígenas, sendo consideradas a origem de recidiva tumoral (Sato et al., 2011).

A quantificação submicroscópica da doença mínima residual após terapia, apresenta uma relevância prognóstica em neoplasias de células B (Böttcher et al., 2013), sendo igualmente eficaz na avaliação da eficácia terapêutica em cães com DLBCL (Sato et al., 2011). Várias técnicas são utilizadas para deteção da DRM em cães com linfoma B difuso de células grandes, contudo a citometria de fluxo demonstrou ser uma técnica relevante em cães com a referida patologia (Riondato et al., 2016).

A presente dissertação traduz o culminar do Estágio Curricular do ciclo de estudos conducente ao grau de mestre em Medicina Veterinária, cuja componente prática assumiu a forma de estágio na área da Clínica de Animais de Companhia. Assim, será feita uma revisão bibliográfica sobre o papel da citometria de fluxo, na deteção da doença residual mínima, em cães diagnosticados com linfoma B difuso de células grandes.

## LINFOMA NO CÃO

Linfoma é um termo genérico que engloba um grupo de patologias heterógenas que resultam da transformação neoplásica dos linfócitos B e T nos seus diferentes estádios de desenvolvimento (Aresu, 2016). Representa uma das neoplasias mais diagnosticadas na espécie canina e mais frequentemente abordadas em oncologia Médica Veterinária (Zandvliet, 2016).

O linfoma no cão é uma das neoplasias mais frequentes (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014; Seelig et al., 2016) e a neoplasia hematopoiética mais comum, apresentando uma taxa de incidência de 13 a 114 casos por 100 000 animais, por ano, segundo Zandvliet, 2016.

Embora o linfoma possa afetar cães de qualquer raça ou idade (Valli et al., 2011) é mais comum em animais de meia-idade a idosos e está bastante reportado nas seguintes raças: Boxer, Bull mastiff, Basset hound, São Bernardo, Scottish terrier, Airedale, Golden retriever, Bulldog inglês (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014) e Rottweiler (Zandvliet, 2016). Não existe predisposição sexual, no entanto fêmeas não castradas parecem ter um risco reduzido de incidência da doença (Zandvliet, 2016).

Nas últimas décadas, a ocorrência de linfoma aumentou no cão e têm sido observadas inúmeras semelhanças com o linfoma não-Hodgkin em humanos (Joetzke et al., 2012; Richards & Suter, 2015), nomeadamente, em termos de apresentação clínica, comportamento biológico, tratamento e resposta ao mesmo (Zandvliet, 2016). Deste modo, devido às similaridades clínicas e patológicas, o cão tem sido utilizado como modelo de estudo do linfoma em oncologia humana (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014). No entanto, devido à não padronização de protocolos de diagnóstico, estadiamento e tratamento em Medicina Veterinária, a comparação de resultados entre as espécies humana e canina torna-se difícil, reduzindo o valor científico do modelo canino para estudo do linfoma (Riondato et al., 2016).

### 1. Classificação

Os sistemas de classificação desenvolvidos para o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin, em humanos, foram utilizados, nos últimos anos, por patologistas veterinários para classificar o linfoma maligno canino (Valli et al., 2011; Valli et al., 2013). São exemplos, o sistema de classificação de Rappaport (1966), *the Working Formulation* (National Cancer Institute, 1982) ou o sistema de Kiel (Fournel-Fleury et al., 1997). No entanto, os antigos sistemas de classificação baseavam-se apenas nas características morfológicas dos linfócitos malignos. Deste modo, e devido ao crescente conhecimento em aspetos imunológicos, histoquímicos, bem como na maturação e diferenciação de células linfoides e os avanços na quimioterapia, houve necessidade de desenvolver novos sistemas de classificação para o linfoma no cão (Valli et al., 2011).

Apesar de se ter vindo a assistir, ao longo dos anos, a tentativas de classificação do linfoma multicêntrico segundo critérios citológicos, histológicos e imunofenotípicos, ainda não existe um consenso para um modelo único de classificação desta neoplasia (Proença, 2009).

### **1.1. Classificação anatômica e sinais clínicos**

Sendo o linfoma uma das neoplasias mais diagnosticadas no cão, a sua classificação de acordo com a localização anatômica dos órgãos afetados é bastante útil. Segundo esta classificação o linfoma pode ser dividido em multicêntrico, digestivo, mediastínico e extranodal (Ettinger, 2003).

Na espécie canina, a forma multicêntrica constitui a apresentação mais comum desta patologia, com uma ocorrência estimada de 80% de todos os linfomas (Barber & Weishaar, 2016). Apesar da afeção dos linfonodos periféricos (linfadenomegalia superficial) constituir uma das alterações mais frequentemente detetadas pelos tutores, a maioria dos animais diagnosticados com linfoma multicêntrico apresenta linfadenomegalia generalizada e não dolorosa (Ettinger, 2003).

Quando o linfoma desencadeia o aparecimento de sinais clínicos, estes são normalmente não específicos e incluem hiporexia, anorexia, perda de peso, vômitos, diarreia, poliúria, polidipsia, dispneia, efusão cavitária e febre. Pode ainda verificar-se hepatomegalia e esplenomegalia (Ettinger, 2003).

Os linfomas multicêntricos de alto grau, clinicamente agressivos e com um prognóstico desfavorável na ausência de tratamento são a forma mais frequentemente detetada. Os linfomas de baixo grau, por outro lado, são raros e caracterizam-se por um curso indolente (Poggi et al., 2016). O curso clínico do linfoma multicêntrico de alto grau depende de vários fatores, tais como, o estadiamento e subestadiamento clínico, imunofenotipagem e tratamento instituído (Marconato et al., 2013).

#### **1.1.1. Estadiamento segundo Organização Mundial de Saúde**

Atualmente, com o intuito de estadiamento do linfoma maligno no cão, aplica-se o sistema da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Valli et al., 2011). Este, baseia-se não só em aspetos histológicos, como também imunofenotípicos (Comazzi & Gelain, 2011). Este estadiamento permite categorizar as neoplasias linfoides de acordo com o seu nível de diferenciação celular, o que providencia uma indicação prognóstica (Valli et al., 2013).

Segundo a OMS, o linfoma pode ser estadiado em 5 estadios e 2 sub-estadios (Zandvliet, 2016), conforme apresentado na tabela 1. Estadiar permite avaliar a extensão da doença (Ettinger, 2003). A classificação em estadios depende do número e localização dos linfonodos afetados, envolvimento secundário do fígado e/ou baço, assim como, da infiltração neoplásica no sangue e/ou na medula óssea. Os sub-estadios, referem-se à presença ou ausência de sinais sistémicos (Zandvliet, 2016).

**Tabela 1** - Estadiamento de linfoma segundo Organização Mundial de Saúde (OMS). Adaptado de Ettinger, 2003 e Zandvliet, 2016.

| Estadio    |                                                              |
|------------|--------------------------------------------------------------|
| I          | Afeção de um único linfonodo                                 |
| II         | Alteração de vários linfonodos, numa mesma região anatómica  |
| III        | Linfadenopatia generalizada                                  |
| IV         | Envolvimento do fígado e/ou baço                             |
| V          | Afeção sanguínea, da medula óssea e/ou outro tecido linfoide |
| Subestadio |                                                              |
| a          | Ausência de sinais sistémicos                                |
| b          | Presença de sinais sistémicos                                |

Deste modo, o estadiamento de um linfoma feito com base na classificação da OMS permite avaliar a extensão da doença e requer o conhecimento da história completa do animal, a realização de um exame físico completo e análises sanguíneas e da medula óssea. Recomenda-se a realização de testes laboratoriais adicionais e exames imagiológicos de forma a realizar um estadiamento mais completo e uma predição do prognóstico (Zandvliet, 2016).

## 1.2. Classificação por imunofenótipo

A determinação da classificação para linfoma, no cão, é fundamental não só na previsão do comportamento biológico da neoplasia e resposta à terapia, como também para orientar na escolha do melhor protocolo de tratamento (Poggi et al., 2013).

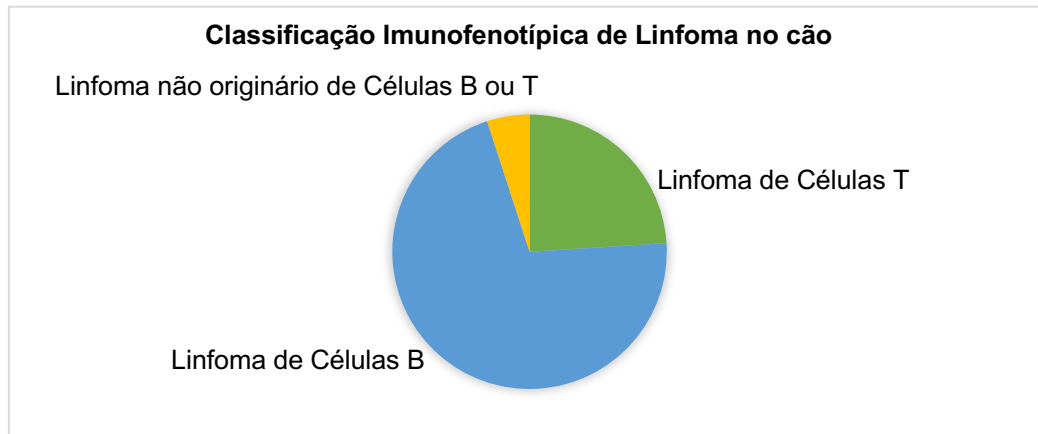
A classificação mais comum para linfoma subdivide a neoplasia em linhagem das células B e T (Deravi et al., 2017), tendo em consideração aspetos morfológicos e imunofenotípicos (Poggi et al., 2017), tal como apresentado no gráfico 1. A imunofenotipagem, ou seja, a classificação da neoplasia como sendo originária das células B ou T, constitui um fator preditivo de prognóstico (Poggi et al., 2017).

Cerca de 80 a 85% dos linfomas (Aniolek et al., 2014) e 70% dos linfomas multicêntricos que afetam a espécie canina têm origem em células B (Chalfon et al., 2019). De uma perspetiva prognóstica, este tipo de linfomas é, geralmente, mais quimiorresponsivo (Comazzi & Gelain, 2011).

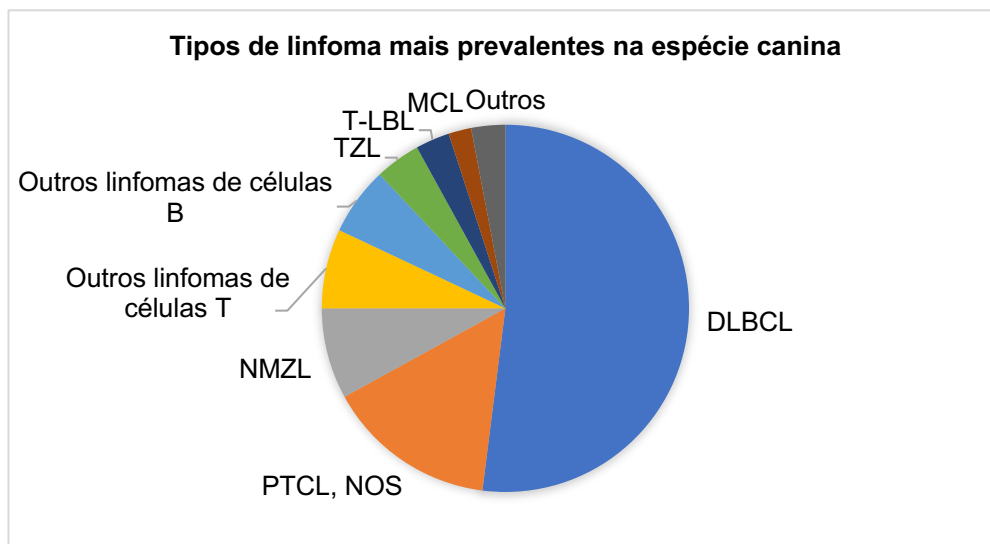
De entre os linfomas com origem em células B, o linfoma B difuso de células grandes (DLBCL) apresenta especial destaque por constituir a variante mais comum (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014; Aresu et al., 2018), tal como apresentado no gráfico 2. Segundo Seelig et al., 2016, na espécie canina, esta malignidade linfoide representa entre 47% a 56% de todos os linfomas e 73% dos linfomas de

células B. Não obstante, alguns dos linfomas de células T são também diagnosticados e podem apresentar um curso clínico mais agressivo quando comparado com o de células B (Avery et al., 2014).

Verifica-se, ainda, que alguns linfomas que não exibem a expressão de nenhum marcador celular definido, não sendo originários de células B ou T, ou, possuindo características de marcadores dos dois tipos de linfócitos (Aniolek et al., 2014).



**Gráfico 1** - Classificação imunofenotípica de linfoma no cão. O linfoma de células B constitui cerca de 71% a 79% de todos os linfomas caninos, enquanto os linfomas com origem em células T apresenta uma incidência de cerca de 22 a 37,9%. Pode ainda ser constatada a presença de linfoma que não exibe a expressão de nenhum marcador celular definido, em 2 a 5% dos casos. Adaptado de Proença, 2009.



**Gráfico 2** – Incidência de linfoma na espécie canina. O linfoma B difuso de células grandes (DLBCL) constitui o subtipo mais frequentemente diagnosticado. Adaptado de Seelig et al., 2016.

(PTCL, NOS - *Peripheral T-cell Lymphoma, Not Otherwise Specified*; NMZL - *Nodal Marginal Zone Lymphoma*, TZL - *T-zone Lymphoma*; T-LBL - *T-cell lymphoblastic lymphoma*; MCL - *Mantle Cell Lymphoma*).

### **1.2.1. Linfoma B Difuso de Células Grandes (DLBCL)**

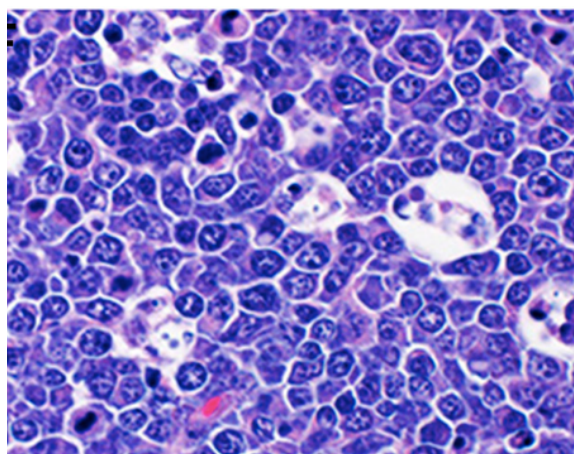
O linfoma B difuso de células grandes constitui um dos linfomas de células B mais agressivos. É um tumor heterógeno cujo diagnóstico não é possível pela avaliação morfológica ou imunofenotípica (Valli et al., 2011; Aresu, 2016). Apresenta um comportamento agressivo, podendo ser progressivo num curto período de tempo, daí a resposta terapêutica ser, por vezes, de difícil previsão (Aresu, 2016). Segundo Aresu, 2016, o DLBCL é provavelmente o tumor mais estudado em Medicina Veterinária por constituir um modelo para o estudo desta neoplasia em Medicina Humana.

Pacientes com DLBCL, sejam da espécie canina ou humana, apresentam doença nodal ou extranodal rapidamente progressiva, geralmente indolor, com sinais clínicos que dependem do grau e da localização tumoral (Seelig et al., 2016). Clinicamente, cães afetados por esta neoplasia apresentam um aumento moderado a severo dos linfonodos periféricos (Aresu, 2016).

#### **1.2.1.1. Caracterização do tumor**

As características histológicas que definem este tipo de neoplasia são a proliferação difusa de células B grandes neoplásicas (Aresu, 2016), com núcleos uniformemente grandes e citoplasma escasso, tal como é visível na figura 1 (Valli et al., 2011).

A avaliação da taxa mitótica, ou seja, do nível de proliferação celular constitui um parâmetro que, embora variável em cães com DLBCL, permite inferir sobre o tempo médio de sobrevivência. Assim, quanto menor a taxa mitótica por campo, maior o tempo de sobrevivência e vice-versa (Valli et al., 2013).



**Figura 1** – Imagem histológica do linfoma B difuso de células grandes na espécie canina. Adaptado de Seelig et al., 2016.

O DLBCL pode ser dividido de acordo com o número e localização dos núcleos nas variantes centroblástica, imunoblástica e numa forma intermédia das duas (Valli et al., 2011; Seelig et al., 2016). A forma centroblástica é a mais frequente e caracteriza-se por uma proliferação difusa de células linfoides de tamanho médio a grande, não clivadas (Aresu, 2016), com múltiplos núcleos vesiculares ovais a redondos localizados na periferia celular (Valli et al., 2011), cromatina fina e citoplasma basófilo (Aresu, 2016; Seelig et al., 2016). A variante imunoblástica é menos frequente em cães e é considerada menos agressiva (Aresu, 2016). Caracteriza-se por apresentar tamanho semelhante à variante centroblástica, com núcleos vesiculares redondos a ovais (Seelig et al., 2016), um único nucléolo proeminente central (Valli et al., 2011) e a periferia citoplasmática de coloração basófilo (Seelig et al., 2016).

## **2. Diagnóstico**

O diagnóstico clínico de uma neoplasia constitui um processo complexo sendo geralmente iniciado pela interpretação de sintomatologia indicativa. Esta sintomatologia permite inferir sobre possíveis diagnósticos diferenciais e direcionar para a elaboração de exames de diagnóstico até determinação do diagnóstico definitivo (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014). Infelizmente, nenhum dos meios de diagnóstico é suficientemente completo ou sensível, sendo impreterível a combinação de vários meios existentes e o uso de várias técnicas disponíveis (Aniolek et al., 2014).

Atualmente, a citologia constitui a abordagem primária a um animal com suspeita de linfoma não só pelo custo reduzido da técnica, mas também por ser minimamente invasiva e bem aceite pelos tutores (Comazzi et al., 2018). A informação obtida por uma citologia permite orientar acerca da abordagem diagnóstica a ser aplicada, na maioria dos casos (Aresu, 2016). No entanto, a diferenciação de células linfoides neoplásicas com recurso a esta técnica pode constituir um desafio devido às características morfológicas similares entre células neoplásicas (aumento de tamanho celular, citoplasma abundante e basófilo e núcleos clivados ou bilobados) e não neoplásicas (Riondato et al., 2017).

O recurso à análise citológica pode permitir chegar ao diagnóstico de linfoma, no entanto a determinação dos vários subtipos tumorais e a antecipação do seu comportamento biológico ainda constitui um desafio (Aresu, 2016). Assim, embora a citologia constitua uma técnica útil no diagnóstico de linfomas caninos de alto grau, a sua utilidade em linfomas de baixo grau e em proliferações linfoides atípicas é limitada (Zandvliet, 2016).

A análise histopatológica permite o diagnóstico de linfomas de baixo grau. Em alguns casos, a realização de uma biópsia incisional pode ser suficiente, no entanto, pode ser necessário a realização de uma biópsia excisional, com remoção completa do linfonodo afetado (Zandvliet, 2016).

Assim, e de modo a diminuir possíveis biópsias excisionais (Zandvliet, 2016), a técnica de citometria de fluxo surge como um método de imunofenotipagem e de diagnóstico dos subtipos de

linfoma no cão. Além disso, pode ainda ser usada para estadiamento tumoral e na avaliação da doença residual mínima após o tratamento (Comazzi et al., 2018).

Relativamente ao diagnóstico definitivo de linfoma B difuso de células grandes, o exame histopatológico dos tecidos afetados é altamente preditivo, tanto em Medicina Humana como em Veterinária (Seelig et al., 2016). Contudo, o uso da técnica de citometria de fluxo demonstrou ter relevância neste tipo de neoplasia permitindo o estudo do envolvimento sanguíneo periférico (SP), assim como, da infiltração neoplásica na medula óssea (MO) e linfonodos (Riondato et al., 2016).

## **2.1. Citometria de Fluxo**

Em Medicina Humana, a citometria de fluxo constitui um método de referência para análise imunofenotípica de leucemia aguda e linfoma (Culmsee, Simon, Mischke, & Nolte, 2001). Atualmente, em Medicina Veterinária, tem vindo a demonstrar uma grande utilidade na análise e caracterização imunofenotípica do linfoma maligno na espécie canina (Culmsee & Nolte, 2002), uma vez que a subclassificação imunofenotípica constitui um dos principais indicadores de prognóstico desta neoplasia linfóide (Thalheim, Williams, Borst, Fogle, & Suter, 2013).

A técnica de citometria de fluxo consiste na medição de um grande número de células e na análise de múltiplos parâmetros em células individuais (tamanho, complexidade e características de fluorescência) (Comazzi & Gelain, 2011; Joetzke et al., 2012). O princípio desta técnica consiste na análise de partículas suspensas num meio líquido em fluxo, que passam através de uma fonte de luz (laser). De referir que, esta técnica permite a medição de múltiplos parâmetros não só celulares, como também de cromossomas, proteínas ou ácidos nucleicos, desde que suspensos num fluido (Wilkerson, 2012).

A CF constitui a técnica ideal para a análise de suspensões celulares por meio de um foco hidrodinâmico em fluxo laminar. Assim, células individuais são estudadas, separadamente, por um laser e os dados relativos à dispersão e propriedades de fluorescência são armazenadas para análise futura (Comazzi & Gelain, 2011).

A técnica de imunofenotipagem por CF pode ser realizada a partir de amostras de sangue ou outros fluidos corporais, armazenadas em tubo com EDTA para posterior processamento (Aniolek et al., 2014). Em amostras obtidas por aspiração por agulha fina procede-se à suspensão da amostra numa solução tampão salina fosfatada, ou seja, em meio RPMI1640. Normalmente, duas ou três aspirações são suficientes para colher pelo menos 5000 células/ml em 0,5ml de solução. A amostra deve ser refrigerada para posterior transporte e recomenda-se a análise da mesma dentro de 24 horas (Comazzi & Gelain, 2011).

A imunofenotipagem com recurso a esta técnica envolve a identificação de proteínas (antígenos) presentes na superfície de membrana ou no citoplasma de uma população de células. Estes antígenos são classificados segundo a nomenclatura de diferenciação (*Cluster of Differentiation* - CD) e a sua expressão pode ser específica de uma linhagem de células ou de células num

determinado estadio de desenvolvimento (Ilchyshyn, 2016). Os antígenos são detetados com recurso a anticorpos monoclonais (Culmsee & Nolte, 2002), ou seja, anticorpos que se ligam a epítomos em antígenos CD específicos e que, por sua vez, se encontram ligados a fluorocromos. Os fluorocromos são substâncias químicas que emitem luz de um comprimento de onda específico quando estimulados por uma fonte luminosa (Ilchyshyn, 2016).

Em contraste com outras técnicas, a CF apresenta como vantagem poder ser realizada a partir de células obtidas por punção por agulha fina, evitando-se a utilização de métodos mais invasivos, dispendiosos e que possam requerer sedação ou anestesia (Thalheim, Williams, Borst, Fogle, & Suter, 2013).

Contrariamente aos métodos de imunofenotipagem, a CF é fácil de realizar e é possível a obtenção de resultados num curto período de tempo. Contudo, o custo inerente ao equipamento e à técnica, não permite a sua disponibilidade em muitos dos laboratórios de diagnóstico veterinários (Comazzi & Gelain, 2011).

### **2.1.1. Aplicações da Citometria de Fluxo**

Em doenças linfoproliferativas, a identificação de antígenos de superfície ou de citoplasma por citometria de fluxo auxilia na subclassificação de linfoma e permite revelar a expressão de antígenos aberrantes e com importante significado prognóstico (Ilchyshyn, 2016).

A avaliação da linhagem celular, ou seja a classificação em células T, B ou *natural killer* (NK), constitui uma das aplicações da CF e baseia-se na avaliação de marcadores de membrana. Os marcadores de células linfoides B são CD20, CD21, CD79a, IgM ou IgG (Comazzi & Gelain, 2011), CD19 e CD22 (Aniolek et al., 2014). Cerca de 10% dos linfomas de células B apresentam, ainda, a expressão de CD34 (Ilchyshyn, 2016).

A CF permite a deteção da expressão de antígenos aberrantes em células B e T (Thalheim, Williams, Borst, Fogle, & Suter, 2013), que se encontra descrito como associado a um mau prognóstico (Gelain, Mazzilli, Riondato, Marconato, & Comazzi, 2008).

Consoante o tipo de célula linfóide avaliado por CF, os fluorocromos presentes nos diferentes antígenos são expressos em diferentes intensidades, o que permite inferir sobre o grau de diferenciação tumoral (Wilkerson, 2012). Assim, consoante o grau de diferenciação das células neoplásicas, verifica-se a expressão de diferentes antígenos que são indicativos do estadio de desenvolvimento tumoral. Por exemplo, em linfócitos B verifica-se a expressão de CD79a e CD20 em todos os estadios de maturação, enquanto a expressão de CD21 e imunoglobulinas de superfície (Ig) apenas se verificam em linfócitos B maduros (Comazzi & Gelain, 2011).

Outra utilidade da CF relativamente a outras técnicas de imunofenotipagem é a capacidade de quantificar a expressão antigénica (Comazzi & Gelain, 2011). A quantificação dos antígenos em linfócitos é de grande importância na determinação da patogénese da doença e na abordagem terapêutica a ser instituída. A CF permite a medição de células com baixa expressão antigénica

permitindo, assim, a sua avaliação, estadiamento e identificação da doença mínima residual (Gelain, Mazzilli, Riondato, Marconato, & Comazzi, 2008).

Em Medicina Veterinária, a CF tem apresentado um valor limitado na classificação das entidades de linfoma devido à ausência de anticorpos específicos para os diferentes graus de maturação celular e de anticorpos marcados com diferentes fluorocromos (Culmsee & Nolte, 2002; Comazzi et al., 2018).

### **2.1.2. Utilidade da Citometria de Fluxo em Linfoma no cão**

Um dos objetivos da imunofenotipagem por citometria de fluxo consiste na determinação do tipo de linfócito contido numa amostra. Este método permite uma avaliação rápida, quantitativa e qualitativa, da população de células hematopoiéticas e permite determinar quais os linfócitos neoplásicos (Aniolek et al., 2014).

Segundo a literatura, em canídeos diagnosticados com linfoma, diferentes técnicas têm sido utilizadas para avaliar a infiltração neoplásica em amostras de sangue periférico, linfonodos e medula óssea. De entre as técnicas referidas, destacam-se a citologia, citometria de fluxo ou *Polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements* (PARR). A citometria de fluxo tem sido cada vez mais utilizada em Medicina Veterinária (Thalheim, Williams, Borst, Fogle, & Suter, 2013), constituindo uma ferramenta para determinação imunofenotípica de linfoma no cão (Joetzke et al., 2012).

O linfoma B de células grandes caracteriza-se por células de médio a grande tamanho que expressam CD21 por citometria de fluxo. Para além disto, esta neoplasia é positiva na expressão dos marcadores CD20 (Comazzi et al., 2018) e CD79a (Ilchyshyn, 2016) e negativa para CD3 (Comazzi et al., 2018). A deteção de IgH (*immunoglobulin heavy chain*) por CF representa, ainda, um alvo molecular útil para o diagnóstico de DLBCL (Aresu et al., 2014). Animais diagnosticados com esta neoplasia apresentam moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) variável, embora geralmente se verifique a expressão da classe II (Rout & Avery, 2017).

## **3. Tratamento**

Sendo o linfoma uma doença sistémica e, na maioria dos casos, uma neoplasia quimiossensível, a quimioterapia sistémica constitui a opção terapêutica mais adequada. Sem tratamento, a maioria dos cães com linfoma morre entre 4 a 6 semanas (Ettinger, 2003).

O tratamento recomendado para cães com linfoma é o protocolo CHOP, constituído pelos seguintes agentes quimioterápicos: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona (Ettinger, 2003) e, ao qual pode ser adicionado L-asparaginase (L-CHOP) (Zandvliet, 2016). O protocolo CHOP, normalmente, resulta em altas e longas taxas de resposta, constituindo um dos protocolos mais usados para linfomas de alto grau no cão (Zandvliet, 2016).

O protocolo COP (vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida), em altas doses, constitui outra opção terapêutica (Sirivisoot et al., 2018). Segundo Sirivisoot et al., 2018, cães com linfoma multicêntrico cujo tratamento envolva o protocolo COP ou L-COP, apresentam uma taxa de remissão de 70 - 80% e uma média de tempos de sobrevivência de 6 - 7 meses. O tratamento com L-CHOP, por sua vez, demonstrou uma taxa de resposta de 90 - 100% e uma média dos tempos de sobrevivência de 12 meses (Ettinger, 2003).

Dependendo do protocolo quimioterápico escolhido, o tempo médio de sobrevivência pode variar entre 6 e 12 meses (Ettinger, 2003). A recorrência desta neoplasia é frequente em canídeos e em apenas cerca de 20% dos casos a taxa de sobrevivência é superior a 2 anos (Sato et al., 2013).

O objetivo da implementação de um protocolo quimioterápico é uma remissão da doença superior a 6 meses e/ou a re-indução de uma remissão após uma ou mais recaídas. Para além disto, a aplicação de um protocolo de tratamento quimioterápico tem como objetivo providenciar uma boa qualidade de vida ao animal, assim como, a remissão dos sinais clínicos (Ettinger, 2003).

Em cães com linfoma B de células grandes o protocolo CHOP, ao qual pode ser associada a administração de L-Asparaginase, é igualmente considerado o tratamento mais eficaz. Segundo Comazzi et al., 2018, a taxa de remissão completa de cães submetidos a tratamento quimioterápico ronda os 80 - 85%.

Atualmente, segundo Chalfon et al., 2019 e Aresu et al., 2014, graças aos desenvolvimentos terapêuticos, cães com DLBCL apresentam melhorias em termos prognósticos. No entanto, grande parte dos animais submetidos a quimioterapia de primeira linha e que alcançam remissão clínica, acabam por recidivar (Comazzi et al., 2018). Tal, deve-se à presença continuada de células malignas no animal, o que coloca cães afetados com DLBCL em risco de recidiva e consequentemente origina uma ineficácia do tratamento (Aresu et al., 2014). Assim, o desafio em animais diagnosticados com DLBCL consiste na deteção e erradicação completa das células tumorais residuais, melhorando assim o prognóstico (Aresu et al., 2014).

#### **4. Doença Residual Mínima**

A diretriz RECIST - *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*, baseia-se num conjunto de critérios que permitem determinar a redução tumoral e a progressão da doença de modo a inferir sobre a carga tumoral num paciente submetido a tratamento oncológico. Deste modo, segundo RECIST, relativamente à avaliação dos critérios de resposta tumoral, define-se como resposta completa ao tratamento quando se verifica o desaparecimento de todas as lesões, alvo e não-alvo, normalização dos marcadores tumorais e normalização dos linfonodos para um tamanho não patológico, ou seja, eixo curto < 10 mm (Eisenhauer et al., 2008).

Em cães com linfoma multicêntrico, o tamanho dos linfonodos periféricos constitui um dos parâmetros de avaliação de resposta ao tratamento quimioterápico (Chalfon et al., 2019). Os protocolos da *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG) destinam-se ao uso em cães e a avaliação da

linfadenopatia periférica constitui o principal componente de avaliação da doença (Vail et al., 2009). Segundo a VCOG, define-se remissão clínica como a regressão de todos os linfonodos periféricos afetados para um tamanho considerado fisiológico (Chalfon et al., 2019).

O número de células neoplásicas remanescentes (Comazzi & Gelain, 2011), designada como Doença Residual Mínima (DRM), após a remissão clínica, pode implicar uma recidiva tumoral. A medição da doença residual mínima pode providenciar informações referentes à presença de células neoplásicas remanescentes, mesmo durante a fase de remissão clínica (Gentilini et al., 2013; Comazzi et al., 2018).

Atualmente, devido à evolução dos protocolos terapêuticos, pacientes com linfoma de células B podem alcançar remissões clínicas completas. No entanto, as recidivas ocorrem mesmo em pacientes com respostas terapêuticas completas, o que sugere a persistência de células neoplásicas em níveis submicroscópicos. Pacientes com células linfóides residuais detetáveis, mesmo em níveis muito baixos, acarretam um risco aumentado de recidiva da doença (Böttcher et al., 2013).

Várias técnicas, tais como a citometria de fluxo e *Polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements* (PARR), têm sido usadas para detecção da DRM (Comazzi et al., 2018). Contrariamente à CF que constitui um método imunológico, a PARR constitui um método molecular de detecção da DRM (Aresu, 2016), apresentando como vantagens o facto de ser mais sensível que a CF na detecção da presença de células neoplásicas (Riondato et al., 2016) e a facilidade de interpretação dos resultados (Aresu, 2016). Contudo, segundo Aresu, 2016, na avaliação da DRM em cães com DLBCL a PARR demonstrou ser uma técnica morosa e relativamente trabalhosa.

A CF tem demonstrado ser relevante em cães com linfoma B de células grandes (Riondato et al., 2016), devido à facilidade de execução e à rapidez com que produz resultados. Para além disto, constitui uma técnica com inúmeras aplicabilidades (Aresu, 2016), com grande capacidade de detecção (Comazzi & Gelain, 2011), não muito dispendiosa e, com capacidade de distinguir entre células viáveis e não viáveis e células residuais (Aresu et al., 2014). Em DLBCL, a citometria de fluxo apresenta grande utilidade na detecção da DRM através da avaliação do envolvimento neoplásico em amostras de gânglio linfático, sangue e medula óssea (Comazzi & Gelain, 2011).

A detecção da DRM, por CF, em canídeos diagnosticados com linfoma de células B de alto grau e previamente sujeitos a quimioterapia, é possível ser realizada em amostras de sangue e medula óssea, pela capacidade de dispersão e imunofenótipo destas células. Em contraste, o uso de CF na detecção de DRM no linfoma de células pequenas é limitada pela dificuldade em diferenciar linfócitos normais dos neoplásicos, em especial na presença de fenótipos aberrantes (Comazzi & Gelain, 2011).

A avaliação da DRM é cada vez mais usada para adequar a intensidade do tratamento em pacientes individuais, de acordo com as probabilidades de recidiva do mesmo. Além disso, a caracterização da DRM é também uma ferramenta atrativa para entender melhor os mecanismos de resistência à terapia e desenvolver novos protocolos de tratamento (Böttcher et al., 2013).

a. Infiltração linfoide neoplásica da medula óssea por Citometria de Fluxo

No linfoma não-Hodgkin, em Medicina Humana, a avaliação da infiltração da medula óssea constitui um aspeto fundamental para o estadiamento da neoplasia (Marconato et al., 2013).

Em Medicina Veterinária a avaliação do envolvimento da medula óssea constitui igualmente um parâmetro essencial para um correto estadiamento. De acordo com os critérios de estadiamento da OMS, cães com linfoma B difuso que apresentem envolvimento da medula óssea, inserem-se no estadio V da doença com uma esperança média de vida mais reduzida quando comparados com animais no estadio III a IV (Marconato et al., 2013).

Embora o exame histopatológico de medula óssea seja o meio de diagnóstico de eleição para avaliação do envolvimento neoplásico, com o recurso à citometria de fluxo é possível obter resultados com maior sensibilidade na deteção do envolvimento medular mínimo (Marconato et al., 2013). Segundo Marconato et al., 2013, o uso da CF, desde que usada em conjugação com a histopatologia, permite melhorar até 10% a taxa de deteção de linfoma na espécie canina.

Apesar da avaliação do envolvimento neoplásico da MO na espécie canina, não ser feito por rotina para o estadiamento de animais com linfoma, pode demonstrar utilidade em questões relacionadas com o tratamento e prognóstico (Marconato et al., 2013). De facto, a ausência de infiltração medular foi associada, em 95% dos casos, a uma taxa de sobrevida superior a 2 anos (Martini et al., 2018).

Em cães com DLBCL, maiores percentagens de infiltração neoplásica da MO foram associadas a tempos de progressão da doença e tempos de sobrevivência mais curtos. Deste modo, a taxa de infiltração medular é considerada um indicador de mau prognóstico (Marconato et al., 2013).

A avaliação da infiltração neoplásica na MO, por CF, é possível a partir da quantificação da percentagem de células B positivas para CD45 (antigénio leucocitário comum) (Riondato et al., 2016) e para CD21 (Martini et al., 2013). Segundo o estudo realizado por Marconato et al., 2013, em cães com uma infiltração neoplásica  $\geq 1\%$ , a probabilidade de progressão da doença é 6.7 vezes superior e a probabilidade de reaparecimento tumoral e, consequentemente, morte é 3.4 vezes superior comparativamente a cães com uma infiltração neoplásica  $< 1\%$ . Por sua vez, apenas uma infiltração neoplásica de 3% é considerada clinicamente relevante em cães com DLBCL (Riondato et al., 2016; Aresu, 2016).

A determinação do número de mitoses foi considerada um fator de variação do tempo médio de sobrevivência em cães com DLBCL (Aresu, 2016). Deste modo, cães que tenham sido submetidos a tratamento quimioterápico e com menos de 20 mitoses por campo de grande ampliação (400x) apresentam um tempo médio de sobrevivência de 188 dias, enquanto animais com um número superior a 20 mitoses por campo de grande ampliação (400x) apresentam em média 31 dias de sobrevivência (Valli et al., 2013; Aresu, 2016).

b. Infiltração linfóide neoplásica do sangue periférico por Citometria de Fluxo

A detecção da doença residual mínima, por CF, em amostras de sangue periférico de animais previamente sujeitos a tratamento quimioterápico pode ser útil na avaliação da eficácia do mesmo (Aresu et al., 2014), uma vez que é possível a detecção inicial do crescimento de células tumorais, o que eventualmente leva a uma recidiva clínica (Sato et al., 2011). Permite, também, selecionar cães que possam beneficiar da quimioterapia de consolidação, apesar da remissão completa, determinada clinicamente (Aresu et al., 2014).

A infiltração neoplásica em amostras de sangue periférico é considerada positiva quando a percentagem de células com expressão de CD21+, numa população total de células CD45+, é superior a 1% (Aresu et al., 2014).

Estudos indicam que a infiltração neoplásica no sangue periférico encontra-se diretamente relacionada com a infiltração na medula óssea (Marconato et al., 2013; Martini et al., 2018).

No entanto, ainda não existe consenso relativamente à relevância clínica da infiltração neoplásica em sangue periférico em cães com LBCL, contrariamente à quantificação da infiltração na MO (Riondato et al., 2017).

c. Infiltração linfóide neoplásica em linfonodos por Citometria de Fluxo

A detecção da doença residual mínima por citometria de fluxo pode ser realizada a partir de amostras de punções aspirativas de linfonodos. A avaliação da infiltração de células que expressam CD21+ por CF permite inferir sobre o tempo de recidiva, ou seja, o período compreendido entre a detecção da DRM e a recidiva clínica após tratamento (Chalfon et al., 2019). Cães com linfoma B das células grandes apresentam um tempo médio de recaída de 154 dias, com variações dependendo da celularidade da amostra e do nível de infiltração neoplásica (Chalfon et al., 2019).

Segundo o estudo realizado por Chalfon et al., 2019, a partir de amostras de linfonodos, cães com DRM > 0,5% após tratamento apresentam uma recorrência precoce, ou seja, um tempo de recidiva mais curto comparativamente a animais com DRM ≤ 0,5%. Assim, cães com DRM > 0,5%, após tratamento, apresentam um tempo de recidiva médio de 118 dias, enquanto em animais com DRM ≤ 0,5% se verifica uma variação nos tempos de recidiva de 195 a 429 dias (Chalfon et al., 2019). Tal, levanta a hipótese que a avaliação da DRM em linfonodos poderia representar um bom indicador para avaliar o risco de recidiva e também auxiliar na decisão do melhor intervalo de monitoração da doença (Chalfon et al., 2019).

A avaliação da DRM por CF em punções aspirativas de linfonodos em cães com LBCL e em remissão clínica constitui uma ferramenta útil para prever o tempo de recidiva. A infiltração de células com expressão de CD21+ após tratamento constitui um fator de prognóstico desfavorável (Chalfon et al., 2019). Assim, a detecção de DRM é considerada positiva nestas amostras quando pelo menos 1% das células grandes expressam CD21+ por CF (Aresu et al., 2014).

#### **4.1. Limitações da Citometria de Fluxo para detecção da Doença Residual Mínima**

A quantificação da DRM demonstrou ter utilidade na avaliação do risco de recidiva tumoral, mesmo em cães que ainda se apresentam clinicamente em fase de remissão (Chalfon et al., 2019). No entanto, caso a percentagem de células neoplásicas seja baixa, a CF pode ser insuficiente na detecção de alguns casos de DRM e pode ser necessário recorrer a outros métodos tal como a PARR (Aresu et al., 2014). A PARR é uma técnica mais sensível comparativamente à CF na detecção de infiltrações neoplásicas no momento do diagnóstico, contudo resultados PARR falsos negativos também são reportados em cães com linfoma. Tal, significa que casos de infiltração medular ou no sangue periférico não devem ser excluídos com base em resultados PARR negativos (Riondato et al., 2016).

Em Medicina Veterinária, o uso da técnica de CF necessita de otimização através do desenvolvimento de um painel mais amplo de anticorpos marcadores específicos da espécie canina (Comazzi & Gelain, 2011). O painel limitado de anticorpos disponível atualmente compromete a sensibilidade da técnica de CF, não permitindo a detecção de algumas das células malignas (Aresu et al., 2014).

Para diagnóstico de linfoma, é recomendado determinar o fenótipo recorrendo à maior gama de anticorpos disponíveis. No entanto, o uso da técnica de citometria de fluxo para detecção de linfoma é limitada pelo facto de linfócitos neoplásicos não possuírem o mesmo fenótipo que os seus equivalentes não neoplásicos. Os linfócitos neoplásicos podem exibir marcadores de superfície inapropriados ao nível de diferenciação ou exibir marcadores que não se encontrem conectados a células neoplásicas (Aniolek et al., 2014).

A avaliação citológica deve sempre ser realizada conjuntamente com CF, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos e avaliar possíveis anomalias de outras populações celulares (Riondato et al., 2017).

## **Conclusão**

A citometria de fluxo constitui uma técnica com ampla aplicabilidade, permitindo a obtenção de resultados relativamente rápidos e a um custo acessível (Aresu et al., 2014). Tem-se revelado útil no diagnóstico de linfoma no cão contribuindo não só para a avaliação da linhagem celular como também da doença residual mínima (Comazzi & Gelain, 2011). Canídeos com um elevado nível de doença residual mínima, detetável por CF, apresentam um prognóstico desfavorável (Sato et al., 2013).

O período entre a remissão clínica e uma possível recidiva é imprevisível (Chalfon et al., 2019). No entanto, a detecção, monitorização e quantificação da doença residual mínima demonstrou ter utilidade no estudo de possíveis pacientes recidivantes e na respetiva adequação de tratamentos e determinação prognóstica (Gentilini et al., 2013). A análise da DRM por CF em cães com linfoma B difuso de células grandes pode ser realizada a partir de amostras de medula óssea, sangue periférico e/ou linfonodos e permite inferir acerca do tempo de recidiva e, consequentemente, do prognóstico (Aresu et al., 2014).

Em suma, cães com linfoma B difuso de células grandes que são submetidos a tratamento quimioterápico podem recidivar. As recidivas constituem a maior causa de falha ao tratamento e, consequentemente, levam a uma diminuição da taxa de sobrevivência. Desta forma, a monitorização da doença residual mínima é crucial, desempenhando a técnica de citometria de fluxo um papel essencial na avaliação da infiltração neoplásica em cães com a referida patologia.

## Referências Bibliográficas

- Aniolek, O., Gajewski, Z., & Gizinski, S. (2014). Application of flow cytometry in diagnosing lymphomas in dogs and cats. *Central European Journal of Immunology*, 39(3), 327–330. <https://doi.org/10.5114/ceji.2014.45943>
- Aresu, L., Aricò, A., Ferraresso, S., Martini, V., Comazzi, S., Riondato, F., ... Marconato, L. (2014). Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *Veterinary Journal*, 200(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.006>
- Aresu, L. (2016). Canine Lymphoma, More Than a Morphological Diagnosis: What We Have Learned about Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(August), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00077>
- Aresu, L., Ferraresso, S., Marconato, L., Cascione, L., Napoli, S., Gaudio, E., ... Bertoni, F. (2018). New molecular and therapeutic insights into canine diffuse large B cell lymphoma elucidates the role of the dog as a model for human disease. *Haematologica*, haematol.2018.207027. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207027>
- Avery, P. R., Burton, J., Bromberek, J. L., Seelig, D. M., Elmslie, R., Correa, S., ... Avery, A. C. (2014). Flow cytometric characterization and clinical outcome of CD4+ T-cell lymphoma in dogs: 67 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 538–546. <https://doi.org/10.1111/jvim.12304>
- Barber, L. G., & Weishaar, K. M. (2016). Criteria for designation of clinical substage in canine lymphoma: a survey of veterinary oncologists. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14, 32–39. <https://doi.org/10.1111/vco.12086>
- Böttcher, S., Ritgen, M., & Kneba, M. (2013). Flow Cytometric MRD Detection in Selected Mature B-Cell Malignancies, 971(CII), 149–174. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-269-8>
- Chalfon, C., Martini, V., Comazzi, S., Aresu, L., Stefanello, D., Riondato, F., ... Marconato, L. (2019). Minimal residual disease in lymph nodes after achievement of complete remission predicts time to relapse in dogs with large B-cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. <https://doi.org/10.1111/vco.12453>
- Comazzi, S., & Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Veterinary Journal*, 188(2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.011>

- Comazzi, S., Cozzi, M., Bernardi, S., Zanella, D. R., Aresu, L., Stefanello, D., ... Martini, V. (2018). Effects of pre-analytical variables on flow cytometric diagnosis of canine lymphoma: A retrospective study (2009–2015). *Veterinary Journal*, 232, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.018>
- Culmsee, K., Simon, D., Mischke, R., & Nolte, I. (2001). Possibilities of Flow Cytometric Analysis for Immunophenotypic Characterization of Canine Lymphoma. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 48(4), 199–206. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00351.x>
- Culmsee, K., & Nolte, I. (2002). Flow cytometry and its application in small animal oncology. *Methods in Cell Science*, 24(1–3), 49–54. <https://doi.org/10.1023/A:1024133628927>
- Deravi, N., Berke, O., Woods, J. P., & Bienzle, D. (2017). Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191(April), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.008>
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., ... Dodd, L. (2008). New response evaluation criteria in solid tumours : Revised RECIST guideline ( version 1 . 1 ). *European Journal of Cancer*, 45(2), 228–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>
- Ettinger, S. N. (2003). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 92–97. <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36622>
- Fournel-Fleury, C., Magnol, J. P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne L., Delverdier, A., Bryon, P. A. & Felman, P. (1997). Cytohistologieal and Immunological Classification of Canine Malignant Lymphomas " Comparison with Human Non-Hodgkin ' s Lymphomas, 117, 35–59
- Gelain, M. E., Mazzilli, M., Riondato, F., Marconato, L., & Comazzi, S. (2008). Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(3–4), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.018>
- Gentilini, F., Turba, M. E., & Forni, M. (2013). Retrospective monitoring of minimal residual disease using hairpin-shaped clone specific primers in B-cell lymphoma affected dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 153(3–4), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.03.012>
- Ilchyshyn, N. (2016). Immunophenotyping of canine lymphoma via flow cytometry, *Vet Times*, 1–13

- Joetzke Dr., A. E., Eberle, N., Nolte, I., Mischke, R., & Simon, D. (2012). Flow cytometric evaluation of peripheral blood and bone marrow and fine-needle aspirate samples from multiple sites in dogs with multicentric lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*, 73(6), 884–893. <https://doi.org/10.2460/ajvr.73.6.884>
- Johnston, S. A., Thamm, D. H., & Legutki, J. B. (2014). The immunosignature of canine lymphoma: Characterization and diagnostic application. *BMC Cancer*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-657>
- Marconato, L., Martini, V., Aresu, L., Sampaolo, M., Valentini, F., Rinaldi, V., & Comazzi, S. (2013). Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: Prognostic significance and proposal of a cut-off value. *Veterinary Journal*, 197(3), 776–781. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.003>
- Poggi, A., Miniscalco, B., Morello, E., Comazzi, S., Gelain, M. E., Aresu, L., & Riondato, F. (2013). Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(4), 475–480. <https://doi.org/10.1111/vco.12078>
- Poggi, A., Miniscalco, B., Morello, E., Gattino, F., Delaude, A., Ferrero Poschetto, L., ... Riondato, F. (2017). Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 431–440. <https://doi.org/10.1111/vco.12184>
- Proença, A. R. (2009). Linfoma Maligno Multicêntrico canino. *Faculdade de Medicina Veterinária*
- Richards, K. L., & Suter, S. E. (2015). Man's best friend: What can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? *Immunological Reviews*, 263(1), 173–191. <https://doi.org/10.1111/imr.12238>
- Riondato, F., Miniscalco, B., Poggi, A., Aricò, A., Aresu, L., Comazzi, S., & Martini, V. (2016). Analytical and diagnostic validation of a flow cytometric strategy to quantify blood and marrow infiltration in dogs with large B-Cell lymphoma. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 90(6), 525–530. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21353>
- Riondato, F., Martini, V., Poggi, A., Massaglia, I., Comazzi, S., Borrelli, A. & Miniscalco, B. (2017). Identification of peripheral blood involvement in dogs with large B-cell lymphoma: Comparison of different methods. *Research in Veterinary Science*, 115, 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.027>

- Rout, E. D., & Avery, P. R. (2017). Lymphoid Neoplasia: Correlations Between Morphology and Flow Cytometry. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 47(1), 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.07.004>
- Sato, M., Yamazaki, J., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K., & Tsujimoto, H. (2011). Increase in Minimal Residual Disease in Peripheral Blood before Clinical Relapse in Dogs with Lymphoma that Achieved Complete Remission after Chemotherapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 292–296. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0675.x>
- Sato, M., Yamazaki, J., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K., & Tsujimoto, H. (2013). The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary Journal*, 195(3), 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.013>
- Seelig, D., Avery, A., Ehrhart, E., & Linden, M. (2016). The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Veterinary Sciences*, 3(2), 11. <https://doi.org/10.3390/vetsci3020011>
- Sirivisoot, S., Tangkawattana, S., Techangamsuwan, S., Teewasutrakul, P., & Rungsipipat, A. (2018). Monitoring minimal residual disease in canine lymphomas treated with modified L-COP or L-CHOP protocols. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(1), 66–84. <https://doi.org/10.1556/004.2018.007>
- Thalheim, L., Williams, L. E., Borst, L. B., Fogle, J. E., & Suter, S. E. (2013). Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1509–1516. <https://doi.org/10.1111/jvim.12185>
- Vail, D. M., Michels, G. M., Khanna, C., Selting, K. A., & London, C. A. (2009). Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs ( v1 . 0 ) – a veterinary cooperative oncology group ( VCOG ) consensus document, 28–37. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00200.x>
- Valli, V. E., Kass, P. H., Myint, M. S., & Scott, F. (2013). Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 15(4), 709–722. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(85\)50031-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(85)50031-5)
- Valli, V. E., Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., ... Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the world health organization criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198–211. <https://doi.org/10.1177/0300985810379428>

- Wilkerson, M. J. (2012). Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42(1), 53–71. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.012>
- Yamazaki, J., Takahashi, M., Setoguchi, A., Fujino, Y., Ohno, K., & Tsujimoto, H. (2010). Monitoring of Minimal Residual Disease (MRD) after Multidrug Chemotherapy and Its Correlation to Outcome in Dogs with Lymphoma: A Proof-of-Concept Pilot Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 897–903.
- Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(2), 76–104. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1152633>