NATÁLIA COELHO COUTO DE AZEVEDO FERNANDES

**Caracterização morfológica e imunofenotípica dos linfomas caninos através de
citologia de meio líquido e imunocitoquímica em embocado celular**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria Lucia Zaidan Dagli

São Paulo, 2016

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Cristina e Dirceu, por todo o amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

A gratidão esteve presente em todos os momentos deste trabalho acadêmico. Na leitura de cada lâmina, lembrei-me das aulas de patologia e dos anos de residência e fui grata a todos aqueles que cederam um pouco de seu tempo em dedicação ao ensino. Na colheita das citologias aspirativas, fui grata aos cães, tão colaborativos, mesmo doentes, e fiquei feliz pela escolha certa que fiz em ser médica veterinária. Ao ler cada trabalho científico, livro e revisão, fui grata por todo o conhecimento e pela dedicação de tantos outros pesquisadores. Fui extremamente grata à ciência.

Nas horas de trabalho em casa, nos momentos de estresse, fui muito grata à minha família, pela compreensão, apoio e paciência. Não deve ser uma tarefa fácil ter uma filha com a cabeça em células e livros. Muito obrigada **Cristina** e **Dirceu** pelo apoio, sempre. Ao meu noivo **Rodrigo Albergaria Réssio**, serei sempre grata. Ele entendeu meu afastamento em alguns momentos, mesmo num ano tão importante para nós. Além de, como colega de profissão, ter sido fundamental para a realização das imunocitoquímicas com a qualidade alcançada neste trabalho.

Ao receber as lâminas, fichas clínicas cuidadosamente preenchidas e termos de consentimento, agradei muito à **Carolina Gonçalves**, **Rodrigo Ubukata**, **Juliana Cirillo**, **Karen Batschinski**, **Andreia Caringi**, **Adriana Nishyia**, **Priscila Pedra** e **Suzana Enumo**. Sim, foi necessária e fundamental a colaboração de todos esses profissionais para reunir essa casuística.

Ao ficar horas no microscópio, dedicando-me aos linfócitos, fui grata a colaboração de todos os colegas do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, especialmente aos do Laboratório de Citologia Oncótica, pelos ensinamentos profundos em Citologia em Meio Líquido, e a **Daniela Etlinger-Colonelli** e **Sandra Lorente**, que participaram

mais ativamente do projeto. Também agradeço muito a **Dra. Yara de Menezes**, que me ajudou diversos momentos a compreender o mundo complicado dos linfomas, e as minhas chefes **Sônia Miranda** e **Maria Lúcia Utagawa**, por terem me dado o tempo necessário para desenvolver este trabalho.

Muito obrigada, **Juliana Mariotti Guerra** e **Danilo Gouveia Wasques**, por terem lido caixas de lâminas e participado tão intensamente da produção desta pesquisa. Foram excelente colegas de microscópio e amigos em todos os instantes.

Agradeço também ao **Emerson Nogueira**, pela colaboração técnica no corte dos emblocados, a **Thais Silva**, por ter embaralhado todos os casos para o teste de concordância, ao meu primo **André Landin Malt** que colaborou na revisão do inglês, mesmo morando bem acima da linha do Equador e a **Luana Pimenta**, que através da BD® cedeu os meios de citologia em meio líquido que utilizamos neste projeto.

Maria Lúcia Zaidan Dagli, são tantos anos de orientação que minha gratidão é múltipla, quase infinita. Muito obrigada por ter acreditado em minhas ideias e por ter guiado meus passos nesta formação longa de pesquisadora.

Finalmente, agradeço à vida, ao universo, e a todas as energias boas que conspiraram ao meu favor tantas vezes. Eu agradeço a todos os Deuses.

RESUMO

Fernandes NCCA. Caracterização morfológica e imunofenotípica dos linfomas caninos através de citologia de meio líquido e imunocitoquímica em emblocado celular [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O linfoma canino é uma das neoplasias mais prevalentes em cães, diagnosticado frequentemente através de exame citológico de aspirados. A imunofenotipagem para diferenciação entre linfomas de células B e T é importante para definição prognóstica e tratamento, entretanto, dificilmente é realizada em materiais provenientes de aspirados citológicos. A citologia em meio líquido (CML) é uma metodologia automatizada de produção de esfregaços citológicos, que permite a conservação de todo o material da aspiração, e utilização do material residual para, por exemplo, produção de emblocado celular (EC) e imunocitoquímica.

Este trabalho teve como objetivo aplicar a CML e EC com imunocitoquímica em amostras de linfonodos caninos suspeitos para linfoma. Além disso, pretendeu caracterizar morfolologicamente as células linfoides neste tipo de preparado, comparando ao esfregaço convencional. Para isto, foram selecionados 54 cães com linfadenomegalia, 10 deles sorologicamente positivos para leishmaniose canina. Comparou-se a CML com a citologia convencional, quanto às características técnicas e testou-se dois métodos diferentes de EC: Bouin e agarose com formalina. Aplicou-se painel imunocitoquímico de anticorpos anti-CD3, anti-CD79a, anti-Pax-5 e anti-Ki67, para imunofenotipagem e determinação da proliferação celular. Adicionalmente, realizaram-se análises estatísticas para avaliação do desempenho e concordância

interobservador comparada entre citologia convencional, CML e o uso conjunto de CML e imunocitoquímica do emblocado celular.

Como resultado, as células linfóides apresentaram-se preservadas, com melhor definição de cromatina e nucléolos, porém com tamanho reduzido e pior definição citoplasmática, na CML. O EC de Bouin revelou grupos densos e bem definidos, que permitiram a aplicação da imunocitoquímica. Por outro lado, os emblocados de agarose, apresentaram-se frouxos, com células marcadamente dispersas, revelando-se inadequados para preparados de células linfóides. O anticorpo anti-Pax-5 mostrou-se mais adequado do que o anti-CD79a para marcação de células B em emblocados, por produzir menos fundo e pela marcação nuclear ser mais distinguível do que a citoplasmática. A concordância interobservadores da CML foi moderada ($k=0,434$), enquanto a da citologia convencional foi boa ($k=0,762$). Ambas as técnicas exibiram a mesma acurácia e, com aplicação da CML, houve redução do percentual de amostras insatisfatórias. A CML em conjunto com EC e imunocitoquímica apresentou maior sensibilidade (75%), especificidade (99%) e acurácia (89,47%). Como conclusão, a CML em conjunto com EC e imunocitoquímica pode ser aplicada para diagnóstico de linfoma canino, com maior sensibilidade, especificidade e acurácia.

Descritores: cães; neoplasias; biologia celular; diagnóstico; imuno-histoquímica; linfoma.

ABSTRACT

Fernandes NCCA. Morphological and immunophenotypic characterization of canine lymphoma in liquid based cytology and cell block immunocytochemistry [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Canine lymphoma is one of the most commonly treated neoplasia in dogs, frequently diagnosed through cytological smears. Differentiating B lymphomas from T lymphomas is important for prognosis and treatment, however, immunophenotyping is rarely applied to cytological preparations. Liquid-based cytology (LBC) is an automated method for producing cytological smears, allowing preservation of the residual material for other analysis, as cell block (CB) immunocytochemistry.

The aim of this study was to apply LBC and cell block immunocytochemistry in the diagnosis of lymphoid samples from dogs suspected of lymphoma. Besides, we intended to characterize the lymphoid cells regarding to its morphology, comparing to conventional cytology.

To accomplish these goals, 54 dogs were selected, being 10 of them with canine leishmaniasis. LBC smears were compared to conventional smears, with production of two types of CB: bouin and formalin with agarose. Also, an immunocytochemistry panel with anti-CD3, anti-CD79a, anti-Pax-5 and anti-Ki-67 was applied, for immunophenotyping and cellular proliferation determination.

As results, lymphoid cells were well preserved, with better nuclear definition, but smaller size and worst cytoplasmic definition, in LBC. Bouin CBs revealed cohesive groups, which allowed immunocytochemistry. In the other hand, agarose CBs were loose, with disperse cells, inadequate for lymphoid aspirates. Anti-Pax-5 antibody was

more adequate than anti-CD79a, once it produced less background and the nuclear marking was more distinct than cytoplasmic. CML interrater agreement was moderate ($k=0,434$), while conventional cytology agreement was good ($k=0,762$). Both techniques exhibited the same accuracy, and, with CML, there was reduction of unsatisfactory results. LBC with cell block immunocytochemistry presented the higher sensitivity (75,00%), specificity (99,99%) and accuracy (89,47%). As conclusion, LBC with immunocytochemistry CB can be applied for canine lymphoma diagnosis, with higher sensitivity, specificity and accuracy.

Descriptors: dogs; neoplasms; cell biology; diagnosis; immunohistochemistry; lymphoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Classificação dos linfomas e leucemias linfoides segundo a OMS (OWEN, 1980, p.46-47).....	30
Figura 1. Esquema representando a preparação de esfregaço citológico por método convencional (squash) (Meinkoth, 2009).....	41
Figura 2. Fluxogramas do processamento da CML por métodos padrão e reduzido....	42
Figura 3. Fluxogramas do processamento de embocado celular pelos métodos de Bouin e Agarose.	44
Quadro 2. Relação de anticorpos utilizados, com respectivos clone, marca, diluição e alvo.	48
Gráfico 1. Distribuição de cães com linfoma quanto ao sexo. São Paulo, 2015.	56
Gráfico 2. Distribuição de cães com linfoma quanto a definição racial. São Paulo, 2015.....	57
Gráfico 3. Frequência de linfomas B e T em cães com linfoma. São Paulo, 2015.	60
Figura 4. Fotomicrografias de citologia convencional e CML de aspirado de linfonodo reacional, cão, 400x. A: Panótico; B: Papanicolaou, Fonte: Fernandes, N.C.C.A, 2015.....	61
Figura 5. Fotomicrografia de CML de aspirado de linfonodo com linfoma, cão, 400x. A: Panótico; B: Papanicolaou. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.....	62
Figura 6. Fotomicrografia de EC de aspirado de linfonodo de cão com linfoma multicêntrico. Seta indica estrutura vascular preservada. H&E, 400x. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.....	65

Figura 7. Fotomicrografia de secções de linfonodo reacional, cão. A: H&E, 20x. B: imuno-histoquímica, Anti-CD3, 20x. C: imuno-histoquímica, anti-Pax-5, 200x. D: imuno-histoquímica, anti-CD79a, 200x. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.....	67
Figura 8. Fotomicrografias de EC de aspirado de linfonodo reacional, cão, 20x. A: H&E; B: anti-CD3; C: anti-CD79a; D: anti-PAX-5 e E: anti-Ki67. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.	68
Figura 9. Fotomicrografia de EC de aspirado de linfonodo com linfoma, cão, 40x. A: anti-CD79a e B: anti-PAX-5. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.....	69
Quadro 3. Concordância, com índice kappa e força dos testes de CML, citologia convencional e EC entre dois observadores, em teste duplo-cego. São Paulo, 2015.....	70
Quadro 4. Sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo da CML em combinação com EC e imunocitoquímica (consenso) e CML e EC (resultados do observador 2). São Paulo, 2015.	71
Quadro 5. Satisfatoriedade dos casos preparados por CML, citologia convencional e de consenso.	72
Quadro 6. Casos com discordância importante no diagnóstico de linfoma. São Paulo, 2015.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média das notas atribuídas pelos patologistas para a avaliação do tipo de colheita. São Paulo, 2015.....	53
Tabela 2. Média das notas atribuídas pelos patologistas para a avaliação do tipo de coloração. São Paulo, 2015.....	53
Tabela 3. Média das notas atribuídas pelos patologistas para a avaliação do uso do reagente de densidade na confecção dos esfregaços de CML. São Paulo, 2015.....	54
Tabela 4. Frequência de raças dos cães diagnosticados com linfoma. São Paulo, 2015.....	57
Tabela 5. Frequência das idades de pacientes caninos com linfoma. São Paulo, 2015..	58
Tabela 6. Frequência dos linfonodos aspirados para citologia em cães com linfoma canino. São Paulo, 2015.	59
Tabela 7. Frequência de cães tratados e tratamento empregado para linfoma canino. São Paulo, 2015.	59
Tabela 8. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à sobreposição celular. São Paulo, 2015.....	63
Tabela 9. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à definição de citoplasma. São Paulo, 2015.....	63
Tabela 10. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à definição de cromatina. São Paulo, 2015.....	64
Tabela 11. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à definição de nucléolos. São Paulo, 2015.....	64
Tabela 12. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à distinção núcleo citoplasmática. São Paulo, 2015.....	64

Tabela 13. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à presença de aglomerados. São Paulo, 2015.	64
Tabela 14. Características das reações imunocitoquímicas dos emblocados celulares (+ - fraco, ++ - moderada, +++ - forte). São Paulo, 2015.....	66
Tabela 15. Distribuição dos diagnósticos histopatológicos de cães com linfonodomegalia. São Paulo, 2015.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

CAAF – citologia aspirativa por agulha fina.

CAP – Colégio Americano de Patologia.

CB – *cell block*.

CCAF – Citologia por capilaridade por agulha fina.

CEUA-FMUSP - Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

CEUA-IAL – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz.

CEUAVET - Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

CML – Citologia em meio líquido.

EC – Emblocado celular.

FDA – *Food and Drug Administration*.

IAL – Instituto Adolfo Lutz.

LBC - *Liquid-based cytology*.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PARR - Reação em cadeia da polimerase para rearranjos de receptores antigênicos.

VPN – Valor preditivo negativo.

VPP – Valor preditivo positivo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Histórico	19
2.2. Colheita e processamento.....	21
2.3. Linfoma canino	28
2.4. Citologia do linfoma canino.....	31
2.5. Determinação da proliferação celular	35
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVOS.....	39
4.1. Objetivo geral	39
4.2. Objetivos específicos	39
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1. Bioética	40
5.2. Padronização de colheita, CML e EC	40
5.2.1. Cães suspeitos para linfoma canino	40
5.2.2. Colheita	40
5.2.3. Citologia em meio líquido.....	41

5.2.4. Emblocado celular	43
5.2.5. Análise microscópica	45
5.3. Caracterização do linfoma canino em CML e EC.....	45
5.3.1. Estudo prospectivo com cães suspeitos para linfoma canino	45
5.3.2. Colheita	46
5.3.3. Citologia em meio líquido	46
5.3.4. Emblocado celular	47
5.3.5. Imunocitoquímica	47
5.3.6. Diagnóstico	49
5.3.7. Análise da concordância interobservador	50
5.3.8. Determinação da acurácia	50
5.3.9. Análise estatística	51
6. RESULTADOS.....	52
6.1. Padronização de colheita, coloração e metodologia de citologia em meio líquido e emblocado celular.....	52
6.2. Caracterização do linfoma canino em CML e EC	56
6.2.1 Estudo prospectivo – dados epidemiológicos	56

6.2.2. Citologia em meio líquido	60
6.2.3. EC e imunocitoquímica	65
6.2.4. Concordância interobservador e avaliação do teste diagnóstico	70
7. DISCUSSÃO.....	74
8.CONCLUSÕES	83
9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	84
10. REFERÊNCIAS	85
ANEXO 1.....	94
ANEXO 2.....	96
ANEXO 3	98
ANEXO 4.....	100
ANEXO 5.....	106
ANEXO 6	109

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte entre os cães, alcançando taxas de mortalidade de 15 a 30% nessa espécie (BRONDEN et al., 2009). Nos últimos anos, a incidência de neoplasias foi crescente, assim como outras doenças relacionadas ao envelhecimento, principalmente devido ao aumento da expectativa de vida dos animais de companhia que recebem alimentação mais adequada, participam de programas de vacinação e são menos frequentemente acometidos por moléstias infecciosas (PAOLINI e KHANNA, 2008). Esses dados são reflexo do aumento no cuidado dos proprietários com seus animais de estimação, os quais partilham do ambiente doméstico, tornando-se assim parte integrante da família. Com o estabelecimento de relações próximas, as pessoas também buscam ativamente pelo diagnóstico e tratamento das doenças que acometem seus cães, tomando como referência a medicina humana. Assim, a exigência por melhores tratamentos deve se traduzir em desenvolvimento na oncologia canina, em todos seus aspectos, incluindo o diagnóstico.

O diagnóstico de neoplasias envolve áreas de imagem, patologia clínica e patologia, que auxiliam o clínico oncologista a melhor delinear o tratamento para o paciente e definir o prognóstico para cada caso, fornecendo um panorama ao proprietário do que pode ocorrer com seu animal e quais serão os recursos necessários para melhor tratá-lo. Na rotina, a citologia aspirativa é empregada frequentemente como diagnóstico inicial, fornecendo, em muitos casos, a indicação para realização de procedimentos cirúrgicos ou início de protocolos quimioterápicos.

A Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF) é o método com melhor custo benefício para obtenção de um diagnóstico morfológico. Muito menos onerosa do que um procedimento cirúrgico, pode ser realizada rapidamente e servir como triagem para

a hospitalização de pacientes. Pode reduzir a necessidade de exames de imagem e indicar medidas terapêuticas, reduzindo assim os custos (DEMAY, 2013).

A CAAF consiste em colher, através da inserção de agulha de baixo calibre, células de sítios alvo suspeitos para neoplasia, que podem ser nódulos cutâneos e subcutâneos, formações em órgãos parenquimatosos acessados através de ultrassom, linfonodos entre outros.

No caso dos linfomas, frequentemente o diagnóstico é conclusivo pelo próprio exame citológico, indicando-se o início do tratamento quimioterápico, pois os tipos celulares envolvidos e o padrão morfológico são reconhecidos por um citopatologista experiente. Entretanto, este diagnóstico fica, muitas vezes, limitado à avaliação microscópica dos esfregaços, sem o emprego de exames auxiliares como citometria de fluxo ou imunocitoquímica, que poderiam oferecer importantes informações quanto ao tipo de linfócito envolvido e ao seu índice proliferativo. O exame padrão para este diagnóstico seria o histopatológico dos linfonodos afetados, para observação da arquitetura nodal, com associação da imuno-histoquímica. Entretanto, este exame não é a primeira opção dos clínicos, que muitas vezes preferem evitar o procedimento cirúrgico e optam pela citologia. Assim, aprimorar o valor diagnóstico do aspirado permitiria uma melhor abordagem terapêutica e definição prognóstica do paciente, sem precisar submetê-lo a procedimento cirúrgico para retirada do linfonodo. Isto pode ser alcançado com o melhor aproveitamento do aspirado obtido, armazenando-o para análises posteriores, como a confecção de emblocados celulares para exame imunocitoquímico, ou para exames biomoleculares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

A história da citologia teve início no século XVII, quando o homem passou a observar as células através do microscópio óptico; Jan Swammerdam (1637-1680) observou hemácias no instrumento recém-desenvolvido por Sacharias Janssen (1580 – 1638) e seu pai (DIAMANTIS et al., 2013). O termo célula foi cunhado por Robert Hooke (1635-1701), ao observar cortiça sob microscopia (BEDROSSIAN, 2007). Entretanto, a princípio, tratava-se de uma atividade contemplativa, de observação. No século XIX, foi empregada pela primeira vez como arte diagnóstica, com o achado de células atípicas no escarro de um paciente doente. No início do século XX, em 1927, o professor Dungeon da *King Cross University*, aprimorou a obtenção de células através da esfoliação de tumores, o que culminou na publicação da primeira revisão ilustrada e sistemática do emprego da citopatologia no diagnóstico de lesões pulmonares por escarro (HUSAIN e BUTLER, 2000). Apesar disso, a citologia diagnóstica ficou em segundo plano e ganhou força apenas com as pesquisas de George Nicolas Papanicolaou pouco depois.

George Nicolas Papanicolaou nasceu na Grécia em 1883 e conduziu seus estudos em Medicina na Universidade de Atenas, posteriormente completando sua formação com filosofia, zoologia e fisiologia na Alemanha e França. Mas foi na Universidade de Cornell, nos Estados Unidos, que começou um dos estudos mais importantes de sua vida, através da observação de esfregaços de células que esfoliavam da vagina de porquinhos da Índia, para estudo do ciclo reprodutivo destas fêmeas. Ele percebeu alterações na população celular conforme o ciclo mudava e resolveu investigar

se os mesmos eventos poderiam ser vistos também em mulheres, o que se provou realidade. A observação dos esfregaços cérvico-vaginais resultou na detecção de células neoplásicas, o que levou a publicação do artigo “*The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus*” em 1941, em parceria com Herbert Traut. Como contribuição também importante, Papanicolaou percebeu a importância da fixação imediata dos esfregaços e trabalhou no aprimoramento da coloração das células, o que facilitou a percepção das células alteradas (PAPANICOLAOU e TRAUT, 1941).

Na medicina veterinária, a história da patologia foi fortemente influenciada pelo desenvolvimento da medicina humana. Rudolph Virchow, importante pesquisador e desenvolvedor da patologia humana, foi incentivador da patologia veterinária. Alguns estudos em citologia animal, inclusive, começaram como pesquisas com intuito de aplicação para pacientes humanos. Em 1922, por exemplo, Tagaki realizou estudo citológico da tireoide canina, com propósito de estabelecer paralelo com a histologia do órgão e compreender melhor a morfologia destas células (TAGAKI, 1922). Com propósito clínico veterinário, em 1945, Bloom et al. (1945) publicaram o primeiro trabalho com uma descrição detalhada do linfoma canino, com o estudo das características citológicas através do *imprint* de linfonodos aumentados, mostrando a possibilidade do diagnóstico da doença em cães pela citologia.

Atualmente, tanto a citologia humana quanto a veterinária passam por revolução técnica, com a introdução de metodologias complementares para aprimoramento do diagnóstico de neoplasias e melhoria nos programas de rastreio.

2.2. Colheita e processamento

É fundamental que a colheita da citologia seja feita de modo correto, pois seu insucesso pode resultar em esfregaços inadequados, com diagnóstico limitado ou insatisfatório.

A colheita da citologia por agulha fina pode ser realizada através da aspiração do sítio de interesse, ou apenas por capilaridade, posicionando-se a agulha, mas sem exercer a pressão da aspiração. Mair (1988) avaliou os dois métodos em uma sucessão de 100 casos de massas superficiais, através da atribuição de um escore que considerava a presença de coágulos sanguíneos, degeneração celular, preservação da arquitetura e quantidade de material diagnóstico presente. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos. Tauro et al. (2012) também não observaram diferença estatística entre os dois métodos ao avaliar esfregaços de citologia de tireoide, entretanto relataram que em processos benignos e/ou menos celulares, a citologia com aspiração pode produzir esfregaços mais frequentemente diagnósticos, enquanto em processos altamente celulares, a citologia por capilaridade com agulha fina (CCAF) é preferencial. A combinação dos dois métodos, com a confecção de esfregaços com e sem aspiração, permite uma melhora da sensibilidade e seria a melhor opção para a citologia por agulha fina (RIZVI, 2005). A citologia causa desconforto mínimo ao paciente, possibilitando que o procedimento seja realizado comumente em cães sem emprego de agentes anestésicos ou tranquilizantes (VERNAU, 2001).

A avaliação morfológica de esfregaços citológicos convencionais pode ser comprometida pela realização inadequada da técnica, gerando esfregaços espessos ou com outros artefatos que comprometam a análise morfológica (LINDER, 1998). Para

minimizar estes interferentes, há mais de uma década, na medicina humana, adotou-se a técnica de citologia em meio líquido (CML) para amostras do trato ginecológico e outros sítios anatômicos, incluindo efusões, lavados e punções.

A CML consiste na transferência imediata das células colhidas para líquido preservativo, resultando em uma amostra rica em células, que possibilita a confecção de diversas lâminas, além da manutenção de conteúdo nuclear e proteínas no material residual, possibilitando testes moleculares e confecção de esfregaços com amostra mais concentrada, em monocamada, com coloração adequada e livre de interferentes. (BERNSTEIN et al., 2001; GUPTA et al., 2001, NONOGAKI et al., 2004). Para este processo há disponibilidade de diferentes técnicas no mercado, manuais e automatizadas, sendo as aprovadas por *Food and Drug Administration* (FDA – USA): Surepath® (Becton & Dickinson - B&D) e Thinprep® (Hologic).

O SurePath® da empresa B&D é baseado na concentração das células através de centrifugações, passagem do material colhido por líquido a base de ficol para enriquecimento celular, que retira possíveis interferentes (excesso de hemácias e leucócitos indesejáveis). De modo automatizado, as células são transferidas para a lâmina e coradas pela técnica de Papanicolaou.

O Thinprep® da Hologic foi aprovado em 1991 pelo FDA para uso em citologia de sítios não ginecológicos e em 1996 como substituição para o método convencional de Papanicolaou. Consiste na homogeneização e concentração das células imersas num líquido preservativo através de um filtro cilíndrico, automático e impulsionado por uma bomba de vácuo. A quantidade de células presas no filtro é controlada, debris celulares e excesso de hemácias e leucócitos são retirados, com transferência posterior de uma monocamada mais rica em células alvo para a lâmina (LINDER, 1998).

Em medicina humana, a CML é mais frequentemente empregada para citologia ginecológica, entretanto também pode ser utilizada para processamento de amostras de outros sítios anatômicos. Ambas as técnicas (Surepath® e Thinprep®) permitem a confecção de esfregaços a partir de materiais não ginecológicos, com preservação das características celulares (HODA, 2007).

A CML tem sido empregada para o processamento de diferentes amostras não ginecológicas em medicina humana, como líquidos cavitários, líquido, escarro, lavados e biópsias aspirativas, inclusive de linfonodos (LINDER, 1998; HERNEL e SUURMEIJER, 2013).

Michael et al. (2001) compararam a análise de esfregaços preparados com Thinprep® e Surepath® a partir de amostras de urina, líquidos cavitários e CAAF através da análise de cinco observadores. Surepath® exibiu menos agregados de linfócitos, redução maior do volume celular e análise de cromatina mais difícil quando comparado com Thinprep®. Além disso, com Surepath® as células apresentavam-se em diferentes planos, formando arranjos tridimensionais, e exigia que o observador mudasse constantemente o foco da análise.

Algumas alterações artefatuais resultantes do preparo com CML podem interferir no diagnóstico de citologias não ginecológicas, e é importante que o patologista seja advertido quanto a isso. Há redução de matriz extracelular, redução do tamanho celular, com células por vezes exibindo forma discretamente fusiforme. Além disso, células pequenas como linfócitos podem agregar-se e há redução importante da quantidade de sangue ao fundo (MICHAEL e HUNTER, 2000).

Estudo de 135 citologias aspirativas de tireoide, preparadas tanto com método convencional como com CML revelaram maior número de diagnósticos insatisfatórios

na CML, provavelmente pela baixa celularidade de lesões benignas. Entretanto, o diagnóstico foi possível para todas as neoplasias detectadas (FROST, 1998).

Na medicina humana, a citologia pode ser empregada para o diagnóstico de linfomas, com auxílio da citometria de fluxo ou da imunocitoquímica de embocado celular (EC) (MAYALL et al, 2003). Na medicina veterinária, a citologia é aceitável como forma diagnóstica para linfoma canino uma vez que estes apresentam-se frequentemente sob forma difusa (CARTER, 1986), entretanto não há estudos com emprego da CML.

Um estudo em Bruxelas, envolvendo dois hospitais universitários, comparou o diagnóstico por CAAF de linfonodos com a citologia convencional e a CML. Foram utilizadas 96 amostras colhidas em CML por radiologistas, utilizando SurePath®, e 43 esfregaços convencionais produzidos por patologistas, todos comparados com resultados histopatológicos. Os casos citológicos foram classificados como hiperplasia reacional, suspeito para neoplasia, metástases e linfomas. Não houve diferença estatística entre a sensibilidade, especificidade e acurácia em ambos os métodos, entretanto a CML apresentou mais resultados insatisfatórios, que podem estar relacionados aos profissionais de colheita (GARBAR et al., 2008). O aumento da acurácia em aspirados de linfonodo pode ser conseguido através da aplicação de estudos adicionais, como a imunocitoquímica de EC e associando-se a avaliação do esfregaço corado por método de panótico com esfregaço corado com Papanicolaou, para garantir a melhor avaliação, tanto de citoplasma, quanto de núcleo (CARAWAY, 2005).

O EC pode ser produzido a partir do remanescente da CML e consiste em concentrar as células e processá-las em blocos parafinados, com cortes histológicos. Nestes cortes, é possível executar colorações adicionais e reações imunocitoquímicas para caracterização de processos neoplásicos e infecciosos (HERNEL e SUURMEIJER,

2013). O EC, além de permitir a avaliação das características citomorfológicas, frequentemente permite acessar a microarquitetura da área (CHOI et al., 2014). O EC também permite superar parte das dificuldades em empregar marcações imunocitoquímicas em esfregaços citológicos, as quais frequentemente exibem resultados falso-positivos pela presença de fundo (LEONG et al., 1999). Como desvantagem, é um método que dispende maior tempo de preparo, atrasando o resultado da análise citológica, entretanto pode ser valioso quando a aplicação de marcadores imunocitoquímicos é necessária (ZITO et al., 1994).

Existem diversas técnicas para preparo dos ECs descritas, as quais variam quanto aos agentes fixadores empregados e técnica para produção do agregado celular. Mayall e Darlington (2010) descrevem método simplificado denominado pelos autores “*The poor man cell block*”, em que colocam o material aspirado na tampa invertida de um tubo pequeno. Posteriormente, o tubo é acoplado a tampa de ponta-cabeça, contendo uma gaze ou algodão embebidos em formalina; o material fixado pode ser incluído em parafina. Podem ser empregadas marcações imunocitoquímicas ao emblocado produzido, o qual exibe elevada celularidade.

O emprego da solução de Nathan, composta por 90% de álcool absoluto e 10% de formalina 40%, também foi descrito para produção de ECs, com aprimoramento na sensibilidade de detecção de malignidades comparado à análise isolada de esfregaços, com boa preservação de características nucleares e citoplasmáticas. Entretanto, amostras escassas não permitiam a produção de ECs. (NATHAN, 2000). Domagala et al. (1989) descrevem método que emprega fixação em álcool absoluto a 4° C com posterior desidratação em acetona e xilol, para inclusão em parafina. Como vantagem, o método pode ser realizado em cerca de quatro horas, permitindo o diagnóstico mais rápido. Todos estes métodos descritos exibem como dificuldade a transposição do agregado

celular para o papel de seda e cassete histológico, podendo haver perda de material. O emprego de gel de agarose para produção de agregado de mais fácil manipulação e visualização pode ser uma opção (CHOI, 2014). Zanoni et al. (2012) empregaram a técnica de gel de agarose para aprimoramento do diagnóstico citológico em amostras caninas com sucesso.

A imuno-histoquímica é uma ferramenta prática e de grande aplicação na patologia humana, especialmente na oncologia e vem apresentando um paralelo na rotina de anatomia patológica veterinária. Consiste na detecção de antígenos teciduais através da ligação com anticorpos específicos. Esta ligação é demonstrada por reação colorida ou fluorescente, que permite a visualização sob microscopia de luz ou fluorescência, respectivamente (RAMOS-VARA e MILLER, 2014). A técnica foi empregada pela primeira vez em 1941, por meio da conjugação de anticorpo anti-Pneumococos com grupo fluorescente (COONS et al., 1941). Na década de 90, a técnica passou por grande avanço, com introdução de etapa de recuperação antigênica, que permitia a realização do teste em tecidos fixados rotineiramente (RAMOS-VARA, 2005).

Os anticorpos empregados são produzidos em espécies variadas de mamíferos e aves, e podem ser monoclonais ou policlonais, sendo que os primeiros apresentam maior especificidade, enquanto os segundos exibem uma reatividade mais ampla (HAYAT, 2002). A técnica também pode ser empregada em ECs produzidos a partir de material remanescente de CML. Em medicina humana, foi demonstrada a detecção do vírus HPV em amostras de colo uterino preservadas em CML (AFIFY et al., 2009), assim como de p16INK4a e Ki-67 (AKPOLAT et al., 2004). Sakamoto et al. (2012) demonstraram a marcação com sucesso de diversos anticorpos por imunocitoquímica de EC de coágulo de trombina, com celularidade de origem ginecológica e não

ginecológica, incluindo líquidos cavitários e aspirados de tireoide. Houve redução de resultados falso-negativos, com detecção de uma lesão cervical que não havia sido diagnosticada no esfregaço citológico e identificação de mesotelioma por aplicação do anticorpo anti-calretinina.

Apesar do número reduzido de anticorpos específicos para aplicação em espécies animais, diversos estudos comprovam a presença de reações cruzadas com anticorpos delineados para aplicação em tecidos humanos (RUIZ et al., 2005). Para isso, é importante a validação do ensaio para a espécie, com ajustes na diluição do anticorpo, tempo de incubação, recuperação antigênica e outros parâmetros que precisem ser adaptados (RAMOS-VARA e MILLER, 2014).

Por muito tempo, o diagnóstico de neoplasias na medicina veterinária era dependente apenas da avaliação morfológica sob coloração de H&E, entretanto, com a evolução da terapêutica e maior especialização da oncologia veterinária na prática clínica, tornou-se fundamental um diagnóstico mais acurado, como o fornecido pelo exame imuno-histoquímico (RAMOS-VARA et al., 2008). Na avaliação, por exemplo, de doenças linfoproliferativas, a aplicação de marcadores é importante para definição prognóstica e terapêutica (VALLI et al., 2013). Caniatti et al. (1996) aplicaram com sucesso painel de anticorpos para diferenciação de neoplasias B e T em preparados citológicos em citocentrífuga de CAAF, demonstrando a aplicabilidade da técnica em aspirados de linfonodo.

2.3. Linfoma canino

Os linfomas são neoplasias de origem linfoide, frequentemente originadas de órgãos linfoides sólidos, como linfonodos e baço (ARAUJO et al., 2008). Em humanos, há uma incidência crescente de linfoma não-Hodgkin nos últimos anos e estimou-se 5.190 casos novos em homens e 4.450 em mulheres, no Brasil, no ano de 2012, para este tipo neoplásico (INCA, 2012). Em cães, é a neoplasia hematopoiética mais comum e representa de 5 a 10% das neoplasias caninas. No Brasil, estudo realizado no Rio Grande do Sul, demonstrou tratar-se da segunda neoplasia que leva cães a morte ou eutanásia (FIGHERA et al., 2008).

A etiologia do linfoma não-Hodgkin permanece pouco compreendida nos humanos e cães. Em espécies de primatas, além de felinos e bovinos, há uma relação entre o linfoma e agentes virais, entretanto a mesma relação não foi estabelecida para neoplasias caninas (TESKE et al, 1994).

Os linfomas caninos e humanos possuem características morfológicas, comportamentos biológicos e aberrações genéticas semelhantes, além de uma incidência similar em ambas as espécies (ROWELL et al., 2011). O linfoma de grandes células B é o tipo mais comum nos cães, o mesmo dos não-Hodgkin dos humanos (PONCE et al., 2010).

O linfoma afeta cães de diversas idades e raças e é comumente tratado com quimioterapia (VALLI et al., 2011). A apresentação clínica do linfoma é variável, dependendo da classificação, grau e sítio acometido. Comumente, os cães desenvolvem linfomas multicêntricos, comparáveis ao linfoma não-Hodgkin humano (GAMLEM et al., 2008). Boxers, São Bernardos, *Scottish terriers*, *Basset hounds*, *Airedale terriers* e

Bulldogs são relatados como raças mais predispostas ao linfoma, enquanto *Dachshunds* e Pomerânias apresentam risco reduzido para esta neoplasia (VALLI et al., 2011).

Estudo realizado em Porto Alegre, com participação de 30 cães com linfoma, demonstrou predomínio de linfoma multicêntrico, com 60% de cães machos e idade média de 9 anos de idade. Dos linfomas observados, 62% eram de células B (NEUWALD et al., 2014). Zanini et al. (2013) em estudo realizado em São Paulo, observaram idade média de 9,5 anos e 64% dos cães com raça definida no grupo de linfoma.

O linfoma canino é classificado anatomicamente e com estágio determinado baseado nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) para linfomas e leucemias linfoides de cães e gatos. Essas informações devem ser acessadas através de exames clínicos, radiográficos e hematológicos, sem a possibilidade de uso do sistema TNM para estas neoplasias (OWEN, 1980). O **quadro 1** apresenta a classificação anatômica e o estadiamento das neoplasias linfoides dos animais.

Quadro 1. Classificação dos linfomas e leucemias linfoides segundo a OMS (OWEN, 1980, p.46-47).

ESTADIAMENTO CLÍNICO	CLASSIFICAÇÃO ANATÔMICA
<p>I. Envolvimento de apenas um linfonodo ou apenas o tecido linfoide de um órgão (excluindo medula óssea.</p> <p>II. Envolvimento de muitos linfonodos de uma única área.</p> <p>III. Envolvimento generalizado dos linfonodos.</p> <p>IV. Envolvimento do fígado e/ou baço.</p> <p>V. Manifestações sanguíneas e envolvimento da medula óssea.</p> <p><i>a. Sem sinais sistêmicos</i></p> <p><i>b. Com sinais sistêmicos</i></p>	<p><i>a. Generalizado</i></p> <p><i>b. Alimentar</i></p> <p><i>c. Tímico</i></p> <p><i>d. Pele</i></p> <p><i>e. Leucemia (verdadeira*)</i></p> <p><i>f. Outras (inclui renal solitário)</i></p>

*Somente sangue e medula óssea envolvidos.

2.4. Citologia do linfoma canino

O termo linfoma foi cunhado por Virchow (1845) para definir a linfadenopatia neoplásica de humanos. Deste então, diversas classificações surgiram com o intuito de melhor identificar e prever o comportamento das neoplasias linfoides humanas.

Observaram-se, recentemente, diversas publicações com intuito de classificar os linfomas caninos, além de técnicas mais aprimoradas para esclarecimento de imunofenótipo e proliferação celular, em preparados citológicos ou cortes parafinados. Histologicamente e citomorfologicamente, percebeu-se a presença de semelhanças entre os linfomas dos cães e os linfomas não-Hodgkin dos humanos, o que permitiu a adaptação das classificações humanas na espécie animal. (BLOOM et al., 1945, CARTER et al., 1986; ROWELL et al., 2011).

Na medicina humana, mais de 200 artigos foram publicados desde 1985, caracterizando a CAAF para linfomas, que pode ser fonte de esclarecimento e aproximação diagnóstica, quando combinada com citometria de fluxo e imunocitoquímica (SANDHAUS, 2000). Para o diagnóstico de linfoma canino, a citologia é o método mais empregado, uma vez que esta doença frequentemente é uma proliferação difusa que compromete a arquitetura nodal, detectada por citologia com alta sensibilidade (BIENZLE e VERNAU, 2011).

Para melhor resultado da citologia aspirativa de linfonodo, são importantes: colheita adequada, preparo de esfregaços por profissional experiente, determinação da adequabilidade da amostra, realização preferencial de mais de uma coloração (fixadas em ar – Panótico e em álcool – Papanicolaou) e seleção de painel de anticorpos para imunocitoquímica de acordo com a amostra (MEDA et al., 2000).

As amostras citológicas de linfonodos normais exibem geralmente celularidade alta e contêm, aproximadamente, 85% de linfócitos pequenos, 5 a 10% de linfócitos intermediários e 5% de linfócitos grandes. Alguns plasmócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e melanócitos, assim como poucas figuras de mitose, podem ser vistos. Os linfomas são caracterizados por um número aumentado de linfócitos de apenas um tamanho, ao invés de uma população mista com linfócitos pequenos, intermediários e grandes, levando-se em conta os sinais clínicos do paciente (MACNEILL, 2011). Amostras com mais de 50% ou 80% de células jovens podem ser consideradas como positivas para linfoma canino (CANIATTI, 1996).

Rotineiramente, os esfregaços citológicos são corados por método de panótico rápido, para visualização apenas das características citomorfológicas e permitem o diagnóstico de linfoma na maioria dos casos (MACNEILL, 2011; SAPIERZYNSKI, 2012), apesar de não fornecerem informações sobre a arquitetura tecidual. Devido ao predomínio de lesões difusas na espécie canina, com baixa prevalência de linfomas foliculares (VALLI et al., 2013; PONCE et al., 2010), a citologia pode ser uma maneira rápida para indicar o tipo celular (CARTER et al., 1986).

Em 1942, Gall e Mallory estabeleceram a primeira classificação para linfoma humano, a qual foi empregada na medicina veterinária pouco tempo depois, em 1945, através da avaliação de esfregaços citológicos e cortes histológicos de pacientes caninos (BLOOM et al, 1945). Desde estas primeiras tentativas, as neoplasias linfoides eram classificadas quanto ao tamanho celular (grande, intermediário ou pequeno), tamanho e forma nuclear, densidade da cromatina, número, tamanho e distribuição dos nucléolos e volume e basofilia do citoplasma (SÖZMEN et al., 2005), critérios utilizados até o presente na medicina veterinária.

As classificações de Kiel e *Updated Kiel* (STANSFELD et al., 1988) são baseadas em critérios morfológicos das células neoplásicas (tamanho, aspecto da cromatina, tamanho e coloração do citoplasma), sendo a segunda amparada por critérios de imunofenotipagem. Muitas vezes, são utilizadas como base para classificações citológicas, dividindo os linfomas em alto e baixo grau (PARODI, 2001; SAPIERZYNSKI et al., 2012; PONCE et al., 2010). A classificação *Working Formulation* também é adaptada para esfregaços citológicos, dividindo os linfomas em três graus: baixo, intermediário e alto (CARTER et al, 1986).

A classificação histológica aplicada atualmente em cães, também adaptada da medicina humana, é a proposta e revisada pela OMS e conhecida por *WHO System*. A eficiência da classificação foi demonstrada no Projeto de Classificação de Linfomas Não-Hodgkin, em 1997, quando um grupo de cinco patologistas especialistas da área alcançou concordância de 85%, ao avaliarem 1400 casos de linfomas e leucemias humanas. Um estudo de concordância com mais de 300 casos também foi conduzido para linfomas caninos, com concordância entre os observadores e o diagnóstico ouro de 83% e concordância intra-observador de 65,5%, mostrando a aplicabilidade da classificação também na medicina veterinária. Entretanto é ressaltada a importância absoluta da imunofenotipagem para este tipo de abordagem (VALLI et al., 2011).

Uma das limitações encontradas no diagnóstico do linfoma canino é a imunofenotipagem através de punções aspirativas, principalmente devido à dificuldade na obtenção de amostras adequadas e preservadas para realização de exames esclarecedores, como citometria de fluxo e imunocitoquímica (AULBACH et al., 2010).

A importância da imunofenotipagem para os linfomas caninos também é tema de diversas publicações científicas. Kiupel et al. (1999), em análise uni e multivariada de 74 cães com linfoma, não observaram diferença em sobrevida entre cães classificados

como alto e baixo grau por *Kiel updated*, nem entre cães com linfoma B e T. Já outro estudo, com análise de 54 cães tratados com quimioterapia para observação da sobrevida nos diferentes tipos de linfoma, classificados por Kiel Updated, observou-se sobrevida geral menor do linfoma T do que B, uma vez que o tipo T mais comum (pleomórfico misto) foi mais agressivo do que o B mais comum (centroblástico pleomórfico). E dentre os subtipos classificados, a menor sobrevida foi a de cães com linfoma B tipo Burkitt e a maior de cães com linfoma T de células claras, mostrando a importância não só da imunofenotipagem, mas também da classificação adequada com associação de critérios morfológicos (PONCE et al., 2004). Segundo Valli et al. (2013), a caracterização em T e B é essencial, com correlação de aspectos morfológicos e proliferativos, para uma classificação mais acurada das lesões, o que implica em diferenças prognósticas e terapêuticas. Em pesquisa realizada nos Estados Unidos pela *Veterinary Cancer Society*, 76% dos clínicos relataram pedir imunofenotipagem de cães com linfoma e 31% dos veterinários tratam diferencialmente linfomas B e T (REGAN et al., 2013).

O uso de citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica da população neoplásica tem sido empregado, tanto em medicina humana (SANDHAUS, 2000), como em veterinária (CULMSEE et al., 2001). Por meio de marcadores homólogos entre humanos e cães, é permitido avaliar a reatividade de CD3 (linfócitos T) e CD79a (linfócitos B), além de estimar proliferação celular (Ki-67) de modo mais acurado do que o índice mitótico, visto que o mesmo exibe limitações na histopatologia e, principalmente, na citopatologia (PONCE et al., 2010; CARTER et al., 1986). A reação em cadeia da polimerase para rearranjos de receptores antigênicos (PARR) permite verificar a clonalidade de uma população de células linfoides através da amplificação da região do DNA que codifica as várias regiões dos receptores B e T. Assim como a

citometria de fluxo, pode ser realizada a partir de material de aspirado por agulha fina, sem necessidade de biópsia, porém pode ser realizado em material conservado de maneiras variadas (tecidos, esfregaços citológicos, células vivas ou mortas), enquanto a citometria exige que a amostra seja conservada em solução salina ou meio de transporte adequado (TALHEIM et al., 2013).

2.5. Determinação da proliferação celular

O índice de proliferação em tumores geralmente reflete um desbalanço entre a proliferação de células e a diferenciação e senescência de outras. Para identificar a fração em multiplicação há diferentes métodos, como a estimação do índice mitótico, através da contagem de figuras de mitose em cortes corados com H&E, a marcação com PCNA, Ki-67 e de proteínas agirófilas dispersas em núcleos pelo método de contagem de AgNORs (MADEWELL, 2001).

O anticorpo Ki-67 permite a avaliação da fração em crescimento de um tecido, pois é direcionado a uma proteína presente em células normais e neoplásicas em proliferação durante todas as fases do ciclo celular, excluído G0 e início de G1 (GERDES et al., 1983).

Assim como em humanos, essa proteína é expressa nos tecidos normal e neoplásico de diversas espécies de mamíferos, conforme comprovado na análise de culturas celulares de amostras de camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, porcos, entre outros, de Falini et al. (1989).

A avaliação da proliferação celular por Ki-67 é considerada fator prognóstico em linfomas não-Hodgkin humanos, com variação dentre os subtipos (HE et al., 2014). Especialmente em linfomas de células do manto, a avaliação de proliferação por Ki-67 é

importante fator prognóstico, superando a avaliação de tipos citomorfológicos para este subtipo de linfoma, ao dividir os pacientes em maior ou menor que 30% de positividade (HOSTER et al., 2014).

Em medicina veterinária, considera-se o índice mitótico um critério importante a ser avaliado no exame histopatológico de linfomas (PONCE et al., 2010 e VALLI et al., 2013). Entretanto, em preparados citológicos, as figuras de mitose são caracteristicamente menos presentes e mais difíceis de detectar (CARTER et al., 1986). A presença de 2 a 3 figuras de mitose em campo de 400 x de aumento, em esfregaços citológicos, pode indicar elevada proliferação celular (CARTER, 1986). Sözmen et al. (2005) estimaram o índice mitótico em esfregaços nodais através do rastreamento de cinco campos em aumento de 500x contando as figuras de mitose e calculando o número médio. Definiu-se um índice mitótico baixo (0-1 figuras de mitose), médio (2-4 figuras de mitose) e alto (5 ou mais figuras de mitose). Ponce et al. (2010) dividiram os casos de linfomas em alto e baixo grau, levando-se em conta tamanho celular e índice mitótico, com esclarecimento de casos duvidosos com auxílio de um marcador de proliferação celular (Ki-67, clone MIB-1), mas sem comparar estes dados com sobrevida e tempo livre de recidiva. Phillips et al. (2000) mostraram que a análise de Ki-67 pode prever o tempo para a recidiva, mas não o tempo de sobrevida global. Valli et al. (2013) demonstraram em seu estudo que o índice mitótico e a separação entre linfomas de alto e baixo grau pode alterar o prognóstico do paciente, com diferenças em resposta terapêutica e prognóstico.

3. JUSTIFICATIVA

A CML é uma tecnologia amplamente utilizada na rotina ginecológica para o rastreamento do câncer de colo de útero, através do exame de Papanicolaou em humanos, e não ginecológica, por tratar-se de uma metodologia prática e automatizada que aumenta a qualidade dos esfregaços, além de permitir o uso do material residual para outros testes, morfológicos ou moleculares.

Na medicina veterinária, observa-se uma profunda carência de publicações nessa área. A CML oferece a possibilidade de uma colheita simples para o clínico, permitindo a redução dos casos insatisfatórios ou limitados por artefatos, como demonstrado na medicina humana. O linfoma canino é vastamente diagnosticado através de citologia na prática da clínica oncológica veterinária, conforme debatido no Consenso de Linfoma Multicêntrico Canino, no ano de 2013, organizado pela Associação Brasileira de Oncologia Veterinária. Entretanto, o material aspirado é subutilizado, sendo depositado inteiramente em lâminas secas ao ar para produção de esfregaços corados por panótico. Com isso, não é possível realizar outras colorações, como a de Papanicolaou, mas, principalmente, não há possibilidade de realizar a imunofenotipagem desses tumores.

É consenso que a diferenciação entre linfomas B e T é fundamental para o diagnóstico mais acurado do linfoma e que o exame histopatológico é a ferramenta mais adequada para o diagnóstico do linfoma, permitindo avaliações prognósticas e de conduta terapêutica, contudo, razões desde o estado clínico do paciente, a experiência do clínico, até a condição financeira do proprietário, dificultam a realização de um procedimento cirúrgico e retirada do linfonodo para exame histopatológico. Uma opção

de imunofenotipagem a partir de material citológico tornaria esse exame muito mais acessível ao oncologista.

A imunocitoquímica a partir de amostras não somente puncionadas, mas com os esfregaços produzidos pelo próprio clínico, é possível, mas oferece sérias limitações. Caso a fixação seja inadequada, a lâmina espessa ou com outros artefatos, o exame ficará prejudicado, situação notada somente durante a leitura do esfregaço no laboratório. Além disso, uma vez que os esfregaços são esgotados, há limitação para realização de novas lâminas, visto que não há armazenamento de material residual. É possível utilizar o material depositado no esfregaço para PARR, entretanto, o método não permite a associação do resultado com as características citomorfológicas, assim como a citometria de fluxo.

A padronização de uma técnica de colheita que permita estudos adicionais, imunocitoquímicos e moleculares, mantendo a facilidade da citologia e a possibilidade de avaliação conjunta da imunomarcagem com a morfologia, seria interessante para a rotina clínica com os pacientes suspeitos para neoplasias. No caso de linfomas, seria ainda mais propício, por tratar-se de um tipo de câncer com tratamento clínico, com raras indicações cirúrgicas. Assim, o refinamento do diagnóstico citológico permitiria um acompanhamento melhor do paciente, além de uma caracterização morfológica, fenotípica e molecular, com indicações clínicas e uma melhor avaliação prognóstica.

Do ponto de vista de pesquisa comparada, a CML permite o armazenamento de material para inúmeros testes através de uma colheita simples, sem riscos para o paciente. Assim, poderia abrir uma nova gama de investigações a partir de aspirados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Aplicar a citologia em meio líquido em combinação com emblocado celular e imunocitoquímica para o diagnóstico e imunofenotipagem de linfoma em cães.

4.2. Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de colheita e confecção do esfregaço para citologia de meio líquido de amostras colhidas por punção de agulha fina provenientes de linfonodos superficiais em cães suspeitos para linfoma.
- Analisar comparativamente esfregaços citológicos preparados por técnica convencional de *squash* corados por método de panótico e citologia em meio líquido corados pela técnica de Papanicolaou quanto às características morfológicas.
- Padronizar a confecção de emblocado celular a partir do material remanescente da colheita para citologia de meio líquido.
- Padronizar a imunofenotipagem e determinação de proliferação celular em emblocados celulares através de método imunocitoquímico.
- Comparar a concordância interobservador e o índice de satisfatoriedade da citologia convencional com a citologia em meio líquido.
- Analisar a acurácia diagnóstica do uso conjunto de CML, EC e imunocitoquímica, com a histopatologia como método de referência, e avaliar os índices de satisfatoriedade.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Bioética

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CEUAVET) (**Anexo 1**), protocolo nº 2967/2013 e pela Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina da USP (CEUA-FMUSP) (**Anexo 2**), protocolo nº 148/14. Os proprietários dos cães participantes foram informados sobre o experimento e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Os casos de Leishmaniose utilizados para controle são amostras provenientes do Programa de controle de leishmaniose visceral e parte do projeto de fortalecimento da sub-rede de diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina, aprovado pela Comissão em uso de animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL).

5.2. Padronização de colheita, citologia em meio líquido e emblocado celular.

5.2.1. Cães suspeitos para linfoma canino

Participaram desta fase quatro cães suspeitos para linfoma multicêntrico. Todos exibiam linfadenomegalia generalizada, sem tratamento prévio. Dados epidemiológicos como raça, sexo e idade foram compilados em ficha clínica individual (**Anexo 3**).

5.2.2. Colheita

Foi colhida amostra por CCAF dos linfonodos aumentados, totalizando seis linfonodos dentre os quatro pacientes. Todas as colheitas foram realizadas pelo mesmo

veterinário, com agulha de calibre 25x7. Para isso eram realizados movimentos de vai-e-vem, sem aspiração. Para cada linfonodo foram colhidas duas amostras de CML, em frascos contendo 10 mL de solução preservativa (Surepath®, Becton Dickinson, Tripath Imaging, Burlington, NC, USA). A primeira amostra consistiu no remanescente do canhão da agulha após a confecção de um esfregaço convencional citológico preparado por técnica de *squash* (**Figura 1**). A segunda amostra correspondeu ao total colhido em uma punção aspirativa, lavado com auxílio de seringa plástica de 10 mL no frasco coletor, com o líquido preservativo. Após, a lâmina convencional foi seca ao ar e corada por método de panótico. Os frascos de CML foram armazenados à temperatura ambiente e encaminhados ao Laboratório de Citologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) para processamento.

Figura 1. Esquema representando a preparação de esfregaço citológico por método convencional (*squash*) (Meinkoth, 2009).

5.2.3. Citologia em meio líquido

No laboratório, cada amostra foi dividida em dois tubos de centrifugação, com volumes iguais de 5 mL. Em um dos tubos foi realizado o procedimento preconizado para processamento de amostras citológicas cérvico-vaginais (a) e, no outro, versão

resumida (b) sem adição de reagente de densidade, conforme detalhado nos fluxogramas a seguir.

(a) Método padrão

(b) Método resumido

Figura 2. Fluxogramas do processamento da CML por métodos padrão e reduzido.

5.2.4. Emblocado celular

Após a confecção das lâminas citológicas, o material remanescente em todos os tubos de centrifugação foi processado para obtenção de ECs. Foram testados dois métodos diferentes: (a) líquido de Bouin (2,4,6-Trinitrophenol 1,3%, formalina 40%, ácido acético glacial 100%) e (b) agarose com formalina (2g agarose (Vetec, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 40mL formalina tamponada 10% e 0.1g de eosina Y (Merck Milipore KGaA, Darmstadt, Germany)). O processamento de ambos está ilustrado nos fluxogramas a seguir.

(a) Líquido de Bouin

(b) Agarose em formalina

Figura 3. Fluxogramas do processamento de embocado celular pelos métodos de Bouin e Agarose em formalina.

Após a transferência para papel de seda, ambos os preparados eram fixados em solução de formalina por duas horas e depois processados histologicamente, através de banhos sucessivos em álcool, xilol e parafina. Posteriormente, eram embebidos em bloco de parafina e cortados em micrótomo (3 μ m). Os cortes eram colocados em lâminas e corados em H&E, segundo procedimento do Laboratório de Histologia do Instituto Adolfo Lutz (**Anexo 4**).

5.2.5. Análise microscópica

Todos os esfregaços, CML e convencional, foram renumerados, sem manter a identificação original, e avaliados por três patologistas veterinários, de maneira cega, de modo semi-quantitativo quanto à qualidade técnica do esfregaço. Como critérios de avaliação utilizou-se: Celularidade (x400), tipo celular, fundo, sobreposição de células, definição de citoplasma, definição de cromatina, definição de nucléolos, distinção núcleo/citoplasma e presença de aglomerados de células.

5.3. Caracterização do linfoma canino em CML e EC.

5.3.1. Estudo prospectivo com cães suspeitos para linfoma canino

Fizeram parte do experimento 44 cães, machos ou fêmeas, que apresentaram linfadenomegalia, com quadro clínico suspeito para linfoma canino, provenientes da rotina da Universidade Anhembi Morumbi, do laboratório R&R, do laboratório CVAP e do Hospital Público Veterinário, com amostras colhidas de Julho de 2013 a Dezembro de 2014. Foram utilizadas também amostras de 10 cães com Leishmaniose Visceral confirmada por exame sorológico (teste rápido (DDP Biomanguinhos) e Elisa) que exibiam linfadenomegalia generalizada, como controle negativo e padrão para coloração imunocitoquímica, com amostras colhidas no ano de 2014. Dados epidemiológicos

como idade, sexo e raça foram compilados em ficha clínica individual (Anexo 3). Foram excluídos do projeto cães que apresentassem linfoma cutâneo.

5.3.2. Colheita

Foram colhidas duas punções aspirativas de um linfonodo de cada paciente. Com a primeira era confeccionado esfregaço convencional por método de *squash*, ilustrado na Figura 1, seco ao ar e corado por método de panótico. A agulha da segunda punção era lavada no líquido preservativo com auxílio de seringa plástica. Caso a amostra fosse escassa, eram colhidas novas punções até o líquido preservativo adquirir turbidez. Posteriormente, as amostras eram encaminhadas ao Laboratório de Citologia do IAL para processamento.

5.3.3. Citologia em meio líquido

Foi utilizado o método resumido descrito anteriormente (item 1.3) para processamento de todas as amostras. As lâminas eram sempre coradas de modo automatizado com coloração de Papanicolaou.

Para a comparação técnica comparou-se a frequência das notas atribuídas como descrito no item 1.5, para seis amostras colhidas pelo mesmo médico veterinário, sob condições semelhantes. Tabulou-se os resultados das leituras dos critérios: fundo,

sobreposição, definição de citoplasma, definição de cromatina, definição de nucléolos, definição núcleo/citoplasma e presença de aglomerados em tabelas 2x2 ou 2x3, comparando a CML e citologia convencional quanto ao número de vezes em que uma nota foi atribuída. Ou seja, somou-se as leituras dos seis casos em triplicata (total de 18 leituras) e quantificou-se quantas vezes apareceu cada resultado. Finalmente, calculou-se o valor de p por teste exato de Fisher (2x2) ou qui-quadrado (2x3).

5.3.4. Emblocado celular

Foi utilizado o método de Bouin descrito no item 1.4. Além da coloração de H&E, foram obtidos cortes em lâminas silanizadas (3µm) para realização de exame imunocitoquímico.

5.3.5. Imunocitoquímica

O método empregado foi adaptado do padronizado no Laboratório de Imunohistoquímica do IAL, com ajuste de tempo para bloqueio pré-primário e recuperação antigênica para amostras animais.

Anticorpos empregados:

Foi realizado exame imunocitoquímico para caracterização imunofenotípica dos linfomas, através dos seguintes marcadores, ilustrados no **quadro 2**:

Quadro 2. Relação de anticorpos utilizados, com respectivos clones, marca, diluição e alvo.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Alvo
Pax-5	BC/24	Biocare Medical, Concord, CA, USA	1:200	Linfócitos B
CD79a	HM57	Dako, Carpinteria, CA, EUA	1:100	Linfócitos B
CD3	Policlonal	Dako, Carpinteria, CA, EUA	1:400	Linfócitos T
Ki-67	MIB-1	Dako, Carpinteria, CA, EUA	1:100	Células em proliferação

A diluição foi realizada em solução tampão Tris com 1% de albumina bovina (TRIZMA base, D5637 Sigma Chemical CO, St. Louis, E.U.A). A recuperação antigênica foi feita por calor úmido, em panela de pressão a 120°C, por três minutos, em solução de ácido cítrico, com pH 6,0.

Processamento

Primeiramente, foi realizada a desparafinização das lâminas e a hidratação dos cortes. A recuperação antigênica foi realizada com auxílio de panela de pressão contendo solução ácida de pH 6,0 (ácido cítrico). Posteriormente, foi feito bloqueio de peroxidase endógena com solução de H₂O₂ 6%, através de dois banhos de 20 minutos, o primeiro a 37°C e o segundo a temperatura ambiente. Para a reação com anti-CD3, foi feito bloqueio de ligações inespecíficas pré-primário, utilizando composto fornecido no kit NovoLink® (Post primary block NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Novocastra, Newcastle, Reino Unido).

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários *overnight*, lavadas e depois incubadas com anticorpos secundários com o sistema de amplificação do sinal Picture Max® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A revelação foi realizada com cromógeno (3,3' tetraidrocloro de diaminobenzidina – DAB) e contra-coloração com hematoxilina. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula e Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha).

5.3.6. Diagnóstico

O diagnóstico de linfoma foi feito quando se observava população homogênea composta por mais de 50% de células jovens (blastos) ou mais de 90% de população de células intermediárias ou pequenas atípicas. A imunofenotipagem foi feita através da leitura das lâminas de imunocitoquímica, baseada na predominância de linfócitos atípicos (linfócitos B ou linfócitos T). O índice de proliferação foi determinado pela contagem semi-automática utilizando o programa Tmarker® (Schüffler et al, 2013) com

atribuição de valor percentual. Os casos foram classificados como positivos, negativos para presença de linfoma, ou insatisfatórios.

5.3.7. Análise de concordância interobservador

Dois observadores foram treinados na leitura de citologia em meio líquido, com consenso prévio dos critérios diagnósticos. Posteriormente, cada um recebeu as lâminas convencionais coradas por método de panótico, as de CML coradas por método de Papanicolaou e as de EC coradas em H&E para diagnóstico, sem identificação.

Os resultados foram compilados em tabela e foi feita análise de concordância com determinação do valor de kappa para cada método.

5.3.8. Determinação da acurácia

Para os casos que obteve-se fragmento para histopatológico, foi feita a avaliação de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo e acurácia da CML, citologia convencional e CML em conjunto com EC e imunocitoquímica, considerando a prevalência encontrada na população estudada.

5.3.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os programas Minitab v.17 e Graphpad quickcalcs, e foi atribuído nível de significância de 95%. Para tabelas 2x2, utilizou-se teste exato de Fisher, enquanto para tabelas 2x3, qui-quadrado de Pearson.

Para o teste de concordância, os valores de kappa foram interpretados como:

Valores menores que 0,20 – concordância pobre

Valores entre 0,21 e 0,40 – concordância razoável

Valores entre 0,41 e 0,60 – concordância moderada

Valores entre 0,61 e 0,80 – concordância boa

Valores maiores que 0,80 – concordância muito boa

6. RESULTADOS

6.1 Padronização de colheita, coloração e metodologia de CML e EC.

Citologia em meio líquido

Quanto à colheita, testou-se a possibilidade de utilizar-se apenas o remanescente do canhão da agulha após a confecção de um esfregaço citológico convencional.

Houve menor quantidade de células por campo e menor sobreposição na CML, entretanto a escassa celularidade prejudicou a confecção dos ECs, que não puderam ser elaborados.

Quanto à coloração, os preparados de CML corados por método de panótico ficaram com a definição nuclear e citoplasmática muito comprometida, o que dificultou a análise das características celulares.

As **tabelas 1, 2 e 3** ilustram a média das notas atribuídas pelos patologistas na avaliação do tipo de colheita, coloração e uso de reagente de densidade. As notas atribuídas para quantidade de células por campo: 1 a 4, em que 1 corresponde a menos de 10 células e 4 a mais de 100 células por campo/400x. Para os grupos: fundo, sobreposição e presença de aglomerados: 0 a 3, em que 0 corresponde a nenhum e 3 a muito. Para os grupos definição de citoplasma, cromatina, nucléolos e distinção núcleo-citoplasma, notas de 1 a 3, em que 1 corresponde a ruim, 2 a médio e 3 a bom.

A **tabela 1** ilustra os resultados obtidos na análise dos patologistas, comparando-se os esfregaços produzidos com o remanescente da citologia convencional e com o volume total de uma segunda colheita.

Tabela 1. Média das notas atribuídas pelos patologistas para a avaliação do tipo de colheita. São Paulo, 2015.

AVALIAÇÃO	TIPO DE COLHEITA	
	Remanescente da agulha	Exclusivo para CML
Células por campo	2,5	2,9
Fundo	0,7	1
Sobreposição	0,1	0
Definição de citoplasma	1,7	1,9
Definição de cromatina	2,4	2,7
Definição de nucléolos	2,7	2,8
Distinção núcleo/citoplasma	2,5	2,5
Presença de aglomerados	1,1	1,9

Quanto à coloração, foram avaliadas as colorações de Papanicolaou e Panótico nos preparados de CML. Os resultados estão ilustrados na **tabela 2**.

Tabela 2. Média das notas atribuídas pelos patologistas para a avaliação do tipo de coloração. São Paulo, 2015.

AVALIAÇÃO	TIPO DE COLORAÇÃO	
	Papanicolaou	Panótico (CML)
Células por campo	2,7	3
Fundo	0,9	1,2
Sobreposição	0,1	0,5
Definição de citoplasma	1,8	1
Definição de cromatina	2,5	1
Definição de nucléolos	2,7	1
Distinção núcleo/citoplasma	2,5	1,1
Presença de aglomerados	1,6	1,6

A **tabela 3** mostra a média das notas na avaliação dos esfregaços produzidos com e sem o emprego do reagente de densidade.

Tabela 3. Média das notas atribuídas pelos patologistas para a avaliação do uso do reagente de densidade na confecção dos esfregaços de CML. São Paulo, 2015.

AVALIAÇÃO	REAGENTE DE DENSIDADE	
	Presente	Ausente
Células por campo	2,7	2,7
Fundo	2,3	2,3
Sobreposição	0	0,2
Definição de citoplasma	1,9	1,7
Definição de cromatina	2,4	2,6
Definição de nucléolos	2,6	2,8
Distinção núcleo/citoplasma	2,4	2,5
Presença de aglomerados	1,6	1,6

Com esses resultados, observou-se que a coloração por método de panótico é inadequada para o material preservado em meio líquido e não pode ser utilizada. Também observou-se uma discreta piora nas definições de citoplasma, cromatina e nucléolos, quando utilizou-se o reagente de densidade, além de gasto maior de tempo (com necessidade de uma centrifugação adicional com aspiração de sobrenadante), decidindo-se não aplicá-lo. É importante destacar que houve manutenção dos tipos celulares entre as diferentes técnicas, mostrando que não há uma seleção populacional através da técnica de meio líquido.

Emblocado celular

Para confecção dos blocos testou-se duas técnicas: com líquido de Bouin (A) e de gel de agarose (B) com base de formalina.

Todos os blocos preparados com o remanescente do canhão da agulha exibiram pouco sedimento, o qual se desfez no momento da inclusão em parafina. Com isso, percebeu-se que é necessária uma quantidade mínima de amostra para permitir a confecção de emblocado e aplicação de imunocitoquímica, que visualmente pode ser verificada por turbidez no líquido conservativo.

Os ECs preparados com gel de agarose, independentemente do método de colheita, revelaram facilidade para retirada do gel do tubo de centrifugação. Por outro lado, as células linfoides apresentaram-se marcadamente dispersas, com menos de 10 células por campo de menor aumento, o que dificultou muito a avaliação em H&E e impossibilitou a imunofenotipagem.

Os ECs realizados com líquido de Bouin exibiram confecção mais trabalhosa, pois, por vezes, o sedimento fragmentava-se, o que dificultava sua transferência para o papel de seda, para posterior inclusão. Entretanto, mesmo nestas circunstâncias, os grupos celulares apresentavam-se coesos densamente celulares, o que facilitava a avaliação morfológica e a imunocitoquímica, sendo assim, o método adotado.

6.2. Caracterização do linfoma canino em CML e EC.

6.2.1. Estudo prospectivo – dados epidemiológicos

Colhidas amostras de 54 cães, sendo 34 positivos para linfoma canino (combinação dos testes diagnósticos, com achados clínicos relatados) e 18 cães com amostras reacionais ou de neoplasias de outra natureza; 10 deles positivos para Leishmaniose canina, três reacionais inespecíficos, três para melanoma metastático, um para mesotelioma e um para mastocitoma. Duas das amostras foram classificadas como insatisfatórias para análise.

Dos 34 pacientes com linfoma, foram encontrados 18 fêmeas (52,94%) e 16 machos (47,06%). Sete cães não possuíam raça definida (20,59%) e 27 cães tinham raça definida (79,41%) (**Gráfico 1 e 2**), as quais estão representadas na **tabela 4**.

Gráfico 1. Distribuição de cães com linfoma quanto ao sexo. São Paulo, 2015.

Gráfico 2. Distribuição de cães com linfoma quanto a definição racial. São Paulo, 2015.

Tabela 4. Frequência de raças dos cães diagnosticados com linfoma. São Paulo, 2015.

Raças	Número de cães (n)	%
SRD	7	20,59
Beagle	2	5,88
Bernese Mountain Dog	1	2,94
Boxer	4	11,76
Cocker Spaniel Inglês	2	5,88
Coton de Tulear	1	2,94
Golden Retriever	4	11,76
Labrador Retriever	3	8,82
Lhasa Apso	2	5,88
Maltês	2	5,88
Pinscher miniatura	1	2,94
Pitbull	1	2,94
Poodle	1	2,94
Rottweiler	1	2,94
Scottish Terrier	1	2,94
Teckel	1	2,94
Total	33	100,00

Dentre os cães negativos para linfoma, havia 9 fêmeas e 9 machos (50%) e não observou-se associação estatisticamente significativa, por teste exato de Fisher, entre o linfoma e sexo ($p=0,54$).

No grupo negativo, observou-se 11 cães sem raça definida e seis com raça. A raça de um dos cães não foi relatada. Observou-se associação estatisticamente significativa entre definição racial e presença de linfoma no teste exato de Fisher ($p=0,0042$).

Dos 34 cães com linfoma, não foi relatada a idade de dois (5,88%). Para os outros 32 cães, observou-se uma média de idade de 7,72 anos, com desvio padrão de 2,61. A mediana foi 8 anos com mínimo de 3 anos e máximo de 13 anos. A tabela 5 representa as idades encontradas nos pacientes estratificadas em faixas etárias.

Tabela 5. Frequência das idades de pacientes caninos com linfoma. São Paulo, 2015.

Idades	Número	%
 3-6 	11	34,38
 7-9 	14	43,75
 10-13 	7	21,88
Total	32	100,00

No grupo sem linfoma, só foi relatada a idade em seis indivíduos, por isso optou-se por não realizar teste estatístico para esta variável.

Recomendou-se aos veterinários que colhessem as amostras citológicas de linfonodos primeiramente por CCAF e, caso o aspirado fosse seco, por CAAF. O linfonodo mais representado foi o poplíteo e em três casos houve colheita de dois linfonodos distintos do mesmo animal. Todos os cães exibiram linfoma multicêntrico, exceto um, com forma intestinal.

Tabela 6. Frequência dos linfonodos aspirados para citologia em cães com linfoma canino. São Paulo, 2015.

Linfonodo	Número	%
Axilar	2	5,41
Cervical superficial	5	13,51
Inguinal	1	2,70
Mesentérico	1	2,70
Poplíteo	20	54,05
Submandibular	8	21,62
Total	37	100

Dos cães avaliados, 20 receberam tratamento em algum momento (58,82%) e 14 nunca foram tratados (41,18%). O protocolo de tratamento mais empregado foi Madison-Wisconsin.

Tabela 7. Frequência de cães tratados e tratamento empregado para linfoma canino. São Paulo, 2015.

Tratamento	Número	%
Nunca tratados	14	41,18
Prednisolona	2	5,88
Madison-Wisconsin	12	35,29
Vincristina e prednisona	1	2,94
Doxiciclina e prednisona	1	2,94
Clorambucil	1	2,94
Doxorrubicina	1	2,94
Tratamento não especificado	2	5,88
Total	34	100,00

Quanto ao tipo de linfoma, foi realizado exame imunocitoquímico em 30 pacientes. Não foi possível produzir emblocados celulares com celularidade suficiente

para o exame em 4 cães (11,76%). Dos 30, 24 (80%) apresentaram linfoma de células B, com linfócitos neoplásicos positivos para CD79a e PAX-5 e negativos para CD3. Seis (20%) foram linfoma de células T, com linfócitos neoplásicos positivos para CD3 e negativos para CD79a e PAX-5. Os resultados estão expressos em forma de gráfico a seguir (**Gráfico 3**).

Gráfico 3. Frequência de linfomas B e T em cães com linfoma. São Paulo, 2015.

6.2.2. Citologia em Meio Líquido

A CML foi realizada com o método reduzido, sem utilização do reagente de densidade. Todos os esfregaços exibiram monocamada celular, com pouca sobreposição e linfócitos por vezes em discretos agregados tridimensionais. Observou-se preservação de todos os tipos celulares: macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos, com apenas redução na quantidade de hemácias, que se apresentaram muitas vezes como uma massa rósea ao fundo.

Os casos reacionais exibiam frequentemente uma celularidade mais baixa, com células dispostas de modo mais esparsas (**Figura 4**) e presença de tipos celulares mais variados. Os casos de linfoma exibiam celularidade mais abundante frequentemente, como uma população exclusiva de linfócitos, com presença ocasional de macrófagos com corpos tingíveis. O fundo destes preparados citológicos apresentavam-se frequentemente limpos e raramente eram observados corpúsculos linfo-glandulares (**Figura 5**).

Figura 4. Fotomicrografias de citologia convencional e CML de aspirado de linfonodo reacional, cão, 400x. A: Panótico; B: Papanicolaou, Fonte: Fernandes, N.C.C.A, 2015.

Figura 5. Fotomicrografias de citologia convencional e CML de aspirado de linfonodo com linfoma, cão, 400x. A: Panóptico; B: Papanicolaou. Fonte: Fernandes, N.C.C.A, 2015.

O tamanho dos linfócitos ficou reduzido, comparado ao esfregaço convencional (**Figura 5**), e por vezes as células exibiram formato levemente fusiforme. A distinção entre células pequenas e grandes era frequentemente difícil, o que exigia atenção dos observadores para outros tipos celulares (células de Mott, neutrófilos, macrófagos) e características nucleares para melhor definição dos casos negativos. Por outro lado, o núcleo apresentou-se bem conservado, com boa definição de cromatina, nucléolos e carioteca.

As **tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13** apresentam comparações entre a citologia convencional e a CML quanto a critérios técnicos. Houve diferença estatisticamente significativa em todos os critérios avaliados, exceto quanto à distinção núcleo/citoplasma e quanto à presença de aglomerados.

Tabela 8. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à sobreposição celular. São Paulo, 2015.

	Sobreposição		Valor de p
	nenhuma a pouca	moderada a muita	
CML	17	1	<0,001
Convencional	5	13	

Tabela 9. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à definição de citoplasma. São Paulo, 2015.

	Definição citoplasmática			Valor de p
	ruim	médio	bom	
CML	6	7	5	0,002
Convencional	0	3	15	

Tabela 10. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à definição de cromatina. São Paulo, 2015.

Definição de cromatina				Valor de p
	ruim	médio	bom	
CML	0	4	14	0,003
convencional	7	6	5	

Tabela 11. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à definição de nucléolos. São Paulo, 2015.

Definição nucleolar				Valor de p
	ruim	médio	bom	
CML	0	2	16	<0,001
Convencional	6	11	1	

Tabela 12. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à distinção núcleo citoplasmática. São Paulo, 2015.

Distinção núcleo/citoplasma				Valor de p
	ruim	médio	Bom	
CML	2	5	11	0,311
Convencional	0	7	11	

Tabela 13. Comparação entre a CML e a citologia convencional quanto à presença de aglomerados. São Paulo, 2015.

Presença de aglomerados			Valor de p
	nenhum a poucos	moderado a muitos	
CML	7	11	0,26
Convencional	3	15	

6.2.3. EC e imunocitoquímica

Morfológicamente, as células linfoides ficaram bem preservadas nos ECs. Quatro amostras (11,76%) não apresentaram celularidade suficiente para elaboração do embocado celular. Macroscopicamente, o líquido do frasco coletor das mesmas não exibiu turbidez, ao contrário das amostras representativas.

No EC, as células exibiram morfologia muito semelhante à dos cortes histológicos dos linfonodos, inclusive com a preservação da microarquitetura, esboçando folículos e vasos sanguíneos (**Figura 6**).

Figura 6. Fotomicrografia de EC de aspirado de linfonodo de cão com linfoma multicêntrico. Seta indica estrutura vascular preservada. H&E, 400x. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.

A imuno-histoquímica dos ECs foi realizada com sucesso, com aplicação dos anticorpos para CD3, CD79a, PAX-5 e Ki-67. A **tabela 9** ilustra as características das reações imunocitoquímicas no embocado celular quanto à marcação dos anticorpos, que foi semelhante nos linfonodos reacionais e neoplásicos.

Tabela 14. Características das reações imunocitoquímicas dos embocados celulares (+ - fraco, ++ - moderada, +++ - forte). São Paulo, 2015.

	CD3	CD79a	PAX-5	Ki67
Marcação	Membrana	Membrana	Nuclear	Nuclear
Fundo	++	+	+	+
Intensidade de sinal	++	+	+++	+++

Para comprovar a reatividade dos anticorpos com a fração correta de linfócitos, especialmente a reatividade coincidente de linfócitos marcados para anti-Pax-5 e anti-CD79a, testou-se o painel apresentado em cortes histológicos de linfonodos reacionais, de cães com leishmaniose visceral canina.

Observou-se uma marcação CD79a e PAX-5 positiva em região folicular, CD3 positiva em região paracortical e Ki-67 positiva em células centro-germinativas e fração de paracortical (**Figura 7**), conforme era esperado, uma vez que CD79a e PAX-5 são marcadores de linfócitos B, CD3, de linfócitos T e Ki-67 de células em proliferação.

Figura 7. Fotomicrografia de secções de linfonodo reacional, cão. A: H&E, 20x. B: imuno-histoquímica, Anti-CD3, 20x. C: imuno-histoquímica, anti-Pax-5, 200x. D: imuno-histoquímica, anti-CD79a, 200x. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.

Nos ECs, observou-se o mesmo padrão. O EC esboçava a microarquitetura nodal, perceptível sobretudo com a imunocitoquímica, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8. Fotomicrografias de EC de aspirado de linfonodo reacional, cão, 20x. A: H&E; B: anti-CD3; C: anti-CD79a; D: anti-PAX-5 e E: anti-Ki67. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.

Nos emblocados neoplásicos, observava-se uma proliferação difusa de células com mesmo imunofenótipo com poucas células reacionais entremeadas. O anti-CD79a exibiu uma marcação de membrana um pouco mais fraca, com fundo moderado. Nos emblocados neoplásicos, ficava, muitas vezes, difícil a distinção das células verdadeiramente positivas. O anti-PAX-5 por outro lado, com marcação nuclear mais forte, permitia fácil distinção de células positivas e foi mais adequada para aplicação em EC (Figura 9).

Figura 9. Fotomicrografia de EC de aspirado de linfonodo com linfoma, cão, 40x. A: anti-CD79a e B: anti-PAX-5. Fonte: Fernandes, N.C.C.A.F.

6.2.4. Concordância interobservador e avaliação do teste diagnóstico

O **anexo 4** exibe os resultados completos do teste de concordância, com os resultados dos observadores 1 e 2 para as técnicas de CML, citologia convencional e EC. Resultados positivos são aqueles em que o observador julgou a amostra positiva para linfoma. Outras neoplasias observadas foram caracterizadas como negativas, assim como os linfonodos reacionais.

O **quadro 3** apresenta a proporção de concordâncias, os índices kappa e a força de concordância dos testes de concordância de CML, citologia convencional e EC.

Quadro 3. Concordância, com índice kappa e força dos testes de CML, citologia convencional e EC entre dois observadores, em teste duplo-cego. São Paulo, 2015.

	Concordância	Kappa	Força de concordância
CML	69,81%	0,434	Moderada
Convencional	86%	0,762	Boa
EC	60,42%	0,114	Pobre

Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo foram calculados levando-se em conta os casos com resultado histopatológico, no total de 19 casos, e a prevalência de 42,11% de linfoma dentre estes casos. A **tabela 15** apresenta a distribuição dos diagnósticos histopatológicos.

Tabela 15. Distribuição dos diagnósticos histopatológicos de cães com linfonodomegalia. São Paulo, 2015.

Diagnóstico histopatológico	n	%
Linfoma de grandes células	1	5,26
Hiperplasia reacional inespecífica	1	5,26
Linfoma de pequenas células	2	10,53
Linfoma de células intermediárias	5	26,32
Hiperplasia reacional (Leishmaniose)	10	52,63
TOTAL	19	100

O resultado de consenso mostrou a maior acurácia, entretanto sem diferença estatisticamente significativa com a citologia convencional e o CML ($p=0,116$). A CML e a citologia convencional exibiram acurácias iguais, entretanto a CML com maior sensibilidade e a convencional com maior especificidade. Estes dados estão apresentados no **quadro 4**.

Quadro 4. Sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) da CML em combinação com EC e imunocitoquímica (consenso) e CML e EC (resultados do observador 2). São Paulo, 2015.

Teste	Consenso (%)	CML	Convencional
Sensibilidade	75,00	62,50	50,00
Especificidade	99,99	72,73	81,82
VPP	99,98	62,50	82,63
VPN	84,61	72,73	43,03
Acurácia	89,47	68,42	68,42

Quanto ao número de insatisfatórios, considerando-se os resultados de menor insatisfatoriedade para cada método, observou-se redução de insatisfatórios do panótico para a CML e diagnóstico de consenso, nos 54 casos avaliados, entretanto sem

significância estatística por teste exato de Fisher ($p=0,0556$). Em três casos, não foram encaminhadas as lâminas de citologia convencional.

Quadro 5. Satisfatoriedade dos casos de CML, citologia convencional e de consenso. São Paulo, 2015.

	CML	CONVENCIONAL	CONSENSO
INSATISFATÓRIOS (%)	1,85	11,76	3,71

Sete casos apresentaram discordância em mais de uma categoria de exame quanto a positivo e negativo, ou discordância do resultado final. Eles estão ilustrados no quadro a seguir.

Quadro 6. Casos com discordância importante no diagnóstico de linfoma. São Paulo, 2015.

Nº	Consenso	Imunofenotipagem	Discordância	Histopatológico
8	Reacional	Celularidade insuficiente	Falso negativo	Linfoma de células intermediárias
21	Reacional	Reacional	CML/ EC	Reacional
24	Linfoma de células grandes, rico em T reacionais	Linfoma B	CML/ convencional/ EC	Linfoma de células pequenas
32	Reacional	Reacional	CML/ convencional	-
36	Linfoma de células intermediárias macronucleoladas	Celularidade insuficiente	CML/ EC	-
40	Linfoma imunoblástico (alto grau)	Linfoma B	CML/ EC	-
52	Reacional	Reacional	CML/ EC	-

A avaliação dos casos permitiu o delineamento de alguns pontos de provável confusão na análise dos esfregaços citológicos, que foram percebidos no decorrer do trabalho.

O caso 8 apresentou discordância entre o consenso e o histopatológico, com resultado falso negativo, provavelmente devido à baixa celularidade que não permitiu a realização da imunofenotipagem. Os casos 21 e 24, apesar da concordância entre consenso e histopatológico, houve dois diagnósticos discordantes no ensaio de concordância. Os casos restantes exibiram também pelo menos duas discordâncias com o consenso. O caso 24 apresentou população mista de linfócitos grandes e pequenos, enquanto o caso 36 exibiu população de células intermediárias. Linfomas de células intermediárias, mistos, ou com população reacional importante podem ter análise difícil e a associação da imunofenotipagem com a morfologia é fundamental para conclusão do caso.

O caso 21 corresponde a caso de leishmaniose canina, que exibiu pouca quantidade de macrófagos, neutrófilos, plasmócitos, células de Mott e hemossiderina na CML e EC. Observou-se que, frequentemente, o achado de outros tipos celulares, como os descritos, e de hemossiderina podem ajudar na distinção de processos reacionais para processos neoplásicos mistos. Os casos 32 e 52 correspondem a casos de remissão de linfoma. Apresentaram população celular baixa, com imunofenotipagem de células T e B em proporções semelhantes. Clinicamente, ambos os casos apresentaram linfonodos pequenos, praticamente não palpáveis, o que também favorece a colheita de aspirados secos.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou, pela primeira vez na literatura internacional, a utilização da CML em conjunto com o EC para a avaliação de amostras linfóides caninas, com especial atenção ao diagnóstico de linfoma, e sua diferenciação de amostras reacionais. Para mostrar a aplicação da técnica, estudou-se, de modo comparativo, esfregaços convencionais e de CML de cães suspeitos para linfoma canino e cães com leishmaniose visceral canina. Demonstrou-se a aplicação de painel imuno-histoquímico para imunofenotipagem dos linfomas e avaliação da proliferação celular. Além disso, avaliou-se o desempenho do exame, frente aos achados histopatológicos de parte dos pacientes, com obtenção de valores de sensibilidade, especificidade e acurácia.

A população de cães com linfoma estudada apresentou proporções semelhantes de fêmeas e machos, sem associação estatística entre linfoma e sexo, com idade média de 7,72 anos. Caniatti et al. (1996) observaram idade média de 7 anos em cães com linfoma, enquanto estudo com trinta cães com linfoma em Porto Alegre observou idade média de 9 anos (NEUWALD et al., 2014) e estudo no Estado de São Paulo, idade média de 6,58 anos (SUEIRO et al., 2004). Após a imunofenotipagem, a maior parte dos casos revelou-se linfoma de células B (80%), contra 20% de linfomas de células T. Thalheim et al. (2013) encontraram frequência de 74% de linfomas B, contra 26% de células T segundo exame imuno-histoquímico de linfonodos de 63 cães. Em estudo na França, com 608 casos de linfoma, observaram-se 63,8% de linfomas B, 35,4% de linfomas T e 0,8% de linfomas não T, não B (PONCE et al., 2010). Um estudo com 55 casos, no Brasil, mostrou também predomínio de linfomas de células B, com 72,7% deste fenótipo (SUEIRO et al., 2004).

A citologia de linfonodos é comumente empregada na rotina veterinária e o diagnóstico de linfoma é possível na maioria dos casos (MACNEILL, 2011; VALLI et al., 2013). Uma preocupação dos patologistas é o fato da maioria dos diagnósticos definitivos de linfoma ser feitos tradicionalmente somente através de CAAF, sem confirmações com biópsia. Proprietários e clínicos frequentemente não querem submeter os pacientes a procedimentos mais caros e invasivos para obter amostras teciduais para histopatologia, especialmente por ser uma doença tratada de modo clínico apenas. Valli et al. (2013) demonstraram tempos de sobrevida e resposta terapêutica diferente em diferentes tipos de linfoma e graus. Infelizmente, as amostras de CAAF são geralmente inadequadas para imunocitoquímica e citometria de fluxo e o diagnóstico citológico é frequentemente limitado ao tamanho celular e índice mitótico, independentemente de índice de proliferação e imunofenotipagem (AULBACH, 2010). Frente a esta realidade, a CML poderia maximizar o valor do aspirado, uma vez que exibe uma colheita simples, possibilidade de testes complementares e de armazenamento da amostra por período longo, com refrigeração de até três meses (HODA et al., 2007). Além disso, os esfregaços são produzidos no laboratório através de método padronizado, reduzindo as variações técnicas dependentes de operador, como por exemplo artefatos de esmagamento que podem resultar em esfregaços insatisfatórios. Em medicina humana, o uso da CAAF para diagnóstico de linfoma é controverso, mas utilizado em algumas instituições como a Universidade do Texas, e alguns países da Europa. Para aplicar essa técnica, são utilizados em conjunto com a citologia convencional, outros exames complementares, como a imunofenotipagem por citometria de fluxo ou imunocitoquímica de EC (CARAWAY, 2005 e MAYALL et al., 2003). Aplicar esta ferramenta à rotina veterinária pode ser um método alternativo para melhorar o diagnóstico de linfoma e outros tumores, especialmente quando associado à

imunocitoquímica do EC. Neste estudo, a técnica de CML garantiu uma definição nuclear melhor, aprimorando a caracterização citológica quanto à preservação da cromatina e distribuição de nucléolos. Por outro lado, as células eram menores, com pior definição citoplasmática e por vezes com formato fusiforme. A definição citoplasmática pode estar relacionada às características tintoriais da coloração de Papanicolaou, que favorecem mais a observação nuclear, quando comparado ao Panótico. Garbar et al. (2008), ao utilizarem a CML para aspirados de linfonodo, também observaram menor tamanho celular, entretanto com características nucleares mais preservadas. Também perceberam menor endentação das células, e maior dificuldade na distinção de células grandes e pequenas. Os citologistas devem ser alertados quanto a estas discrepâncias na morfologia celular entre os esfregaços secos ao ar e de CML, e recomenda-se um período de treinamento comparativo e adaptação. Além disso, a técnica de CML é mais cara que o esfregaço convencional, o que pode impossibilitar sua implementação em laboratórios menores. Como opção, os procedimentos para confecção dos esfregaços podem ser feitos de modo parcialmente manual, o que reduziria os gastos.

Os ECs são úteis como complementação à avaliação dos esfregaços para permitir um diagnóstico citopatológico mais definitivo, especialmente para amostras de CAAF (NATHAN et al., 2000). Com avanços da CML na medicina, este método passou a ser amplamente utilizado, visto tratar-se de uma opção versátil para detecção de antígenos por imunocitoquímica. (HERNEL e SUURMEIJER, 2013; SAKAMOTO et al., 2012). Na medicina veterinária, foi empregado com diferentes metodologias (TAYLOR et al., 2013; ZANONI et al., 2012) incluindo um estudo brasileiro com gel de agarose, reportado por ZANONI et al. (2012). No presente estudo, o embocado produzido com líquido de Bouin foi mais facilmente reproduzível, com resultados

adequados para amostras com celularidade moderada a abundante. Exibiu agregados mais celulares quando comparado aos emblocados feitos com gel de agarose, mas este achado pode ser devido à natureza não coesiva das células linfoides, as quais poderiam diluir-se facilmente na agarose líquida. Mais estudos são necessários para compreender isto, comparando a técnica de EC para tecidos linfoides e não linfoides. Para amostras paucicelulares, os emblocados com Líquido de Bouin também produziram resultados insatisfatórios e, talvez, outros métodos fossem mais adequados para esta situação, como método com coágulo de plasma-trombina. Na medicina humana, o EC seguido por imunocitoquímica foi aplicado para diversos tipos de amostras, como aspirados de tireoide (ZIMMERMAN et al., 2014) e análise de líquidos cavitários (ZHAO et al., 2014). Em nosso estudo, as secções de emblocado celular se adequaram bem para a imunocitoquímica, especialmente para detecção dos antígenos de CD-3, PAX-5 e Ki-67, permitindo a distinção entre linfomas B e T e a determinação do grau de malignidade. Há outros métodos disponíveis para determinar o imunofenótipo a partir de amostras de aspirado, como a citometria de fluxo e PARR, entretanto ambas as técnicas não permitem a associação entre o tipo celular e a morfologia. Isto é particularmente importante no diagnóstico inicial do linfoma e sua diferenciação de linfonodos reativos, especialmente porque a análise de Ki67 sozinha pode ser fonte de erros, uma vez que o centro germinativo pode exibir alto índice de proliferação. PARR e citometria de fluxo exibiram sensibilidade de 74% e 98% respectivamente, quando comparado com a imuno-histoquímica (TALHEIM et al., 2013).

PAX-5, ou proteína ativadora de células B específica, é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico humano de linfomas de células B (FELDMAN e DOGAN, 2007). É reportado que o anticorpo anti-PAX-5 humano reage com o PAX-5 canino, em células B de linfonodos reativos e linfomas (WILLMANN et al., 2009). Do mesmo modo, em

nosso estudo, anti-PAX-5 mostrou imunorreatividade forte e correspondência com células positivas para anti-CD79a nos casos analisados, tanto de linfoma como de linfonodos reativos. Estes achados indicam que o PAX-5 pode ser empregado para a imunofenotipagem de linfoma canino, assim como o anti-CD79a. Em ECs, o anti-PAX-5 exibiu uma vantagem: a marcação nuclear é mais fácil de distinguir do fundo, quando compara-se com a marcação de membrana do CD79a. Diferentes antígenos aplicados aos emblocados devem ser também testados para auxiliar no desenvolvimento do diagnóstico de linfoma canino, como o anti-CD45, um possível marcador citológico para linfomas de zona T, pois revelou-se negativo em casos caninos com esta classificação histológica (SEELIG et al., 2014).

Ki-67 é um marcador de proliferação celular, expressado em diversas espécies, incluindo as humana e canina, nas fases G1, S, G2 e M e negativo na fase G0 do ciclo celular. É utilizado como marcador prognóstico para diversos tumores, incluindo os linfomas, em que há elevada associação entre a frequência de células neoplásicas positivas para o Ki-67 e o grau neoplásico. Na medicina veterinária, frequentemente, os linfomas são classificados por *Kiel updated*, entretanto, a correta identificação de linfomas de alto e baixo grau é difícil, especialmente para patologistas com pouca experiência no diagnóstico citológico de linfomas. Essa classificação é útil para a definição terapêutica e prognóstica do paciente, especialmente quando aliada à imunofenotipagem em B ou T. Poggi et al. (2013) mostraram a aplicabilidade da citometria de fluxo em amostras colhidas por punção de linfonodos caninos na classificação dos linfomas. Através da análise de 104 casos de linfoma canino, observou-se diferença significativa na proliferação marcada por Ki-67 entre linfomas de alto grau e baixo grau, entretanto sem diferença entre os linfomas B e T. Também, por teste estatístico, estimaram um valor de corte (cut-off) de 12,2% de células positivas

para classificação das neoplasias de alto grau, com sensibilidade de 96,3% e especificidade de 100%. Fournel-Fleury et al. (1997) avaliaram 92 linfonodos de cães com linfoma, fixados em formalina e emblocados em parafina, quanto à proliferação celular, por Ki-67, também encontrando associação entre a fração proliferativa e o grau de malignidade, com ponto de corte de 21%. Deste modo, seria interessante ao clínico oncologista, a possibilidade de acessar o índice de proliferação dos casos confirmados de linfoma. Através do presente trabalho, foi possível aplicar o Ki-67 para identificação da fração proliferativa em material citológico. Ao contrário da citometria de fluxo, que exige processamento rápido da amostra, é possível colher as células em meio líquido, com posterior emblocamento, que permitiria a análise sequencial, sem colheita de nova amostra. A imunomarcagem foi intensa, com pouco fundo, com recuperação por panela de pressão, frequentemente mais intensa do que a marcada no corte histológico, provavelmente pela fixação, feita em solução alcóolica com exposição breve (menos de 12 horas) à formalina.

Um estudo robusto de desempenho, com 9585 casos de punção aspirativa de tireoide, foi realizado através do banco de controle interlaboratorial do Colégio Americano de Patologistas (CAP). Comparou a quantidade de discordâncias dos observadores cadastrados com o diagnóstico final, entre casos apresentados em CML e citologia convencional. Como resultado, houve maior número de falsos-positivos em casos de citologia convencional e maior número de falsos-negativos em CML (FISCHER et al., 2013). Em outra série de revisões do CAP, mas com casos de escovado brônquico, observou-se menor número de discordâncias na CML, que reduziu-se com o passar dos anos, numa comparação entre duas séries históricas (2001 – 2006 *versus* 2007 – 2011) (TABATABAI et al., 2015). O colégio justifica isto pela

familiaridade que os observadores adquirem com o método, o que facilita o diagnóstico, com o passar do tempo. Para reduzir o número de erros por falta de familiaridade, o estudo de concordância da presente pesquisa foi realizado um ano após o início das colheitas, e ambos os observadores realizaram reuniões de consenso durante este tempo. Mesmo assim, a concordância da CML foi inferior à da citologia convencional, método com o qual ambos os observadores estão muito mais familiarizados.

Garbar et al. (2008), compararam a citologia de linfonodo convencional (n=43) com meio líquido (n=96). A citologia convencional foi colhida por citopatologistas em um hospital, enquanto a de CML por radiologistas, em outro hospital, ambos na Bélgica. As classes diagnósticas foram divididas em positivo, negativo e insatisfatório, e quando positivo, eram classificadas em linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin. Observou-se maior proporção de insatisfatórios na CML, entretanto sem diferença estatística. Isso foi justificado, pela provável diferença na colheita, uma vez que no primeiro hospital era feita por citopatologistas com avaliação imediata dos esfregaços. No presente trabalho, observou-se o contrário, com maior número de insatisfatórios na citologia convencional, também sem diferença estatística. A CML e o esfregaço convencional eram colhidos no mesmo momento, pelo mesmo profissional, do mesmo linfonodo. Devido à padronização prévia da colheita, foi dada instrução para que se colhessem punções suficientes para deixar o líquido da CML turvo, o que, provavelmente, reduziu o número de casos hipocelulares. Não houve diferença estatística entre a acurácia da CML e citologia convencional, assim como em nosso estudo. Porém, houve um VPN ligeiramente maior para a citologia convencional. No presente estudo, ocorreu o oposto, houve VPN discretamente maior na CML e maior VPP na citologia convencional. Uma das justificativas para este achado, é que na CML as células ficam com tamanho celular reduzido, com pouca distinção entre células

grandes e pequenas, fato também relatado por Garbar et al. (2008). Isto poderia favorecer o diagnóstico falso positivo na CML. Outra explicação seria a ocorrência da “ansiedade do teste”, conforme relatado pelo grupo de trabalho do CAP, numa revisão de casos de punções de linfonodo (YOUNG et al., 2006), que também observou maior número de falsos positivos em relação a falsos negativos, quando observadores avaliavam esfregaços convencionais de punções de linfonodo, apenas baseados em critérios citomorfológicos. A “ansiedade do teste” corresponde ao viés de expectativa que leva aos participantes diagnosticarem mais frequentemente falsos positivos.

A análise da citologia de linfonodo deve ser sempre acompanhada de dados clínicos e exames complementares, especialmente a imunofenotipagem, entretanto é interessante conhecer a acurácia do teste sozinho, visto que a avaliação citomorfológica é o primeiro passo na distinção dos processos neoplásicos e seleção do painel de imunocitoquímica (YOUNG et al., 2006 e GARBAR et al., 2008). Na medicina veterinária, este teste ganha mais importância, pois a imunofenotipagem ainda não é realizada rotineiramente para diagnóstico de linfoma canino. Com os resultados deste estudo, observou-se que a introdução da CML teria eficácia equivalente e ainda possibilitaria a produção de emblocados para posterior imunocitoquímica. Entretanto, com os resultados diferentes de VPP e VPN para CML e citologia convencional, o melhor seria aplicar ambas as técnicas juntas, na tentativa de otimizar o diagnóstico. Ainda, este trabalho corrobora a importância da imunofenotipagem, que não só é importante para definição prognóstica e terapêutica (VALLI et al., 2013), mas também aumentou a acurácia do teste.

O presente trabalho apresenta a CML aliada ao EC com fixador de Bouin para o diagnóstico de linfoma e sugere que estas técnicas podem ser implementadas como ferramentas valiosas para a imunofenotipagem de linfomas nodais e sua diferenciação

de hiperplasia linfoide. Estudos futuros são necessários, com correlação com dados clínicos para o melhor entendimento dos benefícios da técnica na imunofenotipagem do linfoma. Infelizmente, são realizadas poucas biópsias de linfonodos rotineiramente, o que limitou o número de casos com correlação cito-histológica. Finalmente, este estudo mostrou o potencial do uso da CML em conjunto com o embocado celular na rotina veterinária, tanto para doenças neoplásicas como não neoplásicas, e pode representar uma ferramenta adicional para uma análise citopatológica rápida e acurada.

8. CONCLUSÕES

A citologia em meio líquido em combinação com emblocado celular e imunocitoquímica pode ser aplicada para o diagnóstico de linfoma em cães.

- A colheita deve ser feita primeiramente por CCAF, ou CAAF nos aspirados mais secos, com material exclusivo para o frasco coletor, até que o líquido apresente turbidez, e processada por método resumido sem adição de reagente de densidade, com esfregaços corados por Papanicolaou.
- Morfologicamente, os tipos celulares são facilmente identificados na CML, com redução de tamanho celular, porém melhor preservação de características nucleares, comparativamente aos esfregaços convencionais.
- O emblocado celular fixado com Líquido de Bouin exibiu boa celularidade e agregação dos linfócitos, enquanto o emblocado de agarose apresentou células dispersas de análise impossível.
- Foi possível empregar marcadores para imunofenotipagem linfocitária e determinação de proliferação celular nos emblocados celulares, com anti-PAX-5 revelando-se mais adequado para marcação de células B neste método, comparado ao CD79a.
- A CML individualmente revelou menor concordância interobservador do que a citologia convencional corada em Panótico.
- O uso conjunto de CML, emblocado e imunocitoquímica aumentou a acurácia da citologia e reduziu o número de casos insatisfatórios, entretanto sem significância estatística.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Parte dos resultados alcançados nesta dissertação foi apresentada em forma de pôster no II Congresso de Patologia Veterinária Brasileira (XVI) e em apresentação oral no VIII Oncovet. No último, foi contemplado com o primeiro lugar do Prêmio Profº Drº José Luiz Guerra.

Os resultados também foram publicados na revista *Veterinary and Comparative Oncology*, sob o título “Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples” (FERNANDES et al., 2015), em forma de artigo original (Anexo 6).

10. REFERÊNCIAS

- Afify, A., Yu, C., Hejazi, N., & Howell, L. The diagnostic utility of cell blocks prepared from residual SurePath Pap material for detection of human papilloma virus. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**. v.17, n.2, p.108-114, 2009.
- Akpolat, I., Smith, D. A., Ramzy, I., Chirala, M., & Mody, D. R. The utility of p16INK4a and Ki-67 staining on cell blocks prepared from residual thin-layer cervicovaginal material. **Cancer Cytopathology**. v.102, n.3, p.142-149, 2004.
- Araujo, L.H.L.; Victorino, A.P.O.S.; Melo, A.C.; Assad, D.X.; Lima, D.S.; Alencar, D.R.; Moreira, M.M.L.; Filho, O.M.; Coelho, R.F.S.; Asmar, S.B.; Pereira, B.S.V.; Scheliga, A. Linfoma Não-Hodgkin de alto grau – revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.54, n.2, p.175-83, 2008.
- Aulbach, A.D., Swenson, C.L. e Kiupel, M. Optimized processing of fine-needle lymph node biopsies for automated immunostaining. **J Vet Diag Invest**. v.22, p.383-388, 2010.
- Bernstein, S.J., Sanchez-Ramos, L., Ndubisi, B. Liquid-based cervical cytology smear study and conventional papanicolaou smears: a metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. **Am J Obstet Gynecol**. v.185, p.308-317, 2001.
- Bedrossian, C. W. Cytopathology: A global perspective. **Diagnostic cytopathology**. v.35, n.12, p.745-748, 2007.
- Bienzele, D., & Vernau, W. The diagnostic assessment of canine lymphoma: implications for treatment. **Clinics in laboratory medicine**. v.31, n.1, p.21-39, 2011.
- Bloom, F. & Meyer, L. M. Malignant lymphoma (so-called leukemia) in dogs. **The American journal of pathology**. v.21, n.4, p.683-715, 1945.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012. Rio de Janeiro 2012. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>.
- Brønden, L. B., Lindstrand, S., Nielsen, S. S., Toft, N., & Kristensen, A. T. Validation of data collected in the Danish Veterinary Cancer Registry. **Veterinary and comparative oncology**, v. 7, n.3, p. 207-211, 2009.
- Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S. e Moore, P.F. Canine Lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. **Vet Pathol**. v.33, p.204-212, 1996.
- Caraway, N. P. Strategies to diagnose lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration by using ancillary studies. **Cancer Cytopathology**, v.105, n.6, p.432-442, 2005.

Carter, R.F., Valli, V.E.O. e Lumsden, J.H. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the national cancer institute working formulation. **Can J Vet Res.** v.50, p.154-64, 1986.

Choi, S. J., Choi, Y. I., Kim, L., Park, I. S., Han, J. Y., Kim, J. M., e Chu, Y. C. Preparation of Compact Agarose Cell Blocks from the Residues of Liquid-Based Cytology Samples. **Korean journal of pathology.** v.48(5), p.351-360, 2014.

Coons, A. H., Creech, H. J. e Jones, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Experimental Biology and Medicine**, v.47, n.2, 200-202, 1941.

Culmsee, K., Simon, D., Mischke, R., e Nolte, I. Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, n.48, v.4, p.199-206, 2001.

DeMay, R.M. Building blocks of cytodiagnosis. Em: The Art & Science of Cytopathology. DeMay, R.M. Segunda edição. **ASCP press.** Chicago, p.562-95, 2012. Diamantis, A., Beloukas, A. I., Kalogeraki, A. M., & Magiorkinis, E. A brief chronicle of cytology: From Janssen to Papanicolaou and beyond. **Diagnostic cytopathology.** v.41(6), p.555-564, 2013.

Diamantis, A., Beloukas, A. I., Kalogeraki, A. M., & Magiorkinis, E. A brief chronicle of cytology: from Janssen to Papanicolaou and beyond. **Diagnostic cytopathology**, v.41, n.6, 555-564, 2013.

Domagala, W. M., Markiewski, M., Tuziak, T., Kram, A., Weber, K., & Osborn, M. (1989). Immunocytochemistry on fine needle aspirates in paraffin miniblocks. **Acta cytologica**, 34(3), 291-296, 1989.

Falini, B., Flenghi, L., Fagioli, M., Stein, H., Schwarting, R., Riccardi, C. e Lanfrancone, L. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.37, n.10, p.1471-1478, 1989.

Feldman, A. L., e Dogan, A. Diagnostic uses of Pax5 immunohistochemistry. **Advances in anatomic pathology**, v.14, n.5, p.323-334, 2007.

Fernandes, N.C.C.A., Guerra, J.M., Réssio, R.A., Wasques, D.G., Etlinger-Colonelli, D., Lorente, S., Nogueira, E. e Dagli, M.L.Z. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. **Vet and Comp Oncol.** DOI: 10.1111/vco.12137, 2015.

Fighera, R. A., Souza, T. M., Silva, M. C., Brum, J. S., Graça, D. L., Kommers, G. D., & Irigoyen, L. F. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense. **Pesq. Vet. Bras.** v.28, n.4, p.223-230, 2008.

Fischer, A. H., Clayton, A. C., Bentz, J. S., Wasserman, P. G., Henry, M. R., Souers, R. J., & Moriarty, A. T. Performance differences between conventional smears and liquid-based preparations of thyroid fine-needle aspiration samples: analysis of 47,076 responses in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Non-Gynecologic Cytology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v.137, n.1, p.26-31, 2013.

Fournel-Fleury, C.; Magnol, J.P.; Bricaire, P.; Marchal, T.; Charbanne, L.; Delverdier, A.; Bryon, P.A.; Felman, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodking's lymphomas. **J. Comp. Pathol.** Liverpool, v.117, n.1, p.35-59, 1997.

Frost, A. R., Sidawy, M. K., Ferfelli, M., Tabbara, S. O., Bronner, N. A., Brosky, K. R., & Sherman, M. E. Utility of thin-layer preparations in thyroid fine-needle aspiration. **Cancer Cytopathology**, v.84, n.1, p.17-25, 1998.

Gamlem H., Nordstoga K., Glatte E. Canine neoplasia—introductory paper. **APMIS Suppl.** v.125, p.5–18, 2008.

Garbar, C., Rummelink, M., & Mascaux, C. Fine needle aspiration cytology of lymph node. **Acta cytologica**, v. 52, n.4, p.418-423, 2008.

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International journal of cancer**, v.31, n.1, p.13-20, 1983.

Gondo Y.; Fukumura R.; Murata T.; Makino, S. Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics. **BMB Rep.** v.42, p.315–323, 2009.

Gupta P.K., Baloch Z.W., Cobbs C., Bibbo M. Processing liquid-based gynecologic specimens: comparison of the available techniques. **Acta Cytol.** v.45: p.995-998, 2001.

Hayat MA. Antigens and antibodies. In: Hayat MA, ed. Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy. New York, NY: Kluwer Academic; p.31–51, 2002.

He, X., Chen, Z., Fu, T., Jin, X., Yu, T., Liang, Y et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. **BMC cancer**, v.14, n.1, p.153-166, 2014.

Henry CJ. Biomarkers in veterinary cancer screening: applications, limitations and expectations. **The Veterinary Journal.** v.185, p.10-14, 2010.

Hernel B.M. e Suurmeijer A.J.H. Effective application of the methanol-based preservcyt fixative and the cellient automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry and molecular biology. **Diag Cytopathol.** Publicado online em wileyonlinelibrary.com, 2013.

Hoda, R. S. Non-gynecologic cytology on liquid-based preparations: A morphologic review of facts and artifacts. **Diagnostic cytopathology**, v.35, n.10, p.621-634, 2007.

Hoster, E., Rosenwald, A., Berger, F., Bernd, H. W., Hartmann, S., Loddenkemper, C. et al. Tumor Cell Proliferation (Ki-67 Index) Overcomes Cytology and Growth Pattern As Prognostic Factor in Mantle-Cell Lymphoma—Results from Randomized Trials of the **European MCL Network**. *Blood*, 124(21), 2977-2977, 2014.

Husain, O.A.N., & Butler, E. B. Cytopathology in the United Kingdom: 1854 to the present. **Diagnostic cytopathology**, v.22, n.3, p.203-206, 2000.

Idikio HA. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. **Int J Clin Pathol**. v.3, n.2, p.169-176, 2010.

Karlsson E.K. e Lindblad-Toh K. Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. **Nature reviews**. v.9, p.713-725, 2008.

Leong, A. S. Y., Suthipintawong, C., & Vinyuvat, S. Immunostaining of cytologic preparations: a review of technical problems. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v.7, n.3, p.214, 1999.

Linder J. Recent advances in thin-layer cytology. *Diag Cytopathol*. 1998; 18(1): 24-32.
MacNeill AL. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. **Top Companion Anim Med**. v.26, n.2, p.62-76, 2011.

MacNeill, A. L. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. **Topics in companion animal medicine**, v.26, n.2, p.62-76, 2011.

Madewell, B. R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, n.4, p.334-340, 2001.

Mair, S., Dunbar, F., Becker, P. J., & Du Plessis, W. Fine needle cytology--is aspiration suction necessary? A study of 100 masses in various sites. **Acta cytologica**, v.33, n.6, p.809-813, 1988.

Mankin H.J., Hornicek F.J., Rosenberg A.E., Harmon D.C., Gebhardt M.C. Survival data for 648 patients with osteosarcoma treated at one institution. **Clin Orthop Relat Res**. 429; 286–91, 2004.

Marconato, L., Gelain, M.E., Comazzi, S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. **Hematological Oncology**. v.31, n.1, p.1-9, 2013.

Mayall, F., Darlington, A., e Harrison, B. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of uncommon types of lymphoma. **Journal of clinical pathology**, v.56, p.11, p.821-825, 2003.

Mayall, F., & Darlington, A. The poor man's cell block. **Journal of clinical pathology**, v.63, n.9, p.837, 2010.

Meda, B.A., Geisinger, K.R., Buss, D.H. et al. Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma: the usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytomorphology and flow cytometry. **Am J Clin Pathol.** 113: 688-99, 2000.

Meinkoth J.H., Cowell R.L., Tyler R.D. e Morton R.J. Colheita e preparo de amostras. Em: Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. Cowell RL, Tyler, RD, Meinkoth JH e DeNicola DB. Terceira Edição. Editora MedVet Ltda. São Paulo, SP. p.01-19. 2009.

Michael, C. W. e Hunter, B. Interpretation of fine-needle aspirates processed by the Thin Prep® technique: Cytologic artifacts and diagnostic pitfalls. **Diagnostic cytopathology**, v.23, n.1, p.6-13, 2000.

Michael, C. W., McConnel, J., Pecott, J., Afify, A. M. e Al-Khafaji, B. Comparison of ThinPrep and TriPath PREP liquid-based preparations in nongynecologic specimens: A pilot study. **Diagnostic cytopathology**, v.25, n.3, p.177-184, 2001.

Nathan, N. A., Narayan, E., Smith, M. M. e Horn, M. J. Cell block cytology improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. **American journal of clinical pathology**, v.114, n.4, p.599-606, 2000.

Neuwald E.B., Teixeira L.V., Conrado F.O, Silva M.O.D., Hlavac N.R.C. e González F.H.D. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.4, p.349-354, 2014.

Nonogaki S., Wakamatsu A., Longatto-Filho A., Pereira S.M.M., Utagawa M.L., Alves V.A.F. et al. Hybrid capture II and polymerase chain reaction for identifying HPV infections in samples collected in a new collection medium. **Acta Cytol.** v.48, n.4, p.514-20, 2004.

OWEN, L. TNM Classification of tumors in domestic animals. Geneva. **World Health Organization**, p. 46-47, 1980.

Paoloni M. e Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nat Rev Cancer**. v.8, p.147–56, 2008.

Papanicolaou, G. N., & Traut, H. F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v.121, n.3, p.211, 1997.

Parodi A.L. Classification of malignant lymphoma in domestic animals: history and conceptual evolution. **Eur J of Vet Pathol**. v.7, n.2, p.43-50, 2001.

Pawloski K.M., Maciejewski H., Dolka I., Mol J.A., Motyl T., Król M. Gene expression profiles in canine mammary carcinoma of various grades of malignancy. **BMC Vet Res.** v.9, p.78, 2013.

Phillips B. S., Kass P. H., Naydan D. K., Winthrop M. D., Griffey S. M. e Madewell, B. R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.12, n.2, p.111-117, 2000.

Poggi A., Miniscalco B., Morello E., Comazzi S., Gelain M.E., Aresu L. e Riondato F. Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. **Veterinary and comparative oncology**, doi .1111/vco.12078, 2013.

Ponce F., Magnol J.P., Ledieu D., Marchal T., Turinelli V., Chalvet-Monfray K. e Fournel-Fleury C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, v.167, n.2, p.158-166, 2004.

Ponce F., Marchal T., Magnol J.P., Turinelli V., Ledieu D., Bonnefont C. et al. A Morphological Study of 608 cases of canine malignant lymphoma in france with a focus on comparative similarities between canine and human morphology. **Vet Pathol.** v.47, n.3, p.414-33, 2010.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol.** v.42, n.4, p. 405–426, 2005.

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J Vet Diag Invest.** v.20, p.393-413, 2008.

Ramos-Vara, J. A. e Miller, M. A. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. **Vet Pathol Online**, v.51, n.1, p.42-87, 2014.

Regan, R. C., Kaplan, M. S. W., & Bailey, D. B. Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians. **Veterinary and comparative oncology**, v.11, n.4, p.287-295, 2013.

Rizvi, S. A., Husain, M., Khan, S., e Mohsin, M. A comparative study of fine needle aspiration cytology versus non-aspiration technique in thyroid lesions. **The surgeon**, v.3, n.4, p.273-276, 2005.

Rowell J.L., McCarthy D.O. e Alvarez C.E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine.** v.17, n.7, p.380-388, 2011.

Rutley M., MacDonald V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. **Can Vet J.** v.48, n.9, p.977-979, 2007.

Ruiz F.S., Alessi A.C., Chagas C.A., Pinto G.A. e Vassallo J. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **J Bras Med Lab.** v.41, n.4, p.263-270, 2005.

Sakamoto, H., Takenaka, M., Ushimaru, K., & Tanaka, T. Use of liquid-based cytology (LBC) and cell blocks from cell remnants for cytologic, immunohistochemical, and immunocytochemical diagnosis of malignancy. **Cancer Cytopathol**, v.102, n.3, p. 142–149, 2012.

Sandhaus L.M. Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphoma – the next step. **Am J Clin Pathol** v.113; p.623-7, 2000.

Sapierzynski R., Dolka I. e Fabisiak M. High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. **Polish J of Vet Scienc** v.15, n.2, p.247-52, 2012.

Schüffler P.J., Fuchs T.J., Ong C.S., Wild P.J., Rupp N.J. et al. TMARKER: A free software toolkit for histopathological cell counting and staining estimation. **Journal of pathology informatics**, v.4, suppl, 2013.

Seelig D. M., Avery P., Webb T., Yoshimoto J., Bromberek J. et al. Canine T-Zone Lymphoma: Unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.28, n.3, p.878-886, 2014.

Sözmen M., Tasca S., Carli E., Lorenzi D., Furlanello T. e Caldin M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification and immunophenotyping of canine lymphomas. **J Vet Diagn Invest.** v.17, p.323-329, 2005.

Stansfeld, A. G., Diebold, J., Kapanci, Y., Kelenyi, G., Lennert, K., Mioduszevska, O. et al. Updated Kiel classification for lymphomas. **The Lancet**, n.331, p.292-293, 1988.

Starkey M.P., Scase T.J., Mellersh C.S. e Murphy S. Dogs really are man's best friend – canine genomics has applications in veterinary and human medicine. **Brief Funct. Genomic Proteomic.** v.4, p.112–128, 2005.

Sueiro, F.A.R., Alessi A.C. e Vassallo J. Canine Lymphomas: a Morphological and Immunohistochemical Study of 55 Cases, with Observations on p53 Immunoexpression. **J comparat pathol.** v.131, n. (2-3), p.207-13, 2004.

Tabatabai, Z. L., Auger, M., Kurtycz, D. F., Laucirica, R., Souers, R. J., Nayar, R. et al. Do liquid-based preparations of pulmonary bronchial brushing specimens perform differently from classically prepared cases for the diagnosis of malignancies? Observations from the college of american pathologists interlaboratory comparison program in nongynecologic cytology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v.139, n.2, p.178-183, 2015.

Takagi, K. A Cytological Study on the Dog's Thyroid Gland. **Folia Anatomica Japonica**, v.1, n.2, p.69-100, 1922.

Tauro, L. F., Lobo, G. J., Fernandes, H., George, C., Aithala, P. S., Shenoy, D. et al. A comparative study on fine needle aspiration cytology versus fine needle capillary cytology in thyroid nodules. **Oman medical journal**, v.27, n.2, p.151, 2012.

Taylor, B. E., Leibman, N. F., Luong, R., Loar, A. S. et al. Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, n.1, p.85-91, 2013.

Teske, E. Canine malignant lymphoma: A review and comparison with human non-hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v.16, n.4, p.209-219, 1994.

Thalheim, L., Williams, L. E., Borst, L. B., Fogle, J. E. et al. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. **J Vet Intern Med**, v.27, n.6, p.1509-1516, 2013.

Valli V.E., San Myint M., Barthel A., Bienzle D., Caswell J., Colbatzky F. et al. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. **Vet Pathol.** v.48, n.1, p.198-211, 2011.

Valli V.E., Kass P.H., San Myint M. e Scott F. Canine Lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate and treatment with survival. **Vet Pathol.** 2013 Feb 26. Disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/early/2013/02/26/0300985813478210>.

Vernau, K.M., Higgins, R.J., Bollen, A.W., Jimenez, D.F., Anderson, J.V. e Koblik, P.D. Primary canine and feline nervous tumors: intraoperative diagnosis using the smear technique. **Vet. Pathol.**, Washington v.38, n.1, p.47-57, 2001.

Virchow R. Weisses Blut. Neue Notitz aus dem Gebiet der Natur und Heilkunde. **Neue Notizen**, 36: 151-156, 1845.

Willmann, M., Müllauer, L., de Arespacochaga, A. G., Reifinger, M., Mosberger, I., e Thalhammer, J. G. Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B-and B-cell marker. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.128, n.4, p.359-365, 2009.

Young, N. A., Moriarty, A. T., Haja, J. C., e Wilbur, D. C. Fine-needle aspiration biopsy of lymphoproliferative disorders--interpretations based on morphologic criteria alone: results from the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Nongynecologic Cytopathology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v.130, n.12, p.1766-1771, 2006.

Zanini, D. A., Kimura, K. C., Nishiya, A. T., Ubukata, R., Leandro, R. M., Brito, C. P. D. et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p.1302-1308, 2013.

Zanoni, D. S., Grandi, F. e Rocha, N. S. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an “old and forgotten” method. **Veterinary Clinical Pathology**, v.41, n.3, p.307-308, 2012.

Zhao J, Lin DL, Zhai LH, Wang JG. Evaluation of ultrasound-processed rapid cell blocks in the cytopathologic diagnosis of cavity fluids. **Acta Cytol.** v.58, p.182–91, 2014.

Zimmermann, A. K., Camenisch, U., Rechsteiner, M. P., Bode-Lesniewska, B. e Rössle, M. Value of immunohistochemistry in the detection of BRAFV600E mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. **Cancer cytopathology**, v.122, n.1, p.48-58, 2014.

Zito, F. A., Gadaleta, C. D., Salvatore, C., Filotico, R., Labriola, A., Marzullo, A. e Marzullo, F. A modified cell block technique for fine needle aspiration cytology. **Acta cytologica**, v.39, n.1, p.93-99, 1994.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização morfológica e imunofenotípica dos linfomas caninos através de citologia de meio líquido e imuno-histoquímica em embocado celular", protocolado sob o nº 2967/2013, utilizando 100 (cem) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Morphologic and immunophenotypic characterization of canine lymphoma through liquid based cytology and immune-histochemistry in cell block", protocol number 2967/2013, utilizing 100 (one hundred) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 24 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

ANEXO 2

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/12/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 148/14 intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DOS LINFOMAS CANINOS ATRAVÉS DE CITOLOGIA DE MEIO LÍQUIDO E IMUNO-HISTOQUÍMICA EM EMBLOCADO CELULAR"** que utilizará 100 animais da espécie cães domiciliados, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Maria Lúcia Zaidan Dagli

Pesquisador (a) Executante: Natália C C de A Fernandes

CEUA-FMUSP, 11 de Dezembro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

ANEXO 3

PROJETO DE CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA DO LINFOMA CANINO

Nome: _____	Data da coleta: __/__/__		
Idade: _____	Raça: _____	Cor da pelagem: _____	Sexo: _____
Endereço: _____			
Proprietário: _____	Telefone: (__) _____		

Linfonodos colhidos:

- () Cervical superficial (pré-escapular)
() Poplíteo
() Submandibular
() Outros (_____)

Tempo de evolução: _____

Tamanho: _____

Ulcerado: () Sim () Não **Aderido a planos profundos:** () Sim () Não

Consistência:

() duro () firme () macio () flutuante () outro _____

Sob tratamento?

() Não () Sim. Qual? _____

Outros achados:

Atenção: Identificar corretamente as lâminas e frascos coletores, especificando o linfonodo, principalmente quando mais de um for colhido.

Responsável pela coleta: _____

Telefone: (__) _____

e-mail: _____

Nº de frascos: _____

Nº de lâminas: _____

ANEXO 4

1. OBJETIVO

Realizar coloração de Hemoxilina/ Eosina (H/E) através do método progressivo, nos cortes histológicos para proceder a análise histopatológica (análise morfológica) e a seleção de antígenos a serem pesquisados pelo método imuno-histoquímico.

2. PROCEDIMENTO

Após a desparafinização dos cortes histológicos conforme Anexo “A-NAP-069 Desparafinização e Hidratação”, que estão coladas na lâmina histológica:

- Transferir o berço que contém as lâminas do último álcool da desparafinização para a cuba de água para lavar em água corrente durante 5 minutos.
- Lavar 10 vezes as lâminas com água destilada.
- Mergulhar o berço na cuba de Hematoxilina, previamente filtrada, por 2 minutos.
- Lavar em água corrente até escorrer todo o excesso do corante.
- Lavar 5 vezes as lâminas com água destilada.
- Mergulhar 1 vez na solução de Água Amoniacal (0,5%) até que os cortes histológicos fiquem azulados.
- Lavar em água corrente
- Passar o berço com as lâminas pela Bateria de Desidratação: 1º cuba – ÁLCOOL 50%, 2º cuba - ÁLCOOL 80% e 3º cuba - ÁLCOOL 95%
- Mergulhar o berço na Cuba de Eosina, por 30 segundos.
- Passar para 1º Cuba – ÁLCOOL 95%
- 2º Cuba – ÁLCOOL 95%
- 3º Cuba – ÁLCOOL ABSOLUTO
- Passar pela Bateria de Desidratação a partir da 4º cuba – ÁLCOOL ABSOLUTO
- **NÃO PASSAR PELA** 5º cuba – ÁLCOOL ABSOLUTO
- Passar pela Bateria de Diafanização : 6º cuba - XILOL I
- 7º cuba XILOL II
- 8º cuba - XILOL III

- 9º cuba – XILOL IV (montagem)
- Montar as lâminas com lamínula e meio de montagem permanente (Entellan).
- Colocar as etiquetas de identificação das lâminas.

OBS: Os tempos dos corantes são determinados conforme testes realizados previamente, a alteração pode ocorrer dependendo da marca/lote dos corantes.

2.1 Etiquetas de identificação de lâminas

As lâminas coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) são identificadas utilizando-se etiquetas adesivas.

- **Lâminas de HE (ANATOMO-PATOLÓGICO)**

Contem:

YY= dezena final do ano

XXXX= número seqüencial de registro da Histologia (zerado ao final de cada ano)

- **Lâminas de HE (Imuno-histoquímica)**

Contem:

Número E= número seqüencial da IHQ

Número Original= número do bloco

Inscrição **HE**

Data = data que foi corado

Lâminas de IMUNO-HISTOQUÍMICA

Contém:

Número E= número sequencial da IHQ

Número Original= número do bloco

Data = Data da reação

3. PREPARO DE CORANTES

3.1 HEMATOXILINA DE HARRIS

Utilizado na coloração de Hematoxilina – Eosina (HE) e na contra-coloração da reação imuno-histoquímica.

Material utilizado:

5.0 g hematoxilina

50 mL de Álcool etílico absoluto PA

100g de Sulfato de alumínio e potássio (alúmen de potássio) dodecahidratado PA

2.5 g de Óxido de mercúrio vermelho PA

1000 mL de água destilada

microondas

Procedimento (para 1L):

No 1º dia:

1. Pesar 5,0g de hematoxilina
2. Em um erlenmayer de 100ml: dissolver a Hematoxilina em 50mLde Álcool etílico absoluto PA.
3. Vedar o recipiente com plástico filme ou parafilm.
4. Embrulhar o recipiente com papel alumínio e deixar *overnight* ao abrigo da luz.

No 2º dia:

- Em um becker de 2.000 mL: aquecer 1.000 mL de água destilada até o início da ebulição (aproximadamente 3 e meio minutos no microondas em potência máxima).
- Dissolver 100g de alúmen de potássio na água destilada aquecida.
- Misturar as duas soluções: hematoxilina (do 1º dia) com o alúmen (2º dia),
- Aquecer no micro-ondas, na potência máxima por 3 minutos ou até o surgimento de vapores e sugerir início de ebulição.

- Adicionar óxido de mercúrio lentamente com agitação constante. Realizar esta etapa deve ser em banho de água fria para ocorrer resfriamento simultâneo.
- Guardar em frasco devidamente identificado.
- Filtrar no momento do uso.

3.2 SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE EOSINA 1%

Solução Estoque (1L)

Material utilizado:

10,0g de Eosina amarela (eosina Y)

200mL de água destilada

800mL de álcool etílico 95%

Procedimento:

- Pesar 1,0g de Eosina amarela (eosina Y)
- Em um becker (pequeno): dissolver a eosina em 20mL água destilada
- Transferir para um frasco âmbar e adicionar 800mL de álcool etílico 95%, lavando o becker.

Solução de Uso (quantidade suficiente para cuba de 400mL)

Diluir: 100mL parte da Solução Estoque em 300mL partes de álcool etílico 80%

3.3 ÁGUA AMONIAL

Solução de diferenciação da hematoxilina

Para obter 400mL de água amoniacal (quantidade suficiente para a cuba em uso):

- Na cuba: colocar 400mL de água destilada
- Adicionar 0,5 mL de Hidróxido de Amônio
- Homogeneizar.

4. GERENCIAMENTO DE RESÍDUO QUÍMICO

1- Acondicionar as substâncias abaixo em frasco de vidro, classificado, rotulado e embalado conforme a normas vigentes de biossegurança para descarte de resíduo químico, grupo B. “P-NEESMT-012-04 Descarte de Resíduos Químicos”. Ao armazenar os frascos em caixas de papelão, devidamente etiquetadas, deve ser respeitada a incompatibilidade química no acondicionamento dos resíduos com os demais produtos químicos, conforme o documento A-NSMT-013-04- Lista de Incompatibilidade Química.

2- O Álcool etílico, entellan e o xilol das cubas de colorações: armazenar em frasco de vidro de um litro e etiquetar conforme modelo: “A-NEESMT-39-00 Rótulo para frascos contendo resíduos químicos”. Em seguida, armazenar os frascos em caixa de papelão e etiquetar conforme o modelo “A-NEESMT-005-04-Etiqueta para caixa de frasco contendo resíduos químicos líquidos e sólidos perigosos”.

3- Acondicionar a Hematoxilina de Harris em frasco de vidro e etiquetar conforme modelo: “A-NEESMT-45-00 Rótulo para frascos contendo misturas”. Em seguida, armazenar os frascos em caixa de papelão e etiquetar conforme o modelo “A-NEESMT-026-00-Etiqueta para caixa com frascos contendo misturas”. As duas etiquetas devem ser discriminadas a quantidade de componentes do corante como: 0,5% de Hematoxilina, 5% álcool etílico, 10% de Sulfato de Alumínio e Potássio e 0,25% de óxido de mercúrio.

4- Acondicionar a Eosina em frasco de vidro de 1 litro e etiquetar conforme modelo: “A-NEESMT-45-00 Rótulo para frascos contendo misturas”. Em seguida, armazenar os frascos em caixa de papelão e etiquetar conforme o modelo “A-NEESMT-026-00-Etiqueta para caixa com frascos contendo misturas”. A duas etiquetas devem ser discriminadas a quantidade de componentes do corante como: 2,5% de Eosina e 7,5% álcool etílico.

5- Acondicionar a solução de água amoniacal em frasco de vidro de 1 litro e etiquetar conforme modelo: “A-NEESMT-45-00 Rótulo para frascos contendo misturas”. Em seguida, armazenar os frascos em caixa de papelão e etiquetar conforme o modelo “A-NEESMT-026-00-Etiqueta para caixa com frascos contendo misturas”, A duas etiquetas devem ser discriminadas a quantidade de componentes da solução como: 0,4 % de Hidróxido de amônio.

5. REFERÊNCIAS

MICHALANY, Jorge. Técnica Histopatológica em Anatomia Patológica. 3ªed. São Paulo: Ed Michalany,1998. pag128-129.

BANCROFT, John D; COOK, Harry C. Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application. UK: Churchill Livingstone, 1995. pag 23 a 29.

ANEXO 5

Anexo 5

Resultados do teste de concordância e diagnóstico consenso por dois observadores, em teste duplo-cego. São Paulo, 2015.

Nº	OBS 1 CML	OBS 2 CML	OBS 1 CONVENCIONAL	OBS 2 CONVENCIONAL	OBS 1 EC	OBS 2 EC	CONSENSO*	HISTOPATOLÓGICO
1	EXCLUIDO DO TESTE DE CONCORDÂNCIA							
2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
3	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	POSITIVO	LINFOMA B	
4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
5	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	INSAT	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	LINFOMA DE CÉLULAS PEQUENAS
6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	LINFOMA DE CÉLULAS INTERMEDIÁRIAS
7	NEGATIVO	NEGATIVO	INSAT	INSAT	NEGATIVO	INSAT	REACIONAL	REACIONAL
8	INSAT	NEGATIVO	INSAT	NEGATIVO	-	-	REACIONAL	LINFOMA DE CÉLULAS INTERMEDIÁRIAS
9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	LINFOMA B	
10	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	LINFOMA T	
11	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	REACIONAL	
12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	REACIONAL	REACIONAL
13	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	REACIONAL	REACIONAL
14	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	REACIONAL	REACIONAL
15	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INSAT	NEGATIVO	POSITIVO	REACIONAL	REACIONAL
16	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	REACIONAL	REACIONAL
17	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	REACIONAL	REACIONAL
18	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	REACIONAL	REACIONAL
19	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	REACIONAL	REACIONAL
20	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	REACIONAL	REACIONAL
21	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INSAT	POSITIVO	REACIONAL	REACIONAL
Nº	OBS 1 CML	OBS 2 CML	OBS 1 CONVENCIONAL	OBS 2 CONVENCIONAL	OBS 1 EC	OBS 2 EC	CONSENSO*	HISTOPATOLÓGICO
22	INSAT	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	POSITIVO	LINFOMA T	LINFOMA DE GRANDES CÉLULAS T
23	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	POSITIVO	LINFOMA B	
24	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	LINFOMA B	LINFOMA DE CÉLULAS PEQUENAS
25	INSAT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
26	INSAT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	INSAT	LINFOMA**	
27	INSAT	INSAT	INSAT	INSAT	-	-	CELULARIDADE INSUFICIENTE	
28	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	MESOTELIOMA	
29	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	INSAT	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA T	LINFOMA DE CÉLULAS INTERMEDIÁRIAS
30	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
31	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	MASTOCITOMA	
32	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INSAT	NEGATIVO	REACIONAL	
33	INSAT	POSITIVO	INSAT	INSAT	POSITIVO	NEGATIVO	CELULARIDADE INSUFICIENTE	

34	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	-	-	LINFOMA B	
35	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
36	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	NEGATIVO	LINFOMA**	
37	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
38	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
39	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	LINFOMA**	
40	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
41	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
42	INSAT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
43	POSITIVO	POSITIVO	-	-	INSAT	POSITIVO	LINFOMA**	
44	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA T	
45	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	LINFOMA B	LINFOMA DE CÉLULAS INTERMEDIÁRIAS
46	POSITIVO	POSITIVO	INSAT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	LINFOMA B	LINFOMA DE CÉLULAS INTERMEDIÁRIAS
47	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	INSAT	INSAT	LINFOMA B	
48	POSITIVO	POSITIVO	-	-	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA T	
49	POSITIVO	POSITIVO	-	-	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
50	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
51	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA T	
52	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	REACIONAL	
53	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	
54	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	LINFOMA B	

* O diagnóstico de consenso foi feito por ambos observadores juntos, analisando CML, EC e avaliação da imunocitoquímica em conjunto.

** Casos sem celularidade suficiente para realização de imunofenotipagem.

ANEXO 6

Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples

N. C.C. A. Fernandes¹, J. M. Guerra¹, R. A. Réssio¹, D. G. Wasques²,
D. Etlinger-Colonelli¹, S. Lorente¹, E. Nogueira¹ and M. L. Z. Dagli³

¹Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

²HISTOPET, São Paulo, Brasil

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Abstract

Liquid-based Cytology (LBC) consists of immediate wet cell fixation with automated slide preparation. We applied LBC, cell block (CB) and immunocytochemistry to diagnose canine lymphoma and compare results with conventional cytology. Samples from enlarged lymph nodes of 18 dogs were collected and fixed in preservative solution for automated slide preparation (LBC), CB inclusion and immunophenotyping. Two CB techniques were tested: fixed sediment method (FSM) and agar method (AM). Anti-CD79a, anti-Pax5, anti-CD3 and anti-Ki67 were used in immunocytochemistry. LBC smears showed better nuclear and nucleolar definition, without cell superposition, but presented smaller cell size and worse cytoplasmic definition. FSM showed consistent cellular groups and were employed for immunocytochemistry, while AM CBs presented sparse groups of lymphocytes, with compromised analysis. Anti-Pax-5 allowed B-cell identification, both in reactive and neoplastic lymph nodes. Our preliminary report suggests that LBC and FSM together may be promising tools to improve lymphoma diagnosis through fine-needle aspiration.

Keywords

Cancer, Cytological
Techniques, Dog,
Lymphoma

Introduction

Cancer is the main cause of death in North American adult dogs¹ and lymphomas are among the most common types of dog tumors, affecting animals of all breeds and ages.^{2,3}

Fine-needle aspiration biopsy (FNAB) is a fast and cost-effective tool for the initial diagnostic planning of neoplastic diseases in general⁴ and plays a pivotal role in lymphoma diagnosis, as well in monitoring disease remission and relapse.⁵

However, although some studies have described high specificity and sensitivity of FNAB for

differentiating lymphoma from lymphoid hyperplasia in adequate samples,⁶ an inadequate technical procedure may yield a low-quality smear, with artefacts such as thick smears, contamination,⁷ improper/delayed fixation, low cellularity and cell disruption, thus preventing adequate morphological analysis. Fine-needle aspiration may be performed by a clinician, avoiding anesthesia and additional costs to the owner, while histopathological analysis requires a more invasive procedure. Many techniques are being applied in order to enhance lymphoma diagnosis through fine-needle

Corresponding author:
Dr. Natália CC de A
Fernandes

Centro de Patologia
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355, 7º
andar
São Paulo
Brasil
e-mail:
nccafernandes@
yahoo.com.br

aspiration, such as flow cytometry, gene profiling,⁸ PCR for antigen receptor rearrangements (PARR)⁹ and immunocytochemistry.

Considering these issues, we propose to introduce liquid-based cytology (LBC) and cell block (CB) as adjunct techniques for the cytological diagnosis of lymphoma. LBC has been used in human medicine since the mid-1990s, and consists of immediate transfer of harvested cells (by exfoliation or aspiration) to a preservative fluid with a decreased number of inadequate samples per harvest.¹⁰ In addition, the samples are suitable for multiple slide preparation, as well as further tests such as biomolecular tests, CB and immunocytochemistry.^{10–13}

LBC has been used for several non-gynecological specimens in human medicine, such as cavity body fluids, urine, cerebrospinal fluid, sputum, bronchial washes and aspiration biopsies, including lymph nodes.^{7,14} However, to our knowledge there are no LBC studies in veterinary medicine, despite the paramount importance of cytopathological diagnosis in clinical practice.

CB technique consists of sedimenting fixed cells for paraffin wax block embedding.¹⁵ This technique can be used to preserve the residual sample from LBC in the same manner as it is already performed in human medicine.¹⁴ Furthermore, CB increases the sensitivity in malignancy detection and reduces false-positive results.¹⁶

In this study, we compared LBC samples with traditional air-dried cytology samples from dogs with lymphoma or reactive lymphoid hyperplasia, regarding morphological features, and compared two methods of CB technique: fixed sediment method (FSM) and agar method (AM). We also performed immunocytochemistry technique in CB samples for lymphoma immunophenotyping and determination of proliferation index.

Materials and methods

Sampling

Samples were collected by FNAB from canine lymph nodes, and those were classified into two groups (reactive and lymphoma), with nine cases in each group (18 dogs in total). All dogs from the neoplastic group had a strong suspicion of

lymphoma on clinical examination or a previous cytologic diagnosis, and patients from the reactive group were serologically positive for visceral leishmaniasis. Animals from both groups presented with peripheral lymphadenopathy. Cytologic diagnoses were made through analysis of conventional air-dried Giemsa-stained smears. Cases with more than 50% of blastic population or more than 80% of monomorphic population were considered neoplastic, and classified as low-grade or high-grade lymphoma, according to updated Kiel classification.¹⁷ No further morphological classification was attempted. Every case was correlated with clinical data, history and ancillary tests. Every reactive hyperplasia and three cases of lymphoma had cyto-histological correlation.

In addition to a conventional air-dried smear, another sample was collected by FNAB from the same lymph node and flushed into a vial with preservative fluid (Becton Dickinson, TriPath Imaging, Burlington, NC, USA), for the preparation of LBC smear and CB. The aspirations were done until the preservative liquid in the vial acquired turbidity. Samples were refrigerated until analysis for a maximum of 7 days.

LBC

Preservative solution (10 mL) containing the lymphoid sample were transferred to a centrifugation tube, centrifuged for 10 min at 1218g and the supernatant was decanted. Magnetized blank slides (Surepath™, Becton Dickinson, TriPath Imaging, Burlington, NC, USA) were positioned in a rack and locked with a field delimiter (1.2 cm of diameter). The sample was automatically resuspended in 1 mL of Tris EDTA buffer. Immediately after, 200 µL of the resulting solution were placed in the field for 10 min before staining through Papanicolaou stain (Surepath™, Becton Dickinson, TriPath Imaging, Burlington, NC, USA). A second smear from each case was stained with Giemsa, for comparison. Three veterinary pathologists, experienced in cytological interpretation, evaluated the following morphological criteria in the LBC slides in comparison with air-dried slides: nuclear, cytoplasmic and nucleolar definition, background, cellularity and cell superposition. For cellularity, they counted

the average number of cells in five 400 $\times$ magnification fields. Each field was randomly selected from areas with less superposition and cell disruption. A score for other features was attributed as follows: 1 (poor or low), 2 (moderate) and 3 (good or high).

CB and immunocytochemistry

The residual sample from LBC preparation (800 μ L) was separated into two equal aliquots and centrifuged (1754 g, 15 min). The supernatant was decanted and the resulting pellet was separated into two parts. Half of the sample was fixed with 200 μ L of Bouin solution (2,4,6-Trinitrophenol 1,3%, formalin 40%, glacial acetic acid 100%) and centrifuged (1754 g, 15 min) (fixed sediment method – FSM). In the remaining half, 200 μ L of agar gel at 60 °C; 2 g agarose (Vetec, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 40 mL formalin buffered and 0.1 g eosin Y (Merck Milipore KGaA, Darmstadt, Germany) were added, following refrigeration (agar method – AM). Pellets from both groups were placed in a cassette and stored in 10% formalin-buffered solution, then embedded in paraffin wax and trimmed in 3 μ m-thick sections for H&E stain and immunocytochemistry.

Antigen retrieval was carried out with citrate buffer 10 mM pH 6.0 in a pressure cooker, for 3 min, at 120 °C. Endogenous peroxidase was blocked with 6% hydrogen peroxide for a minimum of 30 min. Primary antibodies anti-CD3 (polyclonal, 1:400) (Dako, Carpinteria, CA, USA), anti-PAX5 (BC-24, 1:200) (Biocare Medical, Concord, CA, USA), anti-CD79a (HM57, 1:100) (Dako, Carpinteria, CA, USA) and anti-Ki67 (MIB-1, 1:100) (Dako, Carpinteria, CA, USA) were diluted in bovine serum albumin 1% Na₃N 0.1% on PBS (pH 7.4), followed by overnight incubation (18 hours) at 4 °C. Signal amplification with Picture Max Kit™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) secondary peroxidase short polymer system was carried out for 30 minutes at 37 °C. After developing with 100 mg of 3,3'-diaminobenzidine (D-5637; Sigma, St. Louis, MO, USA), samples were diluted on PBS (pH 7.4) for 5 min, at 37 °C. The samples were, then, counterstained with Harris Hematoxylin for 30 s at room temperature, followed by dehydration and slide mounting with synthetic resin.

RESULTS

Sampling

The lymphoma group was composed of seven male and two female dogs (77.8% and 22.2%, respectively), with average age of 8.34 years (SD = 2.54). Two of nine dogs (22.2%) were cross-breed, and Labrador and Golden Retriever were represented with two cases each (22.2%). Seven cases were diagnosed as high-grade B-cell lymphomas, and two were classified as low-grade T-cell lymphomas based on morphological features (lymphocyte size, nuclear and cytoplasm features, presence of atypia and mitotic figures), immunophenotyping and proliferation index through Ki-67. All lymphoma patients presented with peripheral lymphadenopathy. Five cases with previous cytology diagnoses of lymphoma were under treatment with chemotherapy (Madison-Wisconsin protocol), but without previous immunophenotyping. One presented atypical lymphocytes (T low-grade) in blood smear examination and another presented thrombocytopenia (B high-grade). The reactive group was comprised of five males and four female dogs (55.5%; 44.5%). All were cross-breed animals, and most presented with unknown age. They had enlarged lymph nodes, skin lesions and serological diagnoses of leishmaniasis.

LBC

Reactive

All LBC smears stained with Papanicolaou were uniform with a monolayer of cells, absence of cell superposition, and rare aggregates. All cellular types were preserved (macrophages, large and small lymphocytes, plasma cells and neutrophils). Red blood cells were often hemolysed and background was clearer as compared to conventional smears (Figure 1).

Lymphoma

In general, background was clearer, with reduced amounts of red blood cells and lymphoglandular bodies. The cells were intact with a uniform distribution and no naked nuclei were present. Lymphocyte nuclei had good chromatin definition

Figure 1. Conventional cytology and liquid-based cytology (LBC) smears from reactive and lymphoma fine needle aspirates. A and B: Reactive lymphoid population present in both smears (A: Conventional, B: LBC), with small and large lymphocytes, besides macrophages and plasma cells. C and D: Monomorphic neoplastic lymphoid population present in both smears (C: conventional, D: LBC), with predominance of large lymphocytes (bar = 20 μ m). A and C: Giemsa stain. B and D: Papanicolaou stain. Inset: High power field. C: Giemsa stain. B and D: Papanicolaou stain.

with an ease assessment of nuclear membrane and nucleolus. All lymphoma cases presented a monomorphic population with large or intermediate lymphocytes in conventional cytology and the same pattern at LBC. Cell types were preserved with similar proportion of large lymphocytes, as compared to conventional smears. Nevertheless, neoplastic cells were smaller, mildly impairing diagnostic definition (Figure 1). As nuclear features were clearer in Papanicolaou stain, it was easier to classify between centroblastic or immunoblastic. LBC smears stained with Giemsa had high stain precipitation, obscuring nuclei and impairing adequate analysis of chromatin. A summary of morphological and technical evaluation of LBC in comparison to air-dried smears is shown in Table 1.

CB and immunocytochemistry

CBs were made from the residual sample from centrifuge tubes, after liquid-based cytology. Lymphoid cells in agarose gel were widely scattered with 2–5 cells per 400 $\times$ microscopic field. There

Table 1. Summary of morphological and technical evaluation of liquid-based cytology (LBC) in comparison to air-dried smears

Morphological and technical criteria	LBC smear	Air-dried smear
Cytoplasm definition	Poor	Good
Nuclear and nucleolar definition	Good	Poor
Shrinkage	Moderate	Low
Cellularity (cells/400 $\times$ field) ^a	50–100	150–200
Superposition	None to low	Moderate to high
Background	Low	Moderate to high
Possibility of ancillary testing ^b	Yes	Yes
Slide production	Automated	Manual

^aCorresponds to the average of cells counted by three pathologists in the lymphoma group.

^bLBC allows multiple ancillary tests, while air-dried only allows PARR.

was, therefore, marked impairment in cellular definition, immunostaining and proliferation index evaluation. Fixed sediment method with Bouin's fixative yielded highly cellular aggregated groups. A reduction in cellular volume as compared to

cytological smears was noted, and morphology of H&E CB slides was reminiscent of that seen in histologic slides, due to cell distribution and size. These findings were found in both groups.

Reactive

Harvested samples from reactive cases were less cellular than lymphoma cases, resulting in smaller CBs. It was noted that for a good-quality CB preparation in Bouin's fixative, the preservative solution should acquire a turbid aspect, requiring one or more aspirations per case. H&E slides exhibited reduction in cellular volume, with good nuclear preservation. In some cases, there was preservation of nodal microarchitecture, with delineation of lymphoid follicles and capillaries. Immunocytochemistry exhibited a polyclonal pattern, with positive cells for CD79a, PAX-5, CD-3 and Ki67, in variable proportions, with strong immunostaining. Blastic cells, mature non-proliferating lymphoid cells, and other non-lymphoid cells, such as macrophages and neutrophils, were present. The samples with preservation of microarchitecture were easier to analyse, and the proliferating cells correlated with the lymph node germinal centers. For samples with high blood contamination (detected in H&E slides), endogenous peroxidase blockage was extended in order to reduce nonspecific background marking. In lymph node histological sections, it was noted that both anti-CD79a and anti-PAX-5 marked the same cells of follicular B region. This co-labeling was present in all cytological and histological cases (Figure 2).

Lymphoma

Neoplastic cases exhibited samples with higher and abundant cellularity and the CBs could be adequately prepared. One of the cases was paucicellular and the FSM was difficult to achieve, although it was possible to establish the immunophenotype. H&E slides exhibited a predominant cellular type and mitotic indexes were easier to assess, as compared to cytological smears (both conventional and liquid-based). All cases exhibited a monoclonal pattern in immunocytochemical analysis allowing differentiation between B- and T-cell lymphomas, confirmed by immunohistochemistry in three cases with histologic evaluation. Seven cases were B-cell

lymphomas (77.8%): CD79a and PAX-5 positive, and CD3 negative. Anti-CD79a immunolabeling exhibited moderate intensity with little distinction from background. Nevertheless, anti-PAX-5 exhibited strong nuclear marking, corresponding to the same CD79a-positive cells. Anti-CD3 and anti-Ki67 exhibited both strong immunoreactivity and intense signal (Figure 3). No cases were negative for immunostaining or showed co-positivity for both B- and T-cell types.

Discussion

In this study we demonstrated an initial attempt at the use of LBC and CB for the diagnosis and immunophenotyping of canine lymphoma, as compared to conventional air-dried smears. The lymphoid cells were well preserved at LBC smears, with good chromatin definition and no superposition of cells. It was possible to produce CBs and to apply immunocytochemistry, differentiating B- from T-cells. Lymphoid cytology is generally employed in veterinary routine and lymphoma diagnosis is possible in most cases.^{18,19} One major concern faced by diagnosticians is the fact that the majority of definitive lymphoma diagnoses have traditionally been made through FNAB alone, without further confirmation with biopsy. Owners and clinicians may not be willing to submit the patient to an invasive and expensive procedure to obtain a tissue specimen for histopathology for a condition treated largely in a non-surgical fashion. Valli et al. (2013)²⁰ demonstrated different survival times and treatment responses in different lymphoma phenotypes and grades. Unfortunately, FNAB samples are usually inadequately suited for immunocytochemistry and flow cytometry analysis and cytological diagnosis is often limited to cell size and mitotic index, despite immunophenotype and proliferation index.²¹ In this scenario, LBC may maximize the value of FNAB, once it presents easy sample collection, possibility of ancillary testing and the possibility of sample storage for a long time (refrigerated up to three months).²² Moreover, the slides are processed in the laboratory in a standardized method, reducing operator-dependent variations in technique (e.g. handling artifacts, unsatisfactory results).

Figure 2. Reactive lymph node from a dog, histologic section and CB cytology of fine needle aspirate. A: Histological section from the lymph node. H&E (bar = 50 µm). B: Immunohistochemistry of the lymph node (anti-Pax-5) with B cells immunolabeling (follicles) (bar = 50 µm). C, D, E, F: CB immunocytochemistry from fine needle aspirates, with evidence of nodal microarchitecture. C: anti-CD3; D: anti-Pax-5; E: anti-Ki67 and F: anti-CD79a (bar = 50 µm).

Applying this tool to veterinary routine may be an alternative method for improving the diagnosis of lymphoma and other tumors, especially when associated with CB immunocytochemistry. In this study, LBC technique yielded better nuclear definition, improving cytological characterization, not only regarding cell size, but also chromatin and nucleoli distribution. On the other hand, the cells were smaller, with worse cytoplasmic definition. Cytologists should be alerted of these discrepancies of cell morphology between air-dried smears and LBC slides, and a period of comparative training and adaptation must be warranted. Also, LBC

technique is more expensive than a conventional smear, which can hinder its implementation in small laboratories. As an option, laboratory procedures could be partially manual, reducing costs. CBs are useful adjuncts to smears for establishing a more definitive cytopathological diagnosis, notably for FNAB samples.²³ With advances in LBC in human medicine, the method has been largely used, since it is a versatile option for the detection of antigens by immunocytochemistry.^{14,24} In veterinary medicine, it has been employed^{15,25} with different methodological approaches, including agarose gel, as reported by Zanoni *et al.*²⁵ In our

Figure 3. Lymphoma case in a dog: histology of lymph node section and CB cytology of fine needle aspirate. A: Histological section from the lymph node. H&E, (bar = 20 µm). B: Immunohistochemistry of the lymph node (anti-Pax-5) with predominance of large B cells (bar = 20 µm). C, D, E, F: CB immunocytochemistry from fine needle aspirates, with predominance of large B cells and high proliferation index. C: anti-CD3; D: anti-ki67; E: anti-Pax-5 and F: anti-CD79a (bar = 20 µm).

study, the FSM with Bouin's fixative was easier to reproduce, with adequate results for moderate to highly cellular samples. It showed more highly cellular and aggregated groups as compared to AM, but this finding may be due to the non-cohesive nature of the lymphoid cell population that could easily be diluted into the agarose gel. Further studies will offer insights in this regard, by comparing LBC technique for lymphoid and non-lymphoid tissues (e.g. epithelial cells, mesenchymal cells). Also, for paucicellular samples, FSM with Bouin's fixative yielded unsatisfactory results, and we suggest that

other methods should be tried for these samples, such as plasma-thrombin clot method. In human medicine, CB following immunocytochemistry has been applied in several samples, such as thyroid aspirates,²⁶ cavity fluids analysis²⁷ and others. In our study, CB sections were well suited for immunocytochemistry, especially for detection of CD3, PAX-5 and Ki67 antigens, allowing distinction between B- and T-cell lymphomas and determination of malignancy degree.²⁸ There are other methods for determining immunophenotype from fine-needle aspiration samples, such

as flow cytometry and PARR, but these techniques do not allow association between cell type and morphology. This was particularly important for the initial diagnosis of lymphoma and its differentiation from reactive lymph nodes, especially when analysis of Ki67 alone may be a potential pitfall, since the germinative center may present high proliferation index. PARR and flow cytometry exhibit a sensitivity of 74% and 98%, respectively, when compared to immunohistochemistry.⁹ A similar study comparing LBC with CB to these techniques could clarify whether or not it increases sensitivity.

Pax-5, or B-cell specific activator protein, is a nuclear protein and a valuable tool in human medicine for B-cell lymphoma diagnosis.²⁹ It is reported that the human anti-Pax5 antibody cross-reacts with canine Pax-5, in B-cells of reactive lymph nodes and lymphomas.³⁰ Accordingly, in our study, Pax-5 has shown strong immunoreactivity and correspondence with CD79a cells in the cases analysed, both from lymphomas and reactive lymph nodes. These findings indicate that Pax-5 may be employed for lymphoma immunophenotyping. For CB preparation, anti-Pax-5 showed an advantage: the nuclear immunolabelling is easier to distinguish from the background than anti-CD79a. Different antigens applied to CBs should also be tested to help further improvement in canine lymphoma diagnosis, such as anti-CD45, a possible cytology marker for T-zone lymphomas.³¹

Our work presents LBC and FSM CB with Bouin's fixative applied to lymphoma diagnosis and suggests that these techniques may be implemented as valuable tools for immunophenotyping of nodal lymphoma and its differentiation from lymphoid hyperplasia. Additional studies are important to determine sensitivity and specificity of the test, as compared to gold standard techniques (i.e. histopathology and immunohistochemistry), as well as predictive values, allowing for a better clinical assessment of the benefits and limitations of the technique. Unfortunately, few cases of lymphoma are routinely biopsied, impairing the achievement of more histopathological samples in our study. Finally, this study shows the overall potential for use of LBC associated with CB in veterinary diagnostic

routine, for both neoplastic and non-neoplastic diseases, and it may represent an additional tool for a fast and accurate cytopathological analysis.

Acknowledgements

This study is part of the MS Dissertation of N. C.C. A. F. in the Oncology Program of the School of Medicine of the University of São Paulo, Brazil. Authors are thankful to Marguiti Isaura Soares from the Laboratory of Experimental and Comparative Oncology of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo for technical help. Authors also thank Ruotti & Kamikawa and CVAP laboratories for providing samples, and André Landin Malt for English review.

Conflict of interest

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content.

References

1. Fleming JM, Creevy KE and Promislow DEL. Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; **25**: 187–198.
2. Ito D, Frantz AM and Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2014; **159**: 192–201.
3. Valli VE, Myint MS, Barthel A, *et al.* Classification of canine malignant lymphomas according to the world health organization criteria. *Veterinary Pathology* 2011; **48**: 198–211.
4. DeMay RM. Introduction to FNA biopsy. In: *The Art and Science of Cytopathology*. 2nd edn., Vol 2. RM DeMay Ed., Chicago, ASCP, 2012: 535–560.
5. Comazzi S, Guscetti F and Marconato L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematological Oncology* 2014; **32**: 68–71.
6. Stewart CJR, Duncan JA, Farguharson M and Richmond J. Fine needle aspiration cytology diagnosis of malignant lymphoma and reactive

- lymphoid hyperplasia. *Journal of Clinical Pathology* 1998; **51**: 197–203.
7. Linder J. Recent advances in thin-layer cytology. *Diagnostic Cytopathology* 1998; **18**: 24–32.
8. Starkey MP and Murphy S. Using lymph node fine needle aspirates for gene expression profiling of canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2009; **8**: 56–71.
9. Talheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE and Suter SE. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptors rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; **27**: 1509–1516.
10. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG and Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology* 2008; **111**: 167–177.
11. Ferenczy A and Franco E. Cervical-cancer screening beyond the year 2000. *Lancet* 2001; **2**: 27–32.
12. Gupta PK, Baloch ZW, Cobbs C and Bibbo M. Processing liquid-based gynecologic specimens: comparison of the available techniques. *Acta Cytologica* 2001; **45**: 995–998.
13. Nonogaki S, Wakamatsu A, Longatto-Filho A, Pereira SMM, Utagawa ML, Alves VAF, *et al.* Hybrid capture II and polymerase chain reaction for identifying HPV infection in samples collected in a new collection medium. *Acta Cytologica* 2004; **48**: 514–520.
14. Hemel BM and Suurmeijer JH. Effective application of the methanol-based Preservcyt fixative and the Cellient automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry and molecular biology. *Diagnostic Cytopathology* 2013; **41**: 734–741.
15. Taylor BE, Leibman NF, Luong R, Loar AS and Craft DM. Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. *Veterinary Clinical Pathology* 2013; **42**: 85–91.
16. Richardson HL, Koss LG and Simon TR. Evaluation of concomitant use of cytological techniques in recognition of cancer in exfoliated material from various sources. *Cancer* 1955; **8**: 948–950.
17. Sözmen M, Tasca S, Carli E, De Lorenzi D, Furlanello T and Caldin M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2005; **17**: 323–329.
18. Rutley M and MacDonald V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. *The Canadian Veterinary Journal* 2007; **48**: 977–979.
19. MacNeill AL. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Topics in Companion Animal Medicine* 2011; **26**: 62–76.
20. Valli VE, Kass PH, San Myint M and Scott F. Canine lymphomas association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology* 2013; **50**: 738–748.
21. Aulbach AD, Swenson CL and Kiupel M. Optimized processing of fine-needle lymph node biopsies for automated immunostaining. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2010; **22**: 383–388.
22. Hoda RS, Loukeris K and Abdul-Karim FW. Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: a comprehensive review of similarities and differences. *Diagnostic Cytopathology* 2012; **41**: 257–278.
23. Nathan NA, Narayan E, Smith MM and Horn MJ. Cell block cytology improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *American Journal of Clinical Pathology* 2000; **114**: 599–606.
24. Sakamoto KH, Ushimaru K, Miwa N and Tanaka T. Application of liquid-based cytology cervical cytologic specimens to cell block for histologic observation (in Japanese). *Journal of the Japanese Society of Clinical Cytology* 2010; **49**: 449–450.
25. Zanon DS, Grandi F and Rocha NS. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an “old and forgotten” method. *Veterinary Clinical Pathology* 2012; **41**: 307–308.
26. Zimmermann A, Camenisch U, Rechsteiner MP, Bode-Lesniewska B and Rössle M. Value of immunohistochemistry in the detection of BRAFV600E mutations in fine needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathology* 2014; **122**: 48–58.
27. Zhao J, Lin DL, Zhai LH and Wang JG. Evaluation of ultrasound-processed rapid cell blocks in the cytopathologic diagnosis of cavity fluids. *Acta Cytologica* 2014; **58**: 182–191.
28. Poggi A, Miniscalco B, Morello E, Comazzi S, Gelain ME, Aresu L, *et al.* Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2013. doi:10.1111/vco.12078.
29. Feldman AL and Dogan A. Diagnostic uses of Pax5 immunohistochemistry. *Advances in Anatomic Pathology* 2007; **14**: 323–334.

30. Willmann M, Mullauer L, Guija de Arespachaga A, Reifinger M, Mosberger I and Thalhammer JG. Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: a novel canine pan pre-B and B-cell marker. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; **128**: 359–365.
31. Seelig DM, Avery P, Webb T, Yoshimoto J, Bromberek J, Ehrhart EJ, *et al.* Canine T-zone Lymphoma: unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; **28**: 878–886.