

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA ANIMAL**

DISSERTAÇÃO

**Imunofenotipagem Comparada dos Plasmocitomas Extramedulares,
Histiocitomas e Linfomas Cutâneos em Cães**

Bartolomeu Benedito Neves dos Santos

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**IMUNOFENOTIPAGEM COMPARADA DOS PLASMOCITOMAS
EXTRAMEDULARES, HISTIOCITOMAS E LINFOMAS CUTÂNEOS
EM CÃES**

BARTOLOMEU BENEDITO NEVES DOS SANTOS

Sob a orientação da Professora
Ticiano do Nascimento França

e Co-orientação da Professora
Claudia Esther Alicia Rocio Hassan

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d237i dos Santos, Barolomeu Benedito Neves, 1991-
Imunofenotipagem comparada dos plasmocitomas
extramedulares, histiocitomas e linfomas cutâneos em
cães / Barolomeu Benedito Neves dos Santos. -
Seropédica, 2020.
68 f.: il.

Orientadora: Ticiano do Nascimento França.
Coorientadora: Claudia Esther Alicia Rocio Hassan

.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, 2020.

1. Plasmocitoma e histiocitoma caninos. 2.
Oncogene de Mieloma Múltiplo 1 (MUM1). 3. Cadeia Alfa
do Receptor de Interleucina 3 (CD123). 4. Célula
Dendrítica Plasmocitoide. 5. Imunohistoquímica. I.
França, Ticiano do Nascimento, 1974-, orient. II.
Hassan, Claudia Esther Alicia Rocio, -, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. IV.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

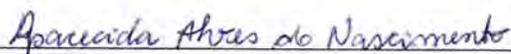
BARTOLOMEU BENEDITO NEVES DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

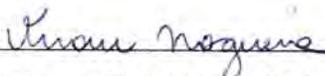
DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 19/02/2020



Ticiania do Nascimento França, M.V., Dra., UFRRJ
(Orientadora)



Aparecida Alves do Nascimento, BIO., Dra., UFRRJ



Vivian de Assunção Nogueira, M.V., Dra., UFRRJ



David Driemeier, M.V., Dr., UFRGS

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Bartolomeu Benedito (*in memoriam*)
e à minha mãe Cordélia, por todo apoio, amor,
carinho e dedicação que me fazem sentir seguro,
amado, capaz e feliz!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, sem ele nada existiria.

À minha mãe Cordélia Bonfim por ser presente, exemplo profissional, compreensiva, fazer sempre mais do que pode por mim e principalmente por seu amor incondicional.

Ao meu pai Bartolomeu Benedito pelo exemplo de honestidade, bondade, esforço e amor incondicional.

À prima Giovanna Neves, por dedicar um tempinho de suas preciosas férias do ensino médio para me ajudar a conferir dados, além do seu companheirismo e atenção.

À toda minha abençoada família pelo carinho, ajuda e exemplo em tudo que há de bom.

Ao Ivo Abraão, por toda força, compreensão, incentivo, carinho, companheirismo, atenção e exemplo profissional no dia a dia.

A todos os amigos, em especial à Adriana Ventura pelos dez anos de amizade, ajuda, incentivo e dom de ensinar, à Letícia Pinto pela pronta ajuda com as lâminas histológicas e ótima companhia no dia a dia que faz a rotina ser mais alegre e prazerosa e à Juliana Mello a prazerosa e divertida amizade, exemplo de atenção, responsabilidade e profissionalismo.

Ao professor Paulo Peixoto toda oportunidade, paciência, apoio e ensinamento que vai muito além do que está nas páginas dos livros e se estende a todos os alunos do Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ, é uma honra e orgulho tê-lo como mestre... agradeço por me ajudar a pensar, refletir, desenvolver senso crítico e por servir como espelho profissional.

À professora Ticiane França por muito me ensinar, por toda oportunidade, compreensão e referência profissional e à Dra. Rocio e sua maravilhosa equipe, por muito me ensinarem, pela disponibilidade, atenção e exemplos profissionais, obrigado por também ajudarem a expandir minha mente.

À professora Aparecida do Nascimento todo ensinamento, atenção, incentivo, paciência e comprometimento desde os tempos de monitoria de histologia, sempre com muito zelo e gentileza, um exemplo profissional para mim.

À professora Vivian Nogueira pela amizade, convivência profissional enriquecedora, ensinamentos, apoio e a incrível agilidade e competência em resolver problemas acadêmico-administrativos.

À professora Marilene Brito e ao professor Daniel Ubiali por todos os ensinamentos, compreensão e enriquecedora convivência profissional e, toda equipe de colegas e amigos residentes, mestrandos e doutorandos do SAP-UFRRJ pela ajuda, compreensão e companheirismo.

À professora Renné Amorim pela atenção e informação sobre o TMA, à equipe do setor de histologia do A.C Camargo, em especial à Dra. Laís Walter pela atenção e ótimo serviço prestado na confecção dos blocos de TMA, aos laboratórios Vetmol e Bacchi pelo ótimo serviço

de IHQ prestado para alguns marcadores utilizados e ao professor David Driemeier por disponibilizar alguns marcadores de outros clones para serem testados.

A todos os professores que passaram pela minha vida.

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

SANTOS, Bartolomeu Benedito Neves. **Imunofenotipagem comparada dos plasmocitomas extramedulares, histiocitomas e linfomas cutâneos em cães.** 2020. 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

RESUMO

A literatura sobre plasmocitomas extramedulares caninos (PEMCs) é ampla e com informações divergentes. Devido sua grande variação morfológica, essa neoplasia é comumente confundida com outros tumores benignos e malignos na rotina de diagnóstico histopatológico; principalmente com o histiocitoma cutâneo canino (HCC), o sarcoma histiocítico canino (SHC) e o linfoma canino (LC). Com o objetivo de fornecer informações adicionais sobre a imunofenotipagem dos PEMCs, testes de imuno-histoquímica foram realizados em microarranjo de tecidos (TMA) com *cores* de 2mm, usando os marcadores convencionais CD79a (em duplicata), CD3 (em duplicata), MUM1 (em duplicata), Iba1 e cadeias leves λ e κ de imunoglobulina em amostras de 39 PEMCs, 27 HCCs e 8 LCs. Para fins de comparação e controle, o estudo também incluiu amostras de 2 SHCs, 2 mastocitomas cutâneos (MCC), 2 melanomas orais, 1 mieloma múltiplo e espécimes de linfonodo, baço, medula óssea e pele caninos. Além disso, foi feita uma investigação inédita com o anticorpo monoclonal anti-receptor α da interleucina 3 (CD123) aplicado a cães. O CD123 tem sido amplamente estudado na medicina humana como eficiente marcador de algumas neoplasias linfoides, de mastócitos e de células dendríticas plasmocitoides blásticas, mas é praticamente inexplorado na medicina veterinária. Com o objetivo de avaliar a eficiência do microarranjo de tecidos (TMA) para alguns dos marcadores, realizou-se um estudo imuno-histoquímico piloto nas seções histológicas convencionais com MUM1 e CD79a em 27 amostras de PEMCs e 10 de HCCs, com os anticorpos anti-CD3 e CD79a em 8 amostras de LCs (5 cutâneos e 3 nodais) e com o anti-CD123 em amostras de 7 PEMCs e 2 HCCs. As conclusões mais importantes foram: 1) MUM1 é muito sensível (89,7%) para detectar PEMCs e eficiente para diferenciar os PEMCs de neoplasias histiocíticas. 2) Linfomas de células T podem expressar MUM1. 3) O CD123 é expresso por PEMCs, MCCs e SHCs, além de plasmócitos normais, endotélio e possivelmente por células dendríticas plasmocitoides caninas. 4) A expressão do antígeno CD123 em neoplasias malignas como MCC e SHC deve ser melhor investigada. 5) O anticorpo Iba1 teve 100% de sensibilidade para detectar HCCs e SHCs e, é muito específico para essas neoplasias.

Palavras chave: Plasmocitoma canino. Célula dendrítica plasmocitoide. CD123.

SANTOS, Bartolomeu Benedito Neves. **Compared immunophenotyping of extramedullary plasmacytomas, histiocytomas and cutaneous lymphomas in dogs.** 2020. 56p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

ABSTRACT

The literature about canine extramedullary plasmacytoma (CEP) is wide and contradictory. Due its great morphological variety, this neoplasm is commonly confused with others benign and malignant tumors in histopathologic diagnostic routine; mainly with Canine Cutaneous Histiocytoma (CCH), Canine Histiocytic Sarcoma (CHS) and Canine Lymphoma (CL). Aiming to compile information to investigate and clarify aspects regarding the immunophenotyping of CEPs, immunohistochemistry tests were performed in tissue microarray (TMA) with 2mm colors, using the conventional markers CD79a (in duplicate), CD3 (in duplicate), MUM1 (in duplicate), Iba1 and immunoglobulin λ and κ light chains in 39 CEPs, 27 CCHs and 8 CLs. For comparison and control purposes, the study also included samples from 2 CHSs, 2 cutaneous mast cell tumors (MCT), 2 oral melanomas and 1 multiple myeloma; in addition to normal and reactive tissues from canine lymph nodes, spleen, bone marrow and skin. Furthermore, an analysis unprecedented was carried out with the antibody anti- Interleukin 3 alpha receptor (CD123) applied in dogs. The CD123 has been widely studied in human medicine as an efficient marker of some lymphoid neoplasms, mast cells and blastic plasmacytoid dendritic cells, but it is practically unexplored in medicine veterinary. To evaluate the efficiency of the tissue microarray (TMA) for some markers used, a pilot immunohistochemical study was carried out in the conventional histological sections with MUM1 and CD79a in 27 samples of CEPs and 10 of CCHs, with antibodies anti-CD3 and CD79a in 8 samples of CLs (5 cutaneous and 3 nodal) and with anti-CD123 in samples of 7 CEPs and 2 CCHs. The mainly conclusions found out were: 1) MUM1 is very sensitive (89.7%) to detect CEPs and efficient to differentiate CEPs from histiocytic neoplasms; 2) T-cell lymphomas can to express MUM1; 3) CD123 is expressed in CEPs, MCCs and CHSs, in addition to normal plasmocytes, endothelium and possibly by canine plasmacytoid dendritic cells; 4) CD123 antigen expressions in malignant neoplasms such as MCC and CHS must be further investigated; 5) The Iba1 antibody had 100% sensitivity to detect CCHs and CHSs, being very specific for these neoplasms.

Keywords: Canine plasmacytoma. Plasmacytoid dendritic cell. CD123.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características histomorfológicas dos 5 tipos de plasmocitomas extramedulares caninos e o seu respetivo número de casos (PLATZ et al., 1999).....	07
Tabela 2. Características histomorfológicas dos 6 tipos de plasmocitomas extramedulares caninos e o seu respetivo número de casos (CANGUL et al., 2002).....	08
Tabela 3. Anticorpos e métodos imuno-histoquímicos.	15
Tabela 4. Imunofenótipo (amostra convencional e TMA), classificação histológica, localização, raça, sexo e idade de 39 PEMCs.....	20
Tabela 5. Imunofenótipo (amostra convencional e TMA), localização, raça, sexo e idade de 27 HCCs.	22
Tabela 6. Imuno-histoquímica em lâminas de TMA com MUM1/IRF4, CD79a em plasmocitomas extramedulares caninos.....	27
Tabela 7. Imuno-histoquímica em lâminas de TMA nos cores de PEMCs para os marcadores MUM1, CD79a, cadeia leve λ e CD123.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Blocos 1 e 2 de TMA e suas respectivas lâminas histológicas coradas em H.E.....	13
Figura 2. Pele, cão. PEMC do tipo maduro. maioria das células neoplásicas elípticas como plasmócitos maduros, halo perinuclear pouco corado proeminente e núcleo excêntrico com heterocromatina periférica em “face de relógio”, sem nucléolo evidente. hematoxilina e eosina (H.E.), obj. 63x.	16
Figura 3. Pele, cão. PEMC do tipo hialino. Células globosas de citoplasma abundante, eosinofílico e homogêneo, com área central menos corada e núcleo frequentemente excêntrico e em forma de foice. H.E., obj.63x.....	17
Figura 4. Pele, cão. PEMC do tipo clivado. Células de citoplasma escasso (alta proporção núcleo/citoplasma) e núcleo endentado. H.E., obj.63x.	17
Figura 5. Pele, cão. PEMC do tipo assincrônico. Maioria das células com citoplasma relativamente abundante e grande núcleo excêntrico com nucléolo central proeminente. H.E., obj.63x.....	18
Figura 6. Pele, cão. PEMC do tipo monomorfoblástico. População homogênea com leve anisocariose, pouco citoplasma, núcleo circular com pequeno nucléolo central evidente. H.E., obj.63x.....	18
Figura 7. Pele, cão. PEMC do tipo polimorfoblástico. Marcado pleomorfismo, anisocitose e anisocariose acentuadas, células neoplásicas gigantes mono e multinucleadas e pseudoinclusão nuclear. H.E., obj.63x.....	19
Figura 8. Casos incomuns de PEMCs. A) Pele, cão. Arranjo morfológico incomum de PEMCs; células neoplásicas com organização pseudofolicular. H.E., obj.63x. B) Pele, cão. Invasão vascular de células neoplásicas de PEMC. H.E. obj.63x. C) Pele, cão. Deposição amiloide em PEMC. Notar material homogêneo, eosinofílico e opaco (amiloide) depositado no estroma com aspecto condroide. H.E., obj.63x. D) Pele, cão. Área de diferenciação condroide com mineralização em foco de deposição de substância amiloide no estroma neoplásico. H.E., obj.63x.	23
Figura 9. Linfonodo, cão. Imuno-histoquímica do controle na lâmina de TMA para o anticorpo anti- receptor de interleucina-3 (CD123). A) Córtex e paracórtex. Endotélio venular e poucas células redondas a poliédricas com citoplasma e membrana fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x. B) Cordões medulares. Células plasmocitoides com citoplasma e membrana fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x.	25
Figura 10. Pele, cão. Imunofenótipo de um PEMC do tipo polimorfoblástico. A) Células neoplásicas polimórficas. H.E., obj.63x. B) Células neoplásicas com membrana e citoplasma fortemente imunocorados. IHQ, CD79a, obj.63x. C) Células neoplásicas com núcleo e citoplasma fortemente e moderadamente imunocorados, respectivamente. IHQ, MUM1, obj.63x. D) Células neoplásicas com membrana e citoplasma fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x.	26
Figura 11. Pele, cão. Imunofenótipo de um PEMC do tipo maduro. A) Células neoplásicas semelhantes a plasmócitos morfológicamente normais. H.E., obj.63x. B) Células neoplásicas com membrana e citoplasma moderadamente imunocorados. IHQ, CD79a, obj.63x. C) Células neoplásicas com citoplasma fortemente imunocorado. IHQ, cadeia leve λ de imunoglobulina, obj.63x. – detalhe para imunocoloração negativa para cadeia leve κ de imunoglobulina no canto esquerdo superior. D) Células neoplásicas com núcleo e citoplasma fortemente e moderadamente imunocorados, respectivamente. IHQ, MUM1, obj.63x. E) Células neoplásicas são imunonegativas. IHQ, molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1 (Iba1). F) Células neoplásicas com membrana e citoplasma fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x.	28

Figura 12. Imunofenótipo em HCC e SHC. Pele, cão. A) Histiocitoma cutâneo. Manto de células neoplásicas redondas com morfologia histiocítica infiltrado por moderado número de pequenos linfócitos. H.E., obj.63x. B) Sarcoma histiocítico (metastático). Folhas dérmicas de células neoplásicas redondas com moderada anisocitose, anisocariose, binucleação e nucléolo proeminente. H.E., obj.63x. C) Histiocitoma cutâneo. As células neoplásicas têm uma forte imunomarcção de membrana. IHQ, Iba1, obj.40x. D) Sarcoma histiocítico (metastático). As células neoplásicas têm uma forte imunomarcção de membrana. IHQ, Iba1, obj.63x. E) Histiocitoma cutâneo. As células neoplásicas são imunonegativas e células plasmocitoides maduras e imaturas infiltradas são fortemente positivas com marcação nuclear e citoplasmática. IHQ, antígeno do mieloma múltiplo 1 / fator regulador de interferon 4 (MUM1 / IRF-4), obj.63x. F) Sarcoma histiocítico (metastático). As células neoplásicas são imunonegativas. IHC para MUM1 / IRF-4, obj.63x. detalhe canto superior direito: forte imunomarcção citoplasmática e de membrana para CD123, obj.100x..... 30

Figura 13. Pele, cão. Linfoma cutâneo (não epiteliotrópico) de grandes células T. A) Densa população de células neoplásicas redondas com citoplasma escasso, núcleo de contorno irregular, com cromatina esparsa e um ou mais nucléolos proeminentes. H.E., obj.63x. B) As células neoplásicas são imunonegativas. IHQ, CD79a, obj.63x. C) As células neoplásicas apresentam discreta a moderada marcação de membrana. IHQ, CD3, obj.63x. D) Células neoplásicas com núcleo fortemente imunocorado. IHQ, MUM1, obj.63x.. 31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Amostras	12
3.2 Microarranjo de Tecidos (TMA)	12
3.3 Imuno-histoquímica	14
4 RESULTADOS	16
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	50
A - Dados das amostras de LCs, SHCs e MCCs	51
B - Mapa do TMA	52
C - Marcação de cadeias leves de imunoglobulinas em SHC	53
D - Expressão do CD123 em MCC	54
E - Expressão do CD123 em plasmócitos no baço canino	55
F - Infiltrado inflamatório com plasmócitos CD123+	56

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico histopatológico de tumores de células redondas caninas pode ser difícil e a imuno-histoquímica é uma importante técnica complementar para a conclusão dos casos nos quais a morfologia da neoplasia não é característica. Na rotina de diagnóstico histopatológico, o plasmocitoma extramedular canino (PEMC) pode ser confundido com outras neoplasias benignas e malignas, entre essas, principalmente o histiocitoma cutâneo canino (HCC), o sarcoma histiocítico canino (SHC) e o linfoma cutâneo canino (LCC).

Nesse contexto, de acordo com um pioneiro e amplo estudo de padronização do anticorpo MUM1, verificou-se que a expressão deste antígeno foi bastante sensível e específica para PEMCs, frente a diversas outras neoplasias (RAMOS-VARA et al., 2007). Da década de 70 até os dias atuais, todavia, muita informação nova, por vezes conflitantes foi incluída na literatura. De fato, em um trabalho mais recente, os autores obtiveram dados antagônicos à pretensa especificidade desse antígeno, dada sua consistente expressão também nos HCC (STILWELL, RISSI, 2018).

Na tentativa de esclarecer esse impasse, trabalhamos com os marcadores MUM1, CD79a, cadeias leves kappa e lambda de imunoglobulina, CD3 e Iba1 em uma análise comparativa desses marcadores nos PEMCs, HCCs, LCCs e, para fins de comparação e controle, em alguns sarcomas histiocíticos (SHCs), mastocitomas cutâneos (MCCs) e melanomas orais caninos. Para isso, aplicamos a técnica de imuno-histoquímica no microarranjo de tecidos (TMA), que consiste em remover cilindros de tecidos incluídos em vários blocos de parafina e transferi-los para um único bloco receptor, a fim de permitir a avaliação de um número grande de amostras sob as mesmas condições em uma só lâmina.

Adicionalmente, visando fornecer informações adicionais relevantes e uma melhor compreensão de aspectos obscuros relativos à histogênese, patogenia e comportamento destas neoplasias, foi realizada uma inédita investigação com anticorpo monoclonal anti-receptor α de interleucina 3 (CD123) que tem sido amplamente estudado na medicina humana como marcador em algumas neoplasias linfoides, dendríticas, mastocíticas e também no contexto de doenças autoimunes, mas é praticamente inexplorado na medicina veterinária.

Em função do exposto, esse estudo tem como objetivos: 1) avaliar a especificidade e sensibilidade do anticorpo MUM1 para PEMCs. 2) verificar os resultados da expressão imuno-histoquímica do MUM1 e CD79a em PEMCs e comparar com os resultados expostos na literatura. 3) testar se há expressão do antígeno CD123 nos PEMCs, HCCs, SHCs e MCCs. 4) verificar a sensibilidade e especificidade do anticorpo Iba1 para HCCs e SHCs no TMA com *cores* únicos de 2mm. 5) verificar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-cadeias leves kappa e lambda de imunoglobulina para PEMCs no TMA com *cores* únicos de 2mm.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As proliferações neoplásicas de plasmócitos em cães podem ser classificadas em quatro grupos: mieloma múltiplo, plasmocitoma ósseo solitário, leucemia de plasmócitos e plasmocitoma extramedular (BREUER, HERMANNNS 1998; VAIL, 2001). Os plasmocitomas extramedulares caninos (PEMCs) na maioria dos casos possuem um bom prognóstico, pois seu percentual de recidiva e metástase é de 5% e 2% respectivamente (VAIL, 2007) e, apesar de poderem ter origem em qualquer parte do corpo, eles são mais frequentes na pele, representando 86% da incidência, seguido pela cavidade oral, cólon/reto e outros locais com: 9%, 4% e 1% de incidência respectivamente (KUPANOFF et al., 2006).

Os PEMCs ocorrem mais frequentemente no tronco, membros, cabeça, cavidade oral e pavilhão auricular. Na macroscopia, geralmente se apresentam como um (ou múltiplos) nódulo (s) sésil ou polipoide de superfície rosada com tamanho entre 1 e 2cm (variando de 0,2 a 10 cm). Foi observado que esses tumores acometem frequentemente a cabeça, dígitos, gengiva e região inguinal em áreas próximas de inflamação crônicas como em cães com gengivite ou doença periodontal, na orelha de cães com otite externa crônica e na pele adjacente a área de dermatite crônica ou perto de neoplasias mamárias em cadelas (SCHRENZEL et al., 1998).

No passado, o que parece, os PEMCs já foram reportados na pele como mielocitoma (MCCLELLAND, 1940) e mieloma extramedular (FUNDERBURG, 1977) e sua característica de apresentar regularmente células neoplásicas gigantes uni e multinucleadas foi observada pelo menos desde 1958 por Sedlmeier e Weiss em um caso relatado como plasmocitoma extramedular esplênico. Mais tarde foram diagnosticados erroneamente como carcinoma neuroendócrino e denominados como histiocitoma atípico (NICKOLOFF et al., 1985). BAER et al. (1989) observaram que os principais trabalhos de neoplasias cutâneas e livros da década de 70 e 80 não incluíam ou citavam o PEMC entre as neoplasias cutâneas e que certamente essa neoplasia foi muitas vezes diagnosticada como tumor neuroendócrino cutâneo, sarcoma de célula reticular ou linfoma cutâneo devido a sua variação morfológica e semelhança com tais neoplasias.

Até meados da década de 80 o PEMC não foi incluído em importantes trabalhos como na Classificação Histológica Internacional de Tumores dos Animais Domésticos de 1974 (WEISS, FREESE, 1974), tão pouco foi citado entre os tumores classificados como neoplasias cutâneas de células redondas até o fim da década de 70 (DUNCAN, PRASSE, 1979), e nem listado entre as neoplasias que acometem a pele e subcutâneo em trabalhos de impacto ou livros de referência (STANNARD, PULLEY, 1978; CONROY, 1983; JONES, HUNT, 1983; GOLDSCHMIDT, 1985; YAGER, SCOTT, 1985; BOSTOCK, 1986).

Weiss (1962) considerou que plasmocitomas são raros em animais, mas menos do que se pensava anteriormente e que a tríade amiloidose, proteinemia e proteinúria existia em casos de plasmocitomas em animais.

Na literatura da década de 70 relata-se o PEMC como entidade rara, com ultraestrutura ainda desconhecida e de prognóstico incerto, embora possivelmente associado ao grau de diferenciação nuclear com relação ao de um plasmócito normal (GHADIALLY et al., 1977). A avaliação ultramicroscópica de um PEMC da gengiva de um cão revelou uma população neoplásica homogênea - com raros macrófagos infiltrados - cujas características mais relevantes eram o núcleo com padrão de heterocromatina clássico em "face de relógio", com um nucléolo (raramente dois ou três), o retículo endoplasmático rugoso abundante com formações dilatadas ou vesiculares - mas não em pilhas de cisternas - e grânulos de glicogênio em forma monoparticulada ou em roseta (não em todas as células); muitas células apresentavam o complexo de Golgi desenvolvido, porém difusamente distribuído e não na forma perinuclear como observado em plasmócitos normais (GHADIALLY et al., 1977).

No início da década de 80 a literatura ainda abordava o PEMC como tumor de rara ocorrência em cães e de prognóstico incerto devido aos poucos relatos existentes. Lester e Mesfin (1980) relataram um caso de PEMC na região perianal de um cão com boa condição física que, após um ano da excisão, foi eutanasiado devido ao péssimo estado clínico provocado por mieloma múltiplo (MM), sugerindo que houve uma progressão do PEMC para MM. Nesse relato, o diagnóstico foi fechado através da observação de células com retículo endoplasmático dilatado, heterocromatina periférica e filamentos intracitoplasmáticos (interpretados como imunoglobulinas polimerizadas) na microscopia eletrônica e, o principal diferencial para os autores na microscopia de luz convencional era neoplasia neuroendócrina (carcinoide). Dada a experiência com o referido caso, foi concluído que qualquer cão com plasmocitoma extraesquelético deveria ser investigado para evidência de neoplasia disseminada.

No final da década de 80 em um estudo que mencionava 11 casos de plasmocitomas cutâneos caninos (PCC), concluiu-se que o PCC deveria ser incluído no diagnóstico diferencial de tumores cutâneos de células redondas, principalmente quando ocorressem nas patas, lábios e canal auditivo de cães de meia idade a idosos. Todos os casos apresentaram excelente prognóstico após remoção cirúrgica e não foram associados à ocorrência de MM; em dois casos havia deposição de substância amiloide no estroma. A microscopia eletrônica revelou que a maioria das células tinha núcleo com heterocromatina periférica e retículo endoplasmático rugoso dilatado, além de fibrilas ao redor de células neoplásicas compatíveis com amiloide (LUCKE, 1987).

Um estudo com 75 plasmocitomas extraesqueléticos caninos apontou que a maioria dos animais acometidos eram adultos com média de idade em 9,7 anos e as áreas mais acometidas eram boca, patas, tronco e ouvidos. Dois animais tinham neoplasia linfóide disseminada, um cão desenvolveu o plasmocitoma durante a remissão clínica de um linfoma, dois animais tinham MM diagnosticado concomitantemente ou poucas semanas após o diagnóstico de plasmocitoma cutâneo. Os 70 animais remanescentes não apresentaram recidiva após a excisão do tumor, sendo que dez possuíam nódulos cutâneos múltiplos (mais tarde referida como plasmocitose cutânea por BOOSTROM et al., 2017), porém sem doença subjacente ou generalizada (RAKICH et al., 1989).

Um estudo imuno-histoquímico direcionado à expressão de IgG, IgM, IgA e cadeias leves kappa (κ) e lambda (λ) de imunoglobulinas foi realizado em amostras de 23 plasmocitomas extramedulares caninos. Um total de 20 casos exibiram monoclonalidade para cadeias leves (17 para cadeia leve λ e 3 para κ) e 19 para cadeias pesadas (17 para IgG e 2 para IgA) de imunoglobulina. Dois casos foram positivos em conjunto para IgG e IgM e um para IgG e IgA. Um caso foi negativo para todos os anticorpos. Os três casos com dupla marcação foram associados à produção de imunoglobulinas biclonais e para a amostra que não apresentou imunomarcação com nenhum dos anticorpos foi proposto a desdiferenciação das células neoplásicas. Esse mesmo estudo apontou que a média de idade dos cães acometidos por PEMCs foi de 8 anos, sem relação com o sexo do animal, com locais de ocorrência em face, boca, orelha, reto, rim e canal medular. Em dois casos houve o envolvimento de linfonodos locais (KYRIAZIDOU et al., 1989).

Ainda no final da década de 80 realizou-se um outro estudo que envolveu a análise de 49 plasmocitomas cutâneos caninos (PCCs) (de 46 cães) quanto ao seu comportamento clínico, morfologia e imunofenótipo. A maioria dos cães era de meia idade a idosos (média de 9.7 anos) e os locais mais frequentes foram dígitos (15/46), lábios (11/46) e orelha externa (11/46). Outros locais acometidos foram dorso (2), região perianal (2), cervical (1), membro anterior (1), lateral do tórax (1), abdômen ventral (1), coxa (1) região costal (1). Todas as neoplasias foram fortemente positivas para vimentina, mas a intensidade de marcação para IgG F(ab)₂ foi fraca em ¼ e moderada em ½ das amostras. O mesmo estudo estabeleceu um sistema de graduação em 3 níveis para a neoplasia baseado na quantidade de células bem diferenciadas. A maioria

dos casos foram classificados como grau 2 (67,4%) e a minoria no grau 3 (10,2%), sendo este com maior incidência nos dígitos. Todos os casos apresentaram células multinucleadas em maior ou menor quantidade, sendo esta considerada uma característica útil para auxiliar no diagnóstico. Não houve correlação do grau citológico com a imunomarcagem e nem com a recorrência tumoral. O estudo indicou que o PCC é uma neoplasia benigna, cuja excisão é curativa (>92% dos casos no estudo) e que deveria ser incluída no diagnóstico diferencial de tumores de células redondas de cães (BAER et al., 1989).

No início da década de 90 foi demonstrada pela primeira vez a origem do tipo de amiloide presente em um caso de PCC. A neoplasia estava localizada no coxim do membro pélvico de uma cadela (relatado como mieloma). A análise imuno-histoquímica demonstrou forte marcação do amiloide presente no estroma neoplásico com anticorpo anti-amiloide derivado de cadeia leve- λ de imunoglobulina ($A\lambda$) e fraca marcação com anticorpo anti-amiloide derivado de cadeia leve κ de imunoglobulina ($A\kappa$). Na microscopia eletrônica quase todas as células tumorais eram plasmocitoides, separadas por fibrilas extracelulares de 10nm sugestivas de amiloide; algumas células neoplásicas apresentavam diferentes estágios de degeneração vistos como deformação e vacuolização do retículo endoplasmático. Cinco semanas após à excisão a neoplasia recidivou no mesmo local, após nova exérese não houve recidiva nem desenvolvimento de metástases (GEISEL et al., 1990).

Rowland et al. (1991) relataram a deposição localizada de amiloide em 6 casos de PCCs acometendo dígitos (2), membros (2), lábio (1) e orelha (1), com média de idade em 10.7 anos, sendo dois da raça Cocker Spaniels, um Poodle, um Weimeraner e dois cães sem raça definida. Todas as amostras de PCCs desses animais, apresentaram reatividade citoplasmática para IgG e 5 para cadeia leve- λ de imunoglobulina na imunofluorescência indireta. A histoquímica com vermelho-congo foi positiva em todos os 6 casos para substância extracelular amorfa e eosinofílica interpretada como amiloide. Os autores concluem que a imunomarcagem monoclonal de imunoglobulinas pode ser eficiente para o diagnóstico de plasmocitoma e que a deposição de proteína amiloide em plasmocitomas extra esqueléticos é incomum com base nas pesquisas de relatos prévios, ocorrendo em 8 de 139 casos.

A quarta edição do livro Patologia dos Animais Domésticos já trazia o PCC como neoplasia benigna, comum no cão, de aparência macroscópica similar a dos histiocitomas, com deposição de amiloide em menos de 10% dos casos e que, eventualmente, em amostras de difícil distinção entre PCC e outras neoplasias como melanoma amelanótico, a microscopia eletrônica ou imuno-histoquímica para imunoglobulinas poderiam ser utilizadas para confirmação diagnóstica (YAGER, SCOTT, 1992).

Em um estudo envolvendo a revisão de arquivos 131 casos de PEMCs constatou-se que os casos mais antigos frequentemente foram inicialmente diagnosticados como tumores de células redondas malignos ou pobremente diferenciados. A média de idade dos animais acometidos foi de 9,4 anos (variando de 2 a 18 anos), os locais de maior ocorrência eram tronco e membros, cabeça, além de cavidade oral e pavilhão auricular. Macroscopicamente em geral tinham de 1 a 2cm (variando de 0,2 a 10 cm) apresentavam-se como um nódulo de superfície rosa, sendo alguns polipoides (principalmente no conduto auditivo) e com superfície ulcerada. Dois cães apresentaram vários tumores e recorrência local (geralmente por exérese incompleta) e o envolvimento de locais distantes ocorreram em pouquíssimos casos (CLARK et al., 1992).

Em 1993 a literatura ainda trazia o PEMC como neoplasia relativamente rara, sem dados de incidência em cães e gatos, mas que, naquela época um aumento de estudos sobre os PEMCs, presumivelmente ocorria pela dificuldade de diferenciar tal neoplasia de outros tumores, principalmente daqueles que poderiam ter um prognóstico extremamente desfavorável como melanomas amelanóticos. Além disso, foi demonstrado que outras duas neoplasias além do PEMC também apresentavam imunomarcagem para cadeias leves e pesadas de imunoglobulina: MM e o imunocitoma (BREUER et al., 1993).

Em 1994, Rowland e Linke realizaram imuno-histoquímica com anticorpos anti-amiloide reativo (AA) e anti-amiloide derivado de cadeia leve lambda de imunoglobulina ($A\lambda$) em 5 amostras de PEMCs, revelando que em todas as amostras, a substância amiloide apresentou marcação de $A\lambda$ e não de AA, o que confirmou que a origem do amiloide ocorreu a partir de imunoglobulinas. Os autores observaram também que na maioria dos casos as células neoplásicas apresentaram leve marcação citoplasmática para $A\lambda$.

Em um estudo de caracterização imunofenotípica de neoplasias linfóides cutâneas de cães e gatos, foram incluídos dez plasmocitomas caninos. Em quatro casos, os tumores encontravam-se na porção distal dos membros e os demais ocorreram nos lábios, região perivulvar, abdômen e/ou região peitoral, com a média idade dos animais de 9 anos; em nenhum caso havia evidência de mieloma múltiplo concomitante. Dois casos foram positivos para cadeia pesada α (um também expressava cadeia λ), dois casos foram positivos para cadeia pesada gama (γ) (um positivo para tipo IgG4 e ambos positivos para cadeia λ). Os 6 casos remanescentes não reagiram com nenhum anticorpo (IgG, IgA, IgM, cadeias λ e κ) (DAY, 1995).

Platz (1995) avaliou 117 PEMCs e 4 MMs de cães, além de 5 plasmocitomas extramedulares felinos, no intuito de investigar as diferenças entre essas neoplasias e o grau de malignidade dos plasmocitomas extramedulares (PEMs). A avaliação citoquímica, imuno-histoquímica e da proliferação celular não mostraram diferenças entre as neoplasias e raramente ocorreu deposição de amiloide associado a cadeias leves nos PEMCs. Na microscopia eletrônica foi notável o acúmulo de filamentos intermediários nos PEMs. As diferenças entre PEM e MM ocorreram apenas em relação à irregularidade nuclear e maior área nuclear e celular nos PEMs. O estudo clínico de acompanhamento dos animais com PEMC revelou que a neoplasia poderia ser considerada de prognóstico relativamente favorável, no entanto, possível recorrência ou metástase deveriam ser consideradas. Platz (1995) também observou que do ponto de vista morfológico a classificação do MM humano poderia ser aplicada ao PEM e MM caninos com algumas modificações, porém sem saber ao certo se isso teria alguma relevância prognóstica.

Um estudo com a finalidade de determinar a razão fisiológica de cadeia leve de imunoglobulina em plasmócitos de animais domésticos (canino, felino, equino, bovino e suíno) que avaliou linfonodos, baços e tonsilas, demonstrou através da imuno-histoquímica com anticorpos anti-cadeias leves λ e κ que a razão λ/κ na maioria das espécies é dominada por cadeias λ , sendo a proporção no cão de $91\lambda/9\kappa$, no bovino e no gato de $92\lambda/8\kappa$, no cavalo $96\lambda/4\kappa$ e no porco uma proporção mais ou menos equilibrada de $52\lambda/48\kappa$. Tais resultados foram em parte de acordo com a literatura prévia (HOOD et al., 1967), exceto pelo fato dos equinos até então serem cadeia λ restrita. Esse estudo foi importante para demonstrar que a análise imuno-histoquímica direcionada a cadeias λ e κ nos plasmocitomas bem diferenciados (correspondente ao de Marschalko na classificação humana) não é útil para diferenciá-los de infiltrados plasmocíticos reativos, devido à elevada proporção fisiológica dominante da cadeia λ na maioria das espécies (ARUN et al., 1996).

Três casos de plasmocitomas extramedulares intestinais localizados na submucosa retal (local considerado raro) associados à deposição de amiloide foram avaliados através de microscopia de luz e imuno-histoquímica; dois casos apresentavam metaplasia condroide e óssea nos locais com deposição de amiloide, todas as amostras foram positivas para cadeia leve λ de imunoglobulina, mas não para cadeia leve κ , o que indicou a monoclonalidade das células neoplásicas. Em duas amostras as células neoplásicas foram positivas para CD79a. A substância amiloide foi positiva para amiloide de origem em cadeia λ de imunoglobulina ($A\lambda$) e negativa para cadeia leve λ de imunoglobulina, e foi sugerido que isso ocorreu pela mudança conformacional da proteína amiloidogênica durante sua transformação em amiloide (RAMOS-VARA et al., 1998).

Ramos-Vara e colaboradores (1998), utilizaram os mesmos três casos de plasmocitomas extramedulares intestinais caracterizados na imuno-histoquímica do trabalho supracitado e os estudaram imuno-ultraestruturalmente através de microscopia eletrônica de transmissão com cortes imunomarcados (*immunogold*). O *immunogold* foi realizado para cadeias leves λ e κ , anti amiloide derivado de cadeia leve λ ($A\lambda$), e anti amiloide reativo (AA). Todos os três tumores foram positivos para cadeia leve λ (que marcou células neoplásicas e a substância amiloide) e negativos para cadeia leve κ , AA e $A\lambda$. Todos os casos apresentaram características ultraestruturais similares com três tipos celulares observados: (1) as mais abundantes eram células plasmocitoides com núcleo excêntrico, heterocromatina periférica, citoplasma amplo contendo abundante retículo endoplasmático rugoso com grânulos densos e material flocular e aparelho de Golgi, além de número variável de filamentos perinucleares de 7 a 9nm de diâmetro, junções intercelulares ocasionais também foram observadas; (2) o segundo tipo celular mais observado foram células gigantes plasmocitoides e (3) o menos comum eram células histiocíticas mono ou multinucleadas.

A partir de 114 amostras de plasmocitomas extramedulares caninos imunomarcados com cadeia leve λ e 3 amostras imunomarcadas com cadeia leve κ de imunoglobulina (76% localizados na pele e 24% no trato digestivo), realizou-se um estudo baseado na classificação do MM humano de Bartl et al. (1986), que diferenciou os PEMC em 5 tipos (maduro, clivado, hialino, assincrônico e polimorfoblástico), sendo os tipos clivado e assincrônico os mais frequentes. Segundo os autores, a classificação morfológica apenas tinha valor diagnóstico e não prognóstico, assim como a taxa de proliferação celular (através da imunomarcagem com Ki-67) não indicava o prognóstico; os dados clínicos estavam de acordo com os de relatos anteriores de que os PEMCs cursavam com baixo risco de recorrência e metástase (PLATZ et al., 1999). O resumo das características histomorfológicas descrita por Platz et al. (1999) para os 5 subtipos de PEMCs está listada na tabela 1.

Tabela 1. Características histomorfológicas dos 5 tipos de PEMCs e o seu respectivo número de casos (PLATZ et al., 1999).

Classificação morfológica e nº de casos	Citoplasma/célula (H.E)	Núcleo	Células Multinucleadas	Citoplasma Giemsa	Crescimento, estroma e organização
Hialino (6)	Eosinofílico centralmente transparente	Excêntrico e frequentemente em forma de foice	Pouca quantidade de células binucleadas	Basofílico na periferia	Expansivo, poucos casos focalmente infiltrativo
Maduro (11)	Maioria elíptico, eosinofílico, finamente granular com halo pouco corado perinuclear	Excêntrico redondo ou oval, heterocromatina marginal com aparência de “roda de carroça”	Pouca quantidade de células binucleadas, estas com halo perinuclear e núcleo com cromatina em padrão de “roda de carroça”	Basofílico	Bem circunscrito, células em fileiras separadas por septos fibrosos
Clivado (50)	Anisocitose e eventual halo perinuclear	Indentado, clivado, proporção núcleo:citoplasma 1:1	Grande número de células gigantes com até quatro núcleos	Não menciona	Grupos de células separados por septos fibrosos. Não encapsulado, focalmente infiltrativo
Assincrônico (36)	Eosinofílico, vacuolar, halo perinuclear	Blástico com nucléolo central	Grande número de células gigantes com até quatro núcleos	Basofílico na periferia	Fina cápsula de tecido conjuntivo
Polimorfoblástico (14) *	Anisocitose, eosinofílico, vacuolar, sem halo perinuclear	Redondo a oval, frequentemente excêntrico e nucléolo evidente	Grande número de células gigantes com até 9 núcleos polimórficos	Basofílico	Ninhos celulares divididos por finos septos fibrosos. Infiltrativo

* Dos 117 casos estudados um apresentou metástase e dois reincidência local, esses três casos de plasmocitomas extramedulares foram classificados como do tipo polimórfico blástico.

Um outro estudo que analisou 63 casos de plasmocitomas cutâneos e muco-cutâneos incluiu mais um tipo de plasmocitoma à classificação de Platz et al. (1999) no caso, o tipo monomorfoblástico; em todos os casos houve imunomarcção monoclonal para cadeias leves λ . Esses autores consideram que não houve correlação entre o tipo morfológico, localização do tumor, presença de amiloide e o prognóstico, e que o prognóstico era, em geral, bom, exceto em um caso, em que posteriormente o cão desenvolveu linfoma. Os tipos mais frequentes na classificação foram: monomorfoblástico (21), clivado (19), assincrônico (11), maduro (10), polimorfoblástico (2) e hialino (1) (CANGUL et al., 2002). O resumo das características histomorfológicas descrita por Cangul et al. (2002) para os 6 subtipos de PEMC está listado na tabela 2.

Tabela 2. Características histomorfológicas dos 6 tipos de PEMCs e o seu respectivo número de casos (CANGUL et al., 2002).

Classificação morfológica e nº de casos	Citoplasma/célula (H.E)	Núcleo	Células Multinucleadas
Hialino (1)	Abundante, levemente eosinofílico, halo perinuclear em algumas células	Excêntrico e frequentemente em forma de foice e nucléolo central em algumas células	Raras
Maduro (10)	Maioria elíptico, eosinofílico, finamente granular com halo pouco corado perinuclear. Corpúsculos de Russell em um caso	Excêntrico redondo ou oval, heterocromatina marginal. Baixo índice mitótico	Pouca quantidade
Clivado (19)	Pálido com limites indistintos, marcados septos fibrosos	Clivado ou convoluto, nucléolo pouco evidente e cromatina finamente granular, índice mitótico baixo a moderado	Pouca a moderada quantidade
Assincrônico (11)	Abundante e basofílico com halo perinuclear proeminente	Grande e excêntrico com nucléolo proeminente, índice mitótico muito baixo	Raras
Polimorfoblástico (2)	Pleomorfismo evidente, células grandes redondas a ovais entremeadas por células maduras ou clivadas	Nucléolo majoritariamente evidente e central em algumas células, índice mitótico muito alto	Grande número
Monomorfoblástico (21)	Células monomórficas, redondas a ovais em arranjo sólido	Grande, eucromático com nucléolo central pequeno proeminente, índice mitótico baixo	Raras

Um estudo pioneiro sobre a clonalidade de neoplasias linfoides caninas a partir de espécimes congelados, incluiu em suas amostras um PEMC e dois MM, essas três amostras apresentaram rearranjo gênico clonal para cadeia pesada de imunoglobulinas (IgH) e não apresentaram rearranjo gênico para receptor de células T (TCR) (BURNETT et al., 2003).

A importância dos estudos anteriores quanto à caracterização dos diversos tipos morfológicos, prognóstico e imunomarcção dos plasmocitomas caninos, pode ser evidenciada quando um tumor pouco diferenciado na mucosa gástrica de uma cadela de 12 anos tem seu diagnóstico concluído como sarcoma histiocítico solitário com auxílio da imuno-histoquímica, mas que devido a características morfológicas similares, o plasmocitoma polimorfooblástico fora descartado pela ausência de marcação do CD79a e positividade da amostra para lisozima (FANT et al., 2004).

Um estudo retrospectivo de amostras de biopsias caninas entre 1998 e 2002 na Universidade da Pensilvânia demonstrou que em meio a mais de 30 mil casos de neoplasias, 751 eram plasmocitomas, algo próximo a 2,4% das neoplasias caninas, a pele foi o sítio mais frequentemente afetado (86%), seguido pela cavidade oral (9%), reto (4%) e outros locais como estômago, intestino delgado, sistema genital, olho e baço (1%). Esse mesmo estudo a partir de 30 amostras de plasmocitomas colorretais indicou que estes possivelmente possuíam um comportamento similar aos que ocorriam na pele (KUPANOFF et al., 2006).

Há um caso interessante de PEMC maligno que acometia o membro anterior esquerdo e o baço de um Golden Retriever. A neoplasia apresentava extensiva atividade fagocítica de hemácias e neutrófilos, além de imunorreção citoplasmática intensa para IgG na imunofluorescência. Nesse relato, poucas células marcaram para CD79a e houve imunomarcção intermitente para lisozima. Os autores discutem que na medicina humana há relatos e levantamentos de trabalhos que mostram o comportamento fagocítico em raros casos de discrasias plasmocitárias e que na medicina veterinária já havia um relato de MM com atividade eritrofagocítica e que a expressão de lisozima frequentemente associada a neoplasias histiocíticas, ocorre em 20% dos casos de MM humano (YEARLEY et al., 2007).

Em um amplo estudo envolvendo 109 plasmocitomas e outros 139 casos de neoplasias (linfoma de células B e T, proliferações histiocíticas, mastocitomas e tumores melanocíticos), evidenciou-se, através de imuno-histoquímica, que 93,5% dos plasmocitomas foram positivos para o MUM-1, 56,2% foram positivos para CD79a e apenas 19,4% foram positivos para CD20 e que além dos plasmocitomas o MUM-1 marcou somente 11 tumores de células B (49 casos ao todo) e um linfoma anaplásico (2 casos ao todo). Devido a esses resultados concluiu-se que o MUM-1 é muito específico para plasmocitomas caninos e que esse marcador é mais sensível que o CD79a e CD20 para identificar plasmocitomas caninos; que poucos casos de linfomas caninos de células B expressam MUM-1 e que outros tumores histiocíticos e melanocíticos caninos não expressam o MUM-1 (RAMOS-VARA et al., 2007).

As proliferações neoplásicas de plasmócitos podem ser classificadas em quatro grupos distintos (1) mieloma múltiplo, (2) leucemia de plasmócitos, (3) plasmocitoma solitário ósseo e (4) plasmocitoma extraesquelético, entretanto, em alguns casos, mesmo que raros, essas doenças podem representar um continuum a exemplo do MM com desenvolvimento de lesões disseminadas cutâneas e em diversos órgãos (MAYER et al., 2008; FUKUMOTO et al., 2012).

Um caso peculiar de plasmocitoma retal contendo pigmento de hemossiderina intracitoplasmático nas células tumorais foi relatado em uma fêmea de Cocker spaniel de 11 anos. Na citologia, inicialmente, além do plasmocitoma, também foram considerados como diagnósticos diferenciais melanoma, carcinoide e sarcoma histiocítico. O diagnóstico foi concluído através de aspectos morfológicos e expressão de cadeias leves λ de imunoglobulinas nas células neoplásicas; quanto à origem não esclarecida do pigmento aventaram-se como hipóteses 1) mutação em alguma enzima que contém heme envolvida na cadeia respiratória, levando ao acúmulo de ferro, 2) sangramento crônico no tumor como fonte de captação de ferro

ou 3)a eritrofagocitose pelas células neoplásicas - embora não houvesse hemácias ou evidências de eritrofagocitose (RANNOU et al., 2009).

Em um relato pioneiro de plasmocitoma em terceira pálpebra de um cão Cocker spaniel fêmea de 7 anos utilizou-se como forma complementar para o diagnóstico à imuno-histoquímica com marcação positiva do CD138, anticorpo bastante empregado para marcação de proliferações plasmocíticas humanas. Além desse marcador, o estudo demonstrou a marcação da amostra para Ki67 indicando alta taxa de proliferação celular e imunomarcação com restrição para cadeia λ de imunoglobulina (PERLMANN et al., 2009).

Em estudo retrospectivo realizado por pesquisadores da Universidade de Cornell, com o objetivo de determinar a frequência de diagnósticos discordantes entre patologistas veterinários por segunda opinião, demonstrou-se que houve casos em que o diagnóstico inicial de plasmocitoma, foi cambiado para sarcoma histiocítico ou linfoma (casos distintos). Em um caso diagnosticado primeiramente como sarcoma de células redondas pobremente diferenciado, uma segunda opinião foi dada como plasmocitoma, o que reflete uma eventual deficiência no diagnóstico morfológico de plasmocitomas (REGAN et al., 2010).

Um estudo sobre a morfologia e imunofenótipo de tumores histiocíticos apontou que o PCC pode ser erroneamente diagnosticado tanto como histiocitoma quanto como sarcoma histiocítico e que a imuno-histoquímica com painel MHCII +, CD18 +, CD79a-, CD3- pode ser necessária para demonstrar a origem das células tumorais como histiocíticas (PAŹDZIÓR-CZAPULA et al., 2015).

O PEMC raramente apresenta malignidade e mais raramente pode progredir para leucemia plasmocítica. Relatou-se um caso de PCC com progressão para leucemia plasmocítica em um cão Bernese de 5 anos, que quatro meses após a excisão da neoplasia cutânea apresentou múltiplas massas na pele, além de hifema, derrames pericárdicos e bicavitários, massas miocárdicas e marcada plasmocitose no sangue periférico. A imuno-histoquímica revelou marcação forte para MUM-1 e a PCR para detecção de rearranjo de genes receptores de antígenos comprovou rearranjo monoclonal para IgH; as células neoplásicas presentes no sangue periférico e no nódulo cutâneo primário possuíam rearranjo idêntico no gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) (ROUT et al., 2017).

A literatura mais recente revelou novas nuances, como um caso de plasmocitoma gástrico secretor metastático em uma cadela de 10 anos com gamopatia monoclonal e hipergamaglobulinemia; a imuno-histoquímica revelou expressão aberrante de CD3 e imunomarcação concomitante para CD79a e MUM1, a PCR para rearranjo de genes receptores de antígeno detectou rearranjo clonal de IgH que confirmou a origem da neoplasia a partir de células B (ATHERTON et al., 2017).

Recentemente, um arranjo morfológico distinto de PEMCs foi publicado em um relato de série de 6 casos de plasmocitomas cutâneos, todos do tipo células maduras, com arranjo celular semelhante ao de células epiteliais glandulares que formavam folículos e por isso descreveu-se a morfologia pseudoglandular. Esse arranjo pode induzir a dúvida na histogênese do tumor por se assemelhar com a disposição celular apresentada mais comumente por alguns grupos de células epiteliais glandulares (MCHALE et al., 2018).

Observou-se em um estudo de casos de 125 cães com PCC a presença de células neoplásicas no lúmen vascular de 20 casos (16%), porém essa característica não apresentou associação com recidiva ou metástase. A média de idade dos cães acometidos no estudo foi de 9,6 anos e os locais mais frequentemente acometidos foram orelha e cabeça, membros distais e tronco (EHRENSING, CRAIG, 2018).

Alterações na técnica de imuno-histoquímica, como troca do anticorpo MUM-1 de camundongo monoclonal pelo de coelho monoclonal e pH da solução de recuperação antigênica, mostrou resultados diferentes da literatura pregressa. No trabalho, todos os 20 histiocitomas cutâneos testados para o anticorpo MUM-1 apresentaram positividade nuclear e

citoplasmática variável (ao passo que todos os histiocitomas foram positivos para Iba-1 e nenhum dos 10 plasmocitomas foi positivo para o Iba-1). O estudo conclui que o MUM1 deve ser usado como parte de um painel de marcadores para tumores de células redondas, incluindo não apenas Iba1, mas também imunomarcadores linfocitários e que deve haver cautela ao utilizar o MUM1 sozinho para se distinguir tumores de células redondas pouco diferenciados, principalmente os plasmocitomas dos histiocitomas (STILWELL, RISSI, 2018).

Um estudo envolvendo lesões tumorais presentes na cavidade oral (neoplásicas e não neoplásicas) em cães e gatos relatou que o plasmocitoma corresponde a cerca de 2% dessas lesões e quando comparado apenas com neoplasias benignas, corresponde a 7% das mesmas (MIKIEWICZ et al., 2019).

Estudo para detecção de rearranjo de genes receptores de antígenos em plasmocitomas caninos a partir de blocos de parafinas mostrou sensibilidade de até 34% na detecção do rearranjo em genes codificantes da cadeia pesada de imunoglobulina (IgH) *versus* até 78% na detecção do rearranjo em linfomas difusos de grandes células B, para essa diferença no estudo da clonalidade baseado no rearranjo de IgH, foi proposto que a baixa taxa de detecção no plasmocitoma canino pode ser causada por hipermutação somática da região variável da IgH (TAKANOSU et al., 2018). Por outro lado, os mesmos autores com intuito de melhorar a sensibilidade do estudo da clonalidade em plasmocitomas caninos, demonstraram uma sensibilidade de quase 83% na análise da clonalidade baseada no lócus da cadeia leve de imunoglobulina kappa - IGK (TAKANOSU et al., 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

A partir do arquivo de tecidos incluídos em blocos de parafina e lâminas histológicas da rotina do Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e de um laboratório privado de patologia veterinária, foram pré-selecionadas 27 amostras de plasmocitomas extramedulares caninos (PEMCs), 10 amostras de histiocitomas cutâneos caninos (HCCs) e 8 linfomas (5 cutâneos e 3 nodais), com registros de entrada nos anos de 2013 a 2019. Nos PEMCs e HCCs foi realizada imuno-histoquímica para avaliar a expressão dos antígenos MUM1/IRF4 e CD79a, com o objetivo de avaliar e comparar os resultados para expressão do MUM1/IRF4 entre essas duas neoplasias em seções de tecidos inteiros e de verificar a porcentagem de amostras de PEMCs positivas para CD79a. Das mesmas amostras pré-selecionadas, sete PEMCs e dois HCCs foram avaliadas num estudo piloto para verificar a expressão do antígeno CD123 e o número menor de casos para esse marcador ocorreu por questões logísticas e orçamentárias, pois os mesmos, foram submetidos à imuno-histoquímica com o marcador CD123 num laboratório humano particular de referência. Para os linfomas, os marcadores CD79a e CD3 foram utilizados para caracterizar o imunofenótipo de célula B ou T dessas neoplasias em seções de tecidos inteiros, a fim de selecionar os casos que, assim como os PEMCs e HCCs, posteriormente iriam compor as amostras de *cores* presentes na lâmina histológica do Microarranjo de Tecidos (TMA), o que também permitiu avaliar a eventual diferença de resultado imunofenotípico entre amostras de seções de tecidos inteiros e amostras em *cores* de TMA.

Para compor os blocos de TMA, foram selecionadas trinta e nove amostras de PEMCs, vinte e sete de HCCs, seis amostras de linfomas de células T (5 cutâneos e 1 nodal), duas de linfomas de células B (nodais), duas amostras de mastocitomas cutâneos caninos (MCC) alto grau, duas amostras de sarcomas histiocíticos caninos (SHC), duas amostras de melanomas orais (MOC), uma amostra de mieloma múltiplo (MM), uma de neoplasia de células redondas indiferenciada (negativa para MUM1, CD79a e CD3), uma amostra de linfonodo sem lesões, uma amostra de medula óssea, uma amostra de baço com hiperplasia linfoide e uma de pele morfologicamente normal. Todos os espécimes foram obtidos de tecidos de cães a partir de material de biopsias na maioria das neoplasias e necropsias apenas para um dos casos de sarcoma histiocítico e para o caso do mieloma múltiplo. Todos os casos foram selecionados pela morfologia histológica com coloração de rotina (hematoxilina e eosina – H.E.), exceto os casos de linfomas de células B e T que tiveram seu imunofenótipo previamente caracterizado para expressão de CD3 ou CD79a. Todos os plasmocitomas foram morfologicamente classificados nas seções inteiras de tecidos corados em H.E. Os PEMCs foram classificados de acordo com Platz et al. (1999) e Cangul et al. (2002) e os linfomas de acordo com Valli et al. (2011) e os dois MCCs foram graduados de acordo com Kiupel et al. (2011).

Para coloração em H.E nas amostras rotineiramente processadas, as seções de tecidos com 3µm foram desidratadas em quatro banhos utilizando álcool etílico P.A. (dois minutos em cada), diafanizadas em dois banhos de xilol (quinze minutos em cada) e coradas pela H.E. Quando disponíveis, dados como raça, sexo, idade e local da lesão foram revisados a partir das requisições de exames dos animais.

3.2 Microarranjo de Tecidos (TMA)

Após a revisão e seleção dos casos, para cada amostra foram definidas duas áreas em seção inteira do tecido corado em H.E a serem coletadas para a confecção do TMA. Em cada

amostra com seção de tecido inteiro examinada em microscópio de luz, as duas áreas foram escolhidas e circuladas com caneta permanente de ponta ultrafina (1mm). O critério utilizado para escolha das áreas foi a maior concentração de células neoplásicas, evitando eventuais focos com necrose, hemorragia, vasos sanguíneos mais calibrosos e outros tecidos que não a neoplasia, como septos conjuntivos largos. O TMA foi confeccionado num grande hospital humano privado com atuação em pesquisa e referência na área oncológica (Setor de Patologia do Hospital A.C. Camargo no Estado de São Paulo – Brasil).

Nos 86 blocos doadores, as duas áreas correspondentes às identificadas nas lâminas com seções inteiras de tecidos, foram removidas e transferidas uma para cada um dos dois blocos receptores que, finalizados, continham 86 *cores* de tecidos de 2 mm de diâmetro cada, de tal modo que cada bloco receptor, apresentava uma amostra de cada bloco doador, mais um *core* de placenta humana, ou seja, foram confeccionados dois blocos de TMA (bloco 1 e 2) com 87 *cores* de tecidos de 2mm, sendo um a duplicata ou réplica do outro (ver figura 1 mais adiante).

Em cada bloco, os *cores* foram dispostos em fileiras organizadas por grupo de neoplasias em ordem crescente de acordo com o número de registro. No início da sequência dos *cores* foi incluído um espécime de tecido placentário humano morfológicamente normal e ao final da sequência havia um *core* de linfonodo, baço, medula e pele normal para orientação na leitura das lâminas, além de servirem como controles internos na lâmina para os marcadores na imunohistoquímica (IHQ). Todas as amostras foram mapeadas de acordo com seu número de registro original sua respectiva posição no bloco de TMA (Anexo B). Para a construção do TMA foi utilizado uma estação de trabalho TMA (TMA builder, Histopathology Inc., Hungary). Após a construção, foram obtidas de cada bloco 20 lâminas histológicas carregadas positivamente (Positive charged adhesion slides, Amitel), com cortes de 3µm de espessura. Todas as lâminas, foram posteriormente banhadas em parafina para preservação antigênica dos tecidos. Dos dois blocos receptores foram obtidos um corte de cada para coloração de H.E com objetivo de analisar as amostras para confirmar a presença de áreas morfológicamente representativas das lesões originais (Figura 1).

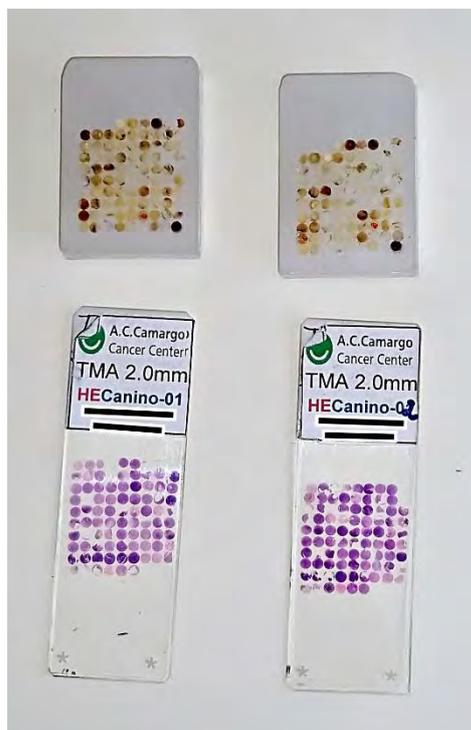


Figura 1. Blocos 1 e 2 de TMA e suas respectivas lâminas histológicas coradas em H.E.

3.3 Imuno-histoquímica

Inicialmente a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para avaliar a expressão de MUM1/IRF4 e CD 79a foi realizada em seções histológicas inteiras de 27 PEMCs e 10 HCCs pré-selecionados, antes da confecção do TMA. Adicionalmente, o anticorpo CD123 também foi testado em seções histológicas inteiras de 7 PEMCs e 2 HCCs. As 8 amostras de linfomas incluídas nos blocos de TMA foram selecionadas com base no imunofenótipo CD79a+/CD3- ou CD3+/CD79- também pré-avaliado nas seções de tecidos inteiros.

Foram utilizados os marcadores MUM-1/IRF4 (Dako – clone MUM1p de rato), Iba1 (Fujifilm Wako - policlonal de coelho), CD79a (Bio Rad - clone HM57 de rato), CD3 (Bio Rad – clone CD3-12 de rato), cadeia leve kappa (Dako Agilent – policlonal de coelho), cadeia leve lambda (Dako Agilent - policlonal de coelho) e CD123 (Cellmarque – clone 6H6 de camundongo) nas lâminas de TMA. As duas lâminas de TMA coradas em H.E retiradas do bloco 1 e bloco 2 (réplica), foram avaliadas. Para o estudo imuno-histoquímico com todos os sete anticorpos testados, foram utilizadas as lâminas de TMA do bloco 1, devido a maior qualidade das amostras contidas nele, isto é, em relação à celularidade neoplásica e ao número de *cores* íntegros presentes na amostra. Os anticorpos MUM1/IRF4, CD79a e CD3 também foram utilizados na lâmina de TMA do bloco 2 (réplicas), sendo assim, somente para estes marcadores, o estudo foi feito em duplicata.

No protocolo dos anticorpos MUM1/IRF4, CD3 e CD79a, após desparafinização das lâminas e tecidos em dois banhos de xilol de 20 minutos e reidratação no álcool, foi realizada a recuperação antigênica com tampão TRIS-EDTA pH 9 (MUM1 e CD3) e tampão citrato pH 6 (CD79a) em banho maria a 98° por 15 minutos com descanso de mais 15 minutos das lâminas no tampão após retirada do banho maria. Seguiu-se a lavagem das lâminas, o bloqueio da peroxidase com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Spring®) por 15 minutos, o bloqueio de reações inespecíficas com Protein-Block DPB-125 (Spring®) por 15 minutos, as lâminas foram incubadas com os referidos anticorpos por 2 horas em câmara úmida a uma temperatura de 4°C. Foi utilizado como sistema de detecção o REVEAL polímero-HRP, livre de biotina (Spring®) e como cromógeno a Diaminobenzidina (DAB) a uma diluição de 1 microlitro do cromógeno para 50 microlitros de Substrate Buffer (Dako®) por 5 minutos em cada lâmina. Todas as seções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. O protocolo para o anticorpo anti-CD123 foi realizado por laboratório de patologia humana privado externo e para os anticorpos anti-Iba1 e anti-cadeias leves λ e κ de imunoglobulina foi realizado por laboratório externo de imuno-histoquímica veterinária. Nessas amostras, a recuperação antigênica ocorreu em equipamento automático (PTLINK Dako®) em tampão de pH 9.0 (Dako-Target Retrieval Solution®) para CD123 e tampão de pH 6 (Dako-Target Retrieval Solution®) para cadeia leve λ e κ de imunoglobulina. O bloqueio de reações inespecíficas foi feito com Protein block (Dako Agilent) e como sistema de detecção para esses marcadores foi utilizado o EnVision FLEX (Dako®) e a revelação com DAB diluído em Substrate Buffer (Dako®). Como controle externo para o anticorpo anti-CD123 foi utilizada uma amostra de tonsila palatina humana, para os anticorpos CD3 e CD79a e MUM1, foi utilizado como controle externo um linfonodo de cão morfológicamente sem alterações e para os anticorpos anti Iba1 e cadeias leves κ e λ de imunoglobulina, o controle externo foi realizado em uma amostra de linfadenite granulomatosa de linfonodo canino com micobacteriose. A imunopositividade para os anticorpos utilizados nesse estudo foi contabilizada em escores de 1 a 3 da seguinte maneira: 3 \geq 60% de células positivas; 2 \geq 30% a 59% de células positivas e 1 \geq 10% a 29% de células positivas. As etapas mais importantes do método de IHQ para cada anticorpo encontram-se resumidas na Tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos e métodos imuno-histoquímicos.

Anticorpo (clone)	Fonte	Diluição	Tempo incubação	Recuperação Antigênica	Sistema de Detecção	Instituição
CD3 (CD3-12) camundongo anti-humano	Bio-Rad	1:100	2h	Tris-EDTA pH 9	REVEAL - Biotin-Free Polyvalent HRP (Spring®)	UFRRJ
CD79a (HM57) camundongo anti-humano	Bio-Rad	1:25	2h	Citrato pH 6	REVEAL - Biotin-Free Polyvalent HRP (Spring®)	UFRRJ
MUM1 (MUM1p) camundongo anti-humano	Dako	1:50	2h	Tris-EDTA pH 9	REVEAL - Biotin-Free Polyvalent HRP (Spring®)	UFRRJ
CD123 (6H6) camundongo anti-humano	Cell Marque	1:250	mín. 8h	Tris-EDTA pH 9	EnVision FLEX (Dako®)	Lab. Bacchi
Iba1 (policlonal) coelho anti-humano	Fujifilm Wako	1:500	overnight	Citrato pH 6	EnVision FLEX (Dako®)	Lab. Vetmol
Cadeia leve λ (policlonal) coelho	Dako Agilent	Pré-diluído	overnight	Citrato pH 6	EnVision FLEX (Dako®)	Lab. Vetmol
Cadeia leve κ (policlonal) coelho	Dako Agilent	Pré-diluído	overnight	Citrato pH 6	EnVision FLEX (Dako®)	Lab. Vetmol

4 RESULTADOS

A idade média dos cães com PEMCs no presente estudo foi de 9,1 anos (variando de 4 a 16 anos) e dos com histiocitoma cutâneo foi de 4 anos (variando de 2 meses a 12 anos). Com base nas classificações histológicas publicadas para os PEMCs (Platz et al., 1999; Cangul et al., 2002), nossa amostragem de 39 PEMCs apresentou 12 (30,7%) clivados, 9 (23%) monomorfolásticos, 7 (17,9%) polimorfolásticos, 7 (17,9%) maduros, 3 (7,7%) assincrônicos e 1 (2,5%) hialino (Figuras 2-7).

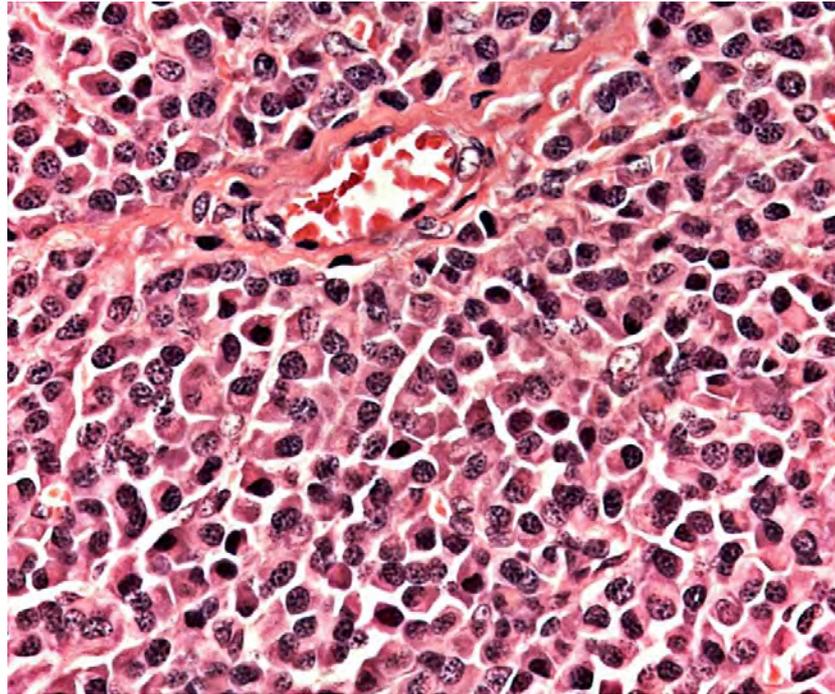


Figura 2. Pele, cão. PEMC do tipo maduro. Maioria das células neoplásicas elípticas como plasmócitos maduros, halo perinuclear pouco corado proeminente e núcleo excêntrico com heterocromatina periférica em “face de relógio”, sem nucléolo evidente. Hematoxilina e eosina (H.E.), obj. 63x.

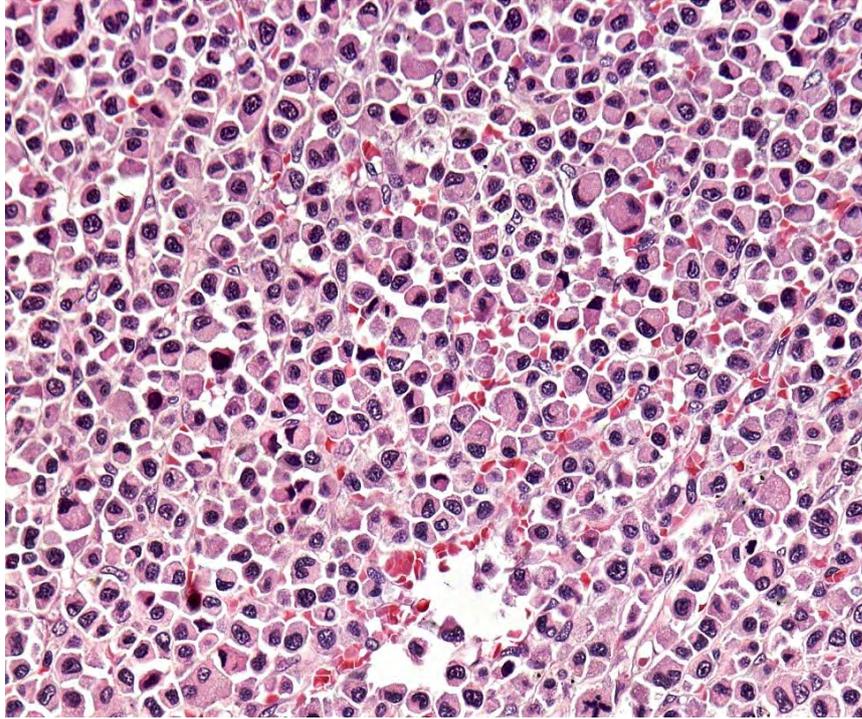


Figura 3. Pele, cão. PEMC do tipo hialino. Células globosas de citoplasma abundante, eosinofílico e homogêneo, com área central menos corada e núcleo frequentemente excêntrico e em forma de foice. H.E., obj.63x.

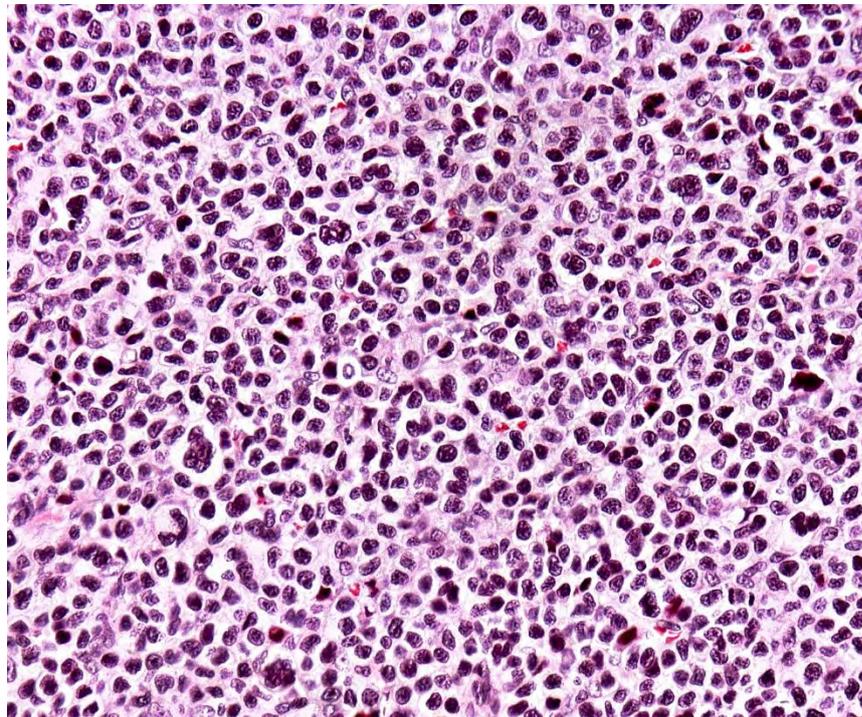


Figura 4. Pele, cão. PEMC do tipo clivado. Células de citoplasma escasso (alta proporção núcleo/citoplasma) e núcleo endentado. H.E., obj.63x.

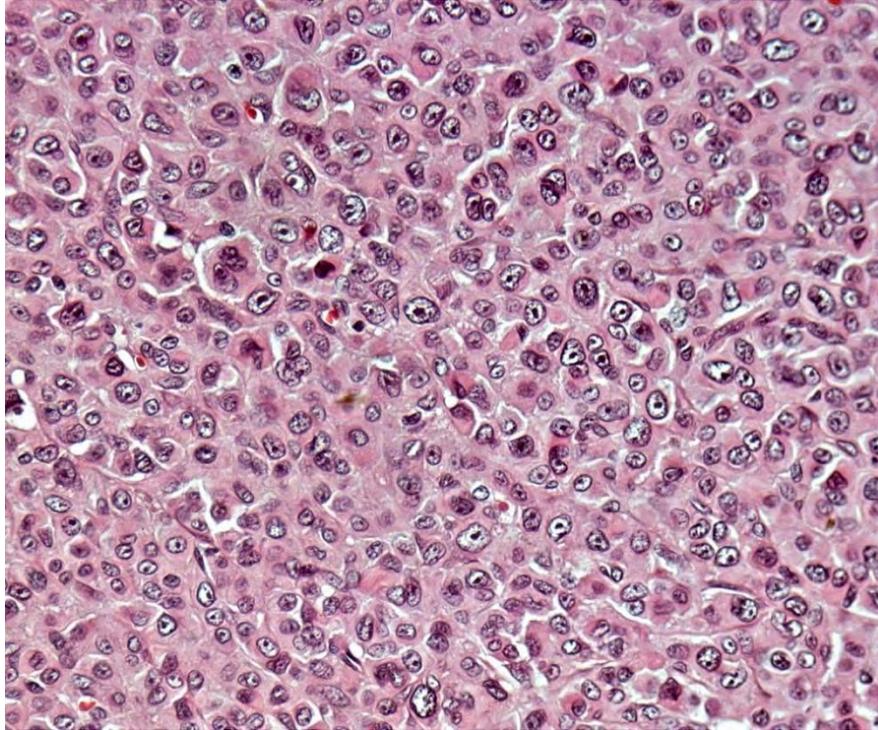


Figura 5. Pele, cão. PEMC do tipo assincrônico. Maioria das células com citoplasma relativamente abundante e grande núcleo excêntrico com nucléolo central proeminente. H.E., obj.63x.

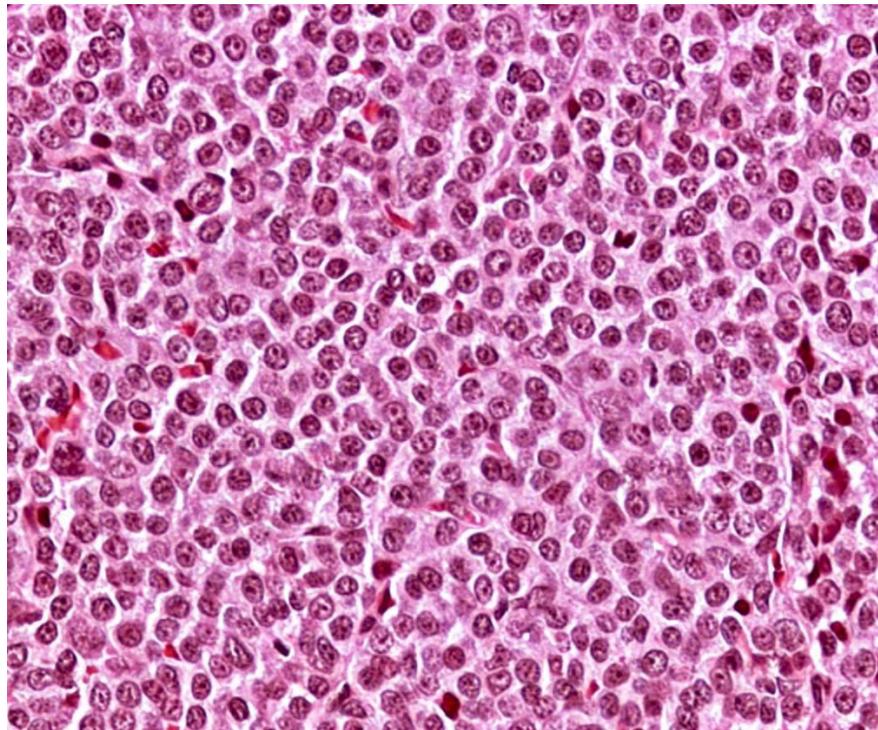


Figura 6. Pele, cão. PEMC do tipo monomorfoláístico. População homogênea com leve anisocariose, pouco citoplasma, núcleo circular com pequeno nucléolo central evidente. H.E., obj.63x.

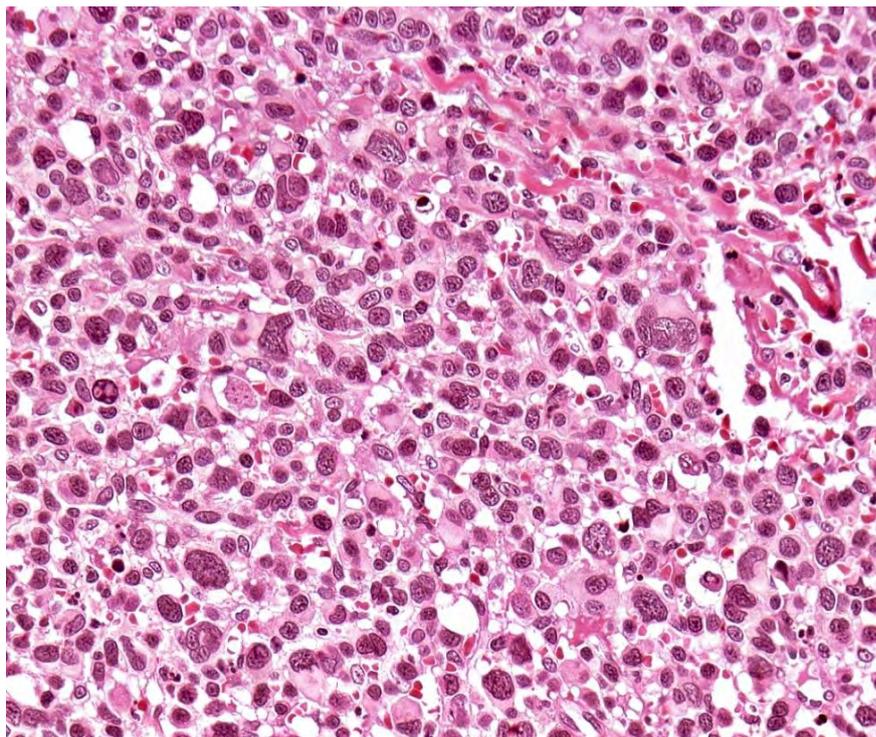


Figura 7. Pele, cão. PEMC do tipo polimorfooblástico. Marcado pleomorfismo, anisocitose e anisocariose acentuadas, células neoplásicas gigantes mono e multinucleadas e pseudoinclusão nuclear. H.E., obj.63x.

Com ressalvas ao plasmocitoma de células maduras e em menor grau ao assincrônico, na maioria dos casos, em uma mesma lâmina, foi possível observar na mudança de campo explorando diferentes áreas da lâmina, dois ou três tipos morfológicos distintos de células neoplásicas. A diversidade de idade, raça, sexo, local anatômico, quando disponíveis e, o tipo morfológico e resultado da análise imuno-histoquímica nas seções inteiras de tecidos e no TMA dessas amostras de PEMCs, podem ser consultadas na tabela 4. A diversidade de idade, raça, sexo, local anatômico, quando disponíveis e resultado da análise imuno-histoquímica nas seções inteiras de tecidos e no TMA dos HCCs, podem ser consultadas na tabela 5.

Tabela 4. Imunofenótipo (amostra convencional e TMA), classificação histológica, local anatômico, raça sexo e idade de 39 PEMCs (continua).

RG	MUM1	CD79	CD3	λ	κ	IBA	CD123	Classificação	Local	Tamanho	Raça	Sexo	Idade
50/14**	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)(+)	Maduro	Orelha	1cm	Shitzu	F	9 anos
76/17**	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	caiu	Polimorfoblástico	Dígito	ni	Poodle	F	16 anos
248/17**	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)(+)	Clivado	Pálpebra inferior	ni	Yorkshire	M	9 anos
1179/17**	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)(+)	Maduro	Orelha	1cm	SRD	F	4 anos
1234/17**	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)(+)	Polimorfoblástico	ni	ni	ni	ni	ni
1263/18**	(+)(+)	(-)(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)(+)	Polimorfoblástico	ni	ni	ni	ni	ni
34636**	sn (+)	sn (+)	(-)	sn	sn	sn	sn (+)	Clivado	ni	ni	ni	ni	ni
3/15*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Polimorfoblástico	ni	ni	ni	ni	ni
04/15**	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	Coxim	ni	SRD	F	7 anos
9/15*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Maduro	Orelha	ni	Poodle	F	5 anos
10/15*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	caiu	Clivado	ni	ni	ni	ni	ni
122/14*	(+)(+)	(-)(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Assincrônico	Calcanho	2cm	Basset Hound	M	6 anos
195/14*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Maduro	Orelha	ni	SRD	F	8 anos
474/16*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Maduro	ni	ni	SRD	M	ni
658/16*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	Monomorfoblástico	Interdigital	ni	Teckel	M	7 anos
764/14*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	caiu	caiu	caiu	(+)	Polimorfoblástico	Flanco	ni	SRD	F	10 anos
1051/16*	(+)(+)	(-)(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	Pata	ni	Yorkshire	F	10 anos
1051/16*	(+)(+)	(-)(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	Orelha	ni	Yorkshire	F	10 anos
1103/18*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Clivado	ni	ni	ni	ni	ni
1261/16*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Hialino	Dígito	ni	Cocker spaniel	F	10 anos
1320/16*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	Clivado	Flanco	ni	Poodle	F	12 anos
1451/13*	(-)(-)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Assincrônico	Interdigital	ni	Lhasa apso	M	10 anos

RG	MUM1	CD79	CD3	λ	κ	IBA	CD123	Classificação	Local	Tamanho	Raça	Sexo	Idade
1528/14*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Polimorfoblástico	Orelha	ni	Labrador	M	10 anos
1605/14*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Maduro	ni	1,5cm	Cocker spaniel	F	ni
1746/13*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	Coxim	2cm	Cocker spaniel	F	13 anos
1795/17*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Clivado	Coxim	ni	SRD	F	ni
13/15*	(+)(+)	(+)(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Clivado	ni	ni	ni	ni	ni
71/14	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	caiu	Clivado	Mandíbula	ni	Cocker spaniel	M	11 anos
152/19	(+)	(+)	(-)	sn	sn	sn	(+)	Clivado	ni	ni	ni	ni	ni
328/14	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Clivado	Orelha	ni	Labrador	M	7 anos
467/13	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	Membro	ni	Golden retriever	M	ni
577/16	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	ni	ni	Beagle	F	ni
607/13	(-)	(-)	(-)	caiu	caiu	caiu	(-)	Maduro	Reto	1 cm	Pitbull	M	7 anos
773/16	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Clivado	Interdigital	2 cm	SRD	M	8 anos
904/14	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	Tórax	ni	Yorkshire	M	4 anos
864/13	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Clivado	Dígito	3cm	SRD	M	12 anos
1182/17	(+)	(+)	(-)	sn	sn	sn	(-)	Assincrônico	Cotovelo	5cm	SRD	M	11 anos
1356/13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Polimorfoblástico	Focinho	1cm	SRD	F	12 anos
1916/16	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Monomorfoblástico	ni	ni	ni	ni	ni

**Amostras com IHQ para CD79a, MUM e CD123 em seções de tecidos inteiros doadores e nos *cores* de TMA correspondentes.

* Amostras com IHQ para CD79a e MUM em seções de tecidos inteiros doadores e nos *cores* de TMA correspondentes.

** Amostras com deposição de amiloide no estroma.

ni = não informado.

sn = sem células neoplásicas.

Tabela 5. Imunofenótipo (amostra convencional e TMA), localização, raça sexo e idade de 27 HCCs.

RG	CD123	MUM	CD79	CD3	KAPPA	LAMBDA	IBA1	RAÇA	SEXO	IDADE	LOCAL
T243/15**	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-)	(-)	(++)	Fox Paulistinha	F	9 anos	face interna
T255/14**	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(++)	ni	ni	ni	ni
T272/15*	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-)	(-)	(++)	Scottish terrier	M	10 anos	membro
T312/14*	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-) (+++) moderado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	ni	ni	ni	ni
T337/17*	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-)	(-)	(++)	Dachshund	M	ni	orelha
T469/14*	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	ni	ni	ni	ni
T473/16*	(-)	(-)	(-) (+++) discreto linfócitos	(-) (+++) discreto linfócitos	(-)	(-)	(+++)	SRD	F	ni	escapula
T543/15*	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) discreto linfócitos	(-)	(-)	(+++)	SRD	M	4 anos	orelha
T549/15*	(-)	(-)	(-) (+++) discreto linfócitos	(-) (+++) moderado linfócitos	(-)	(-)	(++)	Bulldog francês	M	9 meses	dígito
T601/17*	(-)	(-)	(-)	(-) (++) mínimo linfócitos	(-)	(-)	(++)	Shihtzu	M	ni	membro pélvico
T786/15	(-)	(-)	(-)	(-) (++) mínimo linfócitos	(-)	(-)	(++)	Bulldog francês	M	NI	escapula
T791/17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	Pibull	F	2 anos	escápula
846/17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	ni	ni	ni	ni
T1030/17	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-) (+++) moderado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	Pitbull	M	2 meses	face
T1121/17	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	SRD	F	5 anos	tórax
T1141/17	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	Bull terrier	M	3 anos	membro pélvico
T1248/17	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	Shihtzu	M	4 anos	orelha
T1294/17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	Cocker spaniel	M	2 anos	orelha
T1393/16	(-)	(-)	(-)	(-) (++) mínimo linfócitos	(-)	(-)	(+)	Bulldog Francês	M	7 meses	cabeça
T1541/15	(-)	(-)	(-)	(-) (++) mínimo linfócitos	(-)	(-)	(+)	West	M	8 meses	base da orelha
T1548/15	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	Boxer	F	3 anos	tórax lateral 1cm
T1565/16	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	ni	ni	ni	ni
T1626/14	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	Bulldog francês	F	10 meses	lábio superior
T1818/16	(-)	(-)	(-)	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	ni	ni	ni	ni
T1873/16	(-)	(-)	(-) (+++) moderado linfócitos	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	SRD	F	12 anos	flanco direito
T1890/16	(-)	(-)	(-) (+++) discreto linfócitos	(-) (+++) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(+++)	ni	ni	ni	mento
T1902/16	(-)	(-)	(-)	(-) acentuado linfócitos	(-)	(-)	(++)	Boxer	M	4 anos	membro

**Amostras com IHQ para CD79a, MUM e CD123 em seções de tecidos inteiros doadores e nos *cores* de TMA correspondentes. * Amostras com IHQ para CD79a e MUM em seções de tecidos inteiros doadores e nos *cores* de TMA correspondentes. ni= não informado.

De forma geral, as células neoplásicas dos PEMCs estavam dispostas em manto, folhas e/ou cordões com celularidade variando de moderada a acentuada e sustentadas por discreto estroma fibrovascular. Entretanto, em uma amostra de plasmocitoma do tipo clivado e em outra do tipo polimorfooblástico, as células neoplásicas estavam entre moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroadiposo. Em um caso de plasmocitoma de células maduras a disposição das células neoplásicas ao redor de vasos na derme tinha aspecto pseudofolicular (Figura 8A). Células neoplásicas intravasculares foram claramente vistas em um caso de plasmocitoma de células maduras (Figura 8B). Havia em três casos de PEMCs deposição de substância amiloide. Em um caso notou-se acentuada quantidade de substância amiloide que ocupava volume muito maior do que as células neoplásicas proliferadas. Em outro caso observou-se formação de tecido condroide em meio ao amiloide (Figura 8C) e em outro diferenciação condroide com mineralização (Figura 8D).

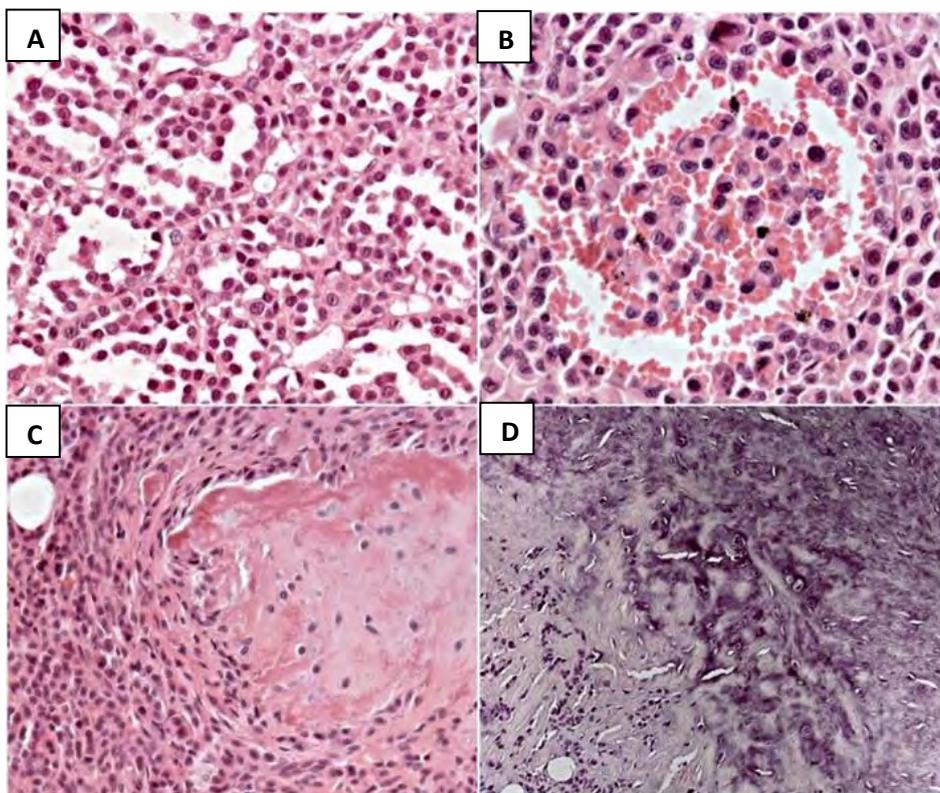


Figura 8. Casos incomuns de PEMCs. A) Pele, cão. Arranjo morfológico incomum de PEMCs; células neoplásicas com organização pseudofolicular. H.E., obj.63x. B) Pele, cão. Invasão vascular de células neoplásicas de PEMC. H.E., obj.63x. C) Pele, cão. Deposição amiloide em PEMC. Notar material homogêneo, eosinofílico e opaco (amiloide) depositado no estroma com aspecto condroide. H.E., obj.63x. D) Pele, cão. Área de diferenciação condroide com mineralização em foco de deposição de substância amiloide no estroma neoplásico. H.E., obj.63x.

Na análise IHQ dos PEMCs nas lâminas de TMA, um caso (1/39) foi excluído da amostragem para todos os marcadores por não apresentar células neoplásicas nos *cores* em nenhuma das duas lâminas (nem do bloco 1 e nem no bloco 2), essa era uma amostra que na seção histológica do tecido inteiro, apresentava pequena área com poucas células neoplásicas e muito estroma fibroadiposo. Nos 38 casos de PEMCs restantes, a perda de *cores* na lâmina de TMA durante o processo de IHQ, impossibilitou a análise de algumas amostras das quais não foram feitas a IHQ no bloco dois (duplicata). Isso ocorreu em três casos para expressão de CD123 (3/38 - 7,9%) e quatro casos para expressão de cadeias leves λ e κ (4/38 -10,5%). A perda do *core* durante as etapas da IHQ para o marcador CD123 também ocorreu em um caso de MCC (1/2 ou 50%) e na amostra de medula óssea (1/1). Todos os *cores* de HCC (27), LT (6), LB (2), SHC (2), MOC (2), neoplasia de células redondas indiferenciada (1), linfonodo (1), baço (1) e pele (1), inclusos no bloco de TMA, puderam ser avaliados para todos os marcadores na IHQ.

Nas vinte e sete seções de tecidos inteiros de PEMCs pré-avaliadas para expressão CD79a, quatro foram negativas e para a expressão do MUM1, apenas uma foi negativa. Nos PEMCs que expressaram o antígeno MUM1 e CD79a, a marcação na IHQ (nuclear e citoplasmática para o MUM1 e membrano-citoplasmática para o CD79a) foi forte com mais de 80% das células neoplásicas marcadas (escore 3). Esse resultado, também foi observado nos casos de linfomas para expressão de CD3 ou CD79a. Nenhuma seção inteira de tecido dos dez HCCs pré-avaliados foi positiva para MUM1 ou CD79a. Todos os sete PEMCs pré-avaliados nas seções inteiras de tecidos para a expressão do antígeno anti-CD123 apresentaram marcação citoplasmática e membranosa, esta foi forte em todos os casos, sendo que o escore 1 foi observado em uma amostra, o escore 2 em cinco e o escore 3 em uma.

Houve 100% de concordância na avaliação do imunofenótipo para expressão de CD79a e MUM1 entre a seções de tecidos inteiros e os *cores* de TMA de 26 PEMCs (uma amostra não foi possível comparar devido à falta de células neoplásicas nos *cores* presentes no TMA) e 10 HCCs. A concordância do imunofenótipo dos linfomas com os marcadores CD3 e CD79a nas seções de tecidos inteiros e nos *cores* de TMA também foi de 100%. Entre as 7 amostras de PEMCs imunocoradas em cortes convencionais com CD123 no estudo piloto, foi possível fazer a comparação do imunofenótipo expresso no TMA entre apenas 5 delas, pois o *core* de uma amostra caiu e o de outra não possuía células neoplásicas. Desta maneira, houve concordância com o imunofenótipo do *core* correspondente no TMA em uma amostra que na seção de tecido inteiro apresentava imunomarcção difusa em mais de 80% das células neoplásicas. As outras quatro amostras disponíveis no TMA para comparação, foram negativas e nas seções de tecidos inteiros, foram positivas, porém, com marcação multifocal em menos de 40% das células neoplásicas.

Células semelhantes a plasmócitos maduros e imaturos com expressão dos antígenos MUM1, CD79a e cadeias leves λ ou κ de imunoglobulinas, presentes em infiltrados inflamatórios nas próprias neoplasias linfoides e não linfoides analisadas e na hiperplasia linfóide esplênica, foram positivos para a expressão do CD123 com um padrão de marcação citoplasmático forte.

No linfonodo canino normal, a maioria das células CD123+ fortemente marcadas estavam localizadas nos cordões medulares e apresentavam características de plasmócitos maduros e seus precursores como imunoblastos, plasmoblastos e pró-plasmócitos (Anexo E). Na região interfolicular e paracortical do linfonodo, células endoteliais venulares e raras células com características citológicas plasmocitoides apresentaram forte marcação para o antígeno CD123 (Figura 9 A-B).

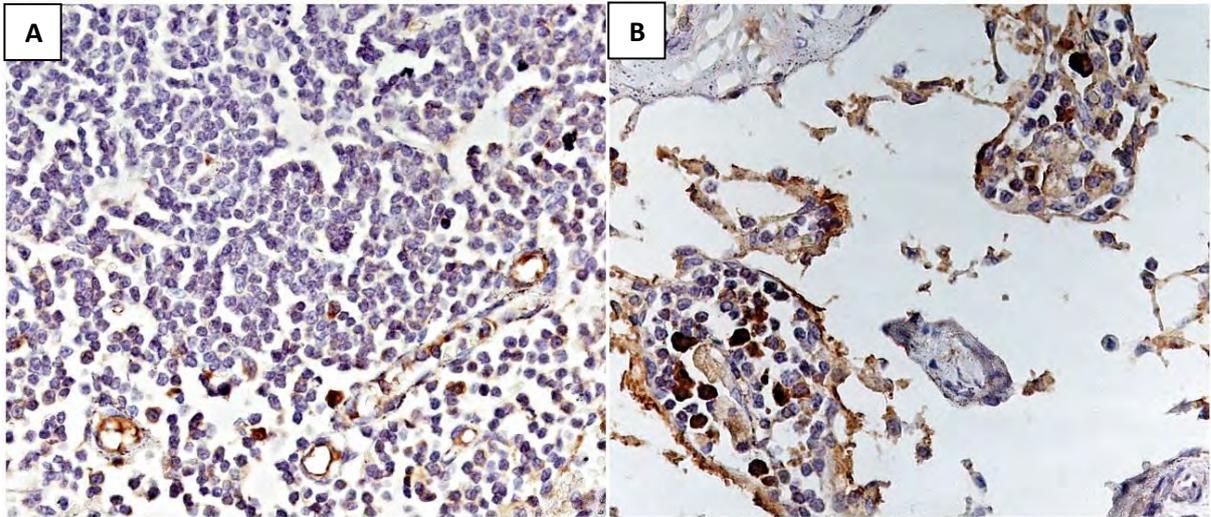


Figura 9. Linfonodo, cão. Imuno-histoquímica do controle na lâmina de TMA para o anticorpo anti-receptor de interleucina-3 (CD123). A) CórTEX e paracórTEX. Endotélio venular e poucas células redondas a poliédricas com citoplasma e membrana fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x. B) Cordões medulares. Células plasmocitoides com citoplasma e membrana fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x.

A marcação do antígeno CD123 nos *cores* de TMA ocorreu em 13 de 35 PEMCs (37,1%) e foi fortemente citoplasmática em células neoplásicas com morfologia madura e também nas com maior atipia e multinucleação (Figura 10 A-D).

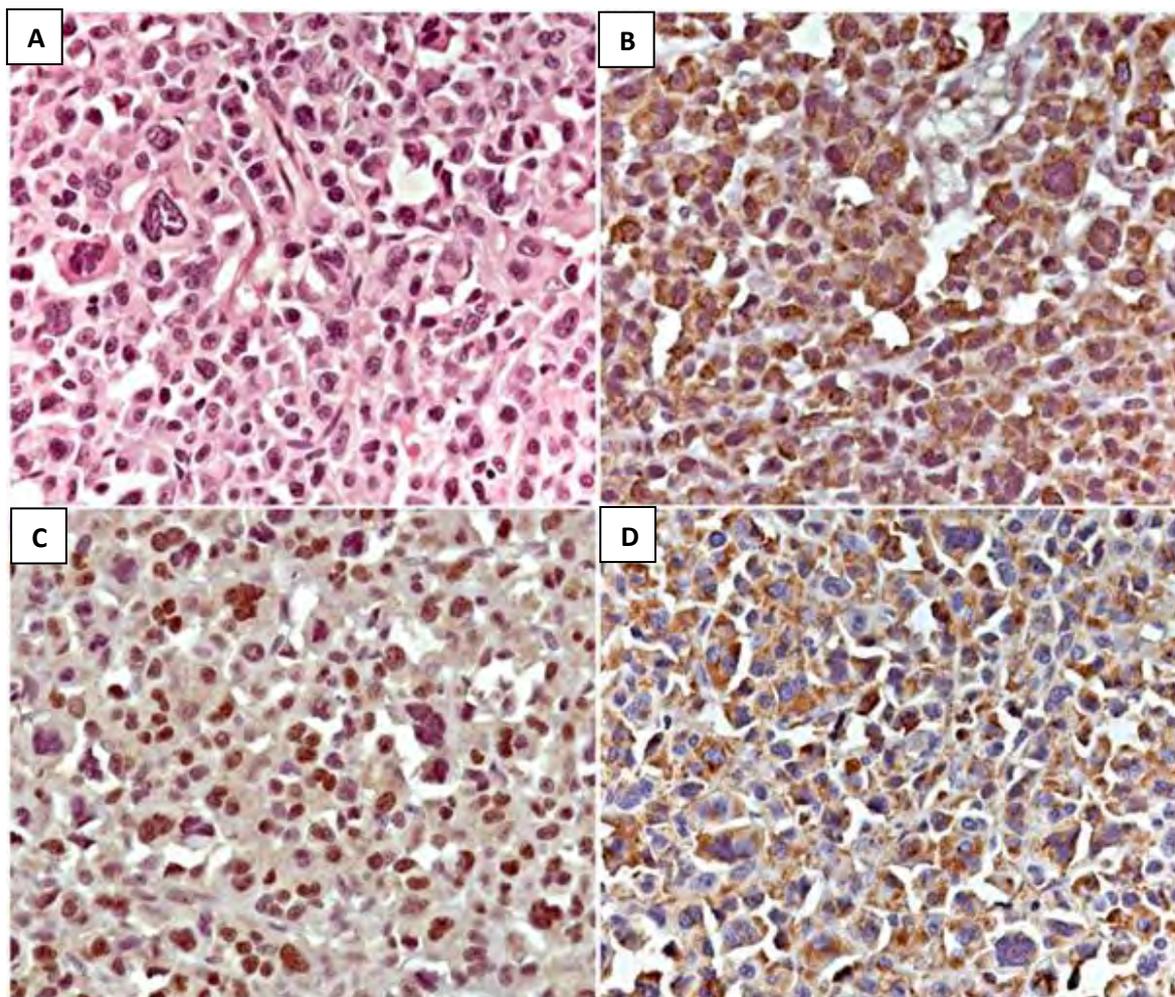


Figura 10. Pele, cão. Imunofenótipo de um PEMC do tipo polimorfooblástico. A) Células neoplásicas polimórficas. H.E., obj.63x. B) Células neoplásicas com membrana e citoplasma fortemente imunocorados. IHQ, CD79a, obj.63x. C) Células neoplásicas com núcleo e citoplasma fortemente e moderadamente imunocorados, respectivamente. IHQ, MUM1, obj.63x. D) Células neoplásicas com membrana e citoplasma fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x.

Nos *cores* de TMA, quando houve marcação para o antígeno CD123, esta foi forte em todas as amostras de PEMCs. Nove amostras de PEMCs apresentaram escore 3 e quatro apresentaram escore 2 de células neoplásicas CD123+.

Nos linfonodos de cães morfologicamente normais (um *core* na lâmina de TMA mais uma seção inteira de tecido como controle externo ao TMA), a maioria das células positivas para MUM1 localizavam-se em cordões medulares e raramente na região interfolicular e paracortical. Os plasmócitos normais positivos para MUM1 apresentavam forte marcação intranuclear e citoplasmática. Quando positivas para expressão do antígeno MUM1, as células dos PEMCs tiveram forte marcação nuclear, com leve a moderada marcação citoplasmática difusa, tanto em células com morfologia madura quanto nas com maior atipia e multinucleação. Dos 38 de 39 *cores* de PEMCs possíveis de avaliar nas lâminas de TMA (avaliados em duplicata bloco 1 e 2), 34 (87,2%) foram positivos para MUM1. Trinta e duas amostras apresentaram escore celular positivo 3 e duas amostras apresentaram um escore celular positivo 2 e quatro amostras não apresentaram células neoplásicas positivas. Assim como o marcador MUM1, também foi possível fazer a análise em duplicata (em lâminas dos dois blocos de TMA) para os marcadores CD79 e CD3. Com relação a detecção do antígeno CD79a nos PEMCs, dos 38 *cores* com células neoplásicas presentes nas lâminas de TMA, 29 (76,3%) foram positivos. Todos os PEMCs foram negativos para detecção do antígeno CD3.

Vinte e oito de 38 PEMCs (73,7%) apresentaram imunomarcção concomitante para CD79 e MUM1; 6/38 (15,7%) foram positivos para MUM1 e negativos para CD79; 1/38 (2,6%) foi positivo para CD79 e negativo para MUM1 e três casos (um do tipo maduro, outro do tipo clivado e outro polimorfooblástico) foram negativos para ambos os marcadores, sendo que o do tipo clivado foi positivo para cadeia leve λ de imunoglobulina (Tabela 6).

Tabela 6. Imuno-histoquímica em lâminas de TMA com MUM1/IRF4 e CD79a em PEMCs.

MUM	CD79	Nº de amostras
+	+	28
+	-	6
-	+	1
-	-	3

Dos 34 *cores* de PEMCs com células neoplásicas presentes nas lâminas de TMA imonocoradas para detecção de cadeias leves λ e κ de imunoglobulinas, vinte (58,8%) foram positivos para cadeia λ e todos foram negativos para cadeia κ de imunoglobulina. Todos os 34 *cores* de PEMCs presentes na lâmina de TMA imunocorada para Iba foram negativos.

Para analisar a relação de imunomarcção entre os marcadores MUM1, CD79a, CD123 e cadeia leve λ de imunoglobulina, nos PEMCs presentes no TMA (Figura 11 A-F), foi necessário a exclusão de casos que tiveram a avaliação comprometida para qualquer um desses marcadores. Assim, a análise do imunofenótipo de 27 casos com a presença dos mesmos *cores* viáveis com células neoplásicas em todos os marcadores foi realizada. A correlação IHQ entre os cinco marcadores foi de 8 casos positivos para MUM1, CD79a, cadeias leves λ de imunoglobulina e CD123. Seis amostras tiveram imunofenótipo positivo para MUM1, CD79a, cadeias leve λ de imunoglobulina e negativo para o CD123; quatro amostras foram positivas apenas para MUM1 e CD79a; três amostras tiveram expressão do MUM1; duas amostras foram negativas apenas para as cadeias leves λ e κ de imunoglobulina; duas foram positivas apenas para MUM1 e cadeia leve λ de imunoglobulina; uma amostra foi negativa apenas para o MUM1 e uma foi negativa para todos os 5 marcadores (Tabela 7).

Tabela 7. Imuno-histoquímica em lâminas de TMA nos *cores* de PEMCs para os marcadores MUM1, CD79a, cadeia leve λ e CD123.

MUM1	CD79a	λ	CD123	Nº amostras
+	+	+	+	8
+	+	+	-	6
+	+	-	-	4
+	-	-	-	3
+	+	-	+	2
+	-	+	-	2
-	+	+	+	1
-	-	-	-	1

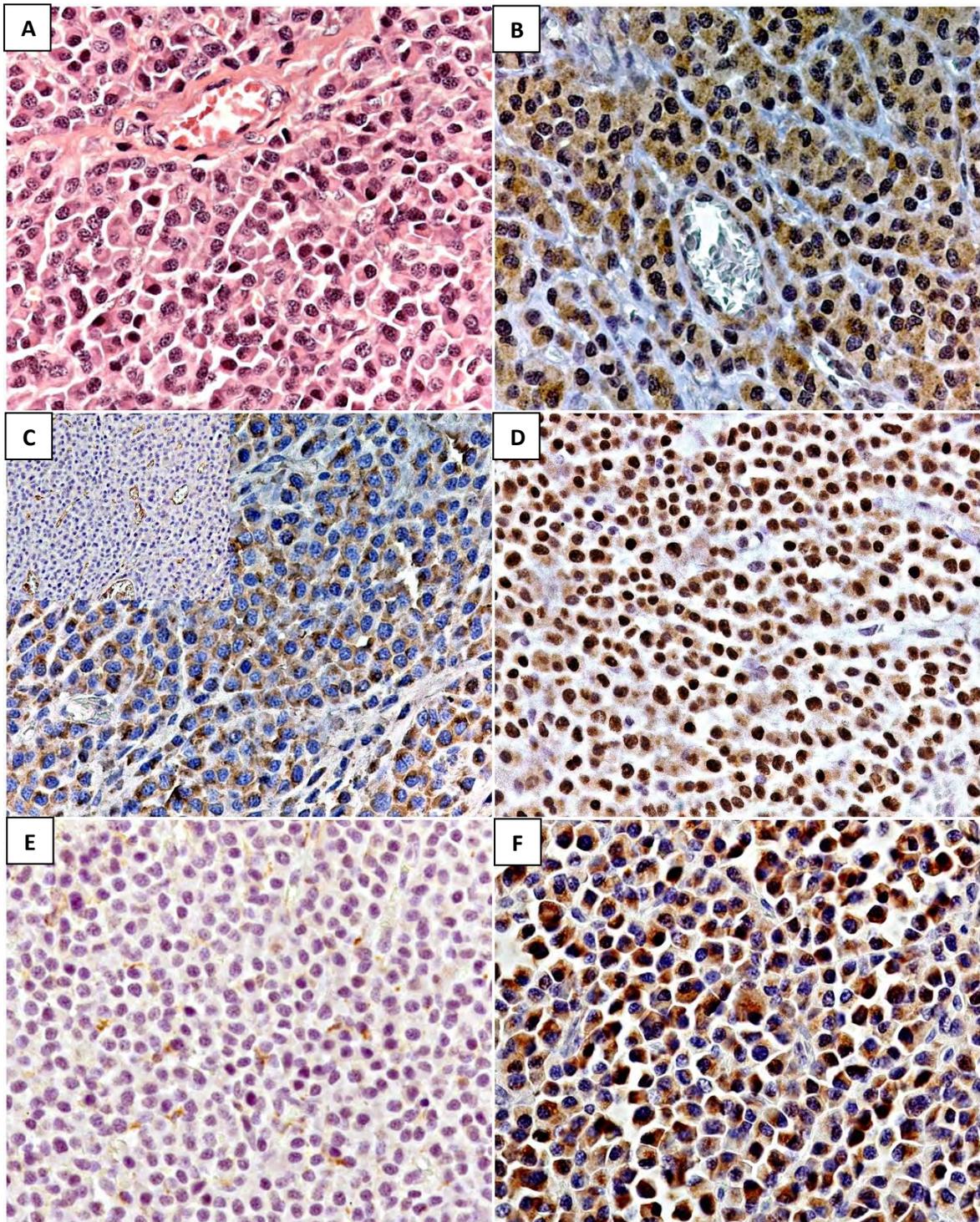


Figura 11. Pele, cão. Imunofenótipo de um PEMC do tipo maduro. A) Células neoplásicas semelhantes a plasmócitos morfologicamente normais. H.E., obj.63x. B) Células neoplásicas com membrana e citoplasma moderadamente imunocorados. IHQ, CD79a, obj.63x. C) Células neoplásicas com citoplasma fortemente imunocorado. IHQ, cadeia leve λ de imunoglobulina, obj.63x. – Detalhe para imunocoloração negativa para cadeia leve κ de imunoglobulina no canto esquerdo superior. D) Células neoplásicas com núcleo e citoplasma fortemente e moderadamente imunocorados, respectivamente. IHQ, MUM1, obj.63x. E) Células neoplásicas são imunonegativas. IHQ, molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1 (Iba1). F) Células neoplásicas com membrana e citoplasma fortemente imunocorados. IHQ, CD123, obj.63x.

Dos vinte e sete HCCs, um apresentou fraca marcação de membrana e citoplasma e vinte e seis apresentaram forte marcação de membrana e citoplasma para Iba1. Todos HCCs foram negativos para a expressão dos antígenos CD79a, CD3, MUM1, CD123 e cadeias leves λ e κ

de imunoglobulina. Os dois SHCs apresentaram forte marcação de membrana e citoplasma para Iba1 e CD123, além de fraca a moderada marcação citoplasmática intermitente para cadeias leves λ e κ de imunoglobulina. Todos SHCs foram negativos para a expressão dos antígenos CD79a, CD3 e MUM1 (Figura 12 A-F).

Um dos dois *cores* de MCC caiu da lâmina de TMA imunocorada com o marcador CD123. O *core* presente na lâmina teve forte marcação citoplasmática difusa nas células neoplásicas para CD123 (Anexo D). Os dois MCC foram negativos para todos os outros marcadores (CD79a, CD3, MUM1, Iba1 e cadeias leves λ e κ de imunoglobulina). A neoplasia de células redondas indiferenciada, foi imunonegativa para todos os anticorpos testados nesse estudo, assim como as duas amostras de melanoma.

A amostra de mieloma múltiplo apresentou moderada marcação difusa do citoplasma e membrana para o antígeno CD123, raras células neoplásicas tiveram marcação citoplasmática para cadeia leve κ de imunoglobulina e todas foram imunonegativas para MUM-1, CD79a, cadeia leve λ de imunoglobulina, CD3 e Iba1, entretanto, cabe ressaltar que essa amostra passou por processo de desmineralização óssea.

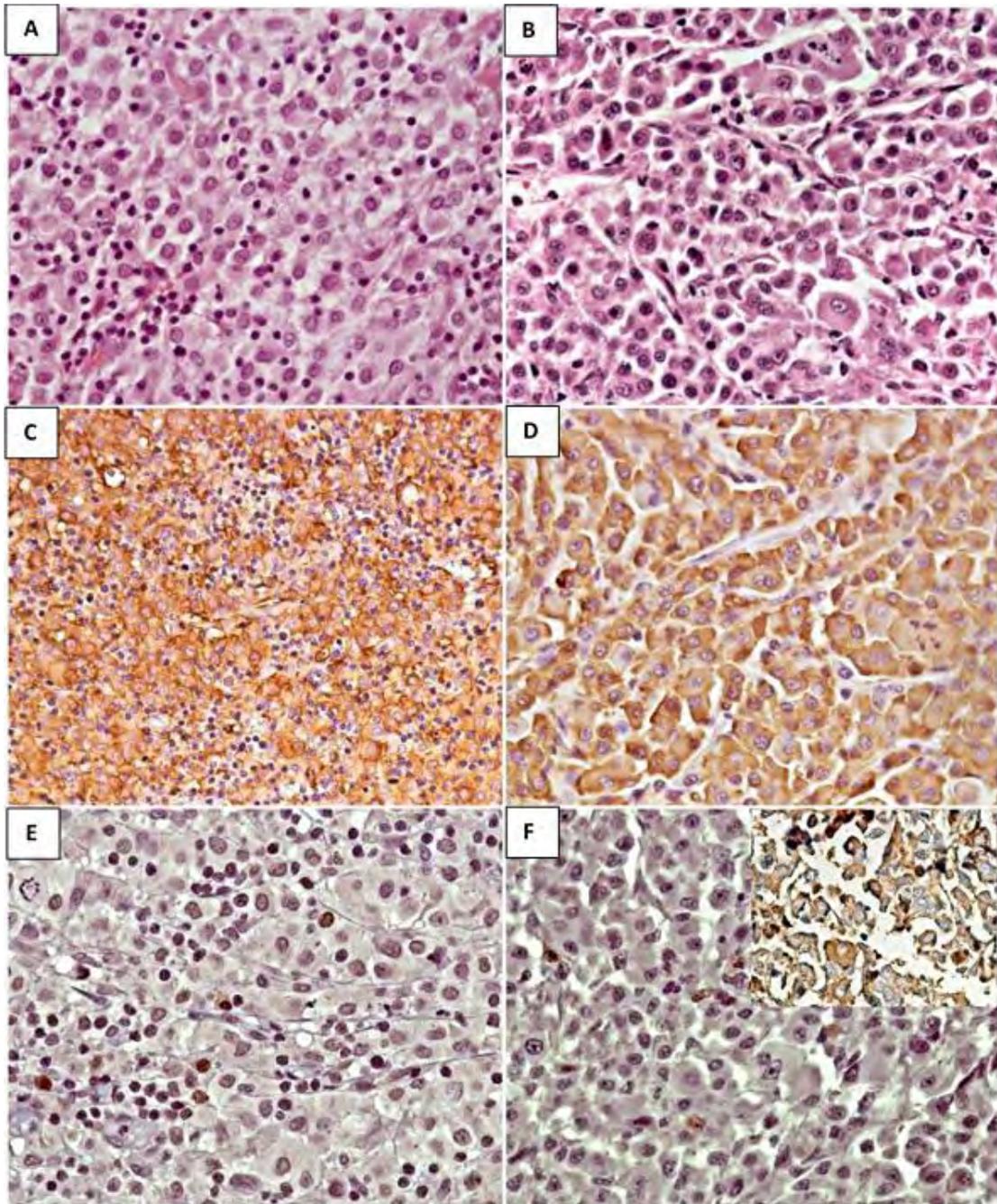


Figura 12. Imunofenótipo em HCC e SHC. Pele e baço, cão. **A)** Histiocitoma cutâneo. Manto de células neoplásicas redondas com morfologia histiocítica infiltrado por moderado número de pequenos linfócitos. H.E., obj.63x. **B)** Sarcoma histiocítico (metastático). Folhas dérmicas de células neoplásicas redondas com moderada anisocitose, anisocariose, binucleação e nucléolo proeminente. H.E., obj.63x. **C)** Histiocitoma cutâneo. As células neoplásicas têm uma forte imunomarcção de membrana. IHQ, Iba1, obj.40x. **D)** Sarcoma histiocítico (metastático). As células neoplásicas têm uma forte imunomarcção de membrana. IHQ, Iba1, obj.63x. **E)** Histiocitoma cutâneo. As células neoplásicas são imunonegativas e células plasmocitoides maduras e imaturas infiltradas são fortemente positivas com marcação nuclear e citoplasmática. IHQ, antígeno do mieloma múltiplo 1 / fator regulador de interferon 4 (MUM1 / IRF-4), obj.63x. **F)** Sarcoma histiocítico (metastático). As células neoplásicas são imunonegativas. IHC para MUM1 / IRF-4, obj.63x. Detalhe canto superior direito: forte imunomarcção citoplasmática e de membrana para CD123, obj.100x.

Dois, dos quatro linfomas não epiteliotrópicos, ambos de células T (CD3+) apresentaram forte marcação intranuclear difusa para o antígeno MUM-1 (Figura 13 A- D). Estas foram as únicas neoplasias além dos PEMCs que apresentaram expressão do antígeno

MUM-1. Os seis casos de linfomas T e, os dois casos de células B, foram negativos para Iba1, CD123 e cadeia leves λ e κ de imunoglobulina.

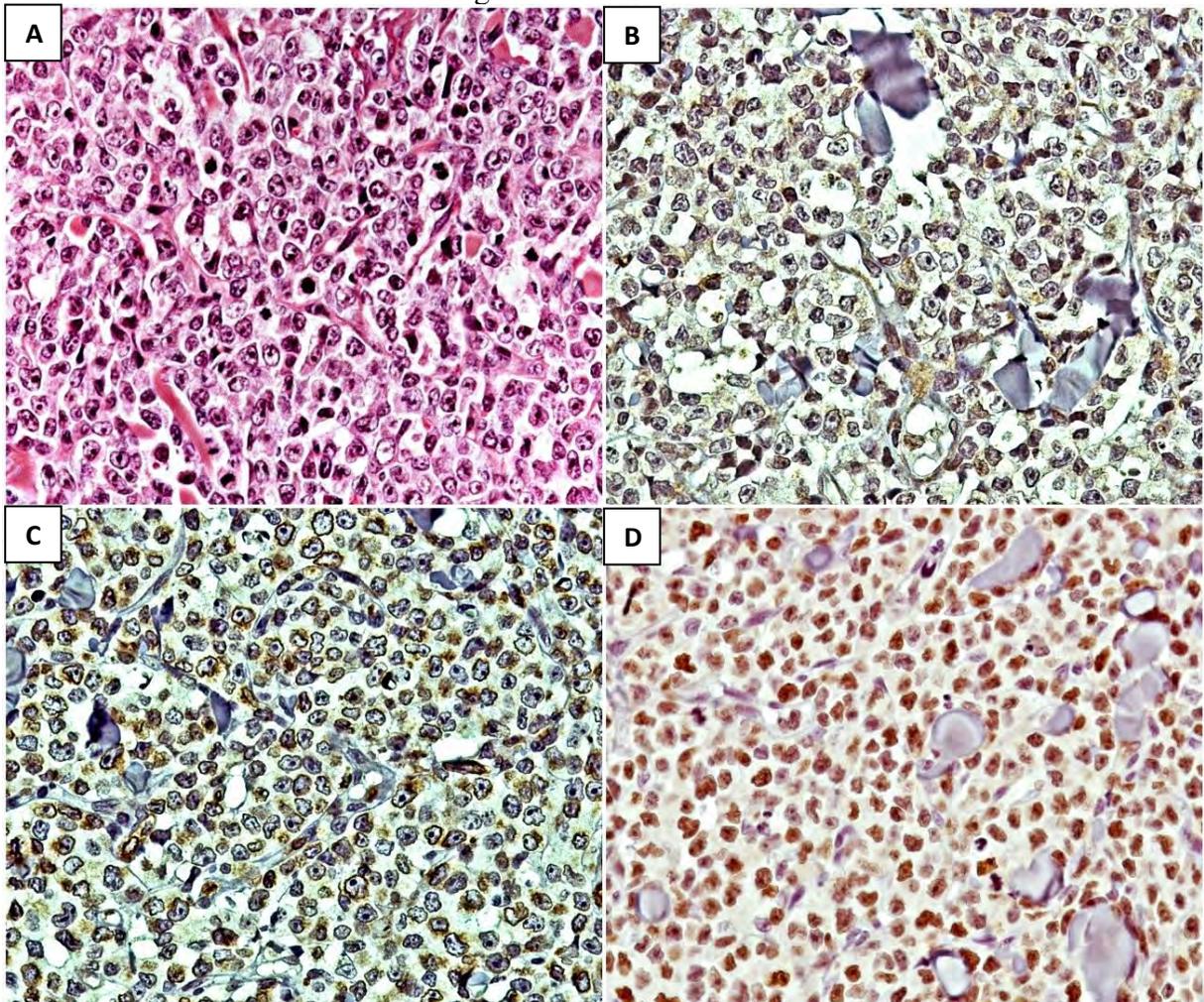


Figura 13. Pele, cão. Linfoma cutâneo (não epiteliotrópico) de grandes células T. A) Densa população de células neoplásicas redondas com citoplasma escasso, núcleo de contorno irregular, com cromatina esparsa e um ou mais nucléolos proeminentes. H.E., obj.63x. B) As células neoplásicas são imunonegativas. IHQ, CD79a, obj.63x. C) As células neoplásicas apresentam discreta a moderada marcação de membrana. IHQ, CD3, obj.63x. D) Células neoplásicas com núcleo fortemente imunocorado. IHQ, MUM1, obj.63x.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, as formas histológicas de PEMCs com células predominantemente do tipo clivadas e monomorfolísticas foram as mais comuns e o tipo hialino o menos frequente, o que está de acordo com o relatado na literatura para PEMCs, apesar do segundo tipo ser considerado e introduzido em uma série de casos mais recente (PLATZ et al., 1999; CANGUL et al., 2002). Um arranjo incomum de PEMCs em forma de estrutura folicular ou acinar foi observada em uma amostra (1/39). Esse arranjo com aspecto epitelióide pseudoglandular implica em considerar os PEMCs no diagnóstico diferencial de neoplasias epiteliais e epitelióides (MCHALE et al., 2018). A deposição de amiloide em PEMCs é observada em menos de 10% dos casos (ROWLAND et al., 1991), portanto, nesta série de casos, a deposição de amiloide em 7,7% das amostras (ou 3/39) está de acordo com a literatura, assim como a ocorrência de metaplasia condroide com e sem mineralização nas áreas de deposição amiloide (RAMOS-VARA et al., 1998) que foi observada em 2 de 3 casos de PEMCs.

Verificamos que em uma das amostras estudadas havia células neoplásicas no lúmen de vênulas, o que não deve estar associado a um prognóstico ruim, pois em um estudo que abrangia 134 amostras de plasmocitomas cutâneos caninos verificou-se a presença de células neoplásicas intravasculares em 16% dos casos, embora esse fato não tenha se correlacionado com índice de recidiva ou metástases (EHRENSING, CRAIG, 2018). Apesar de não termos feito um estudo de acompanhamento clínico dos animais com lesões neoplásicas, já é bem conhecido o comportamento benigno da maioria dos PEMCs, com índice de recidiva e metástase em torno de 5% e 2%, respectivamente (VAIL, WITHROW, 2007). No Rio de Janeiro, contudo, entre 1993 e 2000, verificou-se uma inusual agressividade nos PEMCs, com recidivas e metástases frequentes e sobrevida de poucos meses, embora a morfologia microscópica dessas neoplasias não diferisse da dos casos clássicos; a partir de então a agressividade passou a diminuir paulatinamente, até que hoje seu comportamento equivale ao descrito para os PEMCs de outras partes do mundo (Peixoto 2018 – comunicação pessoal).

Hoje, o patologista veterinário além de estar familiarizado com as seis variantes morfológicas celulares do PEMC (PLATZ et al., 1999; CANGUL et al., 2002) que raramente pode apresentar característica eritrofagocítica (YEARLEY et al., 2007) ou pigmento férrico intracitoplasmático (RANNOU et al., 2009), também deve reconhecer as variantes da arquitetura deste tumor que pode apresentar arranjo pseudoglandular, deposição de amiloide com ou sem diferenciação condroide, osteoide e mineralização, além de invasão vascular.

Posto que a informação da idade não estivesse disponível para todos os casos estudados, a idade média dos vinte e cinco casos em que este dado estava disponível foi de 9,1 anos, semelhante à média de 9,4 anos relatada na literatura (CLARK et al., 1992). Os locais mais comuns foram dígito/coxim (9/27) e a orelha (7/27), dados semelhantes à literatura onde os sítios mais comuns são dígitos, lábios e orelhas (BAER et al., 1989).

Com base em amostras características de PEMCs e HCCs verificou-se que a média de idade de 9,1 anos dos animais com PEMCs foi maior do que a média de idade de 4 anos dos cães com HCCs como consta na literatura (GROSS et al., 2005). Entretanto, animais jovens com quatro anos apresentaram PEMC e animais mais velhos com doze anos apresentaram HCC, o que indica que a idade pode ser um fator diferencial, embora, não exclusivo entre essas duas neoplasias.

Apesar do diagnóstico de PEMC rotineiramente ocorrer sem dificuldades, em alguns casos podem surgir dúvidas quanto à linhagem celular da neoplasia, tendo em vista sua ampla variação morfológica e seus locais de maior ocorrência que a tornaram diagnóstico diferencial de uma série de neoplasias como histiocitoma, linfossarcoma, sarcoma histiocítico e melanoma amelanótico (RAMOS-VARA et al., 2007; RANNOU et al., 2009, PAŹDZIOR-CZAPULA et al., 2015). Tal fato é constatado por estudo da renomada Universidade de Cornell, que mostrou

diagnósticos discordantes de segunda opinião em PEMCs com sarcoma pouco diferenciado, sarcoma histiocítico e linfoma (REGAN et al., 2010). Outro estudo também demonstrou que o PEMC pode ser erroneamente diagnosticado como histiocitoma e sarcoma histiocítico (PAŹDZIOR-CZAPULA et al., 2015). De fato, ao examinar as amostras no presente estudo, em algumas poucas foi relativamente difícil diferenciar PEMCs de HCCs, assim como poucas foram excluídas da seleção dos casos por deixarem em dúvida a sua linhagem (linfoide dos PEMCs ou dendrítica dos HCCs e SHCs).

O oncogene do mieloma múltiplo 1 / fator regulador de interferon 4 (MUM1/IFR4), está envolvido na diferenciação de células linfoides (GAIDANO, CARBONE et al., 2000). Ele é necessário para o rearranjo da cadeia leve da imunoglobulina no estágio pré-B (LU et al., 2003) e é expresso em um subconjunto de células B do centro germinativo, plasmócitos, células T ativadas (FALINI et al., 2000; COLOMO et al., 2003; BRIGHENTI et al., 2005) e em um subconjunto de macrófagos e células dendríticas humanas (SUZUKI et al., 2004). Por outro lado, macrófagos murinos normais expressam níveis de transcritos do MUM 75% mais baixos do que linfócitos B (MARECKI et al., 1999). Foi demonstrado que a superexpressão MUM1 em macrófagos ativa a interleucina 1 (MARECKI et al., 1999), promove a diferenciação de monócitos em células dendríticas (LEHTONEN et al., 2005) e modula a produção de IL 10 e IL33 para promover a diferenciação de células Th2 (WILLIAMS et al., 2013).

Em neoplasias caninas, a detecção da expressão do antígeno MUM1, a partir de metodologias imuno-histoquímicas distintas, tem apresentado resultados controversos na literatura, pois, em um estudo com ampla amostragem de muitas neoplasias de diversas linhagens, a expressão do antígeno MUM1 foi detectada em 101/107 (ou 94,39%) PEMCs e em nenhum dos 17 HCCs e 7 SHCs testados, sendo as únicas neoplasias positivas para a expressão deste anticorpo os PEMCs e linfomas de células B 10/47 (ou 21,2%) (RAMOS-VARA et al., 2007). Por outro lado, em outro estudo verificou-se a expressão do antígeno MUM1 em todos os vinte casos de HCCs e nos dez casos de PEMCs e em nenhum dos cinco SHCs testados, indicando que, embora o PEMC não seja frequentemente um desafio diagnóstico, a expressão do MUM1 deve ser usada com cautela ou em conjunto com outros marcadores para diferenciar as neoplasias de células redondas pouco diferenciadas, principalmente o HCC do PEMC (STILWELL, RISSI, 2018).

No presente estudo, a metodologia e anticorpo empregados para detecção da expressão do MUM1 foram basicamente os descritos no trabalho de Ramos-Vara e colaboradores (2007), com ressalvas à marca do polímero do sistema de detecção (ImmPRESS® versus REVEAL®). Houve reprodução dos resultados, tendo em vista que nas amostras de tecidos inteiros 25/26 (ou 93,1%) dos PEMCs foram positivos para expressão de MUM1 e nos *cores* de 2mm avaliados em duplicata no TMA 34/38 (ou 89,5%) foram imunomarcados. Também não observamos imunomarcagem com MUM1 em nenhum dos 27 HCCs e 2 SHCs, a exemplo do que observaram RAMOS-VARA et al. (2007). Essa observação reforça a importância de que a metodologia da IHQ exposta nos trabalhos seja clara e capaz de ter seus resultados reproduzidos, pois os anticorpos estão entre as ferramentas mais usadas na pesquisa científica básica (UHLEN et al., 2016).

As diferenças de resultados encontradas na literatura para a imunomarcagem com MUM1 certamente ocorreram por mudanças nos métodos de IHQ, com a mudança do anticorpo de camundongo para o de coelho, no pH da recuperação antigênica de alto para baixo e no método de detecção com polímero livre de biotina para complexo-avidina-biotina (ABC). Nesse contexto, o fato de a literatura mais recente demonstrar a expressão do antígeno MUM1 em HCCs pode estar relacionado a uma possível maior afinidade e sensibilidade ou até mesmo, menor especificidade do anticorpo utilizado (STILWELL, RISSI, 2018). Por outro lado, como houve diferenças em diversas etapas do processo, outros fatores isolados ou não, podem ter contribuído para a marcação do MUM1 em HCCs, uma vez que o método ABC além de poder

ser menos sensível do que o método de revelação com polímero livre de biotina, ainda é passível de apresentar elevada reação de fundo por ligações eletrostáticas inespecíficas e a lectinas teciduais (RAMOS-VARA, 2005). A mudança do pH alto por um pH baixo da solução utilizada na recuperação antigênica pelo calor, também pode contribuir para a diferença de resultados (SHI et al., 1995).

Em adição, o anticorpo MUM1 foi positivo em duas das seis amostras de linfomas de células T, testadas em seções de tecidos inteiros e em duplicatas de TMA, com o mesmo método e, as mesmas lâminas em que havia os *cores* de todas as neoplasias inclusas nesse estudo. De nosso conhecimento, este é o primeiro relato de detecção imuno-histoquímica de expressão do antígeno MUM1 em linfomas de células T de cães.

Na validação do anticorpo MUM1 para diagnóstico de PEMCs, Ramos-Vara e colaboradores (2007), não observaram expressão do antígeno MUM1 em nenhum dos trinta e sete linfomas de células T caninos. Por outro lado, nenhuma das duas amostras de linfomas de células B presentes em nossa série apresentou imunomarcagem com MUM1, diferentemente das 10 amostras de linfomas de células B (de 47 ou 21.2%) que foram imunopositivas para esse marcador no estudo de Ramos-Vara e colaboradores (2007), esse resultado provavelmente ocorreu pela baixa amostragem de linfomas de células B em nosso estudo.

Em contrapartida, na medicina humana, o anticorpo MUM1 é normalmente expresso em plasmócitos, células B tardias, células T ativadas, macrófagos e células dendríticas e sua expressão também foi descrita em várias neoplasias de células B e em algumas neoplasias de células T, além de neoplasias melanocíticas (NATKUNAM et al., 2001; SUZUKI et al., 2004; HUANG et al., 2015).

O CD79 é uma molécula de membrana heterodimérica composta pelos segmentos CD79a e CD79b, que está associada a imunoglobulinas de membrana das células B, constituindo uma das subunidades do receptor de células B (BCR). Além do segmento de membrana, apresenta uma região intracitoplasmática substancial para transdução de sinais do BCR quando ligado ao antígeno e, é expresso, desde fases precoces da linhagem de células B (estágio pré-B) podendo ainda ser detectado no estágio mais diferenciado dessas células – os plasmócitos (MASON et al., 1999). Com relação à marcação dos PEMCs para CD79a, 30/39 amostras aqui estudadas foram positivas (ou 76,9%), porcentagem diferente dos 56,2% presentes na literatura de referência para IHQ de PEMCs (RAMOS-VARA et al., 2007). A literatura relativa aos PEMCs apresenta dados variáveis; cerca de 80% dessas neoplasias podem expressar o antígeno CD79a de acordo com outro estudo envolvendo 17 casos e, não obstante, apenas 20 a 60% dos plasmócitos normais presentes em linfonodos caninos com plasmocitose são imunocorados com CD79a, possivelmente por diferenças fisiológicas que envolvem a expressão dessa molécula ou por diferenças intrínsecas na recuperação antigênica não uniforme (SCHRENZEL et al., 1998). Por outro lado, em humanos, a expressão do CD79a é observada em mais de 60% dos plasmocitomas extramedulares e na maioria dos mielomas múltiplos (KREMER et al., 2005).

Um plasmócito normal produz apenas um tipo de cadeia leve (kappa ou lambda) de imunoglobulina e a maioria das espécies domésticas, inclusive os cães, são lambda dominantes numa proporção de 9 plasmócitos produtores de imunoglobulinas com cadeias leves lambda para 1 plasmócito produtor de cadeias leves kappa (ARUN et al., 1996). No presente estudo, avaliou-se a expressão do antígeno de cadeias leves lambda e kappa de imunoglobulina em todas as neoplasias apenas em *cores* únicos de tecidos de 2mm no TMA. Apenas 21/35(ou 60%) dos PEMCs foram imunocorados para cadeias leves lambda de imunoglobulina e nenhuma amostra de PEMC apresentou imunomarcagem para cadeias leves kappa.

A imunomarcagem restritiva a cadeias leves lambda de imunoglobulina vai de encontro com a dominância de expressão fisiológica de cadeias leves lambda por plasmócitos caninos (ARUN et al., 1996). Há diversas hipóteses para 40% das amostras serem imunonegativas para

cadeias leves de imunoglobulinas. Como a avaliação foi realizada apenas nos *cores* de amostras únicas de TMA, é possível que em um padrão de marcação não uniforme/multifocal na amostra convencional, a área presente no core ser justamente a não marcada. A literatura, porém, registra que amostras de PEMCs imunonegativas para cadeias leves de imunoglobulina é variável em 6,9% (BRUNNERT, ALTMAN, 1991) a 60% (DAY, 1995). Esse resultado pode estar relacionado a fixação em formalina por tempo prolongado, a não produção de imunoglobulinas (BRUNNERT, ALTMAN, 1991), a produção apenas de cadeias pesadas de imunoglobulinas (HOENIG, 1987) e a falhas na recuperação antigênica (RAMOS-VARA, 2005).

Além dos PEMCs, os dois casos de SHCs tiveram fraca a moderada marcação tanto para cadeias leves lambda quanto para cadeias leves kappa de imunoglobulina, resultado não surpreendente, uma vez que, apesar dos avanços no diagnóstico dos plasmocitomas caninos se basearem principalmente na demonstração de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, esses marcadores, embora sensíveis, podem ter baixa especificidade devido à adsorção inespecífica de imunoglobulinas nas superfícies celulares, internalização de imunoglobulinas-opsoninas por fagócitos e ligação de imunoglobulinas a vários tipos de células via receptores Fc (SCHRENZEL et al., 1998).

O CD3 é um hexâmero de moléculas de sinalização do receptor de células T (TCR) que é essencial para o desenvolvimento e ativação dos linfócitos T e das respostas imunes a antígenos estranhos por essas células. No presente estudo, como esperado, nenhum dos PEMCs apresentou células neoplásicas imunocoradas com CD3, apesar de haver na literatura um caso de plasmocitoma gástrico canino com expressão aberrante de CD3 e marcação concomitante para CD79a e MUM1 (EHRENSING, CRAIG, 2018). Em uma análise empírica verificamos uma quantidade muito maior de linfócitos CD3 positivos infiltrados nos histiocitomas (aparentemente em regressão ou não) do que nos plasmocitomas, mas a infiltração de células T em HCCs é bem conhecida (MOORE et al., 1996) e em eventuais casos de dúvidas entre o diagnóstico de PEMC e HCC não esclarecidas pelo painel imuno-histoquímico convencional, a análise do escore de células CD3+ infiltradas nos tumores poderia ser explorada e investigada.

No nosso conhecimento, este é o primeiro relato de detecção imuno-histoquímica do CD123 em plasmocitomas e outros tumores de células redondas caninos. O CD123 corresponde a cadeia α do receptor de interleucina 3 (RIL-3) (MORETTI et al., 2001). O RIL-3 é um heterodímero composto por uma cadeia α única de baixa afinidade (CD123) e uma cadeia β (CD131) que é comum ao receptor IL-5 e ao receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (MIYAJIMA et al., 1993). A IL-3 é produzida por células T e NK ativadas (KURZROCK, 2003) e quando ligada ao seu receptor, promove a sobrevivência celular, estimula a proliferação e evita a morte celular por apoptose (HARA, MIYAJIMA, 1996).

No estudo piloto, todos os sete PEMCs foram positivos para CD123 nas amostras convencionais. Por outro lado, dos cinco *cores* correspondentes presentes na lâmina de TMA, quatro não tiveram o mesmo resultado, isto é, foram negativos. Esse resultado no TMA foi interpretado como falso negativo, uma vez que a marcação dessas amostras era heterogênea nas seções inteiras dos tecidos, portanto, as áreas presentes no TMA correspondiam as áreas do tumor não imunocoradas nos cortes convencionais e, possivelmente, se o estudo para este marcador no TMA fosse feito em duplicata, haveria menos resultados falso negativos e o índice de perda de amostras seria menor. Contudo, mesmo com a evidente submarcação no TMA, ao todo, 13 de 36 (ou 36,1%) *cores* de PEMCs apresentaram forte expressão do antígeno CD123 na IHQ e houve marcação em todos os tipos morfológicos de PEMCs.

Embora a submarcação no TMA tenha impedido uma análise mais criteriosa quanto à porcentagem real de tipos morfológicos imunocorados para CD123, ao juntar o resultado da marcação dos sete casos imunopositivos do estudo piloto com os doze novos casos positivos no

TMA, dezenove amostras foram imunomarcadas. Destas, 7 eram do tipo clivado, 5 do tipo maduro, 4 do tipo polimorfoblástico, 1 do tipo assincrônico, 1 do tipo monomorfoblástico e 1 do tipo hialino. Esse resultado, em parte, pode estar associado ao maior número de casos do tipo clivado (12), maduro (7) e polimorfoblástico (7); entretanto, o tipo monomorfoblástico com nove amostras, cursou com apenas um caso positivo, o que pode indicar um possível menor escore de células positivas para este tipo morfológico de PEMC ou até mesmo um maior índice real de casos negativos.

Devido ao fato do CD123 ser superexpresso em células dendríticas plasmocitoides e também na neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas humanas (BUELENS et al., 2002), foi levada em consideração a hipótese dos PEMCs serem de linhagem dendrítica linfóide (células dendríticas plasmocitoides), todavia, em humanos, as células dendríticas plasmocitoides são negativas para marcadores convencionais de células B, células T e células mielóides ou mielomonocíticas, como CD3, CD11c, CD20, CD34, CD79a, lisozima e mieloperoxidase (SALVA et al., 2014). Além disso, a própria literatura demonstra que há dificuldade em se fechar um painel específico para essas células, uma vez que, os marcadores utilizados, inclusive o CD123, são expressos por outros tipos celulares neoplásicos ou não, entretanto parece que o marcador CD303, quando expresso, pode ser restrito à linhagem de células dendríticas plasmocitoides (BOIOCCHI et al., 2013).

Atualmente, com base no que se conhece na literatura veterinária, é praticamente consenso de que os PEMCs são originários de células B e que mais não seriam do que uma variante de neoplasias plasmocitárias, mesmo porque há relatos de sua evolução para mieloma múltiplo, tanto em humanos, quanto em cães.

É importante ter-se em mente, contudo, que não só há muitos dados controversos e aspectos obscuros referentes aos PEMC, sobretudo no que diz respeito à epidemiologia, à morfologia e à imunofenotipagem, como também nada se sabe acerca da morfologia e fisiologia das células dendríticas plasmocitoides em cães; a possibilidade de os PEMC serem originários ou constituídos por células dendríticas plasmocitoides neoplásicas deveria ser investigada (PEIXOTO, FRANÇA, 2020, comunicação pessoal) em função das seguintes constatações :

- 1) Células dendríticas plasmocitóide em humanos podem apresentar duas faces: plasmocitóide e dendrítica (SOU MELIS, LIU, 2006). De fato, em humanos discute-se a dificuldade de reconhecê-la devido a sua plasticidade morfológica, funcional e imunofenotípica.
- 2) Em camundongos, as células dendríticas plasmocitoides expressam o antígeno B220, um marcador de células pré-B e B maduras (ALCULUMBRE et al., 2019).
- 3) A estreita ligação na histogênese entre as células dendríticas plasmocitoides e a linhagem de células B, de vez que uma subpopulação de células dendríticas plasmocitoides humanas e murinas são originadas a partir de precursores linfóides B.
- 4) Independentemente da(s) célula(s) específica(s) que dão origem aos PEMC(s), ou a sua contraparte humana (plasmocitoma extramedular), as diferenças epidemiológicas e clínicas dessa neoplasia em relação aos mielomas indicam a necessidade de melhor estudarem-se esses aspectos.

Por fim, deve ser considerado que as células dendríticas plasmocitoides de ratos expressam o gene de ativação de recombinação (RAGs) e abrigam o rearranjo de IgH D-J, uma característica de células de linhagem B (revisado por ALCULUMBRE et al., 2019). Dessa forma, estudos morfológicos (histológicos e ultraestruturais) e imuno-histoquímicos (emprego de outros anticorpos como CD303, CD4 e CD56, entre outros) adicionais deveriam ser realizados para a melhor caracterização da célula dendrítica plasmocitóide em cães. Inclusive

para verificar se esta célula em cães apresenta papel tão importante como em neoplasias, autoimunidade, alergia e infecções víricas humanas (ALCULUMBRE et al., 2019).

Outro fator que refutaria a possibilidade de os PEMCs serem de linhagem dendrítica plasmocitoide com base na marcação pelo CD123, é que as células não neoplásicas com morfologia plasmocitoide, apresentaram forte marcação citoplasmática para o antígeno CD123. Estas células foram interpretadas como plasmoblastos, pró-plasmócitos e plasmócitos maduros pois, além da morfologia característica, localizavam-se majoritariamente nos cordões medulares do linfonodo e nos cordões esplênicos, locais reconhecidos fisiologicamente como de plasmócitos e seus precursores (FOOKSMAN et al., 2010). Além da morfologia e locais fisiológicos de plasmócitos, essas células expressaram fortemente um imunofenótipo condizente com a linhagem linfoide-plasmocítica CD79+, MUM1+, cadeia leve kappa ou lambda de imunoglobulina +, CD3-, Iba1- (KYRIAZIDOU et al., 1989; RAMOS-VARA et al., 2007; STILWELL, RISSI, 2018). Por outro lado, as células dendríticas plasmocitoides humanas, apesar de circularem no sangue e nos órgãos linfoides e acumularem-se em infiltrados inflamatórios de determinadas enfermidades (CHEN et al., 2019), fisiologicamente estão localizadas em áreas timo-dependentes, no caso do linfonodo, na região paracortical (OLWEUS et al., 1997).

A surpreendente expressão do CD123 em plasmócitos e PEMCs, pode ter fundamentos que necessitam ser profundamente explorados. Sabe-se que a IL-3 está envolvida na proliferação e maturação de células B humanas (TADMORI et al., 1989; XIA, CHOI, 1992). Por outro lado, a detecção da expressão do CD123 através de citometria de fluxo em amostras de medula óssea humana, foi observada em precursores de células B (hematogônias) e em linfócitos B maduros CD19+, mas somente quando próximos a uma população de hematogônias (NAGWA et al., 2009). O CD123 é expresso em uma variedade de neoplasias hematológicas humanas como a neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide crônica, linfoma de Hodgkin e leucemia de células cabeludas (revisado por TESTA et al., 2014) e também em neoplasias humanas de mastócitos (PARDANANI et al., 2015), além de também ser positivo em basófilos murinos (TORRERO et al., 2009).

De outra forma, a existência de marcadores comuns a essas duas linhagens, não é tão surpreendente assim, uma vez que há, ao menos em parte, estreita ligação na histogênese entre as células dendríticas plasmocitoides e a linhagem de células B, tendo em vista que uma subpopulação de células dendríticas plasmocitoides humanas e murinas são originadas a partir de precursores linfoides B (REIZIS, 2019). Nesse cenário, assim como o CD123 pode ser um marcador comum a estágios do desenvolvimento de células B (NAGWA et al., 2009) e a células dendríticas plasmocitoides (BUELENS et al., 2002), outro antígeno, o SPI-B (um fator de transcrição), está envolvido na histogênese destas duas linhagens celulares. A indução da expressão do SPI-B em células progenitoras CD34+ humanas favorece o desenvolvimento de células dendríticas plasmocitoides e prejudica o desenvolvimento de células B, T e NK. De maneira diversa, a inibição do SPI-B em progenitores CD34⁺ resulta em uma forte inibição do desenvolvimento de células dendríticas plasmocitoides e estimula o desenvolvimento de células B e células mielóides CD14⁺ (SCHOTTE et al., 2004). Não obstante, em camundongos, o SPI-B é essencial para a expansão de células B dependente de antígeno, respostas imunes T dependentes e formação de centros germinativos (SU et al., 1997). O SPI-B também está envolvido no controle negativo da diferenciação de linfócitos B para plasmócitos e, é um marcador bastante sensível para neoplasias de células dendríticas plasmocitoides blásticas cutâneas humanas (MONTES-MORENO et al., 2013).

O motivo dos sarcomas histiocíticos terem apresentado imunomarcagem para o CD123 e os histiocitomas cutâneos não, pode estar relacionado ao fato das células dessas neoplasias terem origens em linhagens celulares dendríticas distintas, o que reflete em diferenças

fisiológicas e na expressão de moléculas (MOORE, 2014). No presente estudo, na lâmina de TMA, foi possível avaliar apenas uma amostra de MCC e duas de SHC para marcação do CD123. As duas linhagens neoplásicas apresentaram marcação citoplasmática para o referido antígeno, sendo de intensidade moderada no MCC e forte nos SHCs. Em virtude do reduzido número de casos de MCC e SHC testados, estudos futuros empregando este anticorpo também devem ser realizados nessas neoplasias.

O fato do MCC e dos SHCs apresentarem imunomarcagem com CD123, pode ter relação com a expressão do CD123 durante a diferenciação hemopoiética, pois há evidências de que esse receptor é expresso na maioria dos progenitores hemopoiéticos e sua expressão é rapidamente perdida durante a diferenciação eritróide e megacariocítica, moderadamente diminuída durante a diferenciação monocítica e é sustentada na linhagem granulocítica (TESTA et al., 1996; TESTA et al., 2014). A expressão do RIL-3 aumenta durante os estágios iniciais da diferenciação granulocítica e monocítica e é mantida até os estágios finais da maturação, enquanto na linhagem eritróide e megacariocítica é expresso transitoriamente apenas durante os estágios iniciais da diferenciação e posteriormente desaparecem (MILITI et al., 2000).

Acreditamos que é promissora a expressão do antígeno CD123 no PEMC, MCC e nos SHCs, uma vez que o CD123 vem sendo bastante estudado na medicina humana como biomarcador e alvo terapêutico para várias neoplasias hematológicas, inclusive, um medicamento composto por uma toxina da difteria geneticamente modificada fusionada com a IL-3, mostrou atividade eficaz e está em fase de testes clínicos para o tratamento de neoplasias hematológicas. Além deste medicamento, diferentes anticorpos monoclonais direcionados contra CD123 estão sendo avaliados como fármacos antileucêmicos, mostrando resultados promissores para o tratamento de leucemias (TESTA et al., 2019).

Notamos que em alguns casos houve marcação com CD123 de células endoteliais, principalmente as venulares, mas em um padrão heterogêneo. Esse resultado, vai de acordo com o padrão de expressão para esse marcador em tecidos humanos, uma vez que na medicina humana a expressão do CD123 parece ser bastante específica para células hematopoiéticas, mas também ocorre em subconjuntos de células endoteliais (EHNINGER et al., 2014), uma vez que atividade biológica da IL-3 não se limita apenas ao sistema hematopoiético, mas se estende também à linhagem endotelial, onde atua como estimulador da proliferação celular endotelial (BRIZZI et al., 1992).

O fato de PEMCs superexpressarem o CD123 que é uma subunidade do receptor de interleucina 3, pode corroborar com a hipótese de que a inflamação crônica está envolvida na patogênese dessa neoplasia em cães, uma vez que em um estudo observou-se que a maioria dos casos de plasmocitomas orais caninos apresentava indícios morfológicos de inflamação crônica leve persistente em suas adjacências e na imuno-histoquímica esse mesmo estudo demonstrou a presença de numerosas células T ativadas e macrófagos / células dendríticas infiltradas nos plasmocitomas (SCHRENZEL et al., 1998). Nesse contexto, sabe-se que a IL-3 é produzida principalmente por células T ativadas e promove a sobrevivência celular, estimula a proliferação e evita a morte celular por apoptose (HARA, MIYAJIMA, 1996).

De maneira geral, acreditamos que este trabalho com o marcador CD123 é apenas o início de um universo a ser explorado, tendo em vista que o estudo é pioneiro em neoplasias caninas e já apresenta resultados que podem direcionar diversas pesquisas futuras. Além disso, de maneira geral, os padrões de expressão do receptor de IL-3 alfa (CD123) nas células B normais e nas neoplasias precursoras de células B não estão totalmente caracterizados na literatura (HASSANEIN et al., 2009). A expressão do CD123 em plasmócitos normais, mastócitos e “histiócitos” neoplásicos no presente estudo, além de demonstrar que esse marcador, não é específico para células dendríticas plasmocitoides caninas, também pode fornecer uma base para a pesquisa de eventos normais na maturação de células B e da possível

expansão neoplásica mediada pela interleucina 3 em plasmocitomas, mastocitomas e sarcomas histiocíticos caninos.

O único estudo com o marcador CD123 em tecidos de animais domésticos que encontramos na literatura, evidencia a necessidade de se investigar a morfologia, fisiologia e o imunofenótipo de células dendríticas plasmocitoides caninas, uma vez que essas células foram investigadas quantitativamente em neoplasias mamárias caninas com base apenas no imunofenótipo CD123+ (ROSOLEM et al., 2015). Nesse contexto, pode ter havido uma sobrecontagem de células CD123+ por reação cruzada com plasmócitos ou seus precursores, ainda mais pelo fato do marcador utilizado no referido estudo ser policlonal. Além disto, caracterizar o imunofenótipo das células dendríticas plasmocitoides caninas, permitirá o estudo quantitativo destas células em doenças como o Lúpus eritematoso canino, em que estas células estão reconhecidamente envolvidas na patogênese da doença humana, são alvos de agentes farmacológicos que vêm sendo desenvolvidos e também servem como auxílio de diagnóstico e prognóstico da doença (CHEN et al., 2019). As células dendríticas plasmocitoides também são muito conhecidas como importantes mediadoras das respostas imunes antivirais por secretarem grandes quantidades de interferon do tipo 1 e, ao que parece, são essenciais para a diferenciação de plasmoblastos não secretores de imunoglobulinas em plasmócitos secretores de imunoglobulina em respostas antivirais (JEGO et al., 2003).

Por fim, ao menos em parte, esse estudo só foi possível de ser executado devido a técnica de TMA que além de permitir a análise de dezenas de amostras em uma única lâmina histológica, gerou economia de reagentes, redução de gastos, redução do tempo de análise e redução na variabilidade dos resultados. Apesar disso, em parte pela inviabilidade financeira que impediu a análise em duplicata para alguns marcadores gerou um número considerado de casos falso negativos, mas isso já é conhecido como o principal problema na aplicação dessa tecnologia, principalmente devido à heterogeneidade da maioria das seções tumorais (RAMOS-VARA, 2005). Mas de maneira geral, o TMA mostrou-se uma ferramenta bastante útil para a avaliação dos marcadores MUM e CD79a nas amostras de PEMCs e HCCs e os marcadores CD79a e CD3 nos linfomas caninos, pois o índice de correlação entre os resultados obtidos nas seções de tecidos convencionais e nos *cores* de 2mm em duplicata foi excelente (100%) para esses marcadores, certamente, pelo padrão de marcação difuso e uniforme nessas neoplasias. Embora nesses casos apenas um *core* de 2mm fosse suficiente para verificar a marcação, a duplicata foi importante para casos de perda de material durante as etapas da IHQ e para áreas onde um dos *cores* não apresentava tecido tumoral. Por outro lado, em neoplasias cuja imunomarcação não é uniforme, como o CD123 nos PEMCs a análise de amostras no TMA com apenas um *core* de 2mm não foi representativa, gerando grande número de casos falso negativos de acordo com o comparado no estudo piloto.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O anticorpo MUM1 é muito eficiente para detectar (positivo em 89,7% dos casos) e diferenciar PEMCs de neoplasias histiocíticas e é mais sensível e específico do que o CD79a para os PEMCs
- ✓ A análise dos marcadores CD79a e MUM1 em *cores* duplos de 2mm no TMA teve 100% de correlação com os resultados obtidos nos cortes histológicos convencionais de PEMCs e nos HCCs, assim como os anticorpos CD3 e CD79a para os linfomas, o que indica que o estudo desses marcadores através do TMA para essas neoplasias pode ser de grande valia, com bons resultados, economia de custos e recursos humanos.
- ✓ Linfomas de células T podem expressar MUM1, entretanto a incidência dessa expressão deve ser estudada em uma série maior de casos.
- ✓ A sensibilidade do anticorpo de cadeia leve lambda de imunoglobulina foi de 58,8% para detectar PEMCs em *cores* únicos de TMA.
- ✓ O anticorpo Iba1 é muito sensível (100%) e específico para HCCs e SHCs.
- ✓ Em uma análise preliminar, a sensibilidade do anticorpo CD123 para detectar PEMCs foi de 100% em seções de tecidos inteiros, mas o padrão de marcação é heterogêneo na maioria dos casos (6/7).
- ✓ Na análise de TMA com *cores* únicos de 2mm a sensibilidade do anticorpo CD123 para detecção de PEMCs foi de 37,1% com ocorrência de falso negativo em 5 de 6 amostras, o que indica que houve elevada submarcação.
- ✓ O CD123 é expresso por PEMCs, MCCs, SHCs, mas não em HCCs. A sensibilidade desse anticorpo para essas e outras neoplasias deve ser investigada em seções de tecidos convencionais, uma vez que houve grande submarcação nos *cores* de PEMCs presentes no TMA.
- ✓ O CD123 é expresso por plasmócitos normais caninos e provavelmente células dendríticas plasmocitoides. Células endoteliais de cães também expressam heterogeneamente esse marcador como ocorre em humanos.
- ✓ O anticorpo anti-CD123 precisa ser investigado nos tecidos normais e neoplásicos de cães, a fim de melhor caracterizar as células dendríticas plasmocitoides nessa espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCULUMBRE, S.; RAIELI, S.; HOFFMANN, C.; CHELBI, R.; DANLOS, F. X.; SOUMELIS, V. Plasmacytoid pre-dendritic cells (pDC): from molecular pathways to function and disease association. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2019. p. 24-35

ARUN, S. S.; BREUER, W.; HERMANNNS, W. Immunohistochemical examination of light-chain expression (λ/κ ratio) in canine, feline, equine, bovine and porcine plasma cells. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 43, n. 1-10, p. 573-576, 1996.

ATHERTON, M. J.; VAZQUEZ-SANMARTIN, S.; SHARPE, S.; WAUGH, E. M.; MORRIS, J. S. A metastatic secretory gastric plasmacytoma with aberrant CD3 expression in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 520-525, 2017.

BAER, K. E.; PATNAIK, A. K.; GILBERTSON, S. R.; HURVITZ, A. I. Cutaneous plasmacytomas in dogs: a morphologic and immunohistochemical study. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 3, p. 216-221, 1989.

BARTL, R.; FRISCH, B.; FATEH-MOGHADAM, A.; KETTNER, G.; JAEGER, K.; SOMMERFELD, W. Histologic classification and staging of multiple myeloma: a retrospective and prospective study of 674 cases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 87, n. 3, p. 342-355, 1987.

BOIOCCHI, L.; LONARDI, S.; VERMI, W.; FISOGNI, S.; FACCHETTI, F. BDCA-2 (CD303): a highly specific marker for normal and neoplastic plasmacytoid dendritic cells. **Blood**, v. 122, n. 2, p. 296-297, 2013.

BOOSTROM, B. O.; MOORE, A. S.; DEREGIS, C. J.; ROBAT, C.; FREEMAN, K.; THAMM, D. H. Canine cutaneous plasmacytosis: 21 cases (2005-2015). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1074-1080, 2017.

BOSTOCK, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 1, p.1-19, 1986.

BREUER, W.; COLBATZKY, F.; PLATZ, S.; HERMANNNS, W. Immunoglobulin-producing tumours in dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 109, n. 3, p. 203-216, 1993.

BREUER, W.; HERMANNNS, W. Classification of lymphohaemopoietic neoplasias (LHN) in dogs and cats. **European Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 5-20, 1998.

BRIZZI, M. F.; GARBARINO, G.; ROSSI, P. R.; PAGLIARDI, G. L.; ARDUINO, C.; AVANZI, G. C.; PEGORARO, L. Interleukin 3 stimulates proliferation and triggers endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 gene activation of human endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 6, p. 2887-2892, 1993.

BRUNNERT, S. R.; ALTMAN, N. H. Identification of immunoglobulin light chains in canine extramedullary plasmacytomas by thioflavine T and immunohistochemistry. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 3, p. 245-251, 1991.

- BUELENS, C.; BARTHOLOME, E. J.; AMRAOUI, Z.; BOUTRIAUX, M.; SALMON, I.; THIELEMANS, K.; WILLEMS, F.; GOLDMAN, M. Interleukin-3 and interferon β cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. **Blood**, v. 99, n. 3, p. 993-998, 2002.
- BURNETT, R. C.; VERNAU, W.; MODIANO, J. F.; OLVER, C. S.; MOORE, P. F.; AVERY, A. C. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 1, p. 32-41, 2003.
- CANGUL, I. T.; WIJNEN, M.; VAN GARDEREN, E.; VAN DEN INGH, T. S. G. A. M. Clinico-pathological aspects of canine cutaneous and mucocutaneous plasmacytomas. **Journal of Veterinary Medicine Series**, v. 49, n. 6, p. 307-312, 2002.
- CLARK, G. N.; BERG, J.; ENGLER, S. J.; BRONSON, R. T. Extramedullary plasmacytomas in dogs: results of surgical excision in 131 cases. **American Animal Hospital Association**, v. 28, p. 105-111. 1992.
- CONROY, J. D. Canine skin tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 19, n.1, p. 91-114, 1983.
- CORCORAN, L.; FERRERO, I.; VREMEC, D.; LUCAS, K.; WAITHMAN, J.; O'KEEFFE, M.; SHORTMAN, K. The lymphoid part of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 4926-4932, 2003.
- DAHL, C.; HOFFMANN, H. J.; SAITO, H.; SCHIØTZ, P. O. Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. **Allergy**, v. 59, n. 10, p. 1087-1096, 2004.
- DAY, M. J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, n. 1, p. 79-96, 1995.
- DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. Cytology of canine cutaneous round cell tumors: mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 6, p. 673-679, 1979.
- EHNINGER, A.; KRAMER, M.; RÖLLIG, C.; THIEDE, C.; BORNHÄUSER, M.; VON BONIN, M.; OELSCHLÄGEL, U. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. **Blood Cancer Journal**, v. 4, n. 6, p. 218-e218, 2014.
- EHRENSING, G.; CRAIG, L. E.; Intravascular neoplastic cells in canine cutaneous plasmacytomas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 2, p. 329-332, 2018.
- FANT, P.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; DE LORENZI, D.; BERTOLINI, G.; BETTINI, G.; MASSERDOTTI, C. Primary gastric histiocytic sarcoma in a dog—a case report. **Journal of Veterinary Medicine Series**, v. 51, n. 7-8, p. 358-362, 2004.
- FOOKSMAN, D. R.; SCHWICKERT, T. A.; VICTORA, G. D.; DUSTIN, M. L.; NUSSENZWEIG, M. C.; SKOKOS, D. Development and migration of plasma cells in the mouse lymph node. **Immunity**, v. 33, n.1, 118-127, 2010.

FUKUMOTO, S.; HANAZONO, K.; KAWASAKI, N.; HORI, Y.; HIGUCHI, S.; SASAKI, T.; UCHIDE, T. Anaplastic atypical myeloma with extensive cutaneous involvement in a dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 1, p. 111–115, 2012.

FUNDERBURG, M. R. Adenocarcinoma subsequent to extramedullary myeloma in a German shepherd dog. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, v. 72, p. 1185- 1188, 1977.

GEISEL, O.; STIGLMAIR-HERB, M.; LINKE, R. P. Myeloma associated with immunoglobulin lambda-light chain derived amyloid in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 5, p. 374-376, 1990.

GHADIALLY, F. N.; LOWES, N. R.; MESFIN, G. M. Atypical glycogen deposits in a plasmacytoma: an ultrastructural study. **The Journal of Pathology**, v. 122, n. 3, p. 157-162, 1977.

GOLDSCHMIDT, M. H. Dermal mesenchymal neoplasms of domestic animals. In: **Proc Annu Meet, Am Acad Vet Dermatol**, p. 1-23. Orlando, 1985.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Plasmocitoma cutâneo. In: GROSS T. L. **Doenças de pele do cão e gato: Diagnóstico Clínico e Histopatológico**. 2ª ed. Oxford: Blackwell Science, 2005, p. 866 – 872.

HARA, T.; MIYAJIMA, A. Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis. **Stem Cells**, v. 14, p. 605– 618, 1996.

HASSANEIN, N. M.; ALCANCIA, F.; PERKINSON, K. R.; BUCKLEY, P. J.; LAGOO, A. S. Distinct expression patterns of CD123 and CD34 on normal bone marrow B-cell precursors (“hematogones”) and B lymphoblastic leukemia blasts. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 132, n. 4, p. 573-580, 2009.

HOENIG, M. Multiple myeloma associated with the heavy chains of immunoglobulin A in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, p. 1191-2, 1987.

HOOD, L.; GRAY, W. R.; SANDERS, B. G.; DREYER, W. J. Light chain evolution. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1967. p. 133-146.

HUANG, W.; XIE, J.; XU, X.; GAO, X.; XIE, P.; ZHOU, X. MUM-1 expression differentiates AITL with HRS-like cells from cHL. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11372–11378, 2015.

JEGO, G.; PALUCKA, A. K.; BLANCK, J. P.; CHALOUNI, C.; PASCUAL, V.; BANCHEREAU, J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. **Immunity**, v. 19, n. 2, p. 225-234, 2003.

JONES, T. C.; HUNT, R. D. **Veterinary Pathology**, v. 5, p.41, 1983.

KIUPPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; HENDRICK, M. J. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast

cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, 147-155, 2011.

KREMER, M.; OTT, G.; NATHRATH, M.; SPECHT, K.; STECKER, K.; ALEXIOU, C.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; FEND, F. Primary extramedullary plasmacytoma and multiple myeloma: phenotypic differences revealed by immunohistochemical analysis. **The Journal of Pathology**, v. 205, p. 92–101, 2005.

KUPANOFF, P. A.; POPOVITCH, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H. Colorectal plasmacytomas: a retrospective study of nine dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, n. 1, p. 37-43, 2006.

KURZROCK, R. Interleukin-3. In: KUFEL, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM R. R. (editors). **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker, 2003.

KYRIAZIDOU, A.; BROWN, P. J.; LUCKE, V. M. An immunohistochemical study of canine extramedullary plasma cell tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v.100, n. 3, p. 259–266, 1989.

LESTER, S. J.; MESFIN, G. M. A solitary plasmacytoma in a dog with progression to a disseminated myeloma. **Canadian Veterinary Journal**, v. 10, p. 284-286, 1980.

LI, W.; YONG, J. L. Development of dendritic-cell lineages. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 741-750, 2007.

LUCKE, V. M. Primary cutaneous plasmacytomas in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1987.

MASON, D. Y.; CORDELL, J. L.; BROWN, M. H.; BORST, J.; JONES, M.; PULFORD, K.; JAFFE, E.; RALFKIAER, E.; DALLENBACH, F.; STEIN, H. CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. **Blood**, v. 86, n. 4, p. 1453–1459, 1995.

MAYER, M. N.; KERR, M. E.; GRIER, C. K.; MACDONALD, V. S. Immunoglobulin A multiple myeloma with cutaneous involvement in a dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 7, p. 694, 2008.

MCCLELLAND, R. B. Myelocytoma in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p. 96, 1940.

MCHALE, B.; BLAS-MACHADO, U.; OLIVEIRA, F. N.; RISSI, D. R. A divergent pseudoglandular configuration of cutaneous plasmacytoma in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 2, p. 260–262, 2018.

MIKIEWICZ, M.; PAŹDZIÓR-CZAPULA, K.; GESEK, M.; LEMISHEVSKYI, V.; OTROCKA-DOMAGAŁA, I. Canine and feline oral cavity tumours and tumour-like lesions: a retrospective study of 486 cases (2015–2017). **Journal of Comparative Pathology**, v. 172, p. 80-87, 2019.

MILITI, S.; RICCIONI, R.; PAROLINI, I.; SPOSI, N. M.; SAMOGGIA, P.; PELOSI, E.; TESTA, U.; PESCHLE, C. Expression of interleukin 3 and granulocyte–macrophage colony-

stimulating factor receptor common chain β_c , β_{IT} in normal haematopoiesis: lineage specificity and proliferation-independent induction. **British Journal of Haematology**, v. 111, n. 2, p. 441-451, 2000.

MIYAJIMA, A.; MUI, A. L.; OGOROCHI, T.; SAKAMAKI, K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. **Blood**, v. 82, p.1960–1974, 1993.

MONTES-MORENO, S.; RAMOS-MEDINA, R.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, A.; CORNEJO, C. B.; CUBILLOS, A. P.; QUINTANA-TRUYENQUE, S.; PINILLA, S. M. R.; PAJARES, R.; SANCHEZ-VERDE, L.; MARTINEZ-TORRECUDRADA, J.; RONCADOR, G.; PIRIS, M. A. SPIB, a novel immunohistochemical marker for human blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: characterization of its expression in major hematology neoplasms. **Blood**, v. 121, n. 4, p. 643–647, 2013.

MOORE, P. F. A review of histiocytic diseases of dogs and cats. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 167-184, 2014.

MOORE, P. F.; SCHRENZEL, M. D.; AFFOLTER, V. K.; OLIVRY, T.; NAYDAN, D. Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic Langerhans cell histiocytosis that expresses CD1 and specific beta 2-integrin molecules. **The American Journal of Pathology**, v. 148, n. 5, p. 1699–1708, 1996.

MORETTI, S.; LANZA, F.; DABUSTI, M.; TIEGHI, A.; CAMPIONI, D.; DOMINICI, M.; CASTOLDI, G. L. CD123 (interleukin 3 receptor alpha chain). **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 15, p. 98–100, 2001.

NATKUNAM, Y.; WARNKE, R. A.; MONTGOMERY, K.; FALINI, B.; RIJN, M. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. **Modern Pathology**, v. 14, n. 7, p. 686-694, 2001.

NICKOLOFF, B. J.; HILL, J.; WEISS, L.M. Canine neuroendocrine carcinoma. A tumor resembling histiocytoma. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 7, n. 6, p. 579-586, 1985.

OLWEUS, J.; BITMANSOUR, A.; WARNIKE, R.; THOMPSON, P.; CARABALLIDO, J.; PICKER, L. J.; LUND-JOHANSEN, F. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 23, p. 12551-12556, 1997.

PARDANANI, A.; LASHO, T., CHEN, D.; KIMLINGER, T. K.; FINKE, C.; ZBLEWSKI, D.; BROOKS, C. Aberrant expression of CD123 (interleukin-3 receptor- α) on neoplastic mast cells. **Leukemia**, v. 29, n. 7, p. 1605-1608, 2015.

PAŹDZIOR-CZAPULA, K.; ROTKIEWICZ, T.; OTROCKA-DOMAGAŁA, I.; GESEK, M.; ŚMIECH, A. Morphology and immunophenotype of canine cutaneous histiocytic tumours with particular emphasis on diagnostic application. **Veterinary Research Communications**, v. 39, n. 1, p. 7-17, 2015.

PELAYO, R.; HIROSE, J.; HUANG, J.; GARRETT, K. P.; DELOGU, A.; BUSSLINGER, M.; KINCADE, P. W. Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. **Blood**, v. 105, n. 11, p. 4407-4415, 2005.

PERLMANN, E.; DAGLI, M. L. Z.; MARTINS, M. C.; SIQUEIRA, S. A. C.; BARROS, P. S. M. Extramedullary plasmacytoma of the third eyelid gland in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 1, p. 102-105, 2009.

PLATZ, S. J.; BREUER, W.; PFLEGHAAR, S.; MINKUS, G.; HERMANN, W. Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 1, p. 23-27, 1999.

PLATZ, Stefan. **Plasmozytome Bei Hund Und Katze**. 1995. Tese de Doutorado. Ludwig-Maximilians-Universitat Munchen.

RAKICH P. M.; LATIMER, K. S.; WEISS, R.; STEFFENS, W. L. Mucocutaneous plasmacytomas in dogs: 75 cases (1980-1987). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 6, p. 803-810, 1989.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A.; PACE, L. W.; LINKE, R. P.; COMMON, R. S.; WATSON, G. L. Intestinal multinodular $\Lambda\lambda$ -amyloid deposition associated with extramedullary plasmacytoma in three dogs: Clinicopathological and immunohistochemical studies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, n. 3, p. 239-249, 1998.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A.; VALLI, V. E. O. Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79a and CD20. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 6, p. 875-884, 2007.

RAMOS-VARA, J. A.; TAKAHASHI, M.; ISHIHARA, T.; MILLER, M. A.; PACE, L. W.; CRAFT, D.; WATSON, G. L. Intestinal extramedullary plasmacytoma associated with amyloid deposition in three dogs: an ultrastructural and immunoelectron microscopic study. **Ultrastructural Pathology**, v. 22, n. 5, p. 393-400, 1998.

RANNOU, B.; HÉLIE, P.; BÉDARD, C. Rectal Plasmacytoma with Intracellular Hemosiderin in a Dog. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 6, p. 1181-1184, 2017.

REGAN, R.C.; RASSNICK, K. M.; BALKMAN, C. E.; BAILEY, D. B. MCDONOUGH, S. P. Comparison of first-opinion and second-opinion histopathology from dogs and cats with cancer: 430 cases (2001-2008). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, p. 1-10, 2010.

REIZIS, B. Plasmacytoid dendritic cells: development, regulation, and function. **Immunity**, v. 50, n. 1, p. 37-50, 2019.

ROSOLEM, M. C.; VASCONCELOS, R. O.; GARRIDO, E.; CASTANHEIRA, T. L.; MOREIRA, P. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAMOS, S. B. Immunodetection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in mammary carcinomas of female dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 906-912, 2015.

ROUT, E. D.; SHANK, A. M. M.; WAITE, A. H. K.; SIEGEL, A.; AVERY, A. C.; AVERY, P. R. Progression of cutaneous plasmacytoma to plasma cell leukemia in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 77-84, 2017.

ROWLAND, P. H.; LINKE, R. P. Immunohistochemical characterization of lambda light-chain-derived amyloid in one feline and five canine plasma cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 3, p. 390-393, 1994.

ROWLAND, P. H.; VALENTINE, B. A.; STEBBINS, K. E.; SMITH, C. A. Cutaneous plasmacytomas with amyloid in six dogs. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 2, p. 125-130, 1991.

SALVA, K. A.; HAEMEL, A. K.; PINCUS, L. B.; LIU, J.; SUNDRAM, U.; GUITART, J.; WOOD, G. S. Expression of CD31/PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) by blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. **JAMA Dermatology**, v. 150, n. 1, p.73-76, 2014.

SCHOTTE, R.; NAGASAWA, M.; WEIJER, K.; SPITS, H.; BLOM, B. The ETS transcription factor spi-b is required for human plasmacytoid dendritic cell development. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 11, p. 1503–1509, 2004.

SCHRENZEL, M.D.; NAYDAN, D. K.; MOORE, P. F. Leukocyte differentiation antigens in canine cutaneous and oral plasmacytomas. **Veterinary Dermatology**, v. 9, p. 33-41, 1998.

SEDLMEIER, H.; WEISS, E. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen fiber das Plasmozytom des Hundes. **Monatshefte für Velerinärmedizin**, v. 13, p. 245-251, 1958.

SHIGEMATSU, H.; REIZIS, B.; IWASAKI, H.; MIZUNO, S. I.; HU, D.; TRAVER, D.; AKASHI, K. Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. **Immunity**, v. 21, n. 1, p. 43-53, 2004.

SOUMELIS, V.; LIU, Y. J. From plasmacytoid to dendritic cell: Morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. **European Journal of Immunology**, v. 36, n.1, p. 2286-2292, 2006.

STANNARD, A. A.; PULLEY, L. T. Tumors of the skin and soft tissues. In: **Tumors in Domestic Animals**, ed. Moulton, J. E, 2nd ed., p. 16-74. University of California Press, Berkeley, 1978.

STILWELL, J. M.; RISSI, D. R. Immunohistochemical labeling of multiple myeloma oncogene 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine cutaneous histiocytoma. **Veterinary Pathology**, v.55, n. 4, p. 517–520, 2018.

SU, G. H.; CHEN, H. M.; MUTHUSAMY, N.; GARRETT-SINHA, L. A.; BAUNOCH, D.; TENEN, D. G.; SIMON, M. C. Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 23, p. 7118–7129, 1997.

TADMORI, W.; FEINGERSH, D.; CLARK, S. C.; CHOI, Y. S. Human recombinant IL-3 stimulates B cell differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 6, p. 1950-1955, 1989.

TAKANOSU, M.; NAKANO, Y.; KAGAWA, Y. Improved clonality analysis based on immunoglobulin kappa locus for canine cutaneous plasmacytoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 215, p. 109903, 2019.

TAKANOSU, M.; OKADA, K.; KAGAWA, Y. PCR-based clonality analysis of antigen receptor gene rearrangements in canine cutaneous plasmacytoma. **The Veterinary Journal**, v. 241, p. 31-37, 2018.

TESTA, U.; FOSSATI, C.; SAMOGGIA, P.; MACSIULLI, R.; MARIANI, G.; HASSAN, J.; SPOSI, N. M.; GUERRIERO, R.; ROSATO, V.; GABBIANELLI, M.; PELOSI, E.; VALTIERI, M.; PESCHLE C. Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 88, n. 9, p. 3391–3406, 1996.

TESTA, U.; PELOSI, E.; CASTELLI, G. CD123 as a Therapeutic Target in the Treatment of Hematological Malignancies. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1358, 2019.

TESTA, U.; PELOSI, E.; FRANKEL, A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 4, 2014.

TORRERO, M. N.; LARSON, D.; HÜBNER, M. P.; MITRE, E. CD200R surface expression as a marker of murine basophil activation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 39, n. 3, p. 361-369, 2009.

UHLEN, M.; BANDROWSKI, A.; CARR, S.; EDWARDS, A.; ELLENBERG, J.; LUNDBERG, E.; YAMAMOTO, T. A proposal for validation of antibodies. **Nature Methods**, v. 13, n. 10, p. 823-827, 2016.

VAIL, D. M. Hematopoietic tumors. Section D - plasma cell neoplasms. In: **Small Animal Clinical Oncology**. St. Louis: Saunders Elsevier, v. 4, p. 769–784, 2007.

VAIL, D. M. Plasma cell neoplasms. In: **Small Animal Clinical Oncology**. Philadelphia: Saunders, p. 626-636, 2001.

VAIL, D. M.; WITHROW, S. J. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S. J; MACEWEN'S, E. G. **Small Clinical Veterinary Oncology**. 5. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap. 18, p. 375-401.

VALLI, V. E.; MYINT, M. S.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZKY, F.; KIUPEL, M. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p.198-211, 2011.

WEISS, E. Morphologie und formale Genese der Neubildung der Zellen des rethelialen Systems (RS) bei Hund und Katze. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 9, n. 5, p. 437-462, 1962.

WEISS, E.; FRESE, K. International histological classification of tumours of domestic animals. VII. Tumours of the skin. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1-2, p. 79-100, 1974.

XIA, X. L. L.; CHOI, Y. S. Human recombinant IL-3 is a growth factor for normal B cells. **The Journal of Immunology**, v. 148, n. 2, p. 491-497, 1992.

YAGER J. A.; SCOTT D. W. The skin and appendages. In: JUBB K. V. F.; KENNEDY P. C.; PALMER N. **Pathology of Domestic Animals**. Vol.1. 4th ed. San Diego: Academic Press,. p. 531-738. 1993.

YAGER, J. A.; SCOTT, D. W. **Pathology of the Domestic Animals**. 3th ed. v. 1. Eds KVF JUBB, P. C.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. 1985.

YEARLEY, J. H.; STANTON, C.; OLIVRY, T.; DEAN, G. A. Phagocytic plasmacytoma in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 3, p. 293-296, 2007.

ANEXOS

ANEXO A: Dados das amostras de LCs, SHCs e MCCs.

ANEXO B: Mapa do TMA.

ANEXO C: Marcação de cadeias leves de imunoglobulinas em SHC.

ANEXO D: Expressão do CD123 em MCC.

ANEXO E: Expressão do CD123 em plasmócitos no baço canino.

ANEXO F: Infiltrado inflamatório com plasmócitos CD123+.

ANEXO A

A - Dados das amostras de LCs, SHCs e MCCs.

Dados das amostras de linfomas.

RG	Diagnóstico H.E	Raça	Idade	Local	Imunofenótipo	Origem
107/17	Linfoma cutâneo não epiteliotrópico – anaplásico	SRD	13 anos	NI - subcutâneo	CD3+, MUM1+, CD79- κ-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia
469/17	Linfoma cutâneo epiteliotrópico – tipo reticulose pagetóide	Poodle	NI	Múltiplos focos por todo o corpo	CD3+, MUM1-; CD79- K-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia
480/16	Linfoma difuso de grandes células- centroblástico	NI	NI	Linfonodo	CD3-, MUM1-, CD79+ κ-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia
832/17	Linfoma cutâneo não epiteliotrópico	Pit Bull	7 anos	Membro - subcutâneo	CD3+, MUM1-, CD79- κ-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia
880/16	Linfoma subcutâneo não epiteliotrópico	NI	NI	NI - subcutâneo	CD3+, MUM1-, CD79- κ-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia
883/17	Linfoma difuso de grandes células –centroblástico	NI	NI	Linfonodo	CD3-, MUM1-, CD79+ κ-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia
1000/17	Linfoma cutâneo não epiteliotrópico	SRD	10 anos	Gradil costal e lombar - subcutâneo	CD3-, MUM1+, CD79+ κ-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia
1282/17	Linfoma difuso de grandes células - centroblástico	Labrador	6 anos	Linfonodo submandibular	CD3-, MUM1-, CD79+. κ-, λ-, CD123-, Iba1-	Biopsia

Dados das amostras de sarcomas histiocíticos.

RG	Diagnóstico H.E./Local	Raça	Idade	Tamanho	Imunofenótipo	Origem
35647	Sarcoma histiocítico metastático (baço, linfonodos, musculatura e pulmão)	Rottweiler	9 anos	Variável de 0,5 a 12cm	Iba1+, CD123+, κ+, λ+, CD3-. CD79-, MUM-.	Necropsia
34861	Sarcoma histiocítico metastático (subcutâneo/musculatura e linfonodo)	Golden Retriever	5 anos	11x7x6cm	Iba1+, CD123+, κ+, λ+, CD3-. CD79-, MUM-.	Biopsia

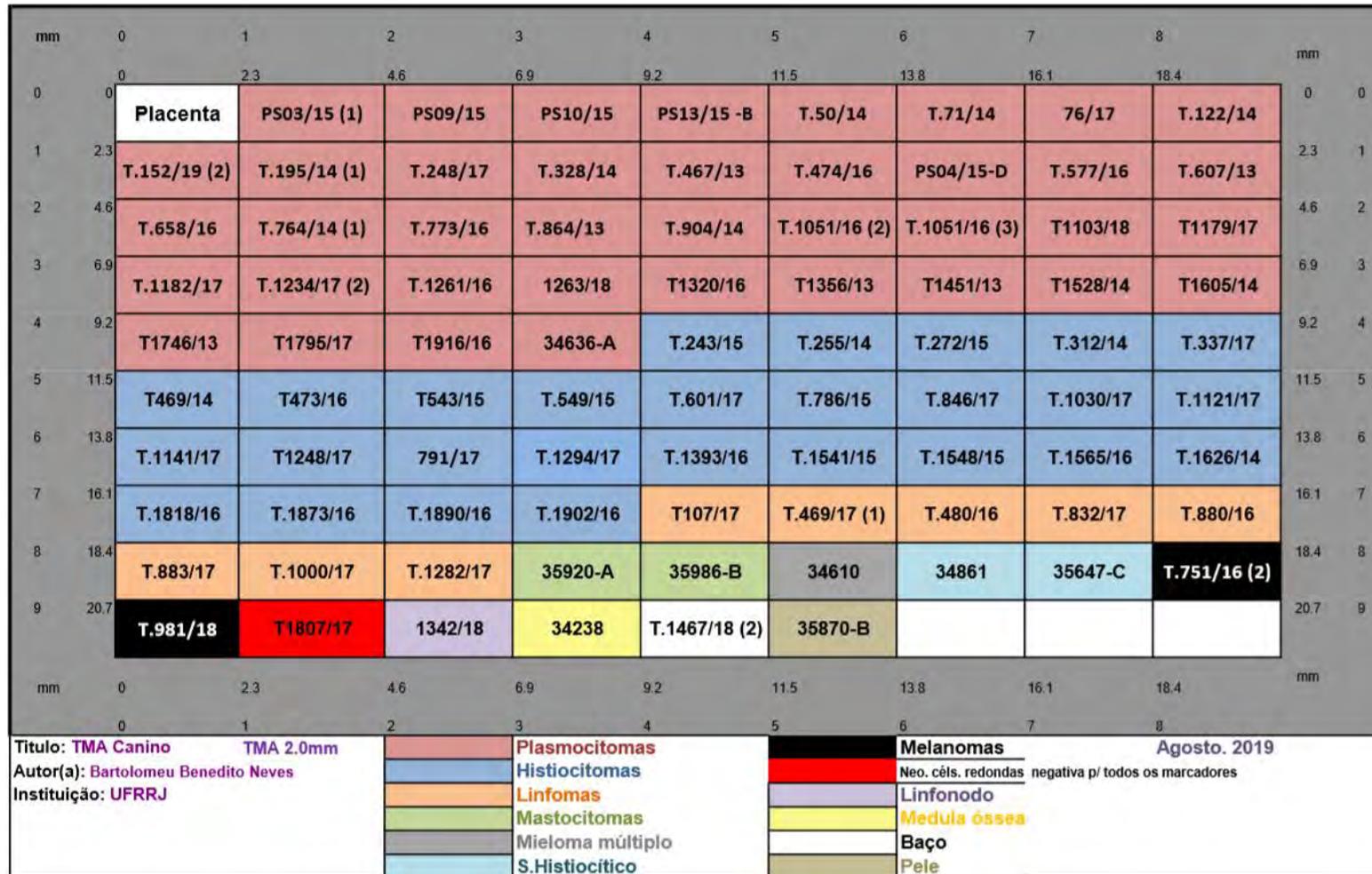
Dados das amostras de mastocitomas cutâneos.

RG	Diagnóstico H.E. e toluidina /Local	Raça	Idade	Tamanho	Imunofenótipo	Origem
35986	Mastocitoma alto grau (Kiupel, 2011) – Múltiplos nódulos na pele e linfonodo	Pit Bull	9 anos	Variável de 4 a 7 cm	CD123+, Iba1-, κ-, λ-, CD3-. CD79-, MUM-.	Biopsia
35920	Mastocitoma cutâneo alto grau (Kiupel 2011) – Pele e linfonodo axilar	SRD	4 anos	6 cm	CD123*, Iba1-, κ-, λ-, CD3-. CD79-, MUM-.	Biopsia

*Amostra não avaliada para o marcador por ter sido perdida no TMA.; NI = Não informado.

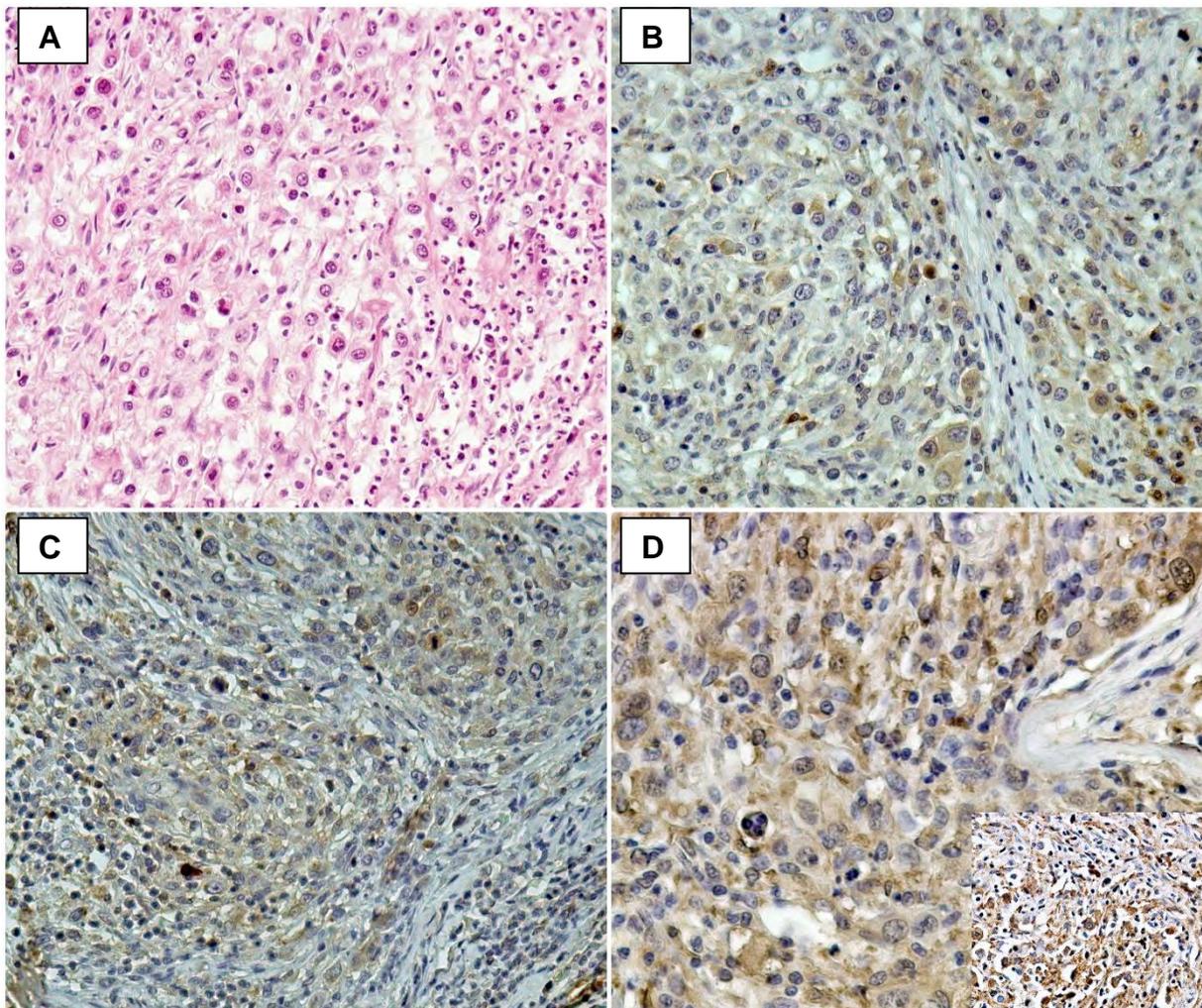
ANEXO B

B - Mapa do TMA.



ANEXO C

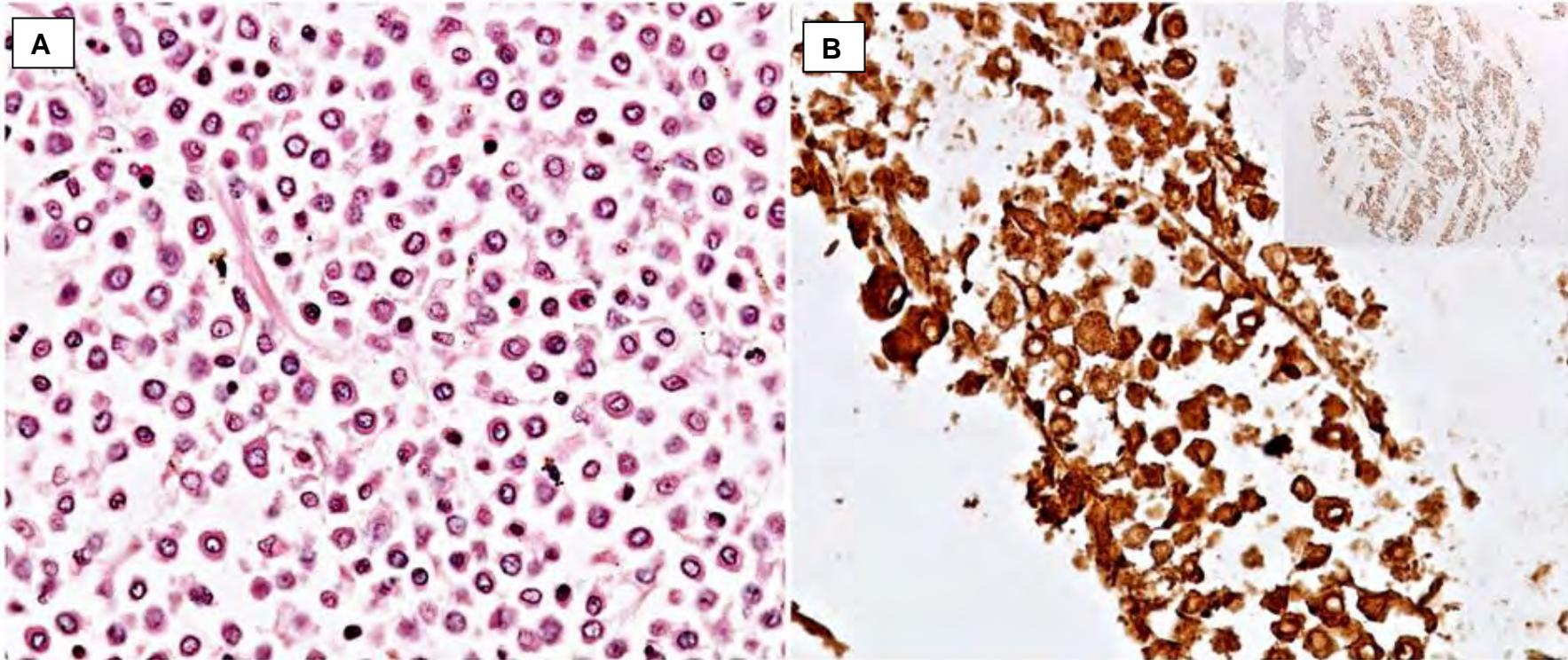
C - Marcação de cadeias leves de imunoglobulinas em SHC.



Subcutâneo, cão. Sarcoma histiocítico (metastático). **A)** Cordões de células neoplásicas redondas com moderada anisocitose, anisocariose que dissecam o estroma fibroso reativo infiltrado por polimorfonucleares. H.E., obj.40x. **B)** Células neoplásicas com citoplasma fraca a moderadamente imunocorado. IHQ, cadeia leve λ de imunoglobulina, obj.40x. **C)** Células neoplásicas com citoplasma fraca a moderadamente imunocorado. IHQ, cadeia leve k de imunoglobulina, obj. 40x. **D)** As células neoplásicas têm moderada imunomarcção do citoplasma. IHQ, Iba1, obj.63x. Detalhe no canto direito inferior: células neoplásicas imunopositivas para CD123.

ANEXO D

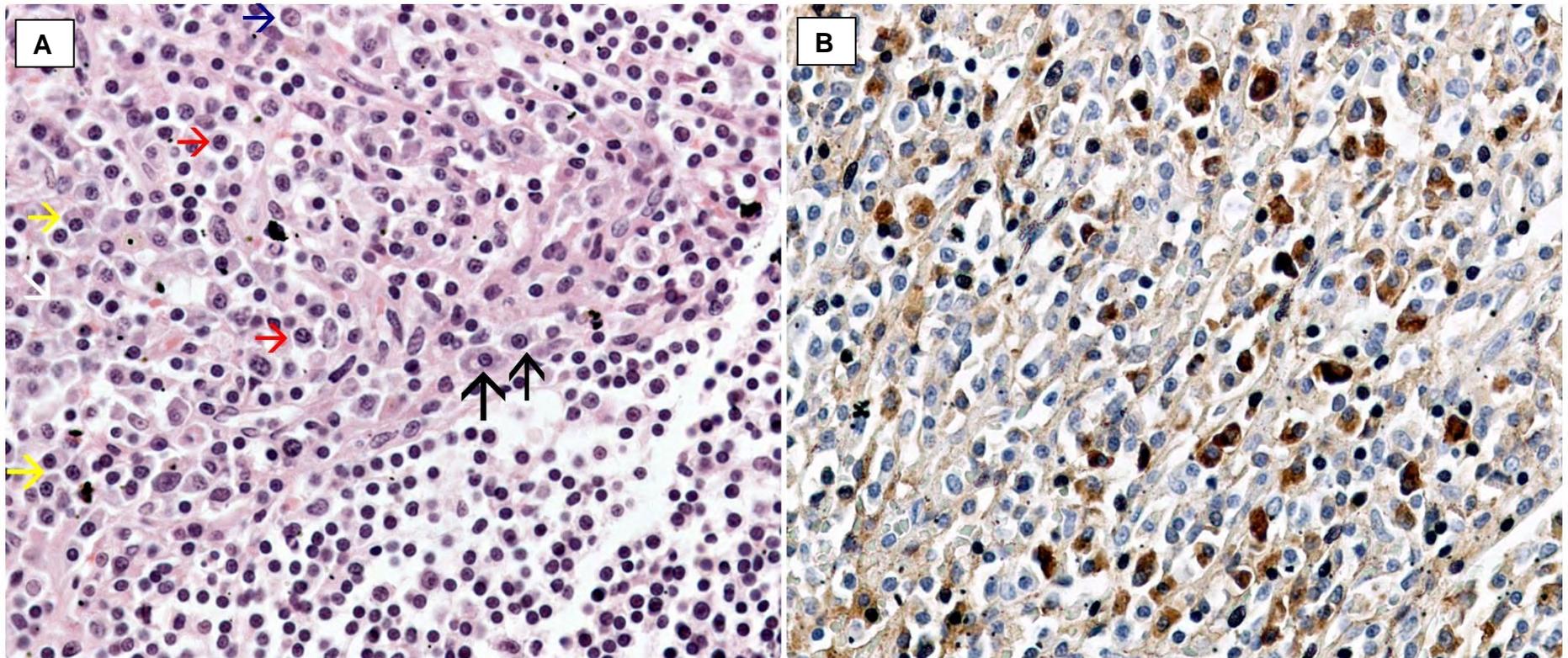
D - Expressão do CD123 em MCC.



Pele, cão. Mastocitoma cutâneo alto grau (metastático). **A)** Cordões de células neoplásicas redondas com moderada anisocitose e anisocariose, estroma fibrovascular muito escasso. H.E., obj.40x. **B)** As células neoplásicas apresentam forte marcação citoplasmática. IHC para CD123, obj.63x. Detalhe no canto superior direito para marcação difusa no core de TMA. IHC para CD123, obj.5x.

ANEXO E

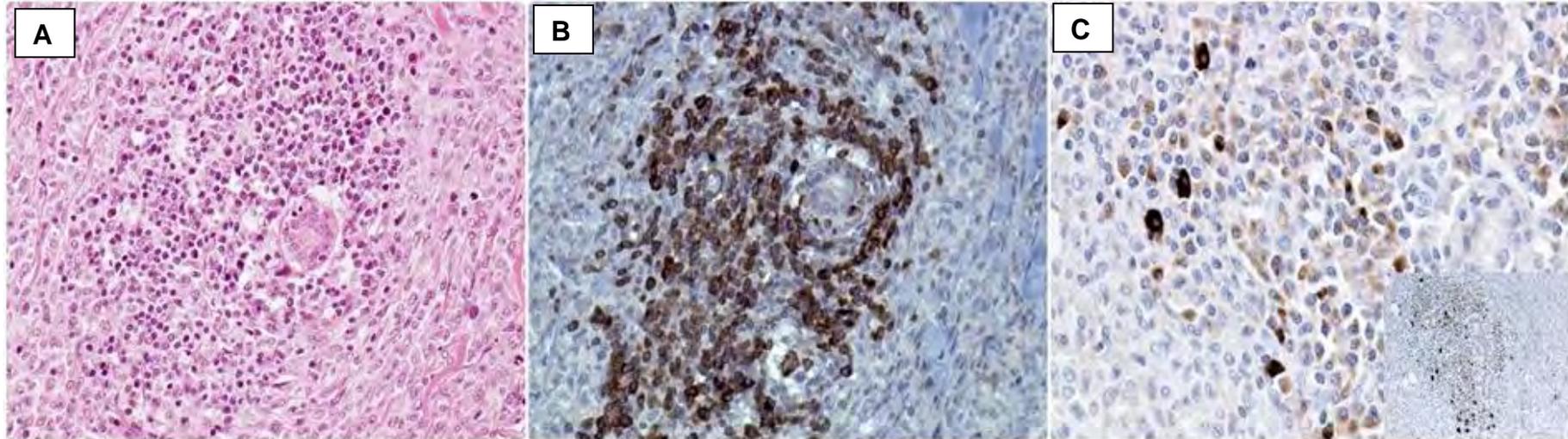
E - Expressão do CD123 em plasmócitos no baço canino.



Baço, cão. Hiperplasia linfoide. A) Nota-se considerável número de plasmócitos como imunoblasto (seta azul) representado por uma célula redonda, grande, com citoplasma escasso e nucléolo evidente; plasmoblastos em diferentes estágios (setas vermelhas) com núcleo redondo central ou excêntrico e cromatina grosseira; pro-plasmócitos ou plasmócitos jovens (setas pretas) com características bem semelhantes a de plasmócitos maduros, porém com nucléolo evidente, núcleo moderadamente excêntrico e por vezes com vacúolo intracitoplasmático; plasmócitos maduros (setas amarelas) núcleo excêntrico, sem nucléolo evidente, heterocromatina periférica em “face de relógio” ou “roda de carroça”; plasmócito binucleado (seta branca). H.E., obj.63x. B) A maioria das células com morfologia plasmocítica são fortemente imunomarcadas. IHQ, CD123, obj.63x.

ANEXO F

F - Infiltrado inflamatório com plasmócitos CD123+.



Pele, cão. Infiltrado inflamatório linfo-plasmocítico periductal nas adjacências de uma proliferação histiocítica. A) Infiltrado inflamatório mononuclear composto por linfócitos e plasmócitos ao redor de um ducto glandular. H.E., obj.40x. B) Maior parte das células linfocíticas e plasmocíticas apresentam forte marcação de membrana e citoplasma. IHQ, CD79a, obj.40x. C) Os plasmócitos mais diferenciados apresentam forte marcação de citoplasma e membrana. IHQ, CD123, obj.63x - detalhe no canto inferior direito mesmo campo em menor aumento. obj.20x