

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**NEOPLASIAS MIELO E LINFOPROLIFERATIVAS EM CÃES E GATOS:
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

LAURA VICTORIA QUISHPE CONTRERAS

Porto Alegre

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**NEOPLASIAS MIELO E LINFOPROLIFERATIVAS EM CÃES E GATOS:
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

**Autor: Laura Victoria Quishpe
Contreras**

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial
para a conclusão do Programa de
Especialização em Patologia Clínica
Veterinária**

Orientadora: Ana Paula Ravazzolo

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Contreras, Laura Victoria Quishpe
Neoplasias mielo e linfoproliferativas em cães e
gatos: técnicas de diagnóstico laboratorial / Laura
Victoria Quishpe Contreras. -- 2023.
37 f.
Orientadora: Ana Paula Ravazzolo.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Veterinária, Especialização em Patologia clínica
veterinária, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Leucemia. 2. Linfoma. 3. Citometria de fluxo. 4.
Micro RNA. I. Ravazzolo, Ana Paula, orient. II.
Título.

Laura Victoria Quishpe Contreras

**NEOPLASIAS MIELO E LINFOPROLIFERATIVAS EM CÃES E GATOS:
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

Aprovado em:

APROVADO POR:

Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo

Orientadora e presidente da comissão

Profa. Dra. Priscila Beatriz da Silva Serpa

Membro da comissão

Profa. Dra. Stella de Faria Valle

Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido concluído sem o apoio de pessoas que foram fundamentais ao longo destes anos. Primeiramente minha família que, mesmo *ad portas* da pandemia (e durante), me apoiou na ideia de permanecer no Brasil para dar continuidade à minha trajetória acadêmica e crescimento profissional. Por serem minha inspiração e refúgio num momento tão cheio de incertezas.

À equipe do LACVet e do Zelle, patologistas e estagiários, amigas e colegas que fazem que aquilo que chamamos de “rotina” ficasse sempre mais leve e divertido. Obrigada pelo respaldo e amizade, por me permitir participar do caminho e crescimento de cada um e, ao mesmo tempo, aprender tanto de vocês. Obrigada, professora Stella, por ter me dado a oportunidade de ser monitora da especialização, pela confiança e por acreditar no meu potencial. Por cada palavra de ânimo, por ser exemplo de resiliência e perseverança.

Agradeço à professora Ana pela orientação durante a elaboração deste trabalho. Orientadora exemplar, certa, ágil, paciente e disposta a ajudar, um exemplo que pretendo seguir.

Aos meus amigos da Colômbia porque, mesmo na distância, sempre contei com a amizade, apoio e momentos de descontração tão necessários.

Ao Matheus, por me ajudar a sair da rotina num momento em que, sem saber, tanto precisava. Pelo apoio incondicional, companheirismo e amor.

À Alexandra Elbakyan porque, mais uma vez, pude vivenciar o quão importante é tornar o conhecimento acessível.

À UFRGS, Alma Máter, e à educação pública e de qualidade, transformadora de vidas e realidades.

“When making plans, think big. When making progress, think small.”

- James Clear. *Atomic Habits*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura básica de um citômetro de fluxo	19
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do grupo de cooperação Franco-Americano-Britânico (FAB) para leucemias em humanos	13
Tabela 2 - Classificação dos principais linfomas em humanos	17
Tabela 3 - Imunomarcadores mais usados em citometria de fluxo para diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas e linfomas em cães e gatos	21

LISTA DE ABREVIATURAS

AML	Leucemia mielóide aguda
B-CLL	Leucemia linfocítica crônica de células B
BLBCL	Linfoma difuso de grandes células B
CD	Grupamento de diferenciação
circDNA	DNA circulante
CLL	Leucemia linfocítica crônica
FAB	Franco-Americana-Britânica
FeLV	Vírus da leucemia felina
JAK-2	Janus quinase 2
MDS	Síndrome mielodisplásica
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
miRNAs	Micro RNAs
MPO	Mieloperoxidase
NK	Natural killer
NZML	Linfoma nodular da zona marginal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARR	PCR para rearranjo de receptores de antígenos
PTCL	Linfoma periférico de células T
qPCR	PCR em tempo real
WGA	Amplificação de genoma completo de célula única

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. LEUCEMIAS EM CÃES E GATOS	10
2.1 Generalidades	10
2.2 O cão e o gato como modelos de estudo	10
2.3 Classificação das leucemias pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela cooperação Franco-Americana-Britânica (FAB)	11
2.4 Principais leucemias em cães	14
2.5 Principais leucemias em gatos	14
3. LINFOMAS EM CÃES E GATOS	15
3.1 Generalidades	15
3.2 Classificações dos linfomas	15
3.3 Principais linfomas em cães	15
3.4 Principais linfomas em gatos	17
4. CITOMETRIA DE FLUXO	19
4.1 Generalidades	19
4.2 Citometria de fluxo aplicada à leucemia	21
4.3 Citometria de fluxo aplicada a linfoma	22
5. MICRO RNAs	25
5.1 Generalidades	25
5.2 Micro RNAs no diagnóstico de leucemia	25
5.3 Micro RNAs no diagnóstico de linfoma	26
6. TÉCNICAS PROSPECTIVAS PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS E LINFOMAS	27
6.1 DNA circulante	27
6.2 Análises de célula única (<i>single-cell analysis</i>)	28
6.3 Transcriptômica espacial	29
7. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

As leucemias e os linfomas são doenças de grande importância, na medicina humana e na veterinária. O estudo das leucemias, tanto na sua origem como no tratamento e desfecho é crucial para a medicina humana, considerando que uma a cada 70 pessoas pode desenvolver leucemia em algum ponto da sua vida (DAVIS *et al.*, 2014). Antigamente, a classificação destes processos era baseada em parâmetros morfológicos, observados na avaliação microscópica do sangue periférico, medula óssea ou órgãos linfóides. Os avanços nas técnicas diagnósticas moleculares têm permitido um melhor esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos destas doenças, facilitando a sua classificação com fim de direcionar o tratamento e estabelecer um prognóstico mais preciso. Recentemente os cães e gatos têm se tornado modelos de estudo mais apreciados na oncologia comparativa. Dentre as vantagens que representam quando comparados com outros modelos animais (camundongos, ratos) ou modelos *in vitro*, estão a resposta semelhante aos tratamentos, compartilhamento de fatores de risco e, inclusive, mecanismos gênicos semelhantes no desenvolvimento das doenças (SAHABI *et al.*, 2018; ONACIU *et al.*, 2020). O objetivo da presente revisão de literatura é descrever as características básicas das leucemias e linfomas em cães e gatos e, posteriormente, aprofundar nas principais técnicas de diagnóstico molecular e sua aplicabilidade no diagnóstico destas neoplasias, trazendo informações sobre técnicas mais inovadoras e que têm grande potencial para estudo de doenças hematopoiéticas e linfoproliferativas em pequenos animais.

2. LEUCEMIAS EM CÃES E GATOS

2.1 Generalidades

A definição de leucemia é a proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea, que acontece por falhas nos mecanismos regulatórios da replicação destas, levando a uma proliferação descontrolada (DAVIS *et al.*, 2014). Isto leva ao comprometimento da hematopoiese, o que acaba se refletindo em alterações persistentes no sangue periférico. As leucemias são classificadas dependendo da velocidade de proliferação, como agudas ou crônicas, ou de acordo com a linhagem celular de origem (CHENNAMADHAVUNI *et al.*, 2022). A classificação destes processos em humanos é mais complexa e compreende também características genéticas e moleculares, determinadas por testes que paulatinamente estão sendo introduzidos na medicina veterinária. Recentemente, cães e gatos têm se tornado ótimos modelos de estudo destas doenças pelo fato de ter evoluído em convivência com os seres humanos (BREEN; MODIANO, 2008).

A heterogeneidade nos sistemas de classificação usados na medicina veterinária, somado a outros fatores e limitações (informações incompletas, perda no seguimento, restrições financeiras dos tutores, entre outras), faz com que os dados epidemiológicos em relação a estas doenças sejam mais escassos. De maneira geral, não há evidência de predisposição por raça. Em cães, animais de 7 a 8 anos de idade são mais predispostos a padecer leucemia, embora estudos relatem pacientes com menos de dois anos acometidos (DAVIS *et al.*, 2018). As leucemias nesta espécie não têm sido relacionadas com agentes infecciosos, diferente do que acontece em felinos, nos quais tem se demonstrado forte associação entre infecções retrovirais e desenvolvimento de leucemias e linfomas. Estes vírus agem como carcinogênicos diretamente, mediante a alteração de oncogenes do hospedeiro, levando conseqüentemente à expressão de oncoproteínas, o que leva a uma falha nos mecanismos de controle da replicação e apoptose celular (ROLPH; CAVANAUGH, 2022)

2.2 O cão e o gato como modelos de estudo

O grande valor do cão e do gato como modelos de estudo tem adquirido bastante relevância nos últimos anos. Os avanços na medicina veterinária laboratorial e oncologia, bem como a aplicação de ferramentas diagnósticas moleculares, somada às limitações que apresentam os modelos tradicionalmente estudados (ratos e camundongos) tiveram como

consequência um maior interesse por parte de pesquisadores pelas leucemias e linfomas em cães e gatos. As características que fazem destes animais modelos de doenças oncológicas para os humanos incluem compartilhamento de fatores de risco, respostas a terapia semelhantes às observadas em humanos e avaliação mais fidedigna de processos como surgimento da neoplasia, o microambiente do tumor e desenvolvimento de metástases (ONACIU *et al.*, 2020). Além disso, estudos têm demonstrado que tanto humanos quanto cães podem apresentar supressão ou alteração na expressão dos mesmos genes em determinados tipos de neoplasias (SAHABI *et al.*, 2018). A limitada heterogeneidade genética evidenciada em algumas raças de caninos tem sido um fator favorável para o estudo da predisposição genética à apresentação de neoplasias linfoproliferativas. As populações humanas apresentam uma vasta heterogeneidade genética, o que dificulta o estudo de risco hereditário de desenvolvimento de doença; enquanto nos cães, essa diversidade é mais restrita e é possível, inclusive, agrupar as raças para identificação de alterações e risco em ancestrais comuns (MODIANO *et al.*, 2005).

2.3 Classificação das leucemias pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB)

A quinta edição da classificação das leucemias, em humanos, foi lançada pela OMS em 2022, realizando modificações da versão anterior, de 2016. Um dos conceitos que é explicado nesta edição é o de hematopoiese clonal, que denota a proliferação de células provenientes de uma única célula pluripotencial mutada, demonstrando clara vantagem de proliferação em relação às outras, e em ausência de citopenias, neoplasias hematológicas, entre outras desordens. Em estudos recentes têm se demonstrado a importância da identificação da hematopoiese clonal, existindo associações entre este achado e doenças cardiovasculares, mecanismos de inflamação e até mesmo de sobrevivência. Tanto a hematopoiese clonal quanto outros fenômenos descritos mais recentemente (como a hematopoiese clonal de potencial indeterminado e a citopenia clonal de significância indeterminada), estão sendo incluídos nas últimas classificações das leucemias em humanos; porém, os estudos referentes a estas manifestações em pequenos e grandes animais são praticamente inexistentes, o que limita atualmente a sua aplicação na rotina veterinária.

Os principais grupos descritos de neoplasias mieloproliferativas em humanos são leucemia mielóide crônica, policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária,

leucemia neutrofilica crônica, leucemia eosinofílica crônica, leucemia a mielomonocítica juvenil e outras doenças mieloproliferativas não especificadas (KHOURY *et al.*, 2022). Algumas destas entidades têm sido pouco relatadas em animais domésticos. Apesar de que o termo “policitemia vera” é ainda usado para descrever a eritrocitose absoluta primária em cães e gatos, o seu uso é discutível. Nos humanos com policitemia vera, a mutação no códon 617 da enzima Janus quinase 2 (JAK-2) é identificada em aproximadamente 90% dos casos, e é considerada inclusive um ponto essencial para a classificação desta neoplasia. Já em cães, apesar de ter sido identificada uma mutação no mesmo códon, a proporção pode ser variável. Em um estudo foi identificada apenas em um de cinco cães com suspeita de eritrocitose primária (BEURLETT *et al.*, 2011).

Na leucemia mielóide crônica, historicamente tinham sido descritas três fases: a fase crônica (que, apesar do nome, acaba sendo a fase inicial, geralmente indolente), fase blástica e, aparecendo de maneira variável, uma outra fase denominada de fase acelerada. A fase blástica é determinada pela presença de mais de 20% de blastos no sangue circulante ou no mielograma, na presença de proliferação extra medular de blastos ou na presença aumentada de linfoblastos no sangue periférico ou medula óssea, sendo que para estes últimos não foi ainda estabelecido um ponto de corte específico (KHOURY *et al.*, 2022).

A síndrome mielodisplásica (*myelodysplastic syndrome*, MDS) e a leucemia mielóide aguda (*acute myeloid leukemia*, AML) configuram grupos separados das neoplasias mieloproliferativas anteriormente descritas. Em alguns pacientes, a MDS pode evoluir para AML. A classificação proposta pela OMS indica que uma porcentagem de blastos acima de 20% pode ser usada para diferenciar MDS e AML; porém, para fins de apenas o diagnóstico desta última, essa porcentagem pode ser inferior, sempre que sejam comprovadas as alterações gênicas nas células aberrantes (KHOURY *et al.*, 2022).

A classificação das leucemias mielóides e histiocíticas, proposta pela OMS em 2022, não contempla as leucemias linfoides. Estas são agrupadas junto com os linfomas. As leucemias linfocíticas são agrupadas em neoplasias de precursores de células B e neoplasias de células B maduras. O grupo de precursores de células B compreende todas as leucemias linfoblásticas. O grupo de neoplasia de células B maduras inclui proliferações pre-neoplásicas e neoplásicas de linfócitos pequenos, como a leucemia linfocítica crônica (CLL), e leucemias de células B de origem esplênica, como por exemplo, a tricoleucemia (*hairy cell leukemia*) e a

leucemia de células B esplênicas com nucléolo proeminente. A classificação de leucemias linfocítica de células T também se divide em células precursoras e células maduras, incluindo neste subgrupo as leucemias de células NK (ALAGIO *et al.*, 2022).

O sistema de classificação proposto pelo grupo de cooperação Franco-Americano-Britânico, FAB (BENNETT *et al.*, 1976), na década de 70, visava estabelecer uma classificação para a leucemia mielóide aguda baseada na maturação das células e suas características morfológicas, criando uma escala que ia de M0 até M7 (Tabela 1). Com o desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico observou-se que características genéticas das células estudadas descreviam melhor o prognóstico e as propriedades biológicas da leucemia do que apenas as características morfológicas, motivo pelo qual a classificação da OMS tem tomado mais relevância na atualidade. Outra diferença fundamental entre ambos os tipos de classificação é o limiar de blastos circulantes para determinação de um processo leucêmico, sendo 30% no sistema da FAB e 20% no sistema da OMS (VARDIMAN *et al.*, 2002).

Tabela 1 – Classificação do grupo de cooperação Franco-Americano-Britânico (FAB) para leucemias em humanos

Subtipo FAB	Nome da leucemia	Célula envolvida
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada	Células pluripotenciais
M1	Leucemia mielóide aguda com maturação mínima	Células pluripotenciais
M2	Leucemia mielóide aguda com maturação	Leucócitos
M3	Leucemia promielocítica aguda	Leucócitos
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	Leucócitos
M4eos	Leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia	Leucócitos
M5	Leucemia monocítica aguda	Leucócitos
M6	Leucemia eritroide aguda	Eritrócitos
M7	Leucemia megacarioblástica aguda	Megacariócitos

Fonte: Adaptada de BENNETT *et al.* (1976).

O reconhecimento da população celular envolvida é fundamental para a adequada classificação do processo. Um dos elementos que facilita este processo é o grupamento de diferenciação (CD pelas siglas em inglês de *cluster of differentiation*). O CD faz referência a proteínas localizadas na superfície das células, podendo ser exclusivos de uma única

população celular ou não. A identificação do CD permite a classificação das células por fenótipos, o que é de grande utilidade para a caracterização das populações celulares envolvidas em diversos processos patológicos (ACTOR, 2019).

2.4 Principais leucemias em cães

Estudos sobre a prevalência das leucemias em cães são escassos quando comparados com os realizados em humanos. Os estudos retrospectivos disponíveis demonstraram que as leucemias linfocítica, aguda e crônica, são mais frequentes do que a leucemia mielóide aguda (ADAM *et al.*, 2009; TASCA *et al.*, 2009).

A leucemia linfocítica crônica de linfócitos B (B-CLL) é a neoplasia hematopoiética maligna mais frequente em humanos adultos, tendo a sua origem em alterações gênicas (BALATTI *et al.*, 2016). Para sua diferenciação de outro tipo de doenças linfoproliferativas de células B, é identificado um CD específico, o CD5, que além disso é um marcador típico de células T. Porém, os cães com CLL de células B não expressam este marcador, o que evidencia a importância de identificar e criar painéis de CD específicos para cada espécie. Algumas das raças mais predispostas a apresentar a B-CLL são Dachshound, Pomerania, Cairn Terrier, Bichon Frise e Bulldog inglês; enquanto algumas raças apresentam risco reduzido, como os Labradores Retriever, Poodle, Collie, Golden Retriever e Corgi (BROMBEREK *et al.*, 2016).

2.5 Principais leucemias em gatos

Nos gatos, a maioria dos casos de leucemias relatadas na literatura têm sido relacionadas com infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV). Embora em países norte-americanos e europeus a prevalência de gatos com FeLV tenha diminuído bastante, consequência das campanhas de vacinação, prevenção e tutoria responsável, no Brasil a infecção com FeLV continua sendo mais comum, detectada em mais de 50% dos pacientes com linfoma (CRISTO *et al.*, 2019).

O tipo de infecção que o gato infectado por FeLV irá desenvolver depende da idade, do estado imune e da carga de vírus. O paciente pode desenvolver uma infecção progressiva, eliminando uma quantidade maior de vírus e vindo a óbito em decorrência de complicações associadas à infecção; desenvolver uma infecção regressiva, apresentando antigenemia baixa e transitória, baixa quantidade de DNA proviral e RNA detectável por qPCR; ou uma infecção

abortiva, menos frequente de acontecer (BEATTY, 2014). As leucemias desenvolvidas por pacientes que apresentam a forma progressiva da infecção por FeLV costumam ser agudas, mas já foram descritos casos de leucemia eosinofílica crônica, mielomonocítica crônica e inclusive linfocítica crônica, embora esta última aconteça com mais frequência em gatos soronegativos (SYKES; HARTMANN, 2014).

3. LINFOMAS EM CÃES E GATOS

3.1 Generalidades

Os linfomas são definidos como aquelas neoplasias provenientes dos linfócitos, podendo ter sua origem em diferentes tecidos, sendo mais comumente acometidos os linfonodos, medula óssea e baço (VAIL *et al.*, 2020).

3.2 Classificações dos linfomas

A revisão mais recente da OMS sobre classificação de neoplasias linfóides proposta para humanos foi publicada em 2022. Até hoje, em alguns estudos, é usada a 4ª revisão, publicada em 2016 (SWERDLOW *et al.*, 2016). Uma lista resumida da classificação de linfomas proposta para humanos encontra-se na Tabela 2.

Considerando a localização anatômica, o linfoma pode ser classificado como generalizado, alimentar, tímico, de pele, leucemia e outros (renal, por exemplo). Já os estágios vão de I até V, sendo grau I quando a neoplasia se encontra limitada a um único local, grau II quando está disseminada numa área anatômica específica, grau III quando a invasão dos linfonodos é generalizada, grau IV quando há envolvimento de baço e/ou fígado e, finalmente, grau V quando há achados hematológicos associados e comprometimento da medula óssea, ou de outros sistemas (VAIL *et al.*, 2020).

Apesar das raças de pequeno porte terem maior predisposição para desenvolvimento de leucemia linfocítica crônica, demonstrou-se que os Boxer apresentam uma sobrevida significativamente menor, tendo esta leucemia um comportamento mais agressivo nessa raça (ROUT *et al.*, 2021).

3.3 Principais linfomas em cães

A apresentação mais comum de linfoma em cães, referente à localização anatômica, é o linfoma multicêntrico, compreendendo até mais de 80%, e se caracterizando pela

apresentação de linfadenomegalia generalizada. Outros tipos de linfomas, como o linfoma alimentar, são menos frequentes.

Tabela 2 – Classificação dos principais linfomas em humanos.

Grupo	Exemplo
Neoplasias de precursores de células B	Linfomas linfoblásticos de células B
Neoplasias de células B maduras	Linfoma linfocítico de pequenas células Linfoma linfoplasmocítico Linfoma nodal da zona marginal Linfoma folicular Linfoma difuso de grandes células B Linfoma mediastinal primário Linfoma de Hodgkin clássico
Neoplasias de plasmócitos e outras doenças com paraproteínas	Plasmocitoma Mieloma múltiplo
Lesões semelhantes a tumores com predominância de células T	Proliferação linfoblástica indolente de células T
Neoplasias de precursores de células T	Linfoma linfoblástico de células T
Neoplasias de células T maduras e NK	Linfomas cutâneos primários de células T Linfoma gastrointestinal indolente de células T Linfoma periférico de células T

Fonte: Adaptada de ALAGGIO *et al.* (2022).

Já o linfoma mais frequente em cães é o linfoma difuso de grandes células B ou DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma* em inglês), seguido do linfoma periférico de células T ou PTCL (*Peripheral T cell lymphoma*) e linfoma nodal da zona marginal ou NMZL (*nodal marginal zone lymphoma*). Outros linfomas de linfócitos T e B, bem como linfoma da zona T, linfoma linfoblástico de células T e linfoma das células do manto são menos frequentes. (AVERY, 2020). Numa população de 1226 cães acometidos com linfoma foi descrita uma prevalência de linfoma de células de B de 61,4% versus 38,6% de linfoma de células T (MODIANO *et al.*, 2005).

A procura de testes menos invasivos que forneçam informações relacionadas à eficácia do tratamento, bem como ao prognóstico e sobrevida, tem levado ao desenvolvimento de testes moleculares e melhor aproveitamento das informações obtidas pelos testes rotineiros, como o hemograma. Um exemplo é o uso de parâmetros como ausência de anemia e a relação neutrófilo:linfócito $<9,44$ antes do tratamento, associados a uma maior sobrevida sem progressão do linfoma após a primeira remissão, ou a relação monócito:linfócito $>1,43$ e a relação neutrófilo:linfócito $<11,44$ indicando maior sobrevida de modo geral (DAVIES *et al.*, 2017). Um valor da relação neutrófilo:linfócito $<7,45$ foi também associado a maior sobrevivência num período de 180 dias e a relação plaqueta:neutrófilo foi identificada como um potencial marcador prognóstico da progressão do linfoma após 180 e 365 dias (HENRIQUES *et al.*, 2021).

As raças mais predispostas a desenvolver neoplasias linfoides podem variar de acordo com a localização geográfica, mas as mais descritas na literatura são o Pastor Australiano, Dobermann, Beagle, Bullmastiff, Boxer, Mastiff Napolitano, Foxhound Terrier, Rottweiler, Bernese Mountain Dog, Golden retriever e Labrador, entre outras. Já outras raças como Akita, Poodle, Maltês, Chihuahua, Chow Chow e Bulldog Francês, apresentam risco reduzido (BENNETT *et al.*, 2018; COMAZZI *et al.*, 2018; VAN ROOYEN *et al.*, 2018).

3.4 Principais linfomas em gatos

Nos gatos, diferente dos cães, a presença de linfoma foi associada em muitos casos à infecção por retrovírus, especialmente FeLV; embora o FIV também aumente o risco de desenvolvimento da neoplasia. Isto faz com que sejam identificados dois picos de idade para desenvolvimento de linfoma, um deles ao redor dos 2 a 3 anos, composto pelos pacientes positivos para FeLV, e outro entre 8 – 10 anos aproximadamente, de pacientes negativos para FeLV (COUTO, 2001). No caso dos gatos FeLV positivo, os linfomas mais comumente apresentados são mediastinal, multicêntrico, espinhal, renal e ocular, sendo principalmente de células T, havendo menos casos de células B. Em gatos com FIV os linfomas tendem a ser de origem de células B (SYKES; HARTMANN, 2014).

Dentre os outros tipos de linfoma em gatos, o linfoma alimentar tem ganhado interesse recentemente na pesquisa de oncologia comparada. Especificamente o subtipo denominado linfoma alimentar de baixo grau, ou LGAL (*low-grade alimentary lymphoma*), que é o mais comum dos linfomas alimentares em gatos, possui potencial como modelo de doenças

linfoproliferativas indolentes de células T em humanos (PAULIN *et al.*, 2018). No entanto, o desafio clínico e diagnóstico que representa a diferenciação entre o processo neoplásico e a enterite linfoplasmocítica demanda o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais precisas, considerando as semelhanças no quadro clínico, achados nos exames de imagem e laboratoriais de ambos os processos (FREICHE *et al.*, 2021). Apesar de a correlação entre o exame histopatológico e de clonalidade auxiliar no diagnóstico, os mecanismos fisiopatológicos de ambos os processos, bem como a diferenciação clara entre um e outro ainda precisam ser elucidados.

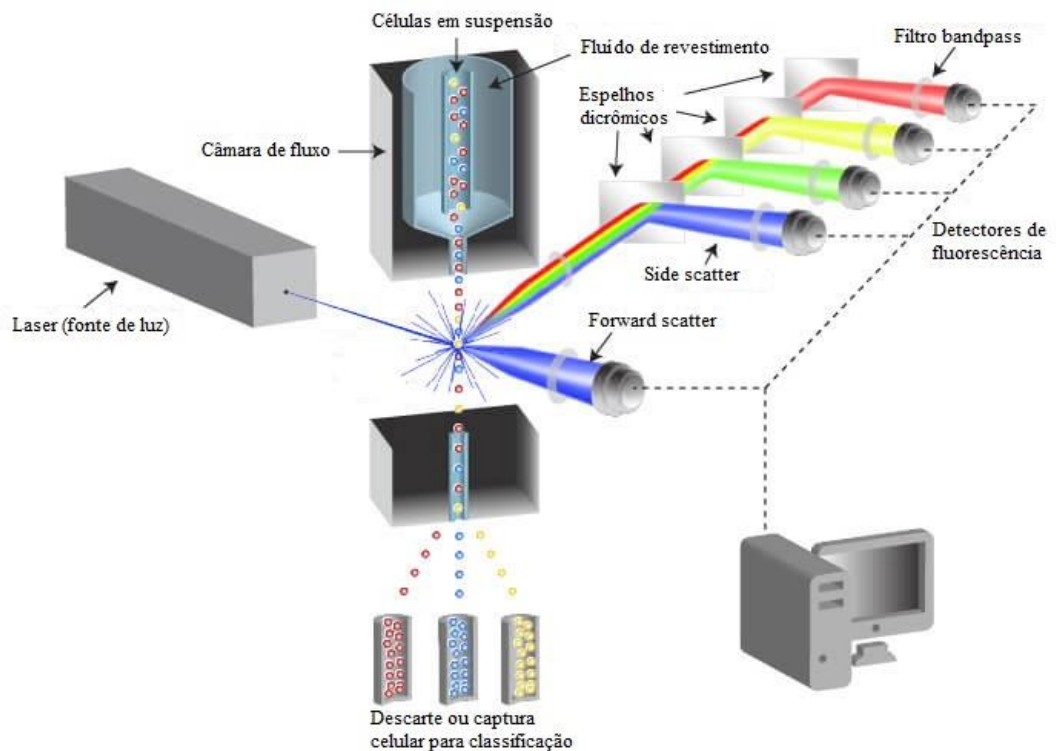
Outros linfomas extranodais, como o nasal, ocular, renal, do sistema nervoso central e de faringe/laringe/traqueia, são bem menos frequentes (MOORE, 2013), o que limita uma melhor elucidação em relação a sinais clínicos associados, provavelmente específicos de cada sistema, além da resposta ao tratamento, prognóstico e características genéticas de cada um quando comparados com linfomas mais frequentes.

4. CITOMETRIA DE FLUXO

4.1 Generalidades

A citometria de fluxo é uma técnica baseada no fluxo de partículas (células na maioria dos casos) num meio líquido, no qual incide um feixe de luz. A dispersão da luz e a fluorescência das partículas (se for o caso) são mensuradas, permitindo sua caracterização pelo tamanho, complexidade e a presença de moléculas fluorescentes, sendo estas, anticorpos ou corantes (MACEY, 2007). A leitura da dispersão da luz é realizada em duas direções, a frontal (*forward scatter*) que indica o tamanho da partícula e, em 90°, a dispersão lateral (*side scatter*) que identifica a granularidade ou complexidade estrutural interna (MCKINNON, 2018), como exemplificado na Figura 1. Além disso, podem ser utilizados corantes que se ligam aos ácidos nucleicos, fosfolípidos ou a proteínas, que permitem determinar a viabilidade das células analisadas; processo de vital importância já que células mortas ou em processo de degeneração devem ser excluídas para evitar dados pouco fidedignos ou irrelevantes (EVANS, 2023).

Figura 1 – Estrutura básica de um citômetro de fluxo



Fonte: Adaptado de www.cellsignal.com (2023)

Apesar de que na medicina humana os citômetros de fluxo começaram a ser usados nos anos 80, o seu uso na medicina veterinária começou mais de uma década depois. O uso desses equipamentos permaneceu restrito a laboratórios de referência, indústria farmacêutica e instituições acadêmicas por muitos anos devido ao seu elevado custo; além da exigência de técnicos capacitados para a execução da análise, bem como de um patologista veterinário para a interpretação dos resultados obtidos (WILKERSON, 2012). Atualmente, estima-se que nos Estados Unidos existam aproximadamente 12 laboratórios comerciais que oferecem esta análise para cães e gatos e 2 para equinos, incluindo dentre estes, instituições acadêmicas e laboratórios de referência (EVANS, 2023). Não há dados publicados sobre levantamentos deste tipo no Brasil. Apesar de que não haver consenso sobre os imunomarcadores que devem ser usados para cada espécie e condição específica, alguns deles são usados com mais frequência; tanto em pesquisa, quanto na rotina (Tabela 3).

É indicado realizar citometria de fluxo em pacientes com achados anormais no hemograma, como presença de blastos ou linfócitos pequenos em grande quantidade. Uma das vantagens da citometria de fluxo frente a outras técnicas de diagnóstico é a possibilidade de realizar imunofenotipagem das células envolvidas no processo neoplásico, o que auxilia no direcionamento do tratamento e estabelecimento do prognóstico do paciente. Também pode auxiliar na diferenciação entre timoma e linfoma nos casos de massas mediastinais. Embora a elevação persistente de neutrófilos, eosinófilos ou monócitos possa estar relacionada com leucemia crônica nestas linhagens, que já é um processo incomum, a citometria de fluxo não é indicada, pois não há diferença entre os imunofenótipos das células neoplásicas e não neoplásicas (TARIGO *et al.*, 2022).

Linfonodos de pacientes com suspeita ou diagnóstico de linfoma também podem ser coletados e analisados mediante citometria de fluxo. É importante ressaltar que a coleta do material/amostra pode influenciar no resultado. Aparentemente, o uso de agulhas de 21G permite a obtenção de uma amostra de aspirado de linfonodo com mais celularidade, como foi identificado num estudo retrospectivo avaliando aspirados de felinos com suspeita de linfoma (MARTINI *et al.*, 2017). O mesmo estudo demonstrou que amostras de melhor qualidade eram coletadas por veterinários com mais treinamento, pós-graduados.

4.2 Citometria de fluxo aplicada à leucemia

A classificação de leucemias agudas, em mielóides ou linfóides, é complexa, e necessita o uso de diversas técnicas de avaliação morfológica e molecular. No caso de leucemias agudas que expressam o marcador CD34+, demonstrou-se que a expressão de CD5+ estava mais relacionada com origem linfóide, enquanto a origem mielóide apresentava expressão do marcador monocítico CD14+ além de MHCII- ou CD18+ MHCII- CD4-. Estes resultados podem ser interpretados em conjunto com a expressão de determinados genes, como é realizado em medicina humana, para obter uma classificação mais precisa ainda (HARRIS *et al.*, 2022).

Tabela 3- Imunomarcadores mais usados em citometria de fluxo para diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas e linfomas em cães e gatos.

Marcador	Célula alvo para marcação
CD1c	Células dendríticas
CD3 e CD5	Todas as células T
CD4	Células T helper, neutrófilos ^a , alguns histiócitos
CD8	Células T citotóxicas
CD11b	Granulócitos, monócitos, alguns histiócitos
CD14	Monócitos/macrófagos
CD18	Leucócitos ^b
CD20, CD21 e CD22	Células B
CD34	Células tronco hematopoiéticas ^c
CD45	Leucócitos
CD61	Megacariócitos, plaquetas
CD79 e CD79a	Células B
CD-117	Células tronco hematopoiéticas, mastócitos, melanócitos, tímócitos
MHCII ^d	Células histiocíticas e células B
Ki67	Todas as células ^e
MPO ^f	Mieloblastos, granulócitos

Fonte: a própria autora (2023). ^a unicamente em cães; ^b predominantemente neutrófilos e monócitos, ^c importante em AML, ^d Complexo principal de histocompatibilidade classe II; ^e fases de interfase e mitose, ^f mieloperoxidase.

A leucemia mielóide é uma doença pouco frequente e, conseqüentemente, os estudos que descrevem os resultados na citometria de fluxo costumam ser retrospectivos, com um número relativamente baixo de pacientes (DAVIS *et al.*, 2017).

Além dos CD, mediante citometria de fluxo é possível avaliar outros marcadores, como é o caso do Ki67. Esta proteína nuclear é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0, o que possibilita seu uso como marcador associado à proliferação celular em mamíferos (BRUEY *et al.*, 2010). A avaliação da expressão de Ki67 por citometria de fluxo demonstrou que, pacientes com leucemia linfocítica crônica e uma expressão de mais de 40% neste parâmetro, apresentavam significativamente uma menor sobrevida do que pacientes com uma expressão menor; associando de maneira diretamente proporcional a presença de Ki67 à agressividade da leucemia (ROUT *et al.*, 2021).

Os marcadores disponíveis para citometria de sangue ou medula de gatos com leucemias são escassos, sendo necessárias mais pesquisas para validar marcadores nesta espécie. Dentre os disponíveis se encontram MPO (mieloperoxidase) e CD11b para células de linhagem mielóide, CD3, CD4, CD5 e CD8 para células T, CD21 e CD79a para células B, CD14, CD1c e MHCII para células histiocíticas, como alguns exemplos, embora alguns destes marcadores (MHCII e MPO) não correspondam a uma linhagem específica (DA SILVA SERPA; MESSICK, 2020).

4.3 Citometria de fluxo aplicada a linfoma

No caso dos cães, a citometria tem auxiliado na identificação e estudo de diversos tipos de linfoma, especialmente o linfoma de células B que é o mais frequente na espécie. Para este tipo de processo, os marcadores mais comumente usados são IgM, CD21, CD22 e CD79 (RIONDATO; COMAZZI, 2021). Com o passar do tempo, o melhor entendimento da técnica tem permitido aproveitar outras informações fornecidas, e que podem auxiliar na classificação da população de linfócitos e o tipo de linfoma. Foi demonstrado que o *forward scatter* era notoriamente diferente entre pacientes com linfoma de grandes células B e pacientes com linfoma folicular ou com linfoma difuso de pequenas células B (WOLF-RINGWALL *et al.*, 2020). O tamanho proporcional dos linfócitos mensurado mediante o *forward scatter* auxilia também na diferenciação entre linfoma de células T e um linfonodo hiperplásico/reactivo, sendo que uma proporção de linfócitos médios e grandes de 1,3-1,5 mais

do que linfócitos pequenos é fortemente sugestivo de linfoma (COMAZZI; RIONDATO, 2021).

Além de avaliação de parâmetros como o *forward scatter*, a citometria de fluxo permite a avaliação de parâmetros que indicam o comportamento imunogênico do tumor, como é o caso da expressão de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. Semelhante ao descrito em pacientes humanos com linfoma, a expressão reduzida de MCH classe II, somada a células de grande tamanho, estava correlacionada com pior prognóstico e menor sobrevida. Os caninos cujo linfoma apresentava baixa expressão de MHC classe II, tiveram 2,9 vezes mais chances de falecimento quando comparados com os que tinham alta expressão do mesmo marcador; enquanto pacientes com tumores de linfócitos de grande tamanho apresentavam 2,8 vezes mais possibilidades de falecimento em relação aos que tinham linfoma com pequenas células (RAO *et al.*, 2011).

Outro parâmetro interessante a ser avaliado, e que favorece o diagnóstico de linfoma mediante citometria de fluxo é a detecção da expressão de padrões de imunofenótipo aberrantes. Alguns exemplos em caninos incluem a expressão diminuída de CD45 em linfoma de células B, ausência de marcadores esperados como CD45 e CD18, coexpressão de antígenos de células B e T e, no caso dos linfomas de células T, células expressando simultaneamente CD4 e CD8 (COMAZZI; GELAIN, 2021).

Estudos têm comparado a citometria de fluxo com outras técnicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para rearranjo de receptores de antígenos, PARR (*PCR for antigen receptor rearrangements*) para identificação do imunofenótipo dos linfócitos em caninos com linfoma, demonstrando que a citometria de fluxo é superior nesse quesito, com sensibilidade de 91 e 100% para identificação de linfócitos B e T respectivamente, além de apresentar uma correlação de 94% com os resultados da imunohistoquímica das amostras avaliadas (THALHEIM *et al.*, 2013). Apesar de que em humanos, de modo geral, a classificação e subtipo preciso do linfoma possa ser determinado apenas pelas características imunofenóticas dadas pela citometria de fluxo, os anticorpos que reconhecem os imunomarcadores validados para cães são mais limitados. Esta situação se agrava ainda mais no caso dos gatos, pois esta espécie tem menos anticorpos e painéis diagnósticos disponíveis. Isto faz com que a determinação do subtipo possa ser feita, na maioria dos casos, unicamente

mediante histologia. Apesar disso, a citometria de fluxo continua sendo uma ferramenta menos invasiva e que proporciona informação relevante (ROUT; AVERY, 2017).

Finalmente, além do diagnóstico, a citometria de fluxo auxilia no monitoramento, contribuindo na avaliação do efeito de um determinado tratamento, tanto em linfomas de células B quanto linfomas de células T e leucemias (ROSEMBAUM *et al.*, 2021).

5. MICRO RNAs

5.1 Generalidades

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs de ao redor de 22 nucleotídeos, não codificantes, que exercem funções reguladoras em processos como proliferação celular, hematopoiese, apoptose, entre outras, sendo em muitos casos filogeneticamente conservados (AMBROS, 2004). Os miRNAs cumprem um papel fundamental no desenvolvimento de neoplasias. Demonstrou-se que miRNAs específicos, vinculados a sequências frequentemente deletadas em pacientes com câncer, tinham sua expressão diminuída; enquanto outros, de sequências amplificadas em neoplasias, apresentavam expressão aumentada. Isto tem sido observado em doenças mieloproliferativas, inicialmente estudadas em camundongos, onde a expressão aumentada, ou ectópica, de determinados miRNAs estava associada com a proliferação anormal de diferentes linhagens celulares (KLUIVER *et al.*, 2006). Apesar dos microRNAs serem aparentemente conservados, podem ser divergentes entre uma espécie e outra, derivando em pouca concordância entre modelos animais e humanos. Esta situação se torna mais complexa no estudo de neoplasias hematopoiéticas que, mesmo com os grandes avanços tecnológicos em sequenciamento e bioinformática, deve considerar a grande variabilidade das células envolvidas e as diferentes cascatas e vias reguladas por diferentes miRNAs (BISSELS *et al.*, 2012).

5.2 Micro RNAs no diagnóstico de leucemia

Os estudos de miRNA em leucemias na medicina veterinária são escassos e têm sido realizados apenas em cães. No estudo realizado por Gioia e colaboradores (2011) foram avaliados 12 miRNA em cães com leucemia linfocítica crônica e saudáveis. Observou-se que o miRNA miR-125b apresenta expressão aumentada em pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B. De igual maneira, a interpretação da relação da proporção entre os miRNA miR-150, miR-125b e miR155 pode auxiliar para a diferenciação entre leucemia linfocítica crônica de células B, de células T e células de sangue normal.

5.3 Micro RNAs no diagnóstico de linfoma

Devido ao potencial do cão como modelo para linfoma em humanos, estudos têm sido realizados, para caracterização de linfomas. A superexpressão do miRNA miR17-5p foi descrita em amostras de linfoma de células B, enquanto a do miR-181a foi identificada em linfoma de células T (MORTARINO *et al.*, 2010) em cães, sendo que miR-181a é considerado biomarcador na mesma doença em humanos (YAN *et al.*, 2015). Recentemente, foi determinado um perfil de miRNAs para caninos com linfoma multicêntrico, a partir de amostras de linfonodo e de plasma, identificando diferentes miRNAs superexpressos e suprimidos, de acordo com o tipo de linfoma (de células B ou T), além de correlacioná-los à sobrevivência sem remissão e sobrevivência geral após tratamento (CRAIG *et al.*, 2019). No caso pontual de DLBCL, o *miR-34a* encontrou-se superexpresso e outros miRNA como o *let-7a*, *let-7b*, *let-7f*, *miR-155* encontravam-se suprimidos. A mensuração em conjunto de *miR-34a* e *let-7f* foi a combinação que melhor diferenciou as amostras de pacientes com DLBCL de pacientes controle (ELSHAFIE *et al.*, 2020).

As pesquisas envolvendo miRNAs em neoplasias de felinos são ainda incipientes. Um estudo avaliou a expressão de miR20-b e miR-192, possíveis pró-oncogênico e supressor de tumor, respectivamente, em pacientes com linfoma de células T, células B, outros tipos de câncer e saudáveis. Pacientes com linfoma de células B e outros carcinomas apresentavam valores de expressão de miR-192 superiores ao grupo controle e ao grupo de linfoma de células T (KEHL *et al.*, 2022).

6. TÉCNICAS PROSPECTIVAS PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS E LINFOMAS

6.1 DNA circulante

O DNA circulante (cirDNA) é definido como DNA extracelular, tem origem nuclear ou mitocondrial, é liberado pelas células e se encontra presente nos fluídos que circulam nos organismos como, por exemplo, no sangue. Mesmo estando presente em animais saudáveis, a concentração do cirDNA pode ser maior em pacientes oncológicos devido à maior atividade apoptótica por parte das células neoplásicas, o que serviu de precedente para desenvolver o que hoje se conhece como “biopsia líquida” (THIERRY *et al.*, 2016). Além de ser excretado de maneira ativa pelas células, o cirDNA também é liberado na apoptose, em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases. Fragmentos de mais de 10.000 pares de bases foram descritos em processos necróticos que não contam com os mesmos mecanismos de morte celular por apoptose, porém também foram identificados em pacientes saudáveis. Ainda considerando que, paradoxalmente, pacientes submetidos a radioterapia apresentem redução nos níveis de cirDNA (apesar de induzir necrose e apoptose das células tumorais), gerando interpretações contraditórias sobre a relação entre câncer e o cirDNA (TUTANOV; TAMKOVICH, 2022).

Estudos têm sido desenvolvidos explorando o cirDNA em cães com diferentes condições patológicas, além das oncológicas, como sepse, tromboembolismo ou trauma, (LETENDRE; GOGGS, 2017; JEFFERY *et al.*, 2017). Porém, os valores obtidos em estudos avaliando caninos saudáveis abrangem um intervalo muito amplo quando comparado com o de humanos, 1-500 versus 0-20 ng/mL, respectivamente. Isto sugere que ainda devem ser realizados mais estudos com o fim de padronizar as diferentes fases da análise, tornar os procedimentos reprodutíveis e envolver populações maiores com o fim de garantir que o uso de biopsia líquida na veterinária seja realizado com o mesmo nível de rigor e confiabilidade quando comparado à medicina humana, onde os laboratórios são acreditados e estritamente regulados para a prestação do serviço diagnóstico (CHIBUK *et al.*, 2021).

As pesquisas sobre a utilidade do cirDNA em gatos são muito mais escassos e não tem demonstrado uma utilidade diagnóstica ou prognóstica em neoplasias e lesões oculares (RUSHTON *et al.*, 2018).

6.2 Análises de célula única (*single-cell analysis*)

As análises de célula única compreendem um grupo de técnicas moleculares, altamente sofisticadas, que permitem analisar o genoma, o transcriptoma e o proteoma de células individualizadas. Até este momento não há estudos descritos na medicina veterinária fazendo uso destas técnicas; portanto, serão descritos apenas os aspectos gerais desenvolvidos com enfoque na medicina humana.

Partindo das técnicas genômicas, as técnicas de amplificação de genoma completo de célula única (WGA, pelas siglas de *single-cell whole genome amplification*.) tem utilidade nos estudos oncológicos pela sua capacidade de sequenciar exons, detectar variações no número de cópias de determinados genes ou, até mesmo, polimorfismos de nucleotídeos em células neoplásicas comparadas com não neoplásicas (YE *et al.*, 2017).

A análise do padrão do transcriptoma pode ser realizada mediante sequenciamento do transcriptoma completo (*whole transcriptome sequencing*) ou sequenciamento do RNA, e tem auxiliado significativamente na identificação de genes expressados em leucemias agudas, permitindo a classificação mais precisa destas, além da correlação com alterações gênicas que potencialmente irão servir para conduzir o tratamento e prognóstico dos pacientes (LILLJEBJÖRN *et al.*, 2022).

O estudo do proteoma é mais complexo porque, diferente do DNA e do RNA, as sequências proteicas não podem ser amplificadas (SAADATPOUR *et al.*, 2015). O estudo das proteínas em células individuais é mais antigo do que a genômica e a transcriptômica, tendo os seus inícios no uso de anticorpos, em técnicas como Western blot, citometria de fluxo e citometria de massas. Com o advento de novas tecnologias tem sido possível identificar, caracterizar e quantificar as diferentes isoformas de proteínas nas células neoplásicas, permitindo identificar possíveis modificações pós-translacionais e correlacionar estes achados com fenótipos celulares e diferentes doenças (ARIAS-HIDALGO *et al.*, 2022). Embora a abordagem de células individualizadas forneça valiosa informação, técnicas como a citometria de massas tem sido associada a técnicas de imagem para tentar entender melhor o microambiente tumoral. A citometria de massas apresenta vantagens quando comparada com

a citometria de fluxo, considerando que avalia um número maior de parâmetros simultaneamente, permitindo a identificação de populações de células imunes específicas e a diversidade destas, com a finalidade de explorar alvos terapêuticos (GONDER *et al.*, 2020).

6.3 Transcriptômica espacial

Como o nome indica, a transcriptômica espacial permite a avaliação do transcriptoma de um tecido preservando a informação da arquitetura do mesmo, possibilitando identificar as diferentes interações entre as células e o seu entorno. Diferente das análises com células únicas, nas quais essa informação era omitida por essas células serem removidas do seu microambiente (LIU *et al.*, 2022). Pelo fato de que as interações parácrinas e justácrinas acontecem numa distância entre 0 e 200 micrômetros, a transcriptômica espacial permite avaliar a expressão de genes com a sua respectiva localização numa lesão específica, identificar a posição de diferentes subpopulações celulares e suas interações (LONGO *et al.*, 2021).

De maneira geral há duas maneiras de obter esta informação. Uma delas consiste na visualização microscópica *in situ* dos mRNA, podendo ser feita mediante a hibridização do mRNA com sondas marcadas, técnica chamada hibridização *in situ* (*in situ hybridization*, ISH), ou mediante o sequenciamento por ligação de transcritos amplificados no fragmento de tecido, denominado sequenciamento *in situ* (*in situ sequencing*, ISS). A outra maneira é extraíndo o mRNA do tecido, mantendo a informação sobre a localização espacial e, posteriormente, analisar o mRNA usando técnicas de sequenciamento de nova geração. Dentre as técnicas que usam esse princípio, as mais usadas são as baseadas em microdissecção, em que as células são microdissecadas e sua localização capturada em imagem, prévio ao sequenciamento, ou os métodos baseados em arranjo (*array-based*) nos quais sondas com códigos de barras são acopladas aos mRNAs do tecido para registrar sua localização antes do sequenciamento (WILLIAMS *et al.*, 2022).

A aplicação desta tecnologia permitiu identificar o perfil transcricional dos nichos e populações celulares mais relevantes na medula óssea, bem como as fontes e localização de origem de fatores pró-hematopoiéticos (BACCIN, 2020). Também foi aplicada para elucidar a distribuição e grande heterogeneidade transcricional e espacial das células B neoplásicas em biopsias de linfoma primário do sistema nervoso central (HEMING *et al.*, 2022). Estas abordagens demonstram o grande potencial que a técnica tem para futuras pesquisas

relacionadas com leucemia e linfoma. Por ser uma técnica tão recente, ainda não foram publicados estudos de transcriptômica espacial na medicina veterinária, embora muitos estudos sejam realizados em roedores.

7. CONCLUSÃO

As leucemias e linfomas são doenças com alta prevalência e relevância na clínica médica de pequenos animais e de seres humanos. Considerando o potencial dos cães e gatos como modelos de estudo *in vivo*, técnicas diagnósticas moleculares, mais precisas e menos invasivas, se tornam cada vez mais necessárias na pesquisa oncológica e na rotina clínica. De maneira prospectiva, é essencial a realização de mais pesquisas explorando a utilidade das técnicas de diagnóstico molecular e sua aplicabilidade na medicina veterinária. Somado a isso, cada uma das doenças citadas no trabalho apresenta prevalências, comportamentos e características que podem variar entre uma região geográfica e outra. Por isso o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a este tema no Brasil é fundamental, porém, fatores limitantes como recursos tecnológicos, técnicos e financeiros devem ser levados em consideração. Finalmente, este tipo de avanço contribui, além da saúde animal, à saúde humana, fortalecendo o conceito de saúde única.

REFERÊNCIAS

- ACTOR, J. K. A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. *In*: ACTOR, J.K. **Introductory Immunology**. 2. ed. London: Academic Press, 2019. v. 1, cap. 1, p. 1–16.
- ADAM, F., et al. Clinical pathological and epidemiological assessment of morphologically and immunologically confirmed canine leukaemia. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 181-195, Set. 2009.
- ALAGIO, R., et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. **Leukemia**. London, v.36, n.7, p. 1720-1748, 2022.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 350-355, Sep. 2004.
- ARIAS-HIDALGO, C., et al. Single-Cell Proteomics: The Critical Role of Nanotechnology. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, n. 12, p. 6707, Jun. 2022.
- AVERY, A. C. The genetic and molecular basis for canine models of human leukemia and lymphoma. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 10, n. 23, p. 19, January 2020.
- BACCIN, C., et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. **Nature Cell Biology**, v. 22, n. 1, p. 38-48, Jan. 2020.
- BALATTI, V. et al. Novel mechanisms of regulation of miRNAs in CLL. **Trends in cancer**, v. 2, n. 3, p. 134-143, May 2016.
- BEATTY, J. Viral causes of feline lymphoma: Retroviruses and beyond. **The Veterinary Journal**, v. 201, n.2, p. 174-180, Aug. 2014.
- BENNETT, P. F.; TAYLOR, R.; WILLIAMSON, P. Demographic risk factors for lymphoma in Australian dogs: 6201 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 32, n. 6, p. 2054-2060, Oct. 2018.
- BEURLET, S., et al. Identification of JAK2 mutations in canine primary polycythemia. **Experimental hematology**, v. 39, n. 5, p. 542-545, May 2011.
- BISELIS, U., BOSIO, A., WAGNER, W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. **Haematologica**, Rome, v. 97, n. 2, p. 160, Feb. 2012.
- BREEN, M.; MODIANO, J. F. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans—man and his best friend share more than companionship. **Chromosome Research**, Amsterdam, v. 16, n.1, p. 145-154, 2008.
- BRUEY, JM., et al. Circulating Ki-67 Index in Plasma as a Biomarker and Prognostic Indicator in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Leukemia Research**, London, v. 34, n. 10, p.1320-1324, 2010.
- BROMBEREK, J. L., et al. Breed Distribution and Clinical Characteristics of B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 30, n. 1, p. 215-222, Jan. 2016. DOI: 10.1111/jvim.13814.

CHENNAMADHAVUNI, A.; LYENGAR, V.; SHIMANOVSKY, A. Leukemia. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/>

CHIBUK, J., et al. Horizons in veterinary precision oncology: fundamentals of cancer genomics and applications of liquid biopsy for the detection, characterization, and management of cancer in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 8, n. 664718, Mar. 2021.

COMAZZI, S., GELAIN, M. E. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. **The Veterinary Journal**, v. 188, n.2, p. 149-155, May 2011.

COMAZZI, S., et al. Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study. **BMC Veterinary Research**, v.14, n.232. Aug. 2018.

COMAZZI, S., RIONDATO, F. Flow Cytometry in the diagnosis of canine T-cell lymphoma. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 8, n. 600963, Apr. 2021.

COUTO, C. G. What is new on feline lymphoma?. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 3, n.4, p. 171-176, Dec. 2001.

CRAIG, K. K., et al. MicroRNA profiling in canine multicentric lymphoma. **PloS One**, v. 14, n. 12, e0226357, Dec. 2019.

CRISTO, T. G., et al. Feline lymphoma and a high correlation with feline leukaemia virus infection in Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 166, p. 20-28, Jan. 2019.

DA SILVA SERPA, P. B., MESSICK, J. B. A case of acute monocytic leukemia (AMoL or AML-M5) in an adult FeLV/FIV-positive cat. **Veterinary Clinical Pathology**, Colorado, v. 50, n. 1, p. 158-163, Mar. 2021.

DAVIS, A.; VIERA, A. J.; MEAD, M. D. Leukemia: an overview for primary care. **American family physician**, Kansas City, v. 89, n. 9, p. 731-738, May 2014.

DAVIS, L. L.; HUME, K. R.; STOKOL, T. A retrospective review of acute myeloid leukaemia in 35 dogs diagnosed by a combination of morphologic findings, flow cytometric immunophenotyping and cytochemical staining results (2007-2015). **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v.16, n. 2, p.268-275, Jun. 2018. doi:10.1111/vco.12377.

ELSHAFIE, N. O., et al. MicroRNA Biomarkers in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 1, p.34-41, Dec. 2021.

EVANS, S. J. Flow Cytometry in Veterinary Practice. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 53, n. 1, p. 89-100, Jan. 2023.

FREICHE, V., et al. Clinical, laboratory and ultrasonographic findings differentiating low-grade intestinal T-cell lymphoma from lymphoplasmacytic enteritis in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 35, n. 6, p. 2685-2696, Nov. 2021.

- GIOIA et al. Immunophenotype-related microRNA expression in canine chronic lymphocytic leukemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Amsterdam, v. 142, n.3-4, p. 228-235, Aug. 2011.
- GONDER, S., et al. Method for the analysis of the tumor microenvironment by mass cytometry: application to chronic lymphocytic leukemia. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, n. 578176, Oct. 2020.
- HARRIS, R. A., et al. Using digital RNA counting to establish flow cytometry diagnostic criteria for subtypes of CD34+ canine acute leukemia. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 710-719, Sept. 2022.
- HEMING, M., et al. Intratumor heterogeneity and T cell exhaustion in primary CNS lymphoma. **Genome Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-19, Sep. 2022.
- HENRIQUES, J. et al. Peripheral blood cell ratios as prognostic factors in canine diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP protocol. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 242-252, Jun. 2021.
- JEFFERY, U., et al. (2017). Cell-Free DNA and DNase Activity in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 31, n. 5, p. 1441-1450, Sep. 2017.
- KEHL, A., et al. Pathological Findings in Gastrointestinal Neoplasms and Polyps in 860 Cats and a Pilot Study on miRNA Analyses. **Veterinary Sciences**, Manhattan, v. 9, n. 9, p. 477, Sep. 2022.
- KHOURY, J. D. et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. **Leukemia**. London, v.36, n.7, p. 1703-1719, 2022.
- KLUIVER, J., et al. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. **Leukemia**, London, v. 20, n.11, p. 1931-1936, Sep. 2006.
- LETENDRE, J. A., GOGGS, R. Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 27, n. 3, p. 307-314, Mar. 2017.
- LILLJEBJÖRN, H., et al. Transcriptomics paving the way for improved diagnostics and precision medicine of acute leukemia. **Seminars in Cancer Biology**, v. 84, p. 40-49, Sep. 2022.
- LIU, B., LI, Y., ZHANG, L. Analysis and visualization of spatial transcriptomic data. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 12, n. 2852, Jan. 2022.
- MACEY, M. G. Principles of flow cytometry. In: MACEY, M. G. **Flow cytometry: principles and applications**. Totowa, 2007. v. 1, cap. 1, p. 1-15.
- MARTINI, V., et al. Flow cytometry for feline lymphoma: a retrospective study regarding pre-analytical factors possibly affecting the quality of samples. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 6, p. 494-501, Jun. 2018.
- MCKINNON KM. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols in Immunology**. New York, v. 21, n.120, p. 5.1.1-5.1.11, Feb. 2018. DOI: 10.1002/cpim.40.

- MODIANO, J. F. et al. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. **Cancer research**, v. 65, n. 13, 5654-5661, 2025.
- MORTARINO, M., et al. Identification of suitable endogenous controls and differentially expressed microRNAs in canine fresh-frozen and FFPE lymphoma samples. **Leukemia research**, v. 34, n. 8, p. 1070-1077, Aug. 2010.
- MOORE, A. Extranodal lymphoma in the cat: prognostic factors and treatment options. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 5, p. 379-390.6, 2013.
- ONACIU A, et al. Spontaneous and Induced Animal Models for Cancer Research. **Diagnostics**, Basel, v. 10, n. 9-660, p. 1-36, Aug. 2020. DOI: 10.3390/diagnostics10090660.
- OVERVIEW of Flow Cytometry. **Cell Signaling Technology**. Disponível em: <<https://www.cellsignal.com/applications/flow-cytometry/flow-cytometry-overview/>>. Acesso em 07 de fev. de 2023.
- PAULIN, M. V., et al. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. **BMC Veterinary Research, London**, v. 14, n. 1, p. 1-19, Oct. 2018.
- RAO, S., ET AL. Class II major histocompatibility complex expression and cell size independently predict survival in canine B-cell lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 25, n. 5, p. 1097-1105, Sep. 2011.
- RIONDATO, F., COMAZZI, S. Flow Cytometry in the diagnosis of canine B-cell lymphoma. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 8, n. 600986, Mar. 2021.
- ROLPH, K. E.; CAVANAUGH, R. P. Infectious Causes of Neoplasia in the Domestic Cat. **Veterinary Sciences**, Manhattan, v. 9, n. 9, p. 467, Aug. 2022.
- ROUT, E. D., AVERY, P. R. Lymphoid neoplasia: correlations between morphology and flow cytometry. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 47, n. 1, p. 53-70, Jan. 2017.
- ROUT, E. D., et al. Clinical outcome and prognostic factors in dogs with B-cell chronic lymphocytic leukemia: A retrospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 35, n. 4, p. 1918-1928, Jul. 2021.
- ROSENBAUM, C. S., et al. Monitoring of large B-cell lymphoma and T-zone lymphoma in a dog via flow cytometry. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 33, n. 5, p. 1008-1012, Sep. 2021.
- SAADATPOUR, A., et al. Single-cell analysis in cancer genomics. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 10, p. 576-586, Oct. 2015.
- SAHABI, K. et al. Comparative aspects of microRNA expression in canine and human cancers. **Journal of Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 162-171, Mar, 2018. DOI: 10.4142/jvs.2018.19.2.162.
- SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Washington, v. 127, n. 20, p. 2375-2390, 2016.
- SYKES, J. E., HARTMANN, K. (2014). Feline leukemia virus infection. In: SYKES, J. E. **Canine and feline infectious diseases**. St Louis, 2014. v.1, cap. 22, p. 224-238.

TARIGO, J. L., SEELIG, D. M., & AVERY, A. C. Flow Cytometry in Hematologic Neoplasia. *In*: BROOKS, M. B., et al. **Schalm's Veterinary Hematology**. 7th ed. River Street, 2022. v. 1, cap. 64, p. 515-527.

TASCA, S., et al. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002–2006). **Veterinary Clinical Pathology**, Colorado, v. 38, n. 1, p. 2-12, Mar. 2009.

THALHEIM, L., et al. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 27, n. 6, p. 1509-1516, Nov. 2013.

THIERRY, A. R., et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. **Cancer and metastasis reviews**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 347-376, Sep. 2016.

TUTANOV, O., TAMKOVICH, S. The Influence of Proteins on Fate and Biological Role of Circulating DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, n. 13, p. 7224, Jun. 2022.

VAIL, D. M.; PINKERTON, M.; YOUNG, K. Hematopoietic tumors. *In*: VAIL, D. M.; THAMM, D.H.; LIPTAK, J. M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 6. ed. St. Louis, 2020. v. 1, cap. 33, p. 688-772.

VAN ROYEN., et al. Breed prevalence of canine lymphoma in South Africa. **Journal of South African Veterinary Association**. v. 8, n. 89, e1-e11. Mar. 2018.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Washington, v. 100, n. 7, p. 2292-2302, 2002.

WILKERSON, M. J. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 53-71, Jan. 2012.

WILLIAMS, C. G., et al. An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research. **Genome Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-18, Jun. 2022.

WOLF-RINGWALL, A., et al. Prospective evaluation of flow cytometric characteristics, histopathologic diagnosis and clinical outcome in dogs with naïve B-cell lymphoma treated with a 19-week CHOP protocol. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 3, p. 342-352, Sep. 2020.

YAN, Z. X., et al. MicroRNA181a is overexpressed in T-cell leukemia/lymphoma and related to chemoresistance. **BioMed Research International**, n. 197241, Sep. 2015. DOI: 10.1155/2015/197241.

YE, F., HUANG, W., GUO, G. Studying hematopoiesis using single-cell technologies. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1-12, Jan. 2017.