

# • Classificação citohistológica dos linfomas caninos

## • *Cytobistological classification of canine lymphomas*

Veridiana Maria Brianezi Dignani De Moura<sup>1</sup> - CRMV-SP - n° 10085

Julio Lopes Sequeira<sup>2</sup> - CRMV-SP - n° 3572

Renée Laufer Amorim<sup>1</sup> - CRMV-SP - n° 8303

\* Enio Pedone Bandarra<sup>3</sup> - CRMV-SP - n° 0786

\* Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP  
Departamento de Clínica Veterinária  
Serviço de Patologia Veterinária  
Caixa Postal 560  
Distrito de Rubião Júnior s/nº  
CEP: 18618-000 - Botucatu - SP  
Fone: (0\*\*14) 6802-6293  
End. Eletrôn.:  
bandarraep@fmvz.unesp.br

<sup>1</sup> Doutoranda em Medicina Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ - UNESP/Botucatu/SP.

<sup>2</sup> Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ - UNESP/Botucatu/SP.

<sup>3</sup> Professor Adjunto do Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ - UNESP/Botucatu/SP.

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a utilização e correlação das classificações citohistológicas de Rappaport, Kiel, Lukes-Collins e Working Formulation, para a classificação dos linfomas não-Hodgkin caninos. Os resultados demonstraram que as classificações citohistológicas utilizadas em seres humanos podem ser aplicadas aos cães, em virtude das semelhanças da neoplasia em ambas as espécies. A maior frequência foi a de linfomas de grau intermediário (52%), seguindo-se a dos de baixo grau (28,6%) e a dos de alto grau (19,4%). Quanto ao grau de malignidade, os linfomas demonstraram prevalência para um tipo celular em cada categoria, sendo a maior ocorrência do tipo linfocítico células pequenas (17,4%) nos linfomas de baixo grau. Os resultados, referentes ao tipo celular mais frequente para linfomas de grau intermediário e de alto grau, demonstraram um percentual de 22,5% de linfomas do tipo difuso células pequenas clivadas e 11,2% do tipo imunoblástico, respectivamente. Diante dos resultados obtidos concluiu-se que os linfomas de grau intermediário são os de maior ocorrência, havendo um tipo celular de maior prevalência dentro de cada grau de malignidade.

**Palavras-chave:** cão, linfoma, classificação citohistológica.

### Introdução e Revisão de Literatura

**L**infomas são neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação de células nativas do tecido linfóide, que são linfócitos, histiócitos e seus precursores e derivados (COTRAN *et al.*, 1994; VONDERHAAR e MORRISON, 1998). Também chamado de linfossarcoma e linfoma maligno, é um dos tumores de maior ocorrência nos cães (CAPURRO *et al.*, 1992; VALLI, 1993; TESKE, 1994; MILNER *et al.*, 1996; VONDERHAAR e MORRISON, 1998).

Os linfomas caninos podem ser classificados anatomicamente em: multicêntricos, tímicos, digestivos, cutâneos e solitários; quanto à citomorfologia em: alto, médio e baixo grau; e quanto à imunomorfologia em: linfomas T, linfomas B e linfomas não B/não T, bem como de celularidade mista (B/T) (MOULTON e HARVEY, 1990; TESKE *et al.*, 1994a; JONES *et al.*, 1997; De MOURA *et al.*, 1999; SEQUEIRA *et al.*, 1999).

As classificações citohistológicas mais frequentemente utilizadas são as de Rappaport, Lukes Collins, Kiel e "Working Formulation", nas quais são considerados o

**Tabela 1.** Classificação citohistológica dos Linfomas não-Hodgkin.

<b>"WORKING FORMULATION"</b>	<b>RAPPAPORT</b>	<b>LUKES - COLLINS</b>	<b>KIEL</b>
<b>BAIXO GRAU</b>			
Linfocítico, células pequenas	Linfocítico, bem diferenciado	Linfocítico, células pequenas Linfocítico Plasmocitóide	Linfocítico Linfoplasmocitóide
Folicular, predomínio de células clivadas pequenas	Nodular, linfocítico pouco diferenciado	FCC, células clivadas pequenas	Centrocítico
Folicular, misto-células clivadas pequenas e grandes	Nodular, misto Linfocítico-Histiocítico	FCC, células clivadas grandes e pequenas	Centrocítico-Centroblástico
<b>GRAU INTERMEDIÁRIO</b>			
Folicular, predomínio de grandes células	Nodular histiocítico	FCC, células grandes clivadas e/ou não clivadas	Centrocítico-Centroblástico
Difuso, células pequenas clivadas	Difuso, linfocítico, pouco diferenciado	FCC, difuso-células pequenas clivadas	Centrocítico
Difuso misto, pequenas e grandes células	Difuso, misto linfocítico-histiocítico	FCC, células clivadas pequenas células grandes clivadas ou não clivadas	Centrocítico Centroblástico
Difuso, grandes células	Difuso histiocítico	FCC-grandes células clivadas ou não clivadas	Centroblástico
<b>ALTO GRAU</b>			
Imunoblástico	Difuso histiocítico	Imunoblástico tipo células B ou T	Imunoblástico
Linfoblástico	Linfoma linfoblástico	Linfoma de células T convolutas	Linfoblástico T
Células não clivadas pequenas	Indiferenciado, Burkitt	FCC, células pequenas não clivadas	Linfoblástico B

padrão de crescimento (nodular ou difuso), a constituição celular (células pequenas ou grandes, clivadas ou não clivadas e diferenciação plasmocitária) e o grau de malignidade (baixo, médio e alto) (GREENLEE *et al.*, 1990; RALLIS *et al.*, 1992; SEQUEIRA e FRANCO, 1992; DEHNER, 1995).

A classificação proposta por RAPPAPORT (1966) destaca a citomorfologia das células neoplásicas e o padrão arquitetural, considerando a diferença entre as pe-

quenas células (linfócitos) e as grandes células (histiócitos), além do padrão folicular ou difuso. LUKES e COLLINS (1974) foram os primeiros a propor uma classificação, baseada, em parte, no fato de as células linfóides pertencerem à linhagem B ou T.

Lennert *et al.* (1975) desenvolveram uma classificação para os linfomas não-Hodgkin humanos de acordo com a linhagem funcional das células tumorais, que enfatiza aspectos de comportamento das neoplasias, classifi-

cando-as em categorias de baixo e alto grau, de acordo com a citomorfologia.

Em 1982, o "National Cancer Institute" divulgou os resultados de um estudo que deu origem à proposta da "Working Formulation for international use". Seu objetivo principal foi auxiliar na resolução de controvérsias, servindo como ponte para a integração entre as diversas classificações existentes (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1982).

Os linfomas caninos apresentam características semelhantes à dos linfomas não-Hodgkin em humanos do ponto de vista epidemiológico, morfológico e imunofenotípico (TESKE, 1994; FURNEL-FLEURY *et al.*, 1997). Portanto, a aplicação das classificações citohistológicas nos linfomas caninos, além de adicionar dados ao estudo do comportamento desse tipo de neoplasia na espécie em questão, permite avaliar a possibilidade de utilização de cães com linfoma como modelo experimental para a doença humana (GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE, 1994; FURNEL-FLEURY *et al.*, 1997).

## Material e Métodos

Classificaram-se citohistologicamente 98 casos de linfoma canino existentes no arquivo do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ-UNESP-Botucatu-SP, no período de julho de 1969 a julho de 2000. Os dados obtidos foram provenientes de necrópsias, peças cirúrgicas e biopsias realizadas pelos Departamentos de Cirurgia e Clínica Veterinária da Unidade, bem como material enviado ao Serviço por clínicas e instituições particulares.

Cortes histológicos de quatro micrômetros, obtidos em micrótomo rotativo, foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) (LUNA, 1968), para a posterior realização da classificação citohistológica em microscopia óptica.

Para cada caso, o tipo citohistológico foi caracterizado segundo as classificações de Rappaport (RAPPA-PORT, 1966); Lukes Collins (LUKES e COLLINS, 1974); Kiel (GERARD-MARCHANT *et al.*, 1974; LENNERT *et al.*, 1975) e "Working Formulation" (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1982), propostas para os linfomas não-Hodgkin humanos. A Tabela 1 apresenta os tipos de linfoma que constam das diferentes classificações e a correlação entre elas. As características morfológicas celulares e o padrão arquitetural das neoplasias foram utilizados para classificá-las segundo os parâmetros de cada método.

Tabela 2. Classificação citohistológica quanto ao grau de malignidade dos linfomas caninos.

Classificação	Número de casos	Frequência
Baixo Grau	28	28,6%
Grau intermediário	51	52,0%
Alto Grau	19	19,4%
Total	98	100%

Tabela 3. Classificação citohistológica dos linfomas caninos quanto ao tipo celular.

Classificação de WF	Número de casos	Frequência
Baixo Grau		
Linfocítico	17	17,4%
Linfoplasmocitóide	11	11,2%
Grau intermediário		
Difuso células pequenas clivadas	22	22,5%
Difuso misto pequenas e grandes células	10	10,2%
Difuso grandes células	19	19,4%
Alto Grau		
Imunoblástico	11	11,2%
Linfoblástico	7	7,1%
Células não clivadas pequenas	1	1%
Total	98	100%

Os linfomas foram classificados baseados na classificação da "Working Formulation" e, em seguida, caracterizados os seus tipos celulares equivalentes, segundo os demais sistemas de classificação.

## Resultados

Os resultados obtidos, comparando-se as classificações citohistológicas propostas por RAPPA-PORT (1966); LUKES e COLLINS (1974); KIEL (1975); NATIONAL CANCER INSTITUTE (1982), e utilizando-se da coloração de rotina Hematoxilina e Eosina (HE), estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3, nos Gráficos 1 e 2, e nas Figuras 1 a 3.

Quanto ao padrão de crescimento da neoplasia, todos os linfomas apresentaram-se na forma difusa.

Quando se utilizou das classificações citohistológicas, os resultados demonstraram que os linfomas de grau intermediário foram os de maior ocorrência (52,0%) e, em seguida, os de baixo grau (28,6%) e os de alto grau (19,4%). Estes valores são representados na Tabela 2 e no Gráfico 1.

Dentro dos graus de malignidade, os linfomas caninos demonstraram prevalência de um tipo celular (Tabela 3 e Gráfico 2). Para as neoplasias de baixo grau, o tipo mais freqüente foi o linfocítico de células pequenas (17,4%). Já nos linfomas de grau intermediário, o tipo celular mais observado foi o difuso de células pequenas clivadas com uma freqüência de 22,5%. Entre os linfomas de alto grau, os resultados demonstram um percentual de 11,2% de linfomas imunoblásticos (Gráfico 2 e Figuras 1 a 3).

As Figuras 1 a 3 demonstram os tipos celulares mais freqüentes dentro da cada grau de malignidade, sendo a Figura 1 um linfoma linfocítico células pequenas, a Figura 2 um linfoma de pequenas células clivadas e a Figura 3 apresenta um linfoma do tipo imunoblástico.

### Discussão e Conclusões

O padrão de crescimento dos linfomas nos cães é predominantemente difuso. Já na espécie humana, observa-se uma equivalência entre os padrões nodular e difuso (MOULTON e HARVEY, 1990; TESKE, 1994;

VONDERHAAR e MORRISON, 1998). TESKE *et al.* (1994b) sugerem que os linfomas nos cães são mais agressivos e apresentam uma progressão mais rápida, por isso raramente é diagnosticada a forma folicular nessa espécie. Neste estudo todos os casos apresentaram padrão de crescimento difuso.

Diante disso, as classificações propostas são importantes, porém, muitas vezes torna-se necessária uma adaptação para melhor auxiliar o estabelecimento do diagnóstico dos linfomas caninos (TESKE, 1994; TESKE *et al.*, 1994b).

O valor da classificação morfológica baseia-se no reconhecimento de que a maioria dos linfomas caninos é incluída em um dos três grupos de diferenciação celular descritos por Kiel: alto grau, grau intermediário e baixo grau (GREENLEE *et al.*, 1990; TESKE *et al.*, 1994b).

Os linfomas caninos facilmente se encaixam nas categorias da Working Formulation (WF), a mais utilizada na oncologia veterinária (VONDERHAAR e MORRISON, 1998). TESKE *et al.* (1994b) classificaram 116 linfomas caninos, de acordo com a WF, e obtiveram 75% dos casos de grau intermediário, 16,4% de baixo grau, 6% de alto grau e 2,6% foram casos de Mycosis fungoides, concluindo que a maioria das neoplasias é de grau intermediário, compostas por células grandes, a exemplo do que ocorre nos seres humanos. No presente trabalho,

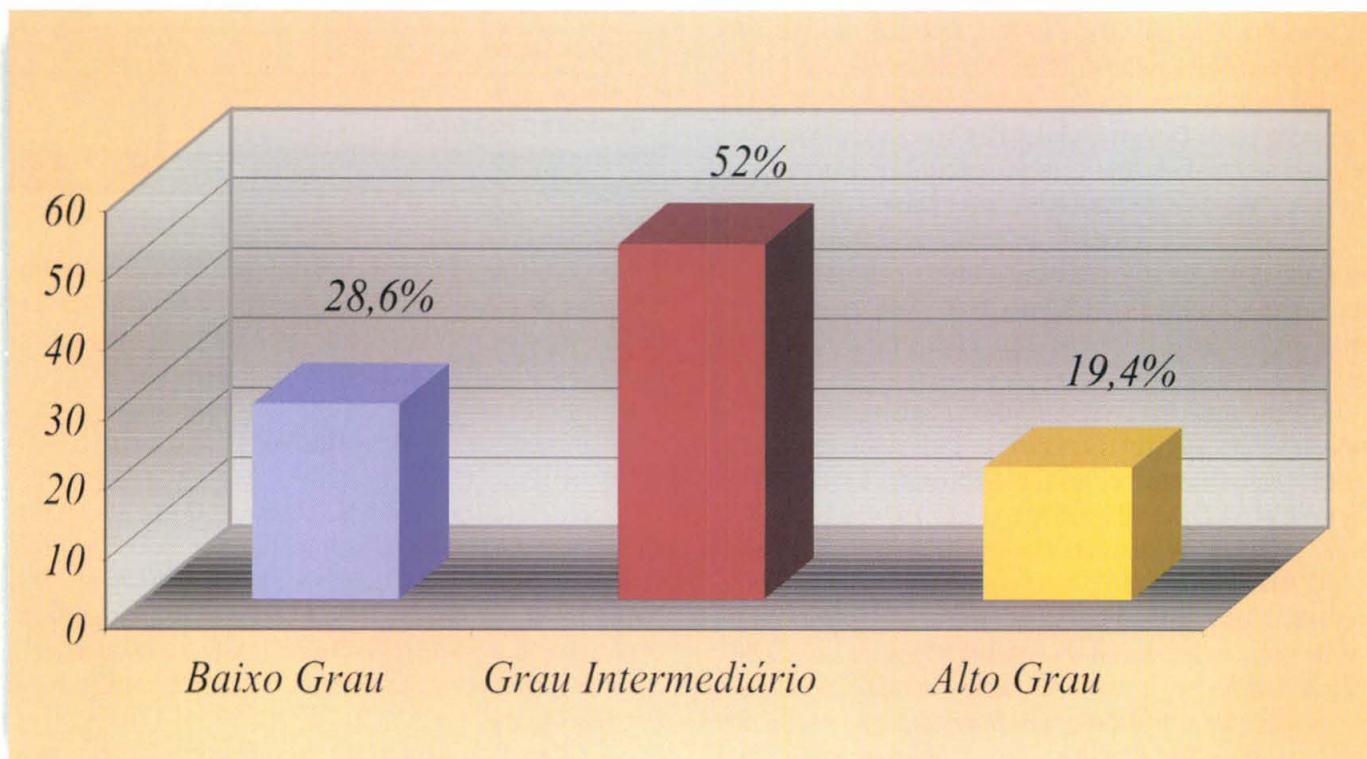


Gráfico 1. Freqüência de linfomas caninos quanto ao grau de malignidade.

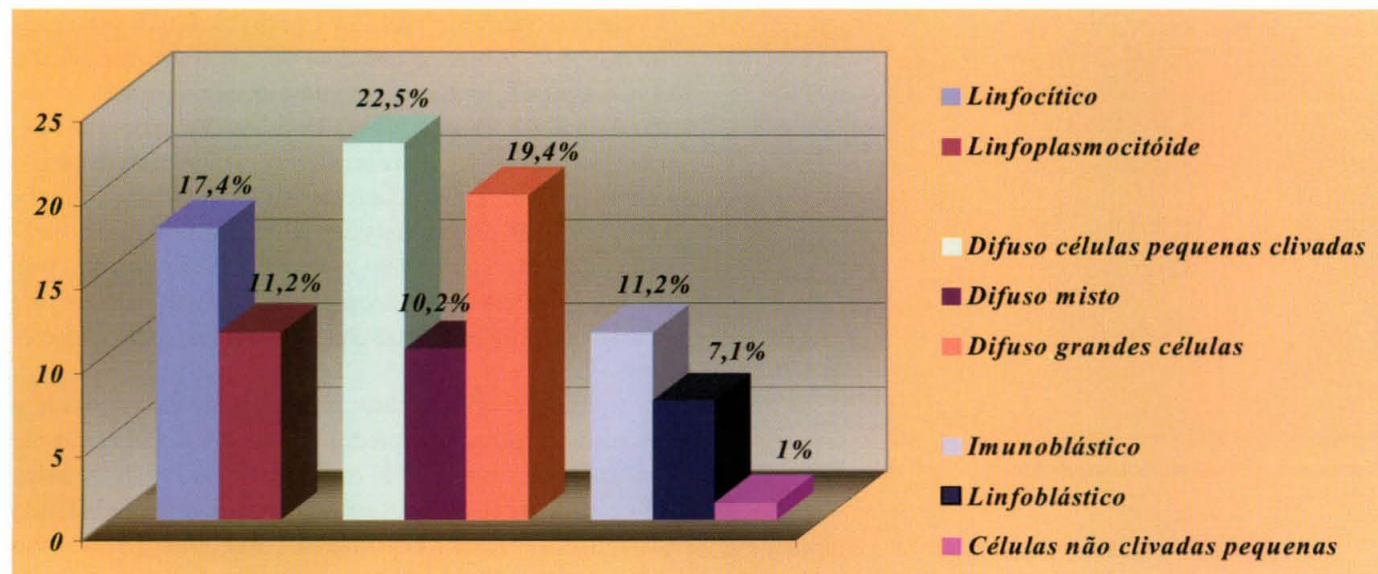


Gráfico 2. Frequência de linfomas caninos quanto ao tipo celular predominante - Working Formulation.

52% dos casos foram de grau intermediário, 28,6% de baixo grau e 19,4% de alto grau.

TESKE e HEERDE (1996) avaliaram 78 cães com linfoma e obtiveram a maioria dos casos de linfoma de alto grau, seguidos pelos de grau intermediário e pelos de baixo grau. Já FURNEL-FLEURY *et al.* (1997), classificaram 136 linfomas em cães de acordo com Kiel, dos quais a maioria foi de neoplasias de alto grau (73,9%).

APPELBAUM *et al.* (1984) classificaram 40 casos de linfoma canino de acordo com a WF, Lukes, Kiel e Rappaport. Obtiveram 48% de linfomas de grau intermediário, dos quais 38% do tipo difuso misto de pequenas e grandes células e 10% difuso de grandes células. Sequencialmente, 46% dos casos foram de alto grau, dos quais 38% eram de grandes células imunoblásticas. O restante era de baixo grau, tipo linfocítico de células pequenas.

Dentre os linfomas de grau intermediário observados neste estudo, os difusos de células pequenas clivadas foram os de maior frequência (22,5%). Em relação às neoplasias de baixo grau, o tipo linfocítico de células pequenas foi o mais frequente (17,4%), seguido pelo tipo linfoplasmocitóide (11,2%). O linfoma imunoblástico foi o de maior ocorrência (11,2%) na categoria das neoplasias de alto grau.

GREENLEE *et al.* (1990) mencionam que os quatro sistemas de classificação podem ser indicativos do comportamento dos linfomas em humanos. No entanto, tais classificações apresentam menor resposta na espécie canina, uma vez que nela, a neoplasia manifesta-se quase que exclusivamente sob a forma difusa.

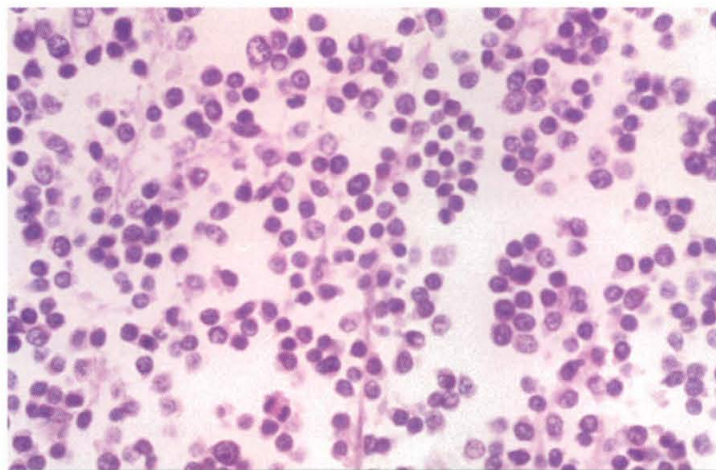


Figura 1. Linfoma linfocítico - células pequenas - Baixo Grau - Working Formulation - HE/400x.

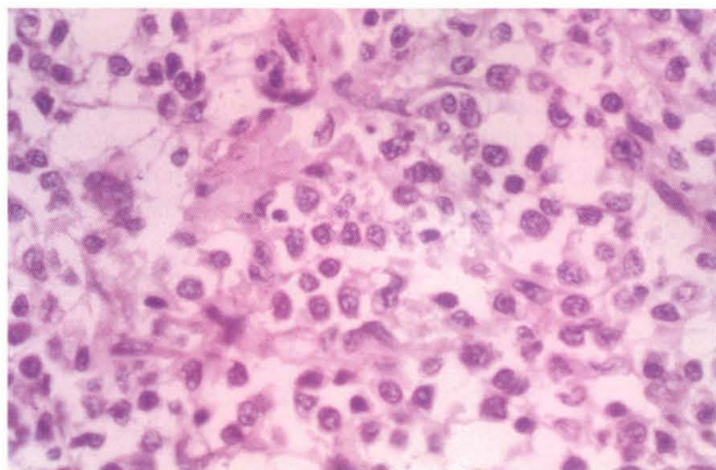
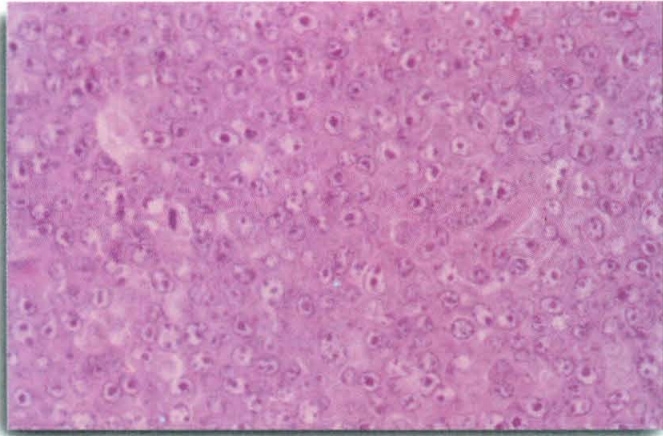


Figura 2. Linfoma difuso de células pequenas clivadas - Grau Intermediário - Working Formulation - HE/400x.



**Figura 3.** Linfoma imunoblástico - Alto Grau - Working Formulation - HE/400x.

Apesar da necessidade de algumas adaptações, pode-se observar e concluir que os sistemas de classificação de linfomas, propostos para a espécie humana, são aplicáveis aos cães com grande sucesso. Também constatou-se que a classificação de Working Formulation foi a que melhor se adaptou à dos linfomas caninos, destacando-se pela facilidade em classificar as neoplasias quanto à morfologia celular, em razão de sua nomenclatura específica e simplificada.

Em concordância com vários autores já citados, conclui-se que os linfomas de grau intermediário são os

de maior ocorrência, seguidos pelos de baixo grau e os de alto grau. Ainda, a presente pesquisa está de acordo com a opinião unânime de que a maioria, senão todos, são de padrão difuso. A esse respeito, além do comportamento agressivo e crescimento rápido da neoplasia (TESKE *et al.*, 1994b), acreditamos que a forma predominantemente difusa nos cães dá-se em virtude do estágio avançado da doença no momento do diagnóstico. Isso ocorre, uma vez que a neoplasia não manifesta, em sua fase inicial, sintomas que chamem a atenção do proprietário.

Embora a literatura apresente dados variáveis a respeito do tipo celular predominante dentro dos graus de malignidade, neste estudo concluiu-se que os tipos linfocítico, difuso células pequenas clivadas e o imunoblástico predominaram nas categorias de baixo grau, nas de grau intermediário e nas de alto grau, respectivamente.

Diante do exposto, o padrão histológico dos linfomas caninos varia conforme o estudo, mas todos os autores concordam que primariamente são difusos, apresentam alto índice mitótico e a maior ocorrência de casos enquadra-se nas categorias de alto grau e de grau intermediário (TESKE, 1994; TESKE *et al.*, 1994a; TESKE *et al.*, 1994b; FOURNEL-FLEURY *et al.*, 1997; VONDERHAAR e MORRISON, 1998; De MOURA *et al.*, 1999).

## SUMMARY

This study intends to classify and correlate the non-Hodgkin lymphomas according to the cytohistological classifications of Rappaport, Kiel, Lukes-Collins and Working Formulation. Results showed that the classification proposed for humans can be applied to dogs, as the non-Hodgkin lymphomas are very similar in both species. Most cases were graded as intermediate (52%), followed by low (28.6%) and high (19.4%) grades. As to the malignancy degree, the lymphomas displayed a single cell type prevalence in each category, with the small lymphocytic cells being the most frequent (17.4%) in low-grade lymphomas. In the intermediate and high grade lymphomas, the results indicated diffuse small cleavage cells (22.5%) and immunoblastic type cells (11.2%), as the most prevalent. It was concluded that the intermediate grade lymphomas are the most frequent type and that there is a cell type that is most prevalent in each malignancy grade. The canine non-Hodgkin lymphomas are very similar to those of man and consequently the human classification system can also be used for dogs.

**Key words:** dog; malignant lymphoma, cytohistological classification.

## AGRADECIMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 98/13933-3

## REFERÊNCIAS

1. APPELBAUM, F. R.; SALE, G. E.; STORB, R.; CHARRIER, K.; DEEG, H. J.; GRAHAM, T.; WULFF, J. C. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. **Hematological Oncology**, v. 2, n. 2, p. 151-168, 1984.
2. CAPURRO, C.; BURACCO, P.; ROSSI, L. Lymphoma in dogs. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 2, n.2, p. 7-19, 1992.
3. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Pathologic basis of disease**. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. p. 634-643.
4. DEHNER, L. P. Here we go again: a new classification of malignant lymphomas. A viewpoint from the trenches. Editorial. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 103, n. 5, p. 539-540, 1995.
5. DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA, E. P. Linfoma Canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV - SP**, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.
6. FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J. P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P. A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 1, p. 35-59, 1997.
7. GERARD-MARCHANT, R.; HAMLIN, I.; LENNERT, K. Classification of Non-Hodgkin's lymphomas. **Lancet**, v. 2, n. 7877, p. 405-408, 1974.
8. GREENLEE, P. G.; FILIPPA, D. A.; QUIMBY, F. W.; PATNAIK, A. K.; CALVANO, S. E.; MATUS, R. E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A. I.; LIEBERMAN, P. H. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, v. 66, n. 3, p. 480-490, 1990.
9. JONES, C. J.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Veterinary pathology**. 6. ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 1997. p. 1009-1042.
10. LENNERT, K.; STEIN, H.; KAISERLING, E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphoma. **British Journal of Cancer**, v. 31, p. 29-43, 1975. Supplement 2.
11. LUKES, R. J.; COLLINS, R. D. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. **Cancer**, v. 34, p. 1488-1503, 1974. Supplement 4.
12. LUNA, L. G. **Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: Mc Graw Hill, 1968. 258 p.
13. MILNER, R. J.; PEARSON, J.; NESBIT, J. W.; CLOSE, P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 309-313, 1996.
14. MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumours of the lymphoid and hematopoietic tissues In: MOULTON, J.E **Tumours in domestic animals**. London: University of California Press, 1990. p. 231-244.
15. NATIONAL CANCER INSTITUTE-The non-Hodgkin's lymphomas pathologic classification project: National Cancer Institute. Sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. **Cancer**, v. 49, n. 10, p. 2112-2135, 1982.
16. RALLIS, T.; KOUTINAS, A.; LEKKAS, S.; PAPADIAMANTIS, C. Lymphoma in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, n. 7, p. 590-596, 1992.
17. RAPPAPORT, H. Tumours of the Hematopoietic System. In: \_\_\_\_\_. **Atlas of tumor pathology**. section 3, Fascicle 8. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1966. p. 97-98.
18. SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M. Características anátomo-clínicas dos linfomas caninos. **Jornal do Anatomopatologista**, v. 7, n. 2, p. 6-8, 1992.
19. SEQUEIRA, J. L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E. P.; FIGUEIREDO, L. M. A.; ROCHA, N. S. Características Anatomoclínicas dos Linfomas Caninos na região de Botucatu/SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 245-249, 1999.
20. 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.
21. TESKE, E.; Van HEERDE, P. Diagnostic value and reproducibility of fine needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. **The Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 112-115, 1996.
22. TESKE, E.; Van HEERDE, P.; RUTTEMAN, G. R.; KURZMAN, I. D.; MOORE, P. F.; MACEWEN, E. G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994a.
23. TESKE, E.; WISMAN, P.; MOORE, P. F.; Van HEERDE, P. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. **Experimental Hematology**, v. 22, n. 12, p. 1179-1187, 1994b.
24. VALLI, V. E. O. The hematopoietic system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**, 4. ed. New York: Academic Press, 1993. v. 3, p. 149-153.
25. VONDERHAAR, M. A.; MORRISON, W. B. Lymphosarcoma. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats**. Philadelphia: Williams e Wilkins, 1998. p. 667-695.