

Ricardo Oliveira Felisberto

**Caracterização e Classificação de 45 casos de Linfoma
não-Hodgkin do gato de acordo com o esquema da
Organização Mundial de Saúde (OMS)**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientador: Joaquim Henriques, DVM
Co-Orientador: Pedro Faísca, PhD, DEA, DVM

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
2013**

Dedico este trabalho aos meus pais, à “Madrinha” Adelaide Casimiro por todo o apoio e por tornarem possível a conclusão do meu curso e ao Dr. Joaquim Henriques que tornou possível a realização deste trabalho graças ao conhecimento que transmitiu e perseverança que investiu em mim.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Pedro Faísca que, desde o princípio do curso, me ajudou e transmitiu o rigor e sentido académico, fundamentais ao sucesso no percurso que efetuei. Pela sabedoria transmitida, pela orientação do meu trabalho, por ter tornado possível a sua realização, ao fornecer amostras provenientes do Laboratório DNATech, deixo o meu agradecimento.

Registo aqui, um especial agradecimento ao Dr. Joaquim Henriques, por todo o apoio, confiança, atenção, paciência, orientação, amizade e por ter partilhado as ferramentas para a construção do meu futuro. Obrigado meu mestre.

Agradeço à Professora Margarida Alves pela paciência, bondade, amizade, orientação, confiança que desde cedo me transmitiu e pela ajuda essencial e imprescindível que jamais esquecerei.

Aos responsáveis da DNATech que, gentilmente, me cederam 11 amostras de linfoma de gato, deixo um especial agradecimento.

Anoto um agradecimento muito especial a todos os Médicos e Técnicos do Instituto Português de Oncologia, Francisco Gentil, Lisboa, que, para além de possibilitarem a realização de metade do meu estágio curricular nas suas instalações, me ofereceram uma quantidade enorme de conhecimento na área do cancro, em muitas vertentes transversal aos animais de companhia. Correndo o risco de me esquecer de alguém, deixo aqui o meu especial agradecimento ao Dr. José Cabeçadas que, com o seu conhecimento quase inesgotável na área dos tumores hematopoiéticos, me auxiliou e orientou na estruturação e interpretação de resultados do meu trabalho, à Prof.^a Doutora Paula Chaves que, com a sua simpatia, paciência, disponibilidade, boa vontade, amizade e, acima de tudo, gosto pela ciência e pelos nossos amigos de quatro patas, me auxiliou e orientou o estágio e aos técnicos de laboratório Teresa Pereira e João Matos, que foram elementos fundamentais para a conclusão deste trabalho, ao ponto de trabalharem para além das suas tarefas diárias programadas, para me auxiliarem no trabalho de bancada. Pela amizade, pelas horas em frente aos micrótomos e a lidar com blocos de parafina e lâminas com amostras de linfoma de gato, pela sabedoria partilhada e paciência despendidos, Muito Obrigado.

Agradeço à auxiliar Liliana de Sousa, pela infinita paciência depositada na organização dos dados das amostras estudadas, pelas horas despendidas em meu auxílio, muito obrigado. Agradeço a todos os meus amigos(as) e colegas de curso, pela amizade, confiança e apoio durante o meu percurso académico.

Por todo o apoio, esforço e perseverança, agradeço aos meus pais e à minha “Madrinha” e grande amiga Adelaide Casimiro, que tornaram possível a conclusão do meu curso e pela ajuda que me ofereceram esperando, em troca, nada mais que o meu sucesso.

Sem todos vós, nada disto seria possível. Espero apenas, que este trabalho e a sua defesa possam estar à vossa altura, pois eu terei um longo caminho a percorrer. E tanto melhor se for convosco ao meu lado.

A todos, Muito Obrigado.

Caracterização e Classificação de 45 casos de Linfoma não-Hodgkin do gato, de acordo com o esquema da Organização Mundial de Saúde (OMS)

Resumo

O linfoma é um dos tumores hematopoiéticos mais frequentemente diagnosticados no gato. Neste estudo retrospectivo foram utilizadas amostras previamente diagnosticadas como linfoma não-Hodgkin de 45 gatos, com os objetivos de caracterizar as entidades de “linfoma” segundo a OMS e analisar a concordância de três marcadores pan fenótipo B (CD79 α cy; BLA.36 e Pax5). Todas as amostras foram processadas segundo técnica validada pelo serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia, Francisco Gentil, Lisboa.

As entidades de linfoma distribuíram-se da seguinte forma: o Linfoma B difuso de células grandes, variante imunoblástico (29%, 13/45) foi o subtipo mais frequente, seguido pelo Linfoma T Associado a enteropatia (17,8%, 8/45). Foram observadas expressões positivas das moléculas CD3 em 100% dos linfomas T, do BLA.36 em 100% dos linfomas B e em 9% (2/22) dos linfomas T, da molécula CD79 α cy em 87% (20/23) dos linfomas B e da molécula Pax5 em 83% (19/23) dos linfomas B.

Os nossos resultados confirmam a aplicabilidade do esquema de classificação OMS ao linfoma do gato e demonstram a necessidade do uso de diferentes anticorpos para a deteção de moléculas específicas de linhagem B e T para a definição do fenótipo do linfoma.

No conhecimento do autor este é o primeiro trabalho realizado em Portugal aplicando o sistema de classificação da OMS, assim como a conjugação de três diferentes marcadores de linhagem B no linfoma não-Hodgkin do gato.

Palavras-chave: Linfoma não-Hodgkin do Gato, Células B, Imunocitoquímica, Sistema de classificação OMS.

Characterization and Classification of 45 cases of cats' non-Hodgkin Lymphoma according to World Health Organization (WHO) scheme

Abstract

Feline lymphoma is one of the most common hematopoietic tumours in this species. In this retrospective study, 45 previously diagnosed as non-Hodgkin feline lymphoma were used to characterize according to WHO classification system and to analyse the concordance of three pan B-cell markers (CD79 α ; BLA.36 e Pax5). All the samples were processed according to the validated technique currently used by the Instituto Português de Oncologia, Francisco Gentil, Lisboa.

The most common subtype was the immunoblastic form of Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) (28,9%, 13/45), followed by Enteropathy Associated T Cell Lymphoma (EATCL) (17,8%, 8/45). The immunostaining results revealed that anti-BLA.36, anti-CD79 α and anti-Pax5 antibodies stained positive in, respectively, 100%, 87% and 83% of all B-cell lymphomas, and BLA.36 was also expressed in 9% (2/22) of all T-cell lymphomas.

Our results confirm the applicability of the WHO classification scheme to feline lymphoma and shown the importance of using different B and T cell markers for an accurate lineage determination.

To the best knowledge of the author this was the first study in Portugal using the WHO classification scheme and to apply three different B-cell markers in feline non-Hodgkin lymphoma.

Keywords: Feline non-Hodgkin Lymphoma; B-cell; Immunohistochemistry; WHO classification system.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

- AgNOR – Região Organizadora Nucleolar Argirofílica
- AOAMC – Oncornavirus Associado à Membrana Celular
- Bcl-2 – Proteína anti-apoptótica “Linfoma de Células B 2”
- BLA.36 – Antígeno de 36 quilodalton das células B
- Bmi-1 – gene codificador da Proteína do complexo *Polycomb* (*locus* de inserção do provirus do FeLV)
- c-Myc – Gene Mielocitomatose celular
- CCNU - Lomustina
- CD – do inglês “*Cluster of Differentiation*”
- CHOP – Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisolona
- COP – Ciclofosfamida, Vincristina e Prednisona
- CMH – Complexo Maior de Histocompatibilidade
- DAB - 3,3’ - Diaminobenzidina
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do Inglês: “*Deoxyribonucleic Acid*”)
- DP – Desvio Padrão
- EBV – Vírus Epstein-Barr (do Inglês: “*Epstein-Barr Virus*”)
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático (do Inglês: “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”)
- ELP – Enterite Linfoplasmocítica
- EPP – Enteropatia por perda de proteína
- FeLV – Vírus da Leucemia Felina
- Fit-1 – Local de inserção para provirus do FeLV (do Inglês: “*Facilitator of Iron Transport-1*”)
- FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina
- Flit-1 – *Locus* de inserção para provirus do FeLV
- Flv-1 – *Locus* no DNA felino para inserção do provirus do FeLV
- Flv-2 – *Locus* no DNA felino para inserção do provirus do FeLV
- GHV – Gamaherpesvirus
- GI - Gastrointestinal

Hhe – *Helicobacter heilmannii*

H&E – Coloração Hematoxilina e Eosina

HLA-DQ – do Inglês: “*Human Leukocyte Antigen*”

HRP – do Inglês: “*Horse Redish Peroxidase*”

IBD – Doença Idiopática/Inflamatória Intestinal

ID – Intestino Delgado

IG – Intestino Grosso

Ig α /Ig β – Imunoglobulina alfa e beta

IHQ – Imunohistoquímica

ILSG – Grupo de Estudo Internacional do Linfoma

IPO – Instituto Português de Oncologia, Francisco Gentil, Lisboa

Ki-67 – Proteína Codificada pelo gene MKI67

kDa - Quilodalton

LB – Linfoma de Burkitt

LBDCG (C) – Linfoma B Difuso de Células Grandes, variante Centroblastico

LBDCG (I) – Linfoma B Difuso de Células Grandes, variante Imunoblástico

LBL – Linfoma Linfoblástico

LBNS – Linfoma B Não Sub-classificável

LBPC – Linfoma B de Pequenas Células

LCE – Líquido Cérebro-espinhal

LF – Linfoma Folicular

LGAG – Linfoma Gastrointestinal de Alto Grau

LGBG – Linfoma Gastrointestinal de Baixo Grau

LGGC – Linfoma Granular de Grandes Células

LH – Linfoma de Hodgkin

LL – Linfoma Linfocítico

LLC – Leucemia Linfocítica Crónica

LnH – Linfoma não-Hodgkin

LTAE – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo I e tipo II

LTPNE – Linfoma T Periférico Não Específico

LTTCP – Linfoma T Transmural de Células Pequenas

MALT – Tecido Linfoide Associado às Mucosas

Máx. – Máximo

Min. – Mínimo

NCI WF – Instituto Nacional do Cancro Formulação de Trabalho (do Inglês: “*National Cancer Institute Working Formulation*”)

NK/T – Linfócitos “*Natural Killer*” ou T

n-Ras – Oncogene Neuroblastoma da família de genes “Sarcoma de Rato” (Ras)

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53 – Gene supressor tumoral

Pax5 – Proteína Ativadora Específica das Células B (fator de transcrição)

PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PD – Polidipsia

PIF – Peritonite Infecciosa Felina

Pim-1 – Gene codificador da Proteína Cinase Serina/Treonina (*locus* para inserção do provirus do FeLV)

PTHrP – Péptido relacionado com a Paratormona

PU - Poliúria

RCB – Recetor de Células B

RCT – Recetor de Células T

RCTG – Recetor de Células T Gama

REAL – Revisão Europeia-Americana. (do Inglês: “*Revised European American Lymphoma*”)

SMD – Síndrome Mielodisplásico

SMP – Síndrome Mieloproliferativo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNC-EM – Sistema Nervoso Central Espinhal Medula

T4 – Tiroxina

$V_H D J_H$ – Recombinação somática dos segmentos **V**ariável, de **D**iversidade e de **L**igação do gene da imunoglobulina (RCB)

Célula $T\gamma\delta$ – Célula T constituída pelas cadeias gama e delta

γ -retrovirus – Gama-retrovirus

Índice Geral

1. Introdução.....	15
1.1. Linfoma – Generalidades.....	16
1.1.1. Nota Histórica.....	16
1.2. Linfoma no gato.....	16
1.2.1. Epidemiologia.....	17
1.2.1.1. Faixas Etárias.....	17
1.2.1.2. Predisposição Racial.....	17
1.2.1.3. Género e Linfoma.....	18
1.2.2. Etiologia/Fatores de Risco.....	18
1.2.2.1. Fatores Ambientais.....	18
1.2.2.2. Agentes Infecciosos.....	19
1.2.2.3. Fatores Genéticos e Moleculares.....	23
1.2.2.4. Imunossupressão.....	24
1.2.2.5. Dieta e o Linfoma Gastrointestinal.....	24
1.2.2.6. Inflamação Crónica.....	25
1.2.3. A Classificação do Linfoma.....	27
1.2.3.1. Nota Histórica.....	27
1.2.3.2. Esquema de Classificação de Acordo com a OMS.....	29
1.2.4. Comportamento Natural e Patologia.....	30
1.2.4.1. Linfoma Gastrointestinal / Alimentar.....	30
1.2.4.2. Linfoma Mediastínico.....	34
1.2.4.3. Linfoma Nodal.....	36
1.2.4.4. Linfoma Extranodal.....	37
1.2.5. Diagnóstico.....	39
1.2.5.1. História e Sinais Clínicos.....	39
Linfoma Gastrointestinal.....	39
Linfoma Mediastínico.....	40
Linfoma Nodal.....	40
Linfoma Extranodal.....	41
Sinais não Específicos.....	41
Diagnósticos Diferenciais.....	42
1.2.5.2. Diagnóstico e Estadiamento Clínico.....	42
1.2.5.2.1. Testes de diagnóstico.....	44
1.2.5.3. Diagnóstico por Localização Anatómica.....	48
Linfoma Gastrointestinal.....	48
Linfoma Mediastínico.....	51
Linfoma Nasal.....	51
Linfoma Renal.....	51
Linfoma Nodal.....	52
Linfoma Sistema Nervoso Central.....	53

Linfoma Cutâneo.....	53
1.2.6. Modalidades Terapêuticas.....	53
1.2.7. Prognóstico.....	55
1.3. Objetivos	55
2. Materiais e Métodos.....	56
2.1. Introdução	56
2.1.1. População Estudada e Análise Histopatológica.....	56
2.1.2. Imunohistoquímica.....	57
2.2. Análise Estatística Descritiva	58
3. Resultados.....	58
3.1. Caracterização da amostra estudada e estatística descritiva.....	58
3.1.1. Detecção das proteínas CD79 α cy, Pax5 e BLA.36 nas amostras de LnH de gato para determinação de fenótipo B.....	62
3.1.2. Detecção da proteína CD3 nas amostras de LnH de gato para a determinação do fenótipo T.....	64
4. Discussão.....	67
5. Conclusões.....	77
6. Referências Bibliográficas.....	79
Apêndices.....	I
Apêndice I	I
Apêndice II	II
Apêndice III	III
Apêndice IV	IV
Apêndice V	V
Apêndice VI	VII
Apêndice VII	VII
Apêndice VIII	VII
Apêndice IX	VII
Apêndice X	VII
Anexos.....	VIII
Anexo I	VIII
Anexo II	IX
Anexo III	X

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais diagnósticos diferenciais ao linfoma no gato tendo em conta a sua localização anatómica.....	42
Tabela 2: Estadiamento clínico de acordo com a OMS para o Linfoma nas espécies domésticas.....	43
Tabela 3: Estadiamento clínico para o Linfoma no gato.....	44
Tabela 4: Resumo dos dados estatísticos para os 45 casos de LnH do gato estudados	60
Tabela 5: Idade (anos) por grupos fenótipo: medidas de estatística descritiva..	61
Tabela 6: Idade (anos) por localização do tumor: medidas de estatística descritiva.....	61
Tabela 7: Extensão das células tumorais nos linfomas GI: frequência absoluta e relativa	61
Tabela 8: Epiteliotropismo nos linfomas GI: frequência absoluta e relativa....	61
Tabela 9: Invasão nodal nos linfomas GI: frequência absoluta e relativa.....	61
Tabela 10: Apresentação do resumo das características histológicas dos linfomas estudados, com principal ênfase às entidades mais frequentemente identificadas (LBDCG C, LBDCG I, LTAE I e LTAE II).....	62
Tabela 11: Apresentação dos dados clinico-patológicos das 45 amostras de LnH de gato estudadas.....	66

Índice de Figuras

Figura 1: Gato, 1 ano, Europeu Comum, FeLV-antigénio positivo, com Linfoma T Mediastínico com deslocamento traqueal dorsal. A) Radiografia torácica lateral esquerda. Evidente efeito de massa na região do mediastino cranial, diagnóstico confirmado por análise citológica após punção aspirativa com agulha fina da lesão. B) Imagem pos-mortem da lesão mediastínica do mesmo paciente..	36
Figura 2: Gato com Linfoma T Cutâneo com linfócitos circulantes (Células com núcleo grande irregular, hipercromático). A) Imagem de lesões cutâneas na região abdominal lateral. B) Imagem de citologia de esfregaço sanguíneo em ampliação a 1000x (coloração Diff Quick®).....	39
Figura 3: Gato com Linfoma GI (diagnosticado após análise histopatológica). Laparotomia exploratória revela massa esbranquiçada e friável na região do íleo, associada a obstrução parcial.....	51
Figura 4: Gato com linfoma renal. Evidente renomegália com deslocamento visceral ventral e caudal. Imagens de radiografia (projeção latero-lateral esquerda (A) e ventro-dorsal (B)).....	52
Figura 5: Linfoma número 9, Traqueia de gato. Caracterização de Linfoma B difuso de células grandes variante imunoblástico.....	63
Figura 6: Linfoma número 44, Intestino Delgado, Jejuno de gato. Caracterização de linfoma T associado a enteropatia tipo I.....	65
Figura 7: Amostra nº4, estômago. Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Imunoblástica. Evidentes zonas de esclerose, necrose e várias mitoses (setas pretas) por campo de observação com a objetiva de 100x.....	72
Apêndices	
Figura 1: A - Gráfico de extremos e quartis (<i>boxplot</i>) da idade (em anos) dos gatos amostrados. O ponto vermelho representa a média aritmética. B - Gráfico de extremos e quartis (<i>boxplot</i>) da idade (em anos) por fenótipo. Os pontos vermelhos representam as médias aritméticas da idade em cada grupo.....	VI
Figura 2: Gráfico de extremos e quartis (<i>boxplot</i>) da idade (em anos) por localização do tumor. Os pontos vermelhos representam as médias aritméticas da idade em cada grupo.....	VI

1. Introdução

As neoplasias são doenças frequentes em clínica de animais de companhia. Durante os últimos anos, o desenvolvimento da qualidade de infraestruturas nos Centros de Atendimento Médico Veterinários aliado ao crescente conhecimento científico lideraram o caminho para o diagnóstico mais preciso e aparecimento de novas terapias para animais de companhia que sofram de doença tumoral (Morris & Dobson, 2001). Estudos revelam que, regra geral, um em cada 10 cães e gatos irão desenvolver um tumor durante a sua vida (Morris & Dobson, 2001). No entanto, e infelizmente, a prevalência de cancro em animais de companhia continua a aumentar (Vail & Young, 2007). Uma das principais razões centra-se na idade avançada que os animais domésticos atingem hoje em dia, devido aos avanços na nutrição, prevenção de doenças potencialmente fatais, protocolos terapêuticos melhorados, legislação que os protege e à, cada vez mais forte, ligação Homem-Animal (Vail & Young, 2007; North & Banks, 2009).

De um modo geral, o cancro, é uma das causas de morte mais frequentes em animais de companhia, chegando aos 23% nos Estados Unidos da América (Vail & Young, 2007) e aos 16% no Reino Unido (Morris & Dobson, 2001). Nos Estados Unidos da América estima-se que ocorrem cerca de 4 milhões de novos casos de cancro/ano em 74 Milhões de cães e de 4 milhões de novos casos de cancro/ano em 90 milhões de gatos domésticos (Hansen & Khanna, 2004).

O linfoma maligno, linfossarcoma, ou como é mais frequentemente designado, linfoma é uma das doenças malignas mais comuns na clínica de animais de companhia. É caracterizado pela proliferação maligna de células linfóides provenientes de qualquer órgão constituído por tecido linfoide, sendo, por isso, uma neoplasia com diferentes apresentações clínicas, podendo tornar o seu diagnóstico difícil (Argyle *et al.*, 2008). Em medicina humana, no diagnóstico de “Linfoma”, é efetuado o seu enquadramento clínico, a sua caracterização fenotípica, morfológica e genética, permitindo a classificação do tumor numa entidade específica e, conseqüente estabelecimento do prognóstico e da terapêutica mais adequados (Bird *et al.*, 2010). Existem estudos que comprovam a similaridade morfológica e fenotípica do linfoma no gato com o linfoma no cão e no Homem (Pohlman *et al.*, 2009; Valli *et al.*, 2000).

1.1. Linfoma – Generalidades

Os linfomas constituem um grupo variado de neoplasias, com origem comum em linfócitos, localizadas em órgãos linfoides, tais como linfonodos, tecido linfoide associado às mucosas (MALT, do inglês, Mucosa Associated Lymphoid Tissue), baço, medula óssea e timo podendo, no entanto, manifestar-se em qualquer localização anatômica, dada a mobilidade permitida no organismo aos linfócitos (Morris & Dobson, 2001; Fan, 2003; Vail & Young, 2007; Argyle *et al.*, 2008). Esta neoplasia está descrita como uma das mais frequentes no homem (Zelenetz *et al.*, 2011), no cão (Morris & Dobson, 2001; Vail & Young, 2007) e no gato (Pohlman *et al.*, 2009; Valli *et al.*, 2000). Em medicina humana, tem-se verificado ao longo dos anos o aumento da incidência de Linfoma não-Hodgkin (3 a 5% por ano). Crê-se que as razões para este aumento residam no envelhecimento populacional, maior eficiência diagnóstica e múltiplos fatores ambientais e/ou genéticos (Bird *et al.*, 2010).

1.1.1 Nota Histórica

Em 1858 Virchow aplica, pela primeira vez, o termo Linfoma. Bilothe, em 1871 foi o primeiro a empregar a expressão Linfoma Maligno, sendo esta menos utilizada até ao século XX (Codina, 2002).

Vários anos mais tarde, Bloom & Meyer (1945) foram os primeiros a descrever o linfoma no cão, Nielsen & Holzworth (1953) descreveram, pela primeira vez, o linfoma no gato.

1.2. Linfoma no gato

O linfoma é uma das neoplasias mais frequentemente diagnosticadas e tratadas no gato (Fan, 2003; Richter, 2003; Grover, 2005; Vail & Young, 2007; Wilson, 2008; Vezzali *et al.*, 2009; Polton, 2010; Briscoe *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011). No entanto a resposta à terapêutica, intervalos livres de doença e tempos de sobrevivência diferem entre indivíduos da mesma espécie, o que sugere a existência de variações individuais de imunidade e do comportamento e tipo biológico do linfoma. O comportamento biológico pode ser influenciado pela localização anatômica, grau histológico e imunofenótipo (Teske *et al.*, 1994; Ruslander *et al.*, 1997; Fan, 2003). Em medicina humana o Linfoma não-Hodgkin representa cerca de 4% de novos casos de cancro, sendo a quinta causa de morte por cancro e o segundo de crescimento mais rápido em termos de mortalidade (Siegel & Naishadham, 2012).

1.2.1. Epidemiologia

Alguns autores reportam que a incidência de linfoma varia entre os 50 a 90% no total de todas as neoplasias hematopoiéticas em gatos (Hardy, 1981) dado que os tumores hematopoiéticos representam, aproximadamente, um terço de todos os tumores do gato, assim, estima-se que a incidência de linfoma seja de 200 por 100,000 gatos em risco (Vail 2013). Esta taxa é superior à do cão, que registra cerca de 1.5 casos por 100,000 cães com menos de um ano de idade em risco e 84 por 100,000 cães entre os 10 e 11 anos de idade em risco (Vail & Young, 2007). Em medicina humana está reportada uma incidência de 27 casos por 100,000 homens em risco e 18.8 no caso das mulheres, independentemente da raça (Howlader *et al.*, 2012). O linfoma é, também, uma das neoplasias mais frequentes em duas outras espécies, o cavalo (Kelley & Mahaffey, 1998; Durham *et al.*, 2012), e bovinos (Vernau *et al.*, 1992).

1.2.1.1. Faixas Etárias

A média de idades dos gatos diagnosticados com linfoma situa-se entre os 10 e 12 anos, valor superior à média de idades dos gatos afetados na era do vírus da leucemia felina (FeLV) (dos 4 aos 6 anos) (Francis *et al.*, 1979; Hardy *et al.*, 1980; Vail *et al.*, 1998; Louwerens *et al.*, 2005; Vail & Young, 2007; Krick *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011). No entanto, existem casos de linfoma reportados em gatos com idades entre os 4 meses e 20 anos de idade (Court *et al.*, 1997). Os gatos mais jovens apresentam, tendencialmente, a localização mediastínica ou multicêntrica da doença e são FeLV-antigénio-positivos. Inversamente, os gatos mais idosos são tendencialmente FeLV-antigénio-negativos e apresentam a localização gastrointestinal (Spodnick *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 1995; Court *et al.*, 1997; Slawinski *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Vail *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Peaston & Maddison, 1999; Rassnick *et al.*, 1999; Louwerens *et al.*, 2005).

1.2.1.2. Predisposição Racial

Encontra-se reportada a tendência para o aparecimento de linfoma nas raças orientais (siamês, principalmente); contudo, qualquer raça pode desenvolver a doença. Além disso, estas raças tendem a desenvolver, com maior frequência, a localização mediastínica em gatos jovens (2 anos) FeLV-antigénio-negativos, o que sugere predisposição genética e indicia riscos de transmissão vertical de potenciais proto-oncogenes. O mesmo acontece com o cão, tendo sido reportada a possível tendência da

raça Boxer para o desenvolvimento de linfoma T (Court *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Lurie *et al.*, 2004; Louwerens *et al.*, 2005; Modiano *et al.*, 2005).

1.2.1.3. Gênero e Linfoma

Em medicina humana reporta-se a maior tendência para os homens desenvolverem linfoma não-Hodgkin relativamente à população feminina. Nas mulheres, a incidência da doença aumenta a partir dos 50 anos de idade, o que sugere possíveis propriedades protetoras das hormonas femininas nomeadamente estrogénios (Villamil *et al.*, 2009). Em 2009 foi estudada a influência do género e estado reprodutivo como potencial factor de risco para o desenvolvimento de linfoma no cão através da recolha de dados de 14,573 casos de linfoma de cão no *Veterinary Medical Database* desde 1964 a 2002. Os resultados revelaram que, tal como em medicina humana, em canídeos, os machos apresentam maior risco de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin do que as fêmeas. Refere, ainda, que fêmeas inteiras apresentam um risco significativamente menor de desenvolver LnH, o que sugere a função protetora dos estrogénios; contudo, esta associação necessita de ser corroborada em estudos futuros. É, assim, sugerida a predisposição masculina para o desenvolvimento de linfoma no cão, mas o papel do género na etiologia desta doença mantém-se por determinar (Villamil *et al.*, 2009). No caso do linfoma do gato não existem referências concretas relativamente à associação entre o risco de desenvolvimento da doença e o género. Contudo, está reportada a tendência para os gatos machos desenvolverem a doença, dada a maior probabilidade de incidência de infeção por FeLV e/ou vírus da imunodeficiência felina (FIV), pelo comportamento errático e de luta na altura do acasalamento (Court *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998).

1.2.2. Etiologia/Fatores de Risco

A etiologia, na maioria dos casos de linfoma, não é conhecida (Polton, 2010). Sabe-se, no entanto, que esta é multifatorial, podendo ter causas ambientais (fumo de tabaco, agentes virais, dieta, fatores imunossupressores) e causas individuais (fatores genéticos e moleculares, imunossupressão, inflamação crónica e influência do género) (Polton, 2010).

1.2.2.1. Fatores Ambientais

Existem evidências de que a exposição a fumo de tabaco é um fator de risco para o desenvolvimento de linfoma no Homem (Brown *et al.*, 1992; Linet *et al.*, 1992; De

Stefani *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 1998; Herrinton & Friedman, 1998; Miligi *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 2000; Stagnaro *et al.*, 2001). Estudos mais recentes revelam que o tabaco aumenta o risco de desenvolvimento de linfoma do tipo folicular (Morton *et al.*, 2005).

Dada a similaridade entre o linfoma do gato e do homem (Vail *et al.*, 1998; Valli *et al.*, 2000; Bertone *et al.*, 2002) e dada a possibilidade de partilha do mesmo ambiente entre proprietários e gatos foi investigado qual o efeito do fumo de tabaco sobre os últimos (Bertone *et al.*, 2002). Os gatos com estilo de vida interior permanecem durante maior período de tempo em contacto com o fumo do tabaco e partículas depositadas no seu pelo e pele. A exposição ao fumo de tabaco é possível por inalação direta e pela ingestão de partículas depositadas no pelo e pele, aquando da atividade de limpeza (*grooming*) (Bertone *et al.*, 2002). Bertone *et al.* (2002) conduziu um estudo que envolveu um grupo de 80 gatos com linfoma e outro com 114 gatos com doença renal que se apresentaram na Tufts University School of Veterinary Medicine entre os anos 1993-2000, tendo concluído que gatos com 5 ou mais anos de exposição ao fumo de tabaco apresentam um risco relativo de 3.2, de desenvolverem linfoma.

1.2.2.2. Agentes Infecciosos

Várias são as publicações que reportam o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas em gatos infetados com FIV e FeLV (Rojko, *et al.*, 1989; Callanan *et al.*, 1996; Richter, 2003; Grover, 2005; Vail & Young, 2007; Hartmann, 2011). Estes vírus pertencem à família de retrovírus e são os agentes infecciosos mais comumente associados a doenças em gatos (Hartmann, 2011). O FIV é classificado como um lentivírus e o FeLV como um γ -retrovírus. Embora sejam ambos retrovírus, são diferentes no que respeita à sua capacidade de causar doença. O FeLV revela um maior impacto na mortalidade da população felina e o FIV, menos patogénico, leva ao desenvolvimento de três diferentes fases: a fase aguda com sintomas clínicos, a fase assintomática, e, por fim, a fase terminal de síndrome de imunodeficiência adquirida felina (Goto *et al.*, 2000; Levy, 2000; Hartmann, 2011, 2012). As principais consequências da infeção por FeLV são a anemia, linfoma, leucopenia ou trombocitopenia, leucemia ou outra doença mieloproliferativa, imunossupressão, doenças imunomediadas, neuropatia associada ao FeLV (anisocoria, midríase, cegueira central, síndrome de Horner, maioritariamente causados por linfoma ou infiltrados linfocíticos), desordens reprodutivas e Síndrome de “*fading kitten*” (Barnett *et al.*,

2003; Lauring *et al.*, 2002). O curso clínico da infecção varia de acordo com o hospedeiro e com o tipo de vírus (FeLV-A e -B, associados ao desenvolvimento de tumores, FeLV-C, associado a anemia não regenerativa) (Hartmann, 2011, 2012).

No que diz respeito ao linfoma, gatos infetados com FIV apresentam 5.6 vezes maior probabilidade de desenvolverem este tumor (maioritariamente de fenótipo B, sendo que os gatos infetados por FeLV desenvolvem, tendencialmente, linfoma de fenótipo T). Gatos infetados apenas com FeLV e simultaneamente com FIV e FeLV apresentam 62.1 e 77.3 vezes maior probabilidade de desenvolverem linfoma ou leucemia, respetivamente, quando comparados com gatos não infetados; o mesmo se verifica para outros tumores como o carcinoma espinocelular, fibrossarcoma e mastocitoma (Shelton *et al.*, 1990a, b; Fleming *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 1991a; Buracco *et al.*, 1992; Callanan *et al.*, 1992; Poli *et al.*, 1994; Terry *et al.*, 1995; Callanan *et al.*, 1996; Court *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 1997; Beatty *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 2001; Richter, 2003; Grover, 2005; Hartmann, 2011, 2012). Existem autores que sugerem que a infecção por FIV pode estar envolvida no desenvolvimento de linfoma B gastrointestinal, devido à desregulação do sistema imunitário ou ativação de vias oncogénicas (Rosenberg *et al.*, 1991b; Buracco *et al.*, 1992). No entanto, existem autores que reportam que o FIV raramente se encontra associado a gatos com linfoma gastrointestinal (Slawienski *et al.*, 1997; Vail *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998). O provírus do FIV tem sido encontrado ocasionalmente nas células tumorais, sugerindo oncogénese indireta, através da diminuição dos mecanismos de imunovigilância celular ou da hiperplasia das células B, o que permite o crescimento tumoral através dos efeitos imunoestimulantes dos linfócitos em replicação ou através da perda do seu controlo devido à infecção por FeLV (Endo *et al.*, 1997; Beatty *et al.*, 1998b; Wang *et al.*, 2001; Hartmann, 2011, 2012). Alguns estudos revelam, no entanto, a presença de genoma viral de FIV em células de linfoma o que pode indicar efeito direto na génese do linfoma (Diehl & Hoover, 1992; Beatty *et al.*, 1998, 2002). Assim sendo ainda não é consensual o papel do FIV no Linfoma gastrointestinal (GI).

Entre os anos 60 e 80 o FeLV foi considerado o agente mais frequentemente associado ao linfoma do gato. Esta ficou conhecida como a “era do FeLV”. Durante este período cerca de 60 a 70% dos gatos com linfoma estavam associados à presença de antígenos de FeLV (Francis *et al.*, 1979; Hardy *et al.*, 1980; Jeglum *et al.*, 1987; Mooney, 1989; Jackson *et al.*, 1996; Vail & Young, 2007). O FeLV é responsável por maior número de mortes que qualquer outro agente infeccioso isolado e é considerado o

agente viral que mais síndromes clínicas provoca no gato (Hartmann, 2011, 2012). Encontra-se, inclusive, descrito o envolvimento do FeLV em desordens mieloproliferativas (SMP) e mielodisplásicas (SMD) (Hartmann, 2011, 2012).

O mecanismo mais importante pelo qual o FeLV causa cancro está relacionado com a inserção do genoma viral no genoma do hospedeiro, próximo de um proto-oncogene celular (mais comumente o *c-myc*) levando à sua ativação e sobreexpressão. Estas alterações levam à proliferação descontrolada da célula afetada, promovendo a formação de clones, existindo, concomitantemente, uma incorreta resposta imune contra estas células aberrantes (Hartmann, 2011, 2012). Em 1994 foi reportada a prevalência de 32% de transdução ou inserção no *locus myc*. Assim, crê-se que a ação oncogénica do FeLV reside na mutagénese de inserção adquirida, na qual o provirus pode ativar um proto-oncogene ou desligar um gene supressor de tumor (Tsatsanis *et al.*, 1994).

Estão identificados seis *loci* de integração do FeLV associados ao desenvolvimento de linfoma: *c-myc*, *flvi-1*, *flvi-2* (contém *bmi-1*), *fit-1*, *pim-1* e *flit-1*. O *flit-1* parece apresentar um papel importante no desenvolvimento de linfomas tímicos, sendo que em 25 destas neoplasias de uma amostra de 35 relacionados com FeLV, cinco revelaram inserção de provirus no *locus flit-1*, não sendo expressa em linfomas com diferentes localizações (gastrointestinal e multicêntrico) (Fujino *et al.*, 2009).

Após os anos 80, verificou-se a redução acentuada de gatos com linfoma e virémia associada, em consequência de programas de eliminação ou esterilização, segregação e identificação de gatos infetados, reforçados pela possibilidade de vacinação, o que reduziu para cerca de 20% os gatos com linfoma associado ao FeLV (Moore *et al.*, 1996; Vail *et al.*, 1998; Louwerens *et al.*, 2005; Hartmann, 2011; Stützer *et al.*, 2011). O mesmo não se verificou relativamente ao FIV, dado que a sua prevalência não diminuiu tão drasticamente (Louwerens *et al.*, 2005).

Os gatos com linfoma no Sistema Nervoso Central (SNC) são tendencialmente (85 a 90%) FeLV-positivos, contrariamente ao reportado para o linfoma GI (Spodnick *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 1995; Court *et al.*, 1997; Slawienski *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Vail *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Peaston & Maddison, 1999; Rassnick *et al.*, 1999; Louwerens *et al.*, 2005). Estas afirmações têm em conta a pesquisa de antígeno de FeLV em circulação pela técnica de *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA), contudo, é possível que a prevalência de FeLV seja superior na população felina com linfoma, caso o mesmo seja pesquisado recorrendo à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase*

Chain Reaction) (Rohn *et al.*, 1994). Jackson *et al.*, (1993) demonstrou por PCR a presença de DNA de provirus em tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina de 7 em onze linfomas de gatos FeLV-antígeno-negativos, o que sugere uma prevalência superior à reportada na população felina com e sem linfoma. Em relação ao linfoma gastrointestinal a infecção por FeLV foi detetada em 25% dos casos FeLV-negativos pelo teste de ELISA (Jackson *et al.*, 1993). Contudo, outros autores, recorrendo igualmente à técnica de PCR, descreveram prevalências inferiores, na ordem dos 4,5% (Sheets, *et al.*, 1993). Além disso, é possível detetar antígenos virais no citoplasma e na membrana celular, recorrendo à técnica de ELISA para pesquisa de Antígeno de Oncornavirus Associado à Membrana Celular (AOAMC), tendo-se detetado infecção viral em 20% dos casos FeLV-antígeno-negativos (Richter, 2003; Grover, 2005).

Vários estudos revelam que o fenótipo T predomina em gatos FeLV-positivos e o B em gatos FeLV-negativos (Hardy, 1981; Neil *et al.*, 1984). Mais recentemente, Stützer *et al.*, (2011) demonstraram que 18/28 (64,3%) gatos FeLV-negativos apresentavam linfoma de imunofenótipo T, ao passo que nenhum dos gatos FeLV-positivo (0/8) evidenciou tumor de imunofenótipo B.

Quanto à associação de FeLV e morfologia tumoral, não parece haver associação pois, tanto linfomas de alto grau (Linfoma de Linfócitos Grandes Granulares) como os linfomas de baixo grau (Linfoma linfocítico) parecem não apresentar qualquer associação com a infecção com FeLV (Kiselow *et al.*, 2008; Krick *et al.*, 2008).

Apesar da controvérsia da associação da infecção retroviral com o desenvolvimento de linfoma, o “estado retroviral” dos gatos com a doença deve ser definido, dado que a antigenemia persistente de FeLV acarreta um prognóstico reservado e a dupla infecção com FIV e FeLV pode promover a desregulação da função imunitária que, por si só, já poderá ser afetada pela quimioterapia instaurada para induzir a remissão. Assim, devem ser tomadas medidas de monitorização específicas para estes pacientes (Barrs & Beatty, 2012a).

Apesar da prevalência de FeLV na população felina atual estar a diminuir, a prevalência total de gatos com linfoma está a aumentar, sendo a localização gastrointestinal a mais frequente, tornando-se importante identificar outras possíveis causas (Louwerens *et al.*, 2005).

Outro agente infeccioso sugerido como possível agente etiológico para o desenvolvimento de linfoma no gato é a infecção por *Helicobacter* spp. (Bridgeford *et al.*, 2008). Em medicina humana está comprovada a associação entre a presença de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e o desenvolvimento do Linfoma do Tecido Linfoide Associado à Mucosa (MALT) (Farinha & Gascoyne, 2005). Bridgeford *et al.*, (2008) associaram a presença de *Helicobacter heilmannii* (Hhe) em gatos com linfoma MALT gástrico. Esta associação foi significativa, revelando a presença do agente em 22/29 casos estudados. Além disso, verificou-se a associação da infecção de Hhe especialmente com o linfoma linfoblástico, o que abre portas para a realização de estudos prospectivos para melhor compreensão da frequência e distribuição da infecção por esta bactéria em gatos saudáveis e com linfoma gástrico (Bridgeford *et al.*, 2008).

Foi recentemente associada a presença de gamaherpesvirus (GHV) no linfoma do cão (Huang *et al.*, 2012). Em medicina humana está comprovada a associação entre a infecção do vírus Epstein-Barr (EBV), um GHV, e o desenvolvimento de Linfoma de Hodgkin (HL), de Linfoma não-Hodgkin (LnH) (incluindo o Linfoma de Burkitt (LB), de Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG) e de Linfoma *Natural Killer* (NK/T)). Apesar de existirem muitos estudos incidindo nas proteínas virais com capacidade de ativar vias oncogénicas, os mecanismos através dos quais o EBV contribui para a patogénese das neoplasias linfoides e epiteliais não estão, totalmente, compreendidos o que impede o desenvolvimento de estratégias para tratar ou prevenir as neoplasias associadas ao EBV (Huang, *et al.*, 2012). A infecção por EBV em cães e gatos encontra-se descrita (Milman *et al.*, 2011); porém, nos últimos não está reportada a associação com neoplasia hematopoiética.

1.2.2.3. Fatores Genéticos e Moleculares

Avanços recentes na citogenética molecular, como técnicas de microarranjos de genes (*gene microarray*), têm sido utilizados na investigação de aberrações cromossómicas em cães com linfoma, tendo sido documentado ganho nos cromossomas 13 e 31 e perda do cromossoma 14 como aberrações mais frequentes (Thomas, 2001, 2003a, 2003b). Além disso, a prevalência de determinados subtipos de linfoma em algumas raças está relacionada a traços hereditários (Lurie *et al.*, 2004; Modiano *et al.*, 2005); em gatos, a elevada incidência de linfoma mediastínico em animais jovens (2 anos de idade), FeLV-negativos e de raça oriental (siamês, por exemplo) sugere uma predisposição genética e indica riscos de transmissão hereditária (Court *et al.*, 1997;

Gabor *et al.*, 1998; Louwerens *et al.*, 2005). Nos últimos anos observou-se uma expansão do conhecimento dos eventos moleculares e da tumorigénese em medicina humana e veterinária: alterações de genes supressores de tumores/oncogenes, epigenéticas, em vias de transdução de sinal, e em vias de apoptose são comuns em linfomas do Homem e, possivelmente, em cães e gatos (Vail & Young, 2007). Aberrações dos genes *N-ras* (oncogene) em cães e gatos (Mayr *et al.*, 2002) e p53 apenas em cães, embora raros em ambas as espécies, foram demonstradas em alguns cães e gatos com linfoma (Veldhoen *et al.*, 1998; Nasir & Argyle, 1999; Setoguchi *et al.*, 2001; Mayr *et al.*, 2003, Sueiro *et al.*, 2004; Sokołowska *et al.*, 2005). Alterações da atividade das telomerasas estão, também, documentadas no linfoma do cão (Carioto *et al.*, 2001; Nasir *et al.*, 2001; Yazawa *et al.*, 2003a; Renwick *et al.*, 2006; Zavlaris *et al.*, 2009) e do gato (Cadile *et al.*, 2001; Yazawa *et al.*, 2003b).

Foram, também, estudadas no LnH do gato alterações relacionadas com a proliferação celular e a regulação da apoptose, estando envolvidos reguladores do ciclo celular quinase ciclina-dependentes (Madewell, *et al.*, 2001) e moléculas da família do BCL-2 (Dank *et al.*, 2002).

1.2.2.4. Imunossupressão

Alterações no sistema imunitário do gato, assim como no cão e no Homem, estão associadas ao desenvolvimento de linfoma. No gato a infeção por FIV está reportada como potencial factor etiológico do linfoma (Shelton *et al.*, 1990a, 1990b; Hutson *et al.*, 1991; Terry *et al.*, 1995; Beatty *et al.*, 1998a, b; Gabor *et al.*, 2001; Beatty *et al.*, 2002). Encontra-se, também, descrito o desenvolvimento *de novo* de linfoma em gatos após transplante renal (Wooldridge *et al.*, 2002; Schmiedt *et al.*, 2009) o que reforça a ligação entre a terapêutica imunossupressora e o desenvolvimento de linfoma, de modo semelhante aos humanos transplantados e imunossuprimidos.

1.2.2.5. Dieta e o Linfoma Gastrointestinal

Embora não tenha sido comprovada a relação direta entre a dieta e o desenvolvimento do linfoma gastrointestinal do gato, esta relação foi sugerida por Louwerens *et al.* (2005). Esta associação é suportada pelo facto de, nos últimos 20 anos, se ter observado um aumento absoluto e relativo do número de casos de gatos com linfoma gastrointestinal e pelo facto de, dentro do mesmo período de tempo, terem ocorrido modificações no alimento comercial para gatos, com especificações para

determinadas condições clínicas com elevada prevalência na população felina, particularmente a doença do trato urinário felino (Markwell *et al.*, 1998; Vail & Young, 2007). Está reportado que cerca de 71% dos gatos com diarreia crônica, melhoram a sua condição clínica após mudança de um alimento comercial relativamente rico em hidratos de carbono, para alimentos ricos em proteína animal e pobres em hidratos de carbono (Laflamme & Long, 2004). Além disso, foi sugerido que refeições compostas por carne são melhor fonte proteica para os gatos que glúten de milho (Funaba *et al.*, 2002). Está comprovada a associação da dieta no aumento de incidência da Doença Inflamatória/Idiopática Intestinal (IBD) (Jergens, 2012), e existem autores que sugerem que a IBD (inflamação crônica) pode contribuir para o desenvolvimento de linfoma gastrointestinal em gatos predispostos (Louwerens *et al.*, 2005).

Em medicina humana está comprovada a associação direta entre a doença celíaca (doença inflamatória intestinal associada à sensibilidade ao glúten) e o desenvolvimento de linfoma gastrointestinal (GI). Em indivíduos geneticamente predispostos, o Linfoma T Associado a Enteropatia (LTAE) pode-se desenvolver a partir da transformação clonal dos linfócitos intraepiteliais intestinais após estimulação antigénica crônica e é a complicação neoplásica mais comum associada à doença celíaca (Green & Cellier, 2007; Ferreri *et al.*, 2011). Estudos recentes revelam que o subtipo de linfoma GI mais frequentemente diagnosticado no gato é compatível com o LTAE em humanos (Moore *et al.*, 2011; Vezzali *et al.*, 2009), porém são necessários mais estudos que comprovem a associação do tipo de alimento com o desenvolvimento deste subtipo de linfoma no gato.

1.2.2.6. Inflamação Crônica

Embora não esteja completamente comprovada a associação da inflamação crônica com o desenvolvimento de linfoma no gato, existem evidências indiretas que sugerem que o linfoma pode desenvolver-se a partir de estados de inflamação crônica. Tendo sido sugerida a associação entre IBD (Enterocolite Linfo-plasmocítica) e linfoma (Tams, 2003; Carreras *et al.*, 2003; Ragaini *et al.*, 2003; Louwerens *et al.*, 2005; Swanson *et al.*, 2012). Esta associação foi reforçada por estudos que descrevem a associação entre o desenvolvimento de sarcomas em locais onde foram realizadas vacinações (Sarcoma associado ao local da vacinação), uma síndrome diretamente relacionada com a inflamação que pode, também, predispor ao desenvolvimento de linfoma (Madewell *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da IBD surge da junção de diversos fatores, 1) distúrbio na barreira mucosa do trato gastrointestinal, 2) distúrbio na imunidade da mucosa e 3) alteração da microflora presente na mucosa (Sartor, 2006). No trato gastrointestinal saudável a barreira epitelial participa ativamente na regulação dos sistemas imunes inato e adquirido na resposta às agressões. Recetores nas e entre as células epiteliais controlam os sistemas inato e adquirido, desempenhando um papel importante na interação entre a barreira mucosa, imunidade e microflora (Abreu *et al.*, 2005; Cario, 2005; Gribar *et al.*, 2008). A desregulação dos recetores epiteliais e inter-epiteliais interrompe a homeostase e o número elevado de determinadas linhagens bacterianas podem originar o desenvolvimento da IBD (Dunbar, 2011). Não estão comprovados os mesmos mecanismos ou similares na IBD do gato, porém suspeita-se que antigénios derivados da flora comensal podem desempenhar um papel importante no desenrolar da doença. Além disso, é sugerido um papel importante da dieta tanto na etiologia como na terapêutica da IBD e, embora se suspeite, ainda não foi totalmente comprovada a base genética da IBD em determinadas raças (orientais), apesar de qualquer raça poder desenvolver a doença (Jergens, 2012).

A distinção eficaz entre a IBD e o linfoma gastrointestinal pode ser desafiante por métodos não invasivos, dado que a linfadenopatia dos linfonodos mesentéricos e o espessamento da *muscularis própria*, apesar de indicativos, não são patognomónicos de linfoma ou IBD (Zwingenberger *et al.*, 2010). Além disso, a própria análise histomorfológica das biopsias totais da parede intestinal pode não ser esclarecedora, devendo-se recorrer a técnicas de Imunohistoquímica e PCR (estudo de clonalidade) para a diferenciação entre inflamação e neoplasia linfoide (Waly *et al.*, 2005; Kiupel *et al.*, 2011; Swanson *et al.*, 2012).

A obtenção de amostras por endoscopia dificulta a distinção entre IBD e linfoma GI, dado que apenas a mucosa é analisada, tornando-se difícil perceber a verdadeira extensão dos linfócitos. Além disso, as regiões onde o linfoma é mais frequentemente reportado (válvula ileocecólica e jejuno) são de difícil acesso endoscópico (Moore *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2006; Willard *et al.*, 2008; Kiupel *et al.*, 2011). Evans *et al.*, (2006) concluíram que a distinção entre IBD e linfoma GI só pode ser feita através de biópsia total da parede do intestino (jejuno e íleo).

Existem várias linhas de evidência que suportam a associação entre a inflamação crónica e o desenvolvimento de linfoma T (de qualquer grau histológico) no gato. Um estudo revela que 60% dos gatos com linfoma T intestinal apresentavam doença clínica

de progressão crónica, sugerindo história pré-existente de doença inflamatória crónica (Roccabianca *et al.*, 2006). Além disso, encontra-se descrita uma associação em 41% dos casos de gatos com linfoma T de baixo grau a enterite linfoplasmocítica (ELP) concomitante noutras regiões do trato gastrointestinal (Carreras *et al.*, 2003; Lingard *et al.*, 2009; Briscoe *et al.*, 2011), e estão documentados casos individuais de aparente progressão histológica de ELP para linfoma gastrointestinal (Davenport *et al.*, 1987; Hart *et al.*, 1994).

Conforme já referido, atualmente, a infeção por FeLV deixou, provavelmente, de ser o principal factor etiológico do linfoma do gato; contudo, tem-se observado aumento da sua incidência, o que torna evidente a existência de fatores adicionais que contribuem para o seu desenvolvimento. Assim, devem ser realizadas futuras investigações que ajudem a determinar os verdadeiros potenciais etiológicos da IBD, dieta e fatores ambientais no desenvolvimento de linfoma no gato (Mahony *et al.*, 1995; Krecic & Black, 2000; Louwerens *et al.*, 2005; Roccabianca *et al.*, 2006).

1.2.3. A Classificação do Linfoma

Porquê classificar? A classificação é a linguagem da medicina: as doenças devem ser descritas, definidas e nominadas antes de poderem ser diagnosticadas, tratadas e estudadas. É essencial criar um consenso nas definições e terminologia das doenças para a prática clínica e investigação. Um sistema de classificação deve conter doenças distintamente definidas em termos clínicos e patológicos, tendo a capacidade de abranger todas as entidades conhecidas, para que possa servir de base para estudos futuros e permitir a incorporação de novas informações e descobertas, assim estas se tornem disponíveis (Swerdlow *et al.*, 2008). A classificação tem a grande vantagem de incluir a totalidade das entidades no contexto de uma única doença (Valli, 2007).

1.2.3.1. Nota Histórica

Ao longo dos anos as classificações desenvolvidas para o linfoma não-Hodgkin no Homem foram utilizadas pelos patologistas veterinários para a classificação dos linfomas das espécies veterinárias afetadas (Vernau *et al.*, 1992; Valli *et al.*, 2000; Cesari *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009; Valli *et al.*, 2011; Durham *et al.*, 2012).

Ao longo dos últimos anos verificou-se uma constante atualização dos sistemas de classificação do linfoma em medicina humana e em medicina veterinária. Esta evolução

deveu-se, essencialmente, à capacidade de diferenciação das células pelo seu imunofenótipo, identificação de diferentes comportamentos clínicos de linfomas com a mesma morfologia celular e o surgimento de novos conhecimentos sobre os mecanismos celulares (Valli, 2007).

Em 1942 Gall e Mallory providenciaram um sistema simplificado, baseado na morfologia celular, que foi alterado em 1966 por Henry Rappaport que, através da análise de 300 casos de linfoma, removeu o termo clasmatócito, substituiu o termo linfoma folicular por quatro tipos de linfoma nodular e concluiu que todos os linfomas com esse padrão, incluindo a doença de Hodgkin, apresentavam melhor prognóstico. A classificação Rappaport de 1966 representou o primeiro sistema de classificação a ser utilizado no linfoma do cão (Valli, 2007).

O primeiro sistema de classificação baseado em princípios imunológicos (categorização fenotípica B e T) foi desenvolvido por Karl Lennert, em Kiel, Alemanha, em 1974, tendo sido revisto em 1988 e em 1992. Lennert, ao designar os diferentes linfócitos neoplásicos, tendo como comparação as células benignas em diferentes estádios de diferenciação, aplicou as categorias de centrócitos aos linfócitos de pequenas dimensões e centroblastos os linfócitos de grandes dimensões. Este sistema de classificação foi amplamente utilizado na Europa em medicina veterinária (Valli *et al.*, 1981; Carter *et al.*, 1986; Greenlee *et al.*, 1990; Fry *et al.*, 2003), sendo, ainda, atualmente utilizado para a classificação de séries de linfomas em espécies veterinárias (Chino *et al.*, 2013). Na mesma época, o sistema de classificação de Lukes-Collins (Lukes & Collins, 1974) prevalecia na América do Norte em medicina humana e veterinária (Teske *et al.*, 1994; Fournel-Fleury *et al.*, 2002).

Por forma a facilitar a comunicação entre patologistas e oncologistas clínicos foi definido o sistema de classificação *National Cancer Institute Working Formulation* (NCI-WF), largamente utilizado na América do Norte e na maior parte do mundo, exceto na Europa onde predominava o uso do sistema de Kiel. Este novo sistema de classificação foi aplicado com sucesso na classificação do linfoma do gato tendo revelado a predominância de linfoma de alto grau (54%), sendo constituídos em mais de um terço por entidades do tipo imunoblástico (National Cancer Institute, 1982; Valli *et al.*, 2000).

Contudo, dada a rigidez deste sistema de classificação (NCI-WF), não era possível a inclusão de novas entidades, gerando, novamente, dificuldades de comunicação entre patologistas e oncologistas. Para combater este novo problema, em

1994, o Grupo de Estudo Internacional do Linfoma (ILSG, do inglês *International Lymphoma Study Group*) sugeriu um novo sistema de classificação, a Revisão Europeia-Americana (REAL, do inglês, *Revised European-American Lymphoma classification*) que incluía características como a morfologia celular, imunofenótipo, genótipo e apresentação clínica. Este sistema foi amplamente aplicado e mais tarde, em 2000, apenas foram realizados ajustes pela Organização Mundial de Saúde (OMS), (Harris *et al.*, 2000), tendo sido demonstrada a sua eficácia na classificação do linfoma em medicina humana (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997) e tendo sido atualizado em 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008). O sistema de classificação da OMS revelou concordância entre diferentes patologistas de medicina humana na ordem dos 85%. Posteriormente o mesmo esquema de classificação foi aplicado e validado em medicina veterinária (Valli *et al.*, 2011).

1.2.3.2. Esquema de classificação de acordo com a OMS

O sistema de classificação da OMS identifica várias entidades de linfoma e leucemias como doenças individuais, englobando estudos de topografia, tipo celular, imunofenótipo, citogenética e análise molecular, sendo os três primeiros aplicáveis em termos práticos para o diagnóstico e classificação do linfoma das espécies veterinárias. Em 2002, foi criado um sistema de classificação para o linfoma de espécies domésticas tendo como base o sistema de classificação da OMS (Valli *et al.*, 2002).

Recentemente, foi comprovada a eficácia do sistema de classificação da OMS no linfoma do cão, sendo atingida uma concordância diagnóstica entre patologistas de 83% demonstrando elevada consistência e reprodutibilidade diagnóstica, bem como comprovando a importância da imunofenotipagem para a classificação precisa do linfoma (Valli *et al.*, 2011). O linfoma folicular é o único subtipo de linfoma que pode ser diagnosticado e classificado com precisão apenas por visualização de cortes corados com hematoxilina-eosina (HE); porém este subtipo é incomum em medicina veterinária, o que torna a técnica de imunohistoquímica uma importante ferramenta para a classificação do linfoma das espécies domésticas (Valli *et al.*, 2011). Além disso, este sistema de classificação permite a incorporação de nova informação às entidades descritas, permitindo, por exemplo, a criação de subtipos de entidades de linfoma tendo em conta a maior especificidade diagnóstica e diferentes prognósticos dentro da mesma entidade.

No gato, a localização anatômica mais comum é a GI (representa cerca de 52% dos linfomas do gato) e, dentro desta, a entidade mais descrita é o LTAE (representa cerca de 60 a 80% dos linfomas GI), estando identificados o tipo I, caracterizado pela existência de células pequenas com envolvimento transmural do trato gastrointestinal, e o tipo II, mais frequente (cerca de 83% dos LTAE), caracterizado pelo envolvimento solitário da mucosa intestinal (epiteliotropismo) e associado a taxas de sobrevivência e de resposta à terapêutica superiores em relação ao tipo I e ao linfoma B. Esta entidade de linfoma expressa as moléculas CD3 e CD103 e revela rearranjos clonais do Recetor de Células T Gama (RCTG) (Vezzali *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011).

Encontra-se reportada uma localização de linfoma gastrointestinal com menor prevalência, o Linfoma de linfócitos Granulares de Grandes Células (LGGC) em gatos FeLV-antigénio negativos (Franks *et al.*, 1986; Honor *et al.*, 1986; Goitsuka *et al.*, 1993; McEntee *et al.*, 1993; Kariya *et al.*, 1997; Darbès *et al.*, 1998). Este tumor é caracterizado por apresentar na sua composição, células grandes redondas com vários grânulos azurofílicos (células NK e T citotóxicas). O imunofenótipo deste tumor é, essencialmente, CD3, CD57, CD20 negativo, perforina positivo, apresentando as suas células rearranjo do recetor de células T (RCT). O LGGC surge mais frequentemente no jejuno, e pode, ou não, existir envolvimento dos linfonodos mesentéricos, infiltração ou focos pulmonares, miocárdio, glândulas salivares e espinal medula. Em termos histológicos, dada a sua semelhança, é importante distinguir as células do LGGC, das células enterocromafins, dos mastócitos e dos eosinófilos (Vail & Young, 2007). O Anexo III revela as diferentes entidades já descritas no gato.

1.2.4. Comportamento Natural e Patologia

O linfoma pode ser classificado com base na sua localização anatômica, critério histológico e características imunofenotípicas. Existem, no entanto, diversos sistemas de classificação anatômica para o gato. A prevalência das localizações anatômicas no gato varia de acordo com a distribuição geográfica, infeção retroviral (FeLV, FIV), genética e prevalência de uso de vacinas contra FeLV. No caso do cão, cerca de 80% dos animais afetados apresentam a localização multicêntrica da doença e apenas cerca de 20 a 40% dos animais afetados apresentam sinais clínicos (perda de peso, letargia, anorexia e pirexia) ao diagnóstico; já no gato a localização GI é a mais prevalente (Gabor *et al.*, 1998; Vail & Young, 2007; Vezzali *et al.*, 2009; Barrs & Beatty, 2012a).

1.2.4.1. Linfoma Gastrointestinal/Alimentar

No gato o linfoma é o tumor intestinal mais frequente (55%) seguindo-se o adenocarcinoma (32%) e mastocitoma (4%) (Rissetto *et al.*, 2011). O linfoma gastrointestinal (GI) é a localização anatômica mais comum da doença no gato, verificando-se um aumento significativo da sua incidência nos últimos anos (Mahony *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1996; Gabor *et al.*, 1998; Vail *et al.*, 1998; Kristal *et al.*, 2001; Grover, 2005; Louwerens *et al.*, 2005; Milner *et al.*, 2005; Vezzali *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2011; Stützer *et al.*, 2011; Barrs & Beatty, 2012a); existem, no entanto, autores que descrevem as localizações Leucémica, Mediastínica e Multicêntrica como as mais frequentes (Jackson *et al.*, 1993; Court *et al.*, 1997). As discrepâncias na prevalência de diferentes localizações anatômicas em diferentes estudos podem dever-se ao uso de distintos sistemas de classificação anatômica, diferenças de prevalência da infecção pelos subtipos de FeLV em diferentes áreas geográficas, diminuição da incidência das localizações não gastrointestinais desde a implementação de programas de erradicação do FeLV e o fato de o linfoma GI, por vezes, ser de difícil distinção entre entidade inflamatória e, por isso, requerer de métodos de diagnóstico mais dispendiosos, (Hardy, 1981; Barrs & Beatty, 2012a). No cão, tal como em medicina humana os machos são mais afetados que as fêmeas; no gato, embora ainda controverso, verifica-se semelhante relação. (Keller *et al.*, 1993; Vail *et al.*, 1996, 2007).

O linfoma alimentar pode afetar o trato digestivo alto (cavidade oral e esófago) ou baixo (estômago 25%, intestino delgado 50 a 80%, e grosso 15%), fígado ou pâncreas, sendo caracterizado pela infiltração de linfócitos neoplásicos com ou sem envolvimento dos linfonodos mesentéricos (Mahony *et al.*, 1995; Zwahlen *et al.*, 1998; Rassnick *et al.*, 1999; Richter, 2003; Louwerens *et al.*, 2005; Gieger, 2011). Apesar do linfoma surgir a qualquer idade, os gatos seniores (aproximadamente 13 anos para o Linfoma T e 12 anos para o linfoma B) são os mais afetados pelo linfoma GI e a raça siamesa apresenta maior risco de desenvolvimento desta localização. Além disso, o intestino delgado é quatro vezes mais afetado que o grosso e a vasta maioria dos gatos com linfoma GI são FeLV negativos (Louwerens *et al.*, 2005; Lingard *et al.*, 2009; Gieger, 2011; Moore *et al.*, 2011; Rissetto *et al.*, 2011). Porém, alguns autores, baseando-se na técnica de PCR para a deteção de material genético viral, reportam prevalência superior de infecção por FeLV em gatos com linfoma GI. Os mesmos detetaram material genético viral em gatos com linfoma e antígenemia negativa, e sugerem a presença de infecção latente como potencial etiologia (Jackson *et al.*, 1993,

1996). Independentemente do estado retroviral, muitas células de linfoma expressam o Antígeno de Oncornavirus Associado à Membrana Celular, o que pode indicar exposição prévia ao vírus sem ter ocorrido infecção, permitindo associar a importância oncogénica do mesmo (Hardy *et al.*, 1980). A associação entre a infecção por *Helicobacter heilmannii* foi, também, detetada em 16 de 24 linfomas gástricos de gato, sugerindo outro potencial agente etiológico para o linfoma do gato (Bridgeford *et al.*, 2008).

Em termos macroscópicos o linfoma pode-se manifestar como lesão focal, multifocal ou difusa, apresentando-se sem evidentes alterações macroscópicas comparativamente com o intestino normal, principalmente quando se trata de linfoma linfocítico de baixo grau ou LTAE tipo II. Quando é detetada uma massa no trato gastrointestinal existe, normalmente, espessamento transmural com ou sem ulceração da mucosa. No estômago as lesões podem ser rugosas ou lisas, mais ou menos friáveis, solitárias, múltiplas ou difusamente infiltrativas. No intestino o linfoma manifesta-se com espessamento excêntrico, preservando o lúmen; no entanto pode levar à obstrução funcional, contrariamente ao que acontece com lesões carcinomatosas que tendem a promover obstruções mecânicas totais ou parciais do lúmen intestinal. A hipomotilidade intestinal e linfadenopatia mesentérica provocadas pelo linfoma podem ser detetadas à ecografia e/ou ao exame físico, por palpação (Hittmair *et al.*, 2001). A intussusceção pode ser uma consequência do linfoma intestinal, sendo o jejuno a região maioritariamente afetada (Burkitt *et al.*, 2001). A invasão hepática pelos linfócitos neoplásicos ocorre, principalmente, no linfoma linfocítico, originando uma aparência heterogénea do fígado, com perda do padrão lobular e com lesões multifocais ou solitárias de coloração variável. Em resumo, a aparência macroscópica do linfoma é bastante variável em todas as regiões do trato gastrointestinal, devendo, por isso, ser considerado como um importante diagnóstico diferencial em doenças que possam ou não causar alterações nos órgãos abdominais (Richter, 2003).

Em termos histológicos o linfoma do gato pode-se dividir em células pequenas - Linfoma Linfocítico (LL) – e de células grandes – Linfoma Linfoblástico (LBL). O LL caracteriza-se por apresentar baixo grau e ser bem diferenciado, representando cerca de 10 a 13% de todas as localizações de linfoma do gato, e cerca de 37% a 75% dos linfomas GI do gato (Fondacaro *et al.*, 1999; Lingard *et al.*, 2009; Pohlman *et al.*, 2009). O LBL apresenta alto grau e é pouco diferenciado. Existe ainda, uma entidade intermédia designada por Linfoma GI de Grau Intermédio, que representa cerca de 61%

de todos os linfomas gastrointestinais (Gabor *et al.*, 1999), sendo esta entidade muito similar em termos clínicos ao LBL (Gabor *et al.*, 1999; Valli *et al.*, 2000; Barrs & Beatty, 2012a). Tendo em conta esta classificação, Fondacaro *et al.*, (1999) reportaram que o LL é 3 vezes mais frequente que o LBL; no entanto, encontram-se descritas prevalências similares entre as duas localizações (Lingard *et al.*, 2009) e até prevalências de LBL (64%) superiores relativamente ao LL (Chino *et al.*, 2013).

Recentemente foram classificados 120 casos de linfoma GI do gato de acordo com o sistema de classificação da OMS, tendo em conta o imunofenótipo, o envolvimento da mucosa (infiltrado neoplásico confinado à mucosa e lâmina própria) ou transmural (extensão para a submucosa e muscular própria), a localização anatómica, o tamanho das células neoplásicas, a presença de epiteliotropismo, a clonalidade e dados de sobrevivência. Nenhum dos 120 casos revelou infecção por FeLV e apenas três eram FIV positivos. Este estudo revelou predominância do linfoma T no intestino delgado e B no estômago e intestino grosso. A maioria dos linfomas T são compatíveis com a entidade Linfoma T Associado a Enteropatia tipo II (envolvimento da mucosa), de células pequenas, com epiteliotropismo, e apresentam clonalidade para o recetor das células T (Moore, *et al.*, 2011).

Encontra-se descrita uma localização de linfoma menos frequente (6 a 7% de todos os linfomas GI), o Linfoma de Grandes Células Granulares (LGGC), caracterizado pela presença de grânulos magenta ou azurofílicos no citoplasma das células neoplásicas (Krick *et al.*, 2008); este caracteriza-se por apresentação clínica, terapêutica e prognóstico distintos. Este subtipo de linfoma pode estar subestimado dado serem necessárias técnicas especiais para evidenciar a granzima B, proteína presente nos grânulos citotóxicos. Além disso, este subtipo de linfoma expressa, geralmente, as moléculas CD3, CD8, CD103, mas não o CD20, representando linfoma de fenótipo T; podem, também, não expressar nenhuma destas moléculas revelando origem nas células *Natural Killer* (NK). O LGGC é um subtipo que surge, maioritariamente, no intestino delgado, com apresentação transmural, com epiteliotropismo, revelando, a maioria, envolvimento ganglionar mesentérico e de outros órgãos abdominais e torácicos (Darbès *et al.*, 1998; Krick *et al.*, 2008; Pohlman *et al.*, 2009; Gieger, 2011; Moore *et al.*, 2011).

Existe controvérsia quanto ao fenótipo predominante no linfoma GI do gato, na medida em que alguns autores referem predominância do fenótipo B (Jackson *et al.*, 1996; Vail *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Patterson-Kane *et al.*, 2004; Waly *et al.*,

2005; Pohlman *et al.*, 2009), outros referem o fenótipo T como mais frequente, sendo este fenótipo o mais associado à localização epiteliotrópica do linfoma intestinal ou linfoma de baixo grau (90%) (Zwahlen *et al.*, 1998; Carreras *et al.*, 2003; Vezzali *et al.*, 2009; Kiupel *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011; Chino *et al.*, 2013), ao passo que outros autores descrevem uma reduzida diferença de prevalência entre linfomas B e T em linfomas de intermédio e alto graus (Jackson *et al.*, 1993, 1996; Roccabianca *et al.*, 2006; Kiselow *et al.*, 2008; Kiupel *et al.*, 2011). Além disso, foram identificadas fortes associações entre o imunofenótipo e a localização do linfoma GI, sendo o estômago o local onde predomina o Linfoma B e o intestino delgado onde predomina o linfoma T (Pohlman *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011). Os linfomas gástricos de fenótipo B têm a sua origem no MALT difuso do estômago colonizado por *Helicobacter heilmannii* ou a partir de nódulos linfoides da mucosa gástrica (Bridgeford *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2011).

Os sistemas de classificação histológica mais frequentemente aplicados ao linfoma gastrointestinal do gato são o *National Cancer Institute Working Formulation* (NCI-WF) e o *Revised European-American Lymphoma / World Health Organization* (REAL/WHO) (Fondacaro *et al.*, 1999; Gabor *et al.*, 1999; Valli *et al.*, 2000; Patterson-Kane *et al.*, 2004; Waly *et al.*, 2005; Cesari *et al.*, 2009; Pohlman *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009). O sistema NCI-WF classifica o linfoma de acordo com a taxa de progressão, reconhecendo três graus histológicos (Alto, Intermédio, Baixo), baseando-se na frequência de mitoses por campo de observação. O esquema REAL/WHO classifica o linfoma numa entidade específica, baseando-se, principalmente, no imunofenótipo e características morfológicas (Harris *et al.*, 1994). Vários estudos reportam um aumento da incidência de Linfoma GI de Baixo Grau (LGBG) (Fondacaro *et al.*, 1999; Carreras *et al.*, 2003; Kiselow *et al.*, 2008; Lingard *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 2010; Briscoe *et al.*, 2011; Kiupel *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011), para o qual, recorrendo ao esquema de classificação NCI-WF, os casos de LGBG são subclassificados em Linfoma Linfocítico de Células Pequenas (Valli *et al.*, 2000; Carreras *et al.*, 2003; Kiselow *et al.*, 2008; Lingard *et al.*, 2009; Pohlman *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 2010; Briscoe *et al.*, 2011), ao passo que, segundo o esquema REAL/WHO, o LGBG é identificado como Linfoma Epiteliotrópico de Células Pequenas T, Linfoma Epiteliotrópico de Células T, Linfoma T Intestinal ou Enteropatia Associada ao Linfoma T (Valli *et al.*, 2000, 2002; Waly *et al.*, 2005; Pohlman *et al.*, 2009; Briscoe *et al.*, 2011; Kiupel *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2011).

1.2.4.2. Linfoma Mediastínico

O linfoma mediastínico pode envolver o timo e os linfonodos mediastínicos e esternais (Figura 1). A efusão pleural é um achado comum em gatos com esta forma de linfoma. Cerca de 63% dos gatos com doença no timo e 17% dos gatos com derrame pleural foram documentados como tendo linfoma (Davies & Forrester, 1996; Day, 1997). O linfoma pode estender-se, ocasionalmente, para a região cervical ventral, podendo ser detetado ao exame físico por palpação. Nos anos 80 o linfoma mediastínico apresentava elevada prevalência no gato, representando 20 a 40% dos linfomas no gato nos Estados Unidos, 10 a 50% dos casos no Reino Unido e 70% dos casos no Japão (Takahashi *et al.*, 1974; Gruffydd-Jones *et al.*, 1979). Contudo, em estudos mais recentes, a prevalência do linfoma mediastínico nos Estados Unidos foi de <15% e cerca de 25% na Austrália (Court *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Vail *et al.*, 1998). Estudos anteriores reportam elevada prevalência da infecção por FeLV na localização mediastínica da doença e maior predisposição em gatos jovens (Takahashi *et al.*, 1974; Court *et al.*, 1997; Vail *et al.*, 1998). O fenótipo T é o mais frequente (50 a 85%) no linfoma mediastínico (Gruffydd-Jones *et al.*, 1979; Vail *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2006).

Em cães com linfoma mediastínico a hipercalemia é um achado relativamente frequente (presente em cerca de 43% dos casos), contrariamente aos gatos (Chew *et al.*, 1975; McMillan, 1985; Rosenberg *et al.*, 1991b; Savary *et al.*, 2000). Em gatos com hipercalemia de origem tumoral, incluindo um gato com linfoma, foi detetado, por técnicas imunoradiométricas um péptido relacionado com a paratormona (PTHrP) (Bolliger *et al.*, 2002). A maioria dos gatos com linfoma mediastínico são jovens, FeLV-antigénio-positivos e apresentam, tendencialmente linfoma T (Jackson *et al.*, 1993, 1996; Court *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Vail *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Peaston & Maddison, 1999; Louwerens *et al.*, 2005). Além disso, está descrita a predisposição genética da raça siamesa e cruzados de siamês para o desenvolvimento desta forma de linfoma (Cotter *et al.*, 1975; Gruffydd-Jones *et al.*, 1979; Court *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Louwerens *et al.*, 2005). A ausência de infecção retroviral, o aparecimento precoce (a maioria dos gatos afetados têm menos de dois anos de idade) e apresentação clínica consistente sugerem heritabilidade desta forma da doença na raça siamesa e cruzados de siamês (Seo *et al.*, 2006).

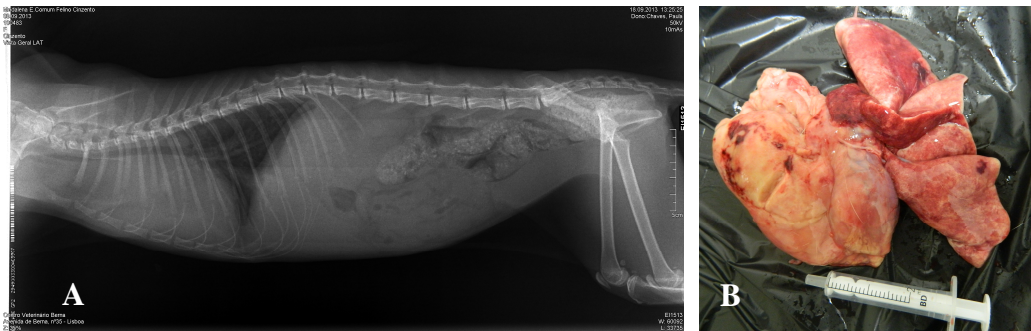


Figura 1.: Gato, 1 ano, Europeu Comum, FeLV-antígeno positivo, com Linfoma T Mediastínico com deslocamento traqueal dorsal. A) Radiografia torácica lateral esquerda. Evidente efeito de massa na região do mediastino cranial, diagnóstico confirmado por análise citológica após punção aspirativa com agulha fina da lesão. B) Imagem pos-mortem da lesão mediastínica do mesmo paciente. Fotografias originais do autor.

1.2.4.3. Linfoma Nodal

O linfoma nodal tem como expressão clínica unicamente o envolvimento de linfonodos periféricos. No gato, esta apresentação é incomum, representando apenas 4 a 10% dos casos (Vail *et al.*, 1998; Louwerens *et al.*, 2005). Contudo, cerca de um quarto de todos os linfomas do gato apresentam algum grau de envolvimento ganglionar (Louwerens *et al.*, 2005). Cerca de um terço dos gatos com linfoma nodal são de fenótipo T, FeLV-antígeno-positivos e a maioria tem menos de um ano de idade (Vail *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999). À medida que o linfoma progride, pode ocorrer infiltração da medula óssea, do fígado e do baço por linfócitos neoplásicos, podendo manifestar-se com supressão medular e hepatoesplenomegália (Vail & Young, 2007). Recentemente foi reportada uma localização incomum e distinta de linfoma nodal em gatos, referida como Linfoma tipo-Hodgkin ou do inglês *Hodgkin's-like Lymphoma* (Walton & Hendrick, 2001). Esta localização envolve tipicamente os linfonodos da região cervical e cabeça e, em termos histológicos, é muito similar ao linfoma de Hodgkin no Homem (Gabor *et al.*, 1998; Day *et al.*, 1999; Walton & Hendrick, 2001). Em termos clínicos, esta localização nodal incomum do gato, manifesta-se, geralmente, com envolvimento singular de linfonodos mandibulares ou cervicais e, em termos imunofenotípicos, é classificado como Linfoma B rico em células T. Nenhum caso foi associado à infeção por FIV e/ou FeLV (Day *et al.*, 1999; Walton & Hendrick, 2001).

1.2.4.4. Linfoma Extranodal

Os locais extranodais mais frequentes para o linfoma são a cavidade nasal, rins, sistema nervoso central, traqueia e laringe, pele, olhos e espaço retrobulbar.

O linfoma nasal ou paranasal é uma doença localizada; contudo, está descrita a sua extensão sistêmica e representa cerca de um terço a metade das neoplasias dos gatos com doença nasal não viral (Elmslie *et al.*, 1991; Vail *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999; Mukaratirwa *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2004). O linfoma é a neoplasia nasal mais comum no gato, ultrapassando outras neoplasias e doenças inflamatórias (Little *et al.*, 2007). A localização extranodal da doença é a que se encontra com mais frequência, apresentando tempos médios de sobrevivência altos (Taylor *et al.*, 2009). O linfoma nasal afeta, maioritariamente, gatos geriátricos (idade média de 9 a 10 anos), FeLV/FIV-antigénio-negativos sendo, pelo menos, três quartos dos casos de fenótipo B associado a grau histológico intermédio a alto. Encontram-se descritos casos de linfoma T nasal epiteliotrópico (Vail *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999; Mukaratirwa *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2004) e linfoma B nasal epiteliotrópico (Little *et al.*, 2007); mais recentemente, foi reportada a predominância do fenótipo T no linfoma nasal (Nagata *et al.*, 2012).

O linfoma renal é a segunda localização extranodal mais frequente no gato, podendo ser primário ou associado ao linfoma gastrointestinal. Este representa cerca de 5% de todos os linfomas do gato, afeta essencialmente gatos com idade média de nove anos, sendo um quarto dos gatos afetados FeLV-antigénio-positivos e, a maioria, de fenótipo B de grau intermédio a alto. A extensão para o sistema nervoso central é uma seqüela comum e ocorre em 40 a 50% dos gatos tratados para o linfoma (Vail *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 1999; Louwerens *et al.*, 2005; Bound *et al.*, 2011).

O linfoma do sistema nervoso central (SNC) pode ter localização intracraniana, espinal ou ambas e em nervos periféricos. Em estudos mais antigos descreviam com maior frequência o envolvimento da espinal medula, região extradural de gatos FeLV-antigénio-positivos (cerca de 85 a 90% dos casos) (Court *et al.*, 1997). Todavia, em estudos mais recentes, o linfoma da espinal medula e intracraniano surgem com maior frequência, em gatos jovens (idade média de 4 a 10,5 anos), FeLV-antigénio-negativos, sendo a região intradural da espinal medula mais afetada que a extradural (Troxel *et al.*, 2003; Marioni-Henry *et al.*, 2004, 2008, 2010). O linfoma é a segunda neoplasia mais comum do sistema nervoso central do gato (15 a 31%) a seguir ao meningioma (Troxel

et al., 2003), podendo ser primário ou ocorrer secundariamente a um envolvimento multicêntrico (principalmente a partir do rim ou medula óssea) (Troxel *et al.*, 2003; Marioni-Henry *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2005). Cinquenta por cento dos gatos com linfoma espinal apresentam envolvimento de múltiplas regiões da espinal medula e cérebro e mais de 80% destes pacientes revelam envolvimento de outros órgãos, como rins e medula óssea (Court *et al.*, 1997; Marioni-Henry *et al.*, 2004, 2008, 2010). Apenas um terço dos casos de linfomas intracranianos serem primários e confinados ao sistema nervoso central; todos os gatos testados revelaram ser FIV- e FeLV-negativos (Troxel *et al.*, 2003). Gatos com esta forma da doença tendem a apresentar tempos médios de sobrevivência inferiores em relação às restantes localizações extranodais da doença (Taylor *et al.*, 2009).

O linfoma traqueal/laríngeo representa cerca de 10% dos casos de linfoma extranodal, afeta maioritariamente gatos com nove anos de idade, não está associado à infecção por FeLV ou FIV e pode-se manifestar como uma lesão solitária ou ocorrer na presença de doença multicêntrica (Taylor *et al.*, 2009).

O linfoma cutâneo é, geralmente, primário; no entanto estão descritos casos de envolvimento cutâneo em linfoma multicêntrico do gato. Esta localização é, regra geral, diagnosticada em gatos com idades médias de 10 a 13,5 anos, sem relação com género, raça e infecção por FeLV ou FIV (Caciolo *et al.*, 1983, 1984; Baker & Scott, 1989; Schick *et al.*, 1993). Contudo, Tobey *et al.* (1994) detetaram a presença de DNA viral de FeLV pela técnica de PCR num linfoma cutâneo de um gato. O linfoma cutâneo pode expressar-se de forma solitária ou generalizada, encontrando-se identificadas duas formas distintas com diferentes características histológicas e imunohistoquímicas, a epiteliotrópica e a não epiteliotrópica (Caciolo *et al.*, 1983, 1984; Baker & Scott, 1989; Schick *et al.*, 1993; Tobey *et al.*, 1994). Na maioria das espécies a forma epiteliotrópica (também referida como *mycosis fungoides*) é composta, essencialmente, por linfócitos T, ao passo que a forma não-epiteliotrópica é composta por linfócitos B. Encontram-se reportados seis casos de linfoma T cutâneo não-epiteliotrópico do gato (Day *et al.*, 1995). Em termos histológicos, o linfoma T cutâneo apresenta linfócitos grandes com citoplasma abundante (*mycosis cells*), formando ninhos intraepidérmicos de cinco a dez células separadas por queratinócitos circundantes (microabcessos de Pautrier's). Encontra-se descrita a linfocitose cutânea no gato, uma doença incomum com características histológicas similares ao linfoma cutâneo bem diferenciado. Esta caracteriza-se por doença progressiva com tendência para infiltração de órgãos internos,

apresentando-se, mais frequentemente, sob a forma de lesões solitárias compostas, na sua maioria, por células T com alguns agregados de células B (Gilbert *et al.*, 2004). Está ainda reportado um caso de um gato com linfoma T cutâneo com linfócitos atípicos (células com núcleo grande irregular e hipercromático) em circulação (Figura 2). Em medicina humana esta condição é designada como *Síndrome de Sézary*, tendo, também já sido reportada no cão (McKeever *et al.*, 1982; Thrall *et al.*, 1984; DeBoer *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1997).

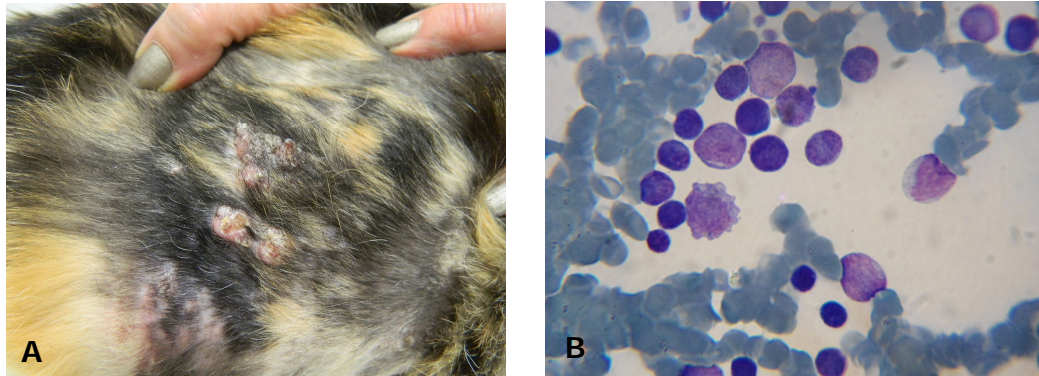


Figura 2.: Gato com Linfoma T Cutâneo com linfócitos circulantes (Células com núcleo grande irregular, hipercromático). A) Imagem de lesões cutâneas na região abdominal lateral. B) Imagem de citologia de esfregaço sanguíneo em ampliação a 1000x (coloração Diff Quick®). Fotografias originais do autor.

O linfoma ocular representa cerca de 20% dos tumores intraoculares e pode estar associado a doença multicêntrica (Taylor *et al.*, 2009).

1.2.5. Diagnóstico

1.2.5.1. História e Sinais Clínicos

Dada à heterogeneidade característica do linfoma do gato, a história, sinais clínicos e a sua duração variam de acordo com a localização anatômica, estadio clínico e o seu comportamento natural.

Linfoma Gastrointestinal

A localização mais comum do linfoma no gato é a gastrointestinal, em cerca de 50% a 85% dos casos, e está associada, à presença de espessamento de ansas intestinais e/ou de massa palpável ao exame físico. Gatos afetados com linfoma GI de baixo grau ou EALT apresentam, com frequência, sintomas crônicos (duração média de seis meses), como perda de peso ($\geq 80\%$ dos casos), vômito ($\geq 70\%$ dos casos), diarreia ($\geq 60\%$ dos casos), anorexia ou hiporexia ($\geq 50\%$ dos casos), letargia e, menos frequentemente, icterícia (7% dos casos) (Mahony *et al.*, 1995; Slawienski *et al.*, 1997;

Zwahlen *et al.*, 1998; Fondacaro *et al.*, 1999; Carreras *et al.*, 2003; Richter, 2003; Grover, 2005; Evans *et al.*, 2006; Vail & Young, 2007; Kiselow *et al.*, 2008; Gieger, 2011; Barrs & Beatty, 2012a). Outras apresentações incluem gatos com baixa condição corporal (1 a 2 em escala de 5), pêlo em mau estado, distensão abdominal, esplenomegália, pica, trombocitopenia persistente, hematoquézia e tenesmo se existir envolvimento do cólon, poliúria, polidipsia e abdómen agudo em casos de peritonite secundária a perfuração/rutura intestinal (Mahony *et al.*, 1995; Slawienski *et al.*, 1997; Fondacaro *et al.*, 1999; Richter, 2003). O linfoma GI de alto grau tende a causar os mesmos sintomas, porém com progressão mais aguda e severa (dias a semanas), podendo levar a tenesmo, hematoquézia (envolvimento do cólon), icterícia e abdómen agudo no caso de obstrução, intussusceção ou rutura intestinal e consequente peritonite. Ao exame físico é frequente observar-se desidratação, hepatomegália, renomegália, e presença de massa abdominal consistente com linfadenopatia ou massa intramural e/ou espessamento difuso das ansas intestinais. Animais com linfoma gastrointestinal podem, contudo, não revelar quaisquer alterações à palpação abdominal (Mahony *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998; Fondacaro *et al.*, 1999; Roccabianca *et al.*, 2006; Krick *et al.*, 2008; Burkitt *et al.*, 2009; Gieger, 2011; Barrs & Beatty, 2012a).

Linfoma Mediastínico

Os sinais clínicos mais frequentemente identificados em pacientes com linfoma mediastínico incluem dispneia, taquipneia, diminuição dos sons cardíacos e/ou pulmonares (associado ou não a efusão pleural). É frequente os gatos afetados, apresentarem derrames pleurais serohemorrágicos a quilosos com células tumorais na sua composição. Embora raro, os animais afetados podem desenvolver síndrome de Horner, devido ao envolvimento do nervo simpático que ascende para a região cervical na região da primeira costela, e edema da face por compressão da veia cava cranial e consequente comprometimento do retorno venoso (Thrall, 1981; Forrester *et al.*, 1991; Davies & Forrester, 1996; Court *et al.*, 1997).

Linfoma Nodal

Apesar de a localização nodal da doença levar à apresentação variada de sintomas, dependendo da localização e extensão do tumor, a maioria dos casos demonstra letargia e depressão. A presença de linfadenopatia periférica como único achado clínico é raro em gatos com linfoma nodal, estando esta apresentação mais frequentemente relacionada com quadro hiperplásico ou reativo. Está descrita no gato uma forma distinta de linfoma nodal que envolve tipicamente os linfonodos linfáticos

mandibulares e/ou cervicais e ausência de outros sinais clínicos; esta foi designada de Linfoma Tipo-Hodgkin (Day *et al.*, 1999; Walton & Hendrick, 2001).

Linfoma Extranodal

O linfoma nasal origina sinais com duração média de dois meses estando reportada duração de 48 meses. Os sinais mais frequentes são corrimento nasal unilateral mucopurulento (60 a 85%), espirros (20 a 70%), sons respiratórios (estridentes, estertores, 20 a 60%), deformação facial (0 a 20%), anorexia (10 a 60%), epífora (10 a 30%) e, eventualmente, linfadenopatia regional, epistáxis, dispneia e exoftalmia (Allen *et al.*, 1999; Mukaratirwa *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2004). O linfoma renal é, frequentemente, bilateral provocando renomegália e, em 50% dos casos, insuficiência renal (inapetência, perda de peso, e poliúria/polidípsia (Mooney *et al.*, 1987). Gatos com linfoma do SNC revelam, frequentemente, sinais associados a envolvimento toracolombar. Os sinais mais frequentes são fraqueza gradual ou súbita, paralisia do neurónio motor superior para a bexiga, flacidez da cauda, ataxia progressiva; a tetraparésia surge quando existe envolvimento dos segmentos medulares cervicais. O linfoma intracranial leva a anorexia, ataxia, letargia, agressividade, alteração de estado de consciência e diabetes insipidus (Spodnick *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1994; Troxel *et al.*, 2003; Simpson *et al.*, 2011).

O linfoma cutâneo pode apresentar-se na forma de lesão solitária ou difusa e, geralmente, manifesta-se com alopecia, eritema, crostas e pápulas, podendo estar associado a linfadenopatia periférica (Caciolo *et al.*, 1983, 1984; Baker & Scott, 1989; Schick *et al.*, 1993; Tobey *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 2004). O linfoma ocular origina sinais compatíveis com uveíte ou massas na íris. O linfoma traqueal/laríngeo está associado a dispneia, disfonia, sons estridentes, regurgitação e, raramente, a tosse (Taylor *et al.*, 2009).

Sinais não Específicos

Independentemente da localização anatômica (vômito, diarreia, anorexia, perda de peso, frequentemente associado ao linfoma GI e renal) pode, ainda, existir infiltração da medula óssea originando anemia não regenerativa (em cerca de 50% dos casos de gatos com linfoma) e leucemia. Poliúria e Polidípsia (PU/PD) podem surgir em linfoma do sistema nervoso central, renal ou estar relacionado com síndrome paraneoplásico (hipercalcemia maligna). Estão descritos síndrome paraneoplásico hipereosinofílico e necrose cutânea simétrica em gatos com linfoma (Ashley & Bowman, 1999; Savary *et al.*, 2000; Barrs *et al.*, 2002).

Diagnósticos Diferenciais

A seguinte tabela revela os principais diagnósticos diferenciais do linfoma no gato:

Tabela 1. Principais diagnósticos diferenciais ao linfoma no gato tendo em conta a sua localização anatômica. Legenda: SNC, Sistema Nervoso Central; PIF, Peritonite Infeciosa Felina; IBD, Doença Idiopática/Inflamatória Intestinal; FIV, Vírus da Imunodeficiência Felina; FeLV, Vírus da Leucemia Felina adaptado de (Vail & Young, 2007; Vail, 2013).

Principais diagnósticos diferenciais das diferentes localizações de linfoma do gato	
Localização Anatômica	Diagnósticos Diferenciais
Mediastínico	Timoma, quilotorax, piotórax, cardiomiopatia, PIF, mesotelioma, hérnia diafragmática
Gastrointestinal	IBD, PIF, carcinoma intestinal, corpo estranho, outros tumores gastrointestinais, hipertiroidismo, parasitismo
Linfoma Nodal	Linfadenopatia reativa ou hiperplásica, infecção sistêmica, infecção por FIV
Linfoma Renal	Doença poliquística, PIF, doença renal aguda, outros tumores renais
Linfoma SNC	Trauma, outros tumores, PIF, discospondilite, embolismo aórtico, Hérnia do disco intervertebral, infecção fúngica, mielopatia associada à infecção por FeLV
Linfoma Nasal	Rinite, Pólipos inflamatórios, Cryptococose, outros tumores

1.2.5.2. Diagnóstico e Estadiamento Clínico

O plano de diagnóstico de linfoma é paralelo ao do estadiamento e deve contemplar a contagem total e diferenciada de células sanguíneas, perfil bioquímico abrangente de avaliação renal, hepática, pesquisa de infecção por FIV e FeLV, urianálise e, em gatos com mais de seis anos de idade, incluir a análise de hormona tireoideia Tiroxina (T4), para descartar possível hipertiroidismo, um dos diagnósticos diferenciais de linfoma GI. Para a obtenção de um diagnóstico definitivo, devem ser utilizadas técnicas de imagiologia, tais como, dependendo da localização anatômica do linfoma, assim como ser realizadas avaliações citopatológica e/ou histopatológica dos linfonodos linfáticos ou dos órgãos afetados via punção aspirativa com agulha fina ou biópsia cirúrgica, endoscópica ou de trocater. Adicionalmente, os tecidos recolhidos podem ser utilizados para uso de técnicas de histopatologia/citologia, adjuvadas por imunohistoquímica, análise por citometria de fluxo, análise molecular (PCR para os rearranjos do recetor de antígenos dos linfócitos neoplásicos, para estudo da clonalidade), por forma a caracterizar e refinar o diagnóstico em casos ambíguos. A

análise de medula óssea por citologia ou biópsia, está indicada em situações de anemia não regenerativa, leucopénia, atipia celular, pesquisa de FeLV por PCR sendo igualmente importante para o estadiamento completo da doença (Vail & Young, 2007; Vail, 2013).

É possível observar na tabela 2 o resumo das características clínicas para o correto estadiamento do linfoma em espécies domésticas de acordo com a OMS e a tabela 3 especifica os dados clínicos essenciais para o estadiamento do linfoma no gato, para o qual houve necessidade de adaptar um sistema de estadiamento específico dada a alta prevalência/incidência de envolvimento extranodal/visceral pelo linfoma.

Tabela 2. Estadiamento clínico de acordo com a OMS para o Linfoma das espécies domésticas (Vail, 2013).

Sistema de estadiamento do linfoma nas espécies domésticas de acordo com a Organização Mundial de Saúde	
Localização Anatômica	
A	Generalizado
B	Gastrointestinal ou Alimentar
C	Tímico
D	Cutâneo
E	Leucemia (Verdadeira – envolvimento do sangue e medula óssea apenas)
F	Outros (incluindo renal solitário)
Estadio (Incluindo a localização anatômica)	
I	Envolvimento de um único linfonodo ou tecido linfoide associado a um órgão (excluindo a medula óssea)
II	Envolvimento de múltiplos linfonodos numa determinada região
III	Envolvimento ganglionar generalizado
IV	Estadio 3 e envolvimento hepático e/ou esplênico
V	Estadio 4 e manifestação no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou outros órgãos
Cada Estadio é Subclassificado em:	
A	Sem sinais sistêmicos
B	Com sinais sistêmicos

Tabela 3. Estadiamento clínico para o Linfoma do gato. Adaptado de Terry *et al.*, (1995).

Estadiamento Clínico para o Linfoma do Gato	
Estadio	Descrição
I	- Tumor único (extranodal) ou apenas uma região anatômica (nodal) - Inclui tumores intratorácicos primários
II	- Tumor único (extranodal) com envolvimento dos linfonodos regionais - Duas ou mais áreas nodais ipsilateral ao diafragma - Dois tumores (extranodal) com ou sem envolvimento dos linfonodos regionais ipsilateral ao diafragma - Tumor primário Gastrointestinal operável, habitualmente na área ileocecal, com ou sem envolvimento dos linfonodos mesentéricos
III	- Dois tumores (extranodal) em localizações opostas do diafragma - Duas ou mais áreas nodais cranial e caudal ao diafragma - Tumor intra-abdominal primário não operável - Tumores paraespinhais ou epidurais, independentemente da existência de tumor noutros órgãos
IV	- Estádios 1-3 com envolvimento hepático e/ou esplênico
V	- Estádios 1-4 com envolvimento inicial do Sistema Nervoso Central ou medula óssea ou ambos

1.2.5.2.1. Testes de diagnóstico

De um modo geral, cerca de 50% dos gatos com linfoma apresentam anemia não regenerativa ao diagnóstico, associada à doença crónica, ao infiltrado neoplásico na medula ou à infeção crónica por FeLV; além disso, pode existir leucopénia ou neutrofilia (secundária à inflamação, neoplasia ou stress). Os perfis bioquímicos, apesar de permitirem o estadiamento clínico dos pacientes com linfoma através da avaliação da função ou lesão de vários órgãos, não permitem obter resultados específicos para um diagnóstico preciso da doença. O aumento das enzimas hepáticas pode indicar infiltração hepática, bem como o aumento da ureia e creatinina (azotémia) podem indicar envolvimento renal pelo tumor. Contudo, caso estes valores se encontrem dentro dos limites normais para a espécie, não se deve descartar a hipótese de infiltração neoplásica destes órgãos. É possível de se encontrar hiperglobulinémia associada a gamapatia mono ou oligoclonal, com ou sem hiperviscosidade, hipoglicémia e, embora raro, gatos com linfoma podem apresentar hipercalcémia. Foi detetado aumento da concentração dos níveis de alfa-1-glicoproteína nos gatos com linfoma; porém este achado até à data não apresenta evidente relevância clínica (Dust *et al.*, 1982; McMillan, 1985; Wellman *et al.*, 1992; Mahony *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1996; Fondacaro *et al.*, 1999; Gabor *et al.*, 2000; Savary *et al.*, 2000; Correa *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2001; Carreras *et al.*, 2003; Richter, 2003; Kiselow *et al.*, 2008; Krick *et al.*, 2008).

As análises citopatológicas e histopatológicas dos linfonodos ou dos órgãos envolvidos obtidas através de punção com agulha fina e colheita de amostras de biópsia através de acesso cirúrgico, endoscópico ou recorrendo a agulhas de biópsia, são essenciais para a obtenção de diagnóstico definitivo. No gato, dada a localização e morfologia celular, a punção com agulha fina, por si só, pode não ser suficiente, sendo difícil a diferenciação de linfoma de alterações benignas hiperplásicas ou reativas. Nestas situações, para a definição de diagnóstico definitivo, torna-se essencial a obtenção de amostras para análise histopatológica, podendo-se, desta forma, avaliar a estrutura do linfonodo e/ou dos órgãos afetados, a invasão dos tecidos pelas células neoplásicas bem como possíveis anomalias arquiteturais (Grover, 2005; Twomey & Alleman, 2005; Vail, 2013).

A técnica de imunohistoquímica representa um método simples efectivo e pouco dispendioso para avaliar a expressão de determinadas proteínas nos tecidos e é uma ferramenta importante para a investigação em oncologia tanto para a deteção de potenciais marcadores indicadores de prognóstico, como para a determinação de possíveis alvos terapêuticos (Keller *et al.*, 2007). Além disso, a IHQ é essencial na determinação da linhagem das células neoplásicas, na diferenciação entre doença reativa e neoplásica e permite a classificação apropriada do linfoma de acordo com a OMS (Ramos-Vara, 2005; Ruiz *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2007). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico e classificação do linfoma do gato, na medida em que permite um diagnóstico eficaz e eficiente na grande maioria dos casos, uma vez que permite distinguir alteração reativa de neoplásica (Moore *et al.*, 1986; Rojko *et al.*, 1989; Day *et al.*, 1995; Callanan *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1996; Gabor *et al.*, 1999; Krecic & Black, 2000; Barrs *et al.*, 2002; Charney *et al.*, 2002; Cesari *et al.*, 2009; Pohlman *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011; Chino *et al.*, 2013). Desde o início da aplicação da técnica de imunohistoquímica para a imunofenotipagem de linfoma do gato, que existe controvérsia quanto ao imunofenótipo mais prevalente na espécie. A vasta maioria dos estudos de imunohistoquímica (IHQ) no linfoma do gato foca-se na avaliação da expressão de dois marcadores glicoproteicos da superfície dos linfócitos e das células acessórias do sistema imunitário, designados por antigénios “*Cluster of Differentiation*” (CD). Estudos anteriores reportam elevada sensibilidade e especificidade do marcador CD3 para as células T e dos marcadores CD79 α e BLA.36 para as células B de linfoma do gato (Vail *et al.*, 1998; Pohlman *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011). A homogeneidade de expressão de um destes marcadores identifica

uma população predominante em número e fenótipo, indicando existência de tumor e o seu imunofenótipo. Em casos de população mista de linfócitos B e T o quadro mais provável é de inflamação (Vail *et al.*, 1998; Carreras *et al.*, 2003; Fan, 2003; Richter, 2003; Grover, 2005). A molécula CD3 é uma glicoproteína composta por um complexo de cinco polipéptidos associados ao Recetor da Célula T (RCT) e ao Complexo Major de Histocompatibilidade (CMH) o qual, contendo antigénios processados permite a sinalização intracelular mediada pelo complexo do RCT, além disso o receptor CD3 tem importante função na activação das células T após estímulo antigénico e é a proteína transmembranar mais frequentemente pesquisada por IHQ para a identificação de células T no gato. De modo semelhante, o heterodímero CD79 (Iga/Igβ ou CD79a/CD79b) está associado ao Recetor da Célula B (RCB) e, quando estimulado, é essencial para a transdução de sinal intracelular das células B. A expressão de CD79 indica neoplasia de fenótipo B e é a proteína transmembranar mais frequentemente pesquisada por IHQ para a identificação de células B no gato. Raramente, neoplasias linfoides expressam ambos marcadores B e T; demonstrando, nestes casos, fenótipo aberrante. Assim é essencial utilizar outros marcadores de linhagem B ou T, para a definição do fenótipo predominante (Morrison & Neuberger, 2001; Richter, 2003).

O BLA.36 é uma glicoproteína membranar com 36 kDa aplicada pela primeira vez no linfoma do gato por Keith Steele e colaboradores em 1997 que é expressa, essencialmente, nas células B dos centros germinativos e da zona do manto dos folículos reativos dos linfonodos e do baço; foi, também, detetado na superfície das células de Reed-Sternberg, nas células de Hodgkin mononucleadas e em células B malignas (Imam *et al.*, 1990; Steele *et al.*, 1997). Esta molécula foi amplamente aplicada no linfoma do gato, revelando boa sensibilidade e especificidade na deteção de células B. Recentemente foi descrita a elevada sensibilidade e especificidade do fator de transcrição, Pax5, no linfoma do cão (Willmann *et al.*, 2008). Até à data do início do presente estudo, não existia nenhuma publicação referente à utilização de anticorpos anti-Pax5 por IHQ para a determinação do fenótipo B em gatos. Tendo em conta que os fatores de transcrição são as moléculas que apresentam maior conservação entre espécies, foi utilizado o anticorpo anti-Pax5 habitualmente usado em medicina humana em tecido linfoide normal de gato (linfonodo), tendo-se verificado forte marcação das células do centro germinativo CD79^{acy} positivas, BLA.36 positivas e CD3 negativas, o que revela forte sensibilidade do Pax5 para a identificação das células B do gato. O Pax5, também conhecido como proteína ativadora específica das células B, é um fator

de transcrição, desempenhando importante função na definição da linhagem celular B, ativando genes específicos da linhagem B e, simultaneamente, inativando genes “inapropriados” da linhagem B. O Pax5 é o único membro da família de fatores de transcrição (Pax) que é expresso nas células do sistema hematopoiético. Além disso o Pax5 restringe a capacidade de transmissão de sinal das células progenitoras indiferenciadas para as vias específicas da linhagem B, regula a migração e adesão celular, induz a recombinação V_H-DJ_H , essencial para a formação do recetor da célula B, facilita a sinalização do pré-recetor da célula B e promove o desenvolvimento das células linfoides progenitoras até ao estadio de maturação da célula B. Estas características conferem ao Pax5 elevada especificidade para as células imaturas e maduras B, deixando de ser expresso em estadios avançados da maturação da linhagem B em plasmócitos (Cobaleda *et al.*, 2007a). O Pax5 é amplamente utilizado em medicina humana para a definição do fenótipo do linfoma e do estadio de maturação em que este se encontra. Em medicina veterinária está reportado o seu uso em cães, mas não existe literatura do seu uso em gatos.

A técnica de IHQ, contudo, pode ser inconclusiva ou obter-se marcação inespecífica, uma vez que existem diferentes anticorpos, reagentes, procedimentos de coloração e técnicas de processamento dos tecidos entre laboratórios o que podem influenciar os resultados (marcação inespecífica). Nestes casos, o recurso à técnica de PCR para os rearranjos do recetor de antigénios permite identificar clonalidade, indicando presença de linfoma e define o seu fenótipo (Gieger, 2011).

Uma alternativa à imunohistoquímica para a definição do fenótipo tumoral é a aplicação da técnica de citometria de fluxo, permitindo a definição da população celular predominante (células linfoides, monocíticas e granulocíticas) através da imunocitoquímica em fase líquida (Twomey *et al.*, 2005). Além disso, a citometria de fluxo permite o uso simultâneo de um espetro de anticorpos maior que a imunohistoquímica, a obtenção de resultados em pouco tempo (poucas horas) e o material estudado pode ser recolhido por técnicas pouco invasivas (punção aspirativa); contudo, esta técnica não permite estudar a arquitetura do tecido afetado, que pode ser importante para a classificação do linfoma (Twomey *et al.*, 2005).

A clonalidade é uma das principais características de um tumor, na medida em que as células tumorais, teoricamente, derivam da proliferação de uma linhagem celular específica. Assim sendo, um gato com linfoma T apresenta células malignas com a mesma sequência de DNA para a região variável do gene do recetor da célula T (RCT),

assim como um gato com linfoma B apresenta células B com sequências de DNA idênticas para o gene da região variável do recetor da imunoglobulina (Vail, 2013). A técnica de PCR permite a amplificação das regiões variáveis dos recetores das células B e T, para a deteção de clonalidade. Este tipo de exame pode, no entanto, revelar falsos negativos no caso de pequena quantidade de células malignas presentes na amostra analisada ou os *primers* utilizados não detetarem a sequência de ambos os genes, em casos de linfoma derivado das células *natural killer* (NK). Esta técnica tem sido aplicada no linfoma do gato ao longo dos anos (Moore *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2005; Henrich *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2011; Avery, 2009, 2012) e pode constituir um importante método para avaliar a presença de doença residual mínima e consequente recorrência precoce, para fenotipar sem recorrer IHQ e para a determinação das taxas de remissão molecular, dado ser uma técnica mais sensível que a abordagem citológica do sangue periférico, medula óssea ou linfonodos (Vail, 2013).

1.2.5.3. Diagnóstico por Localização Anatômica

Linfoma Gastrointestinal

O linfoma GI pode originar anemia regenerativa secundária à perda pelo trato gastrointestinal ou não regenerativa em casos crónicos ou de envolvimento da medula óssea (anemia de doença crónica, infiltrado neoplásico ou infeção por FeLV) que, além de anemia, pode levar a leucopénia ou neutrofilia (secundária à inflamação, neoplasia ou stress). Nesta localização de linfoma a análise hematológica revela fraco rendimento diagnóstico para o linfoma de baixo, intermédio e de alto grau. Contudo, nos casos de LGGC, existe, regra geral, leucocitose marcada com neutrofilia e/ou linfocitose (Wellman *et al.*, 1992; Mahony *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1998, 2000; Carreras *et al.*, 2003; Richter, 2003; Grover, 2005; Roccabianca *et al.*, 2006; Vail & Young, 2007; Kiselow *et al.*, 2008). Em cerca de 23% a 50% dos animais com linfoma GI existe hipoalbuminémia e/ou panhipoproteinémia associada à enteropatia com perda de proteína, má absorção proteica ou doença sistémica. O linfoma GI surge com maior frequência, no intestino delgado (ID) distal (Figura 3), região de absorção de cobalamina o que, associado ao seu consumo pela microflora residente no ID proximal e/ou a insuficiência pancreática exócrina, leva a baixos níveis de vitamina B12 nos gatos afetados. Os níveis de folatos podem variar de baixos, no caso de envolvimento do ID proximal, a altos no caso de sobre crescimento de bactérias produtoras de folatos

no ID proximal (40% dos linfomas) (Kiselow *et al.*, 2008; Lingard *et al.*, 2009; Briscoe *et al.*, 2011; Gieger, 2011; Moore *et al.*, 2011; Barrs & Beatty, 2012a).

Comparativamente ao linfoma GI de baixo grau, as formas de intermédio a alto grau são regra geral, mais facilmente detetadas ao exame físico, à ecografia abdominal e através das análises citológica e histológica de amostras obtidas de linfonodos mesentéricos, massas intestinais ou de outro órgão abdominal afetado. Embora represente valor de prognóstico questionável e não altere a decisão terapêutica, o estadiamento completo requer a realização de radiografia torácica, punção aspirativa de linfonodos periféricos e acesso à medula óssea. A radiografia abdominal de gatos com linfoma GI não revela, geralmente, alterações específicas, podendo-se observar perda de definição entre vísceras resultante da perda de gordura ou presença de fluido abdominal, massa de tecidos moles ou dilatação do intestino delgado (sugerindo obstrução intestinal ou ileus) (Mahony *et al.*, 1995; Zwahlen *et al.*, 1998; Grover, 2005). A ecografia é o meio de diagnóstico que mais aplicações tem no que diz respeito ao linfoma GI do gato, dado que serve para diagnóstico, estadiamento da doença e avaliação do envolvimento de outros órgãos abdominais; permite, ainda, a realização de punção aspirativa precisa de diversas lesões detetadas e a avaliação de forma objetiva da resposta à terapêutica. Porém, a ecografia apresenta as limitações de não determinar de forma exata, a localização topográfica, a extensão de determinadas lesões e de a sua eficácia depender da experiência do operador e da qualidade do ecógrafo (Penninck *et al.*, 1994; Richter, 2003).

O linfoma GI de baixo grau está mais frequentemente associado a ausência de massas intestinais palpáveis ao exame físico, à presença de espessamento difuso intestinal com comportamento clínico semelhante à IBD, o que torna o estudo citológico, na maioria dos casos, insuficiente para o diagnóstico definitivo, havendo necessidade de recorrer à ecografia abdominal, biópsia cirúrgica, endoscópica ou por agulha (Tru-cut) para análise histopatológica, imunohistoquímica e clonalidade. À ecografia o linfoma GI de baixo grau revela espessamento da parede intestinal em 50 a 70% dos casos e linfadenopatia mesentérica em 45 a 80% dos casos. Estes resultados não são patognomónicos dado que cerca de 10 a 50% dos casos com IBD revelam as mesmas alterações à ecografia (Grooters *et al.*, 1994; Penninck *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 1995; Zwahlen *et al.*, 1998; Hanson *et al.*, 2001; Richter, 2003; Grover, 2005; Evans *et al.*, 2006; Zwingenberger *et al.*, 2010; Barrs & Beatty, 2012a). Embora incomum, podem ser evidentes alterações ecográficas noutros órgãos como o estômago,

fígado, baço, cólon e pâncreas. A análise citológica pode não ser suficiente para o diagnóstico de linfoma GI de baixo grau dada a elevada semelhança citológica com a IBD, além de que a técnica de recolha pode ser de difícil execução e o material colhido insuficiente para estabelecimento de diagnóstico. Por isso, é importante a análise histopatológica de biópsias colhidas via endoscopia ou laparotomia, possibilitando a avaliação da arquitetura ganglionar e/ou da parede intestinal (Gabor *et al.*, 1999; Richter, 2003; Barrs & Beatty, 2012b). O linfoma GI de intermédio a alto grau pode ser diagnosticado por citologia dado que as células neoplásicas demonstram características distintas, além de que as técnicas de coloração modificadas de Wright-Giemsa (Diff Quick; Dade Shearing) evidenciam de forma mais clara os grânulos dos linfócitos grandes granulares, do que a técnica de coloração utilizada na histopatologia (hematoxilina-eosina). Deve-se, ainda, recorrer à imunohistoquímica, através da deteção da proteína granzima B, para a deteção dos grânulos citoplasmáticos deste tipo de linfoma (Franks *et al.*, 1986; Wellman *et al.*, 1992; Mahony *et al.*, 1995; Darbès *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998; Roccabianca *et al.*, 2006; Krick *et al.*, 2008; Lingard *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011; Barrs & Beatty, 2012a, 2012b). A endoscopia é um bom método de diagnóstico no linfoma no gato dado que o mesmo tende a envolver a mucosa e o procedimento permite recuperações mais rápidas. Porém, a laparotomia permite a obtenção de amostras de toda a parede intestinal e de outros órgãos potencialmente afetados, requerendo, contudo, recuperações mais prolongadas (Fondacaro *et al.*, 1999; Grover, 2005; Evans *et al.*, 2006; Gieger, 2011). Tendo em conta que as regiões mais afetadas pelo linfoma são o jejuno e íleo, é necessária a realização de gastroduodenoscopia e ileocolonosopia para obtenção de amostras destas regiões do trato GI (Washabau *et al.*, 2010); No anexo I, encontram-se representadas as principais diferenças entre as técnicas para recolha de amostras. O fato de o envolvimento transmural não ser comum no linfoma GI de baixo grau, torna a sua distinção de IBD mais difícil, pelo que se deve recorrer à imunofenotipagem e análise de clonalidade (Kiupel *et al.*, 2011; Vail, 2013).

Num estudo recente, o fenótipo T revelou ser o mais prevalente no linfoma GI do gato, tendo-se verificado elevada percentagem do subtipo LTAE tipo II, bem como a sua associação a maior tempo de sobrevivência, quando comparada com LTAE tipo I e linfoma B (Moore *et al.*, 2011).

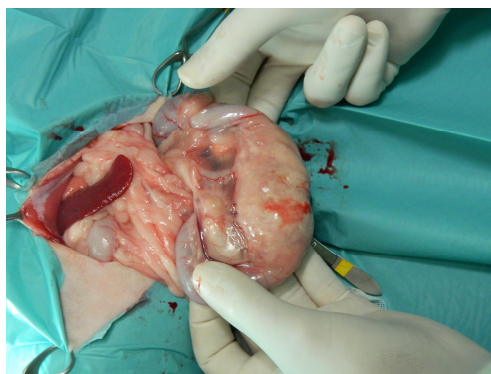


Figura 3.: Gato com Linfoma GI (diagnosticado após análise histopatológica). Laparotomia exploratória revela massa esbranquiçada e friável na região do íleo, associada a obstrução parcial. Fotografias originais do autor.

Linfoma Mediastínico

Os sinais clínicos sugestivos de doença mediastínica já referidos são sugestivos de realização de punção aspirativa ecoguiada da lesão mediastínica e/ou do líquido pleural, podendo estes servir de diagnóstico (Gruffydd-Jones *et al.*, 1979; Davies & Forrester, 1996). A tomografia computadorizada revelou não ser essencial para o diagnóstico definitivo da doença (Yoon *et al.*, 2004). Os principais diagnósticos diferenciais do linfoma mediastínico estão resumidos na tabela 1. A imunohistoquímica e clonalidade tornam-se importantes para definição de diagnóstico de linfoma mediastínico, dado que permitem a distinção entre outras doenças (Vail & Young, 2007; Vail, 2013).

Linfoma Nasal

Em casos de linfoma nasal é importante a realização de radiografias do plano nasal e/ou tomografia computadorizada, de forma a avaliar a extensão local do tumor. A rinoscopia e biópsia são essenciais para o diagnóstico definitivo. O estadiamento da doença é importante, para que se possa planejar possível aplicação de radioterapia local (apenas se doença localizada). A lavagem das narinas e análise microscópica do lavado pode ser uma alternativa de diagnóstico. Nestes casos, é importante avaliar a possível extensão do linfoma para linfonodos, tórax, abdómen e medula óssea, o que pode influenciar a escolha da terapêutica (quimioterapia se doença sistêmica ou radioterapia se doença localizada) (Vail & Young, 2007; Vail, 2013).

Linfoma Renal

O linfoma renal pode ser detetado via exame físico (renomegália bilateral), radiografia (renomegália) (Figura 4) e ecografia abdominal (renomegália, espessamento

subcapsular hipoecoico, hiperecogeneidade cortical difusa). A punção ecoguiada do córtex renal, permite, regra geral, o diagnóstico da doença (Vail & Young, 2007; Vail, 2013). À citologia pode ser detetado elevado número de linfócitos neoplásicos monomórficos de grande dimensão. No entanto, o linfoma de células pequenas pode ser difícil de distinguir da inflamação linfocítica, tornando-se necessário o recurso à histopatologia (Twomey *et al.*, 2005).

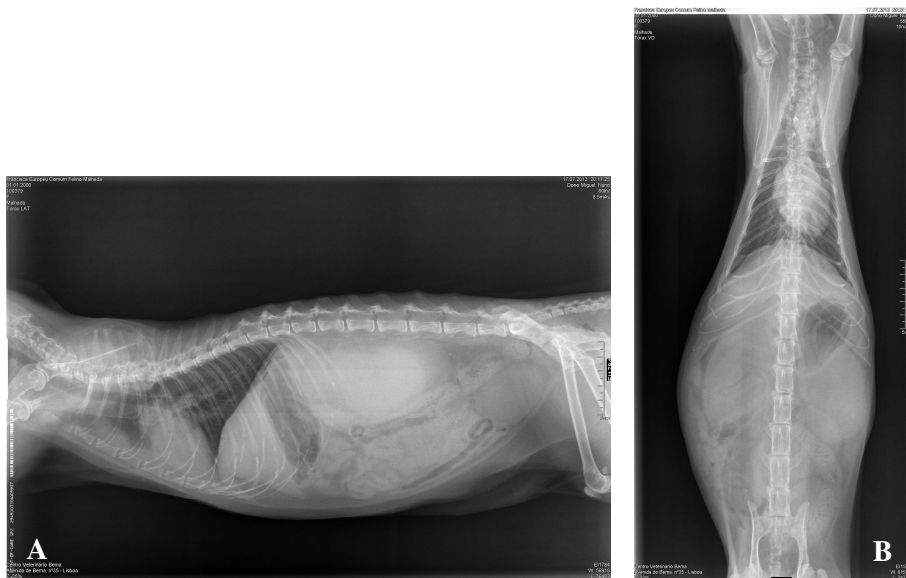


Figura 4.: Gato com linfoma renal. Evidente renomegália com deslocamento visceral ventral e caudal. Imagens de radiografia (projecção latero-lateral esquerda (A) e ventro-dorsal (B)). Fotografias originais do autor.

Linfoma Nodal

A localização multicêntrica do linfoma do gato é relativamente comum na prática clínica, embora raramente se observe linfadenopatia periférica generalizada. A análise histológica do(s) linfonodo(s) afetado(s) é importante dadas as semelhanças à citologia entre as formas benignas (linfadenopatia periférica idiopática, vascularização plexiforme e hiperplasia dos linfonodos periféricos dos gatos jovens e linfoma) e o linfoma. A localização multicêntrica afeta, essencialmente, os linfonodos mesentéricos e/ou fígado, baço e eventualmente a medula óssea do gato. As análises de citometria de fluxo, imunohistoquímica e clonalidade são essenciais para a definição do fenótipo predominante e distinção entre doença neoplásica e reativa. (Moore *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2001; Valli *et al.*, 2002; Twomey *et al.*, 2005).

Linfoma do Sistema Nervoso Central

No linfoma do Sistema Nervoso Central (SNC) intracraniano e/ou a afetar a espinhal medula, as radiografias raramente evidenciam alterações ósseas, pelo que são recomendadas técnicas como mielogramas de contraste, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Em 75% dos casos é detetada massa intra ou extradural nas regiões toracolombar e lombosagrada. As lesões epidurais podem ser puncionadas através de condução fluoroscópica e as amostras obtidas são, geralmente, suficientes para o diagnóstico. A colheita de líquido cérebrospinal (LCE) pode revelar pleocitose e linfoblastos indicativos de linfoma; porém a sua análise, regra geral não é conclusiva para o diagnóstico de linfoma do SNC, dada a baixa celularidade e dificuldade na distinção entre linfócitos neoplásicos e reativos. Nos casos de linfoma do SNC é importante avaliar a função renal e a atividade da medula óssea (localização multicêntrica), dado serem locais frequentes de manifestação do linfoma primário (Spodnick *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1994; Fondevila *et al.*, 1998; Troxel *et al.*, 2003; Marioni-Henry *et al.*, 2004, 2008).

Linfoma Cutâneo

A realização de biópsia (4 a 8 mm) de lesões representativas e regiões com infiltração celular para posterior análise histopatológica, imunohistoquímica e de clonalidade são, habitualmente, suficientes para o diagnóstico. Porém, é importante definir o estadió da doença (localizada ou sistémica) (Vail & Young, 2007; Vail, 2013).

1.2.6. Modalidades Terapêuticas

A grande variabilidade dos subtipos histológicos e das localizações anatómicas observadas no linfoma do gato tornam-no um tumor de resposta pouco previsível ao tratamento instaurado. Os protocolos terapêuticos aplicados ao linfoma do gato variam de acordo com as características histológicas (baixo grau *vs* intermédio e alto graus) (Barrs & Beatty, 2012b).

A quimioterapia é a terapêutica de escolha para o linfoma do gato, dado tratar-se, na maioria dos casos, de uma doença sistémica, sendo bem tolerada por estes, promovendo a sua qualidade de vida e a satisfação dos proprietários (Malik *et al.*, 2001; Tzannes *et al.*, 2008). Os fármacos utilizados são semelhantes aos utilizados no linfoma do Homem e do cão e incluem: doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, metotrexato, L-asparaginase, CCNU (lomustina) e prednisolona. Apesar de estarem definidos diversos protocolos terapêuticos para o linfoma do gato, a decisão deve ser baseada de

acordo com o paciente, tendo em conta o estadio e o sub-estadio da doença, presença ou ausência de doença paraneoplásica, estado geral do paciente, disponibilidade de tempo e capacidade financeira dos proprietários e o seu nível de conforto relativamente às probabilidades de sucesso e efeitos adversos associados à terapêutica.

A maioria dos protocolos aplicados no linfoma do gato são modificações do protocolo CHOP, que representa a combinação entre a Ciclofosfamida (C), Doxorubicina (H, hidroxidaunorubicina), Vincristina (O, Oncovin), e Prednisolona (P) (Mooney *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1996; Vail *et al.*, 1998; Malik *et al.*, 2001; Milner *et al.*, 2005; Hadden *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2008). De um modo geral, o protocolo CHOP é bem tolerado pelos gatos com linfoma de intermédio a alto grau, não devendo ser a primeira linha de tratamento nos linfomas de baixo grau. As modificações ao CHOP podem ser aplicadas no gato, tal como no cão, porém, as suas eficácias não estão totalmente comprovadas. Os gatos apresentam área corporal inferior à dos cães, pelo que a dose de doxorubicina recomendada é inferior; a cardiotoxicidade não está comprovada nos gatos, ao passo que a nefrotoxicidade é uma preocupação.

Uma alternativa ao CHOP é o protocolo COP (Ciclofosfamida, Vincristina e Prednisolona), tendo sido comprovados resultados similares entre os dois protocolos (Teske *et al.*, 2002).

A monoterapia com doxorubicina (25mg/m² a cada 3 semanas para o total de 5 administrações), prednisolona paliativa, ou a lomustina (30 a 60 mg/m² a cada 3 a 6 semanas) são uma alternativa para proprietários que não aceitem protocolos menos espaçados de tempo (exemplo: CHOP), contudo, a sua eficácia é limitada (Peaston & Maddison, 1999; Kristal *et al.*, 2001; Rassnick *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2002). A L-asparaginase é, frequentemente, aplicada em protocolos de quimioterapia do linfoma do gato; no entanto apresenta um período de ação mais curto (depleção da asparagina durante 7 dias) e uma taxa de resposta (remissão) (30%), inferior à do cão (80%) (LeBlanc *et al.*, 2007).

De um modo geral, a taxa de resposta aos protocolos CHOP e COP nos gatos com linfoma (de 50 a 80%, com tempos médios de sobrevivência de 4 a 6 meses) são inferiores às dos cães. Contudo os dados aqui representados têm origem em estudos realizados em grupos de gatos com linfoma com localizações, subtipos e estadios diferentes, consequentemente com prognósticos variáveis (Mooney *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1996; Vail *et al.*, 1998; Malik *et al.*, 2001; Teske *et al.*, 2002; Milner *et al.*, 2005; Hadden *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2008). É possível encontrar, no apêndice I do

presente trabalho, as principais características das diferentes entidades de linfoma GI do gato.

1.2.7. Prognóstico

Para o linfoma do gato estão definidos fatores de prognóstico positivos, dos quais se destacam a localização anatômica (nasal), a resposta à terapêutica (gatos que atingem remissão completa apresentam tempo de sobrevivência superior), a ausência de sinais clínicos aquando do diagnóstico, a seronegatividade para FeLV, o grau histológico baixo ou entidade LTAE tipo II, inclusão de doxorubicina e/ou L-asparaginase no protocolo de tratamento de linfomas de intermédio a alto grau, ausência de perda de peso ou de condição corporal (Mooney *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1996; Vail *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998; Fondacaro *et al.*, 1999; Rassnick *et al.*, 1999; Kristal *et al.*, 2001; Teske *et al.*, 2002; Carreras *et al.*, 2003; Patterson-Kane *et al.*, 2004; Brenn *et al.*, 2008; Lingard *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 2010; Krick *et al.*, 2008, 2011). Estão, igualmente, definidos alguns fatores de prognóstico negativos, tais como elevados níveis de Lactato Desidrogenase (LDH) no momento do diagnóstico, grau histológico intermédio a alto, a entidade LGGC, o linfoma GI B e o LTAE tipo I) (Hadden *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2011). Contrariamente a outras espécies, a expressão de glicoproteína-P e contagem de índices de proliferação (Ki-67, AgNOR, PCNA) ou a atividade das telomerasas no momento do diagnóstico ainda não apresentam valor prognóstico bem definido (Vail *et al.*, 1998; Rassnick *et al.*, 1999; Brenn *et al.*, 2008; Vail, 2013). O anexo II representa o resumo das principais características das diferentes localizações de linfoma do gato e os seus diferentes prognósticos.

1.3. Objectivos

O presente trabalho tem como objetivo principal, de forma retrospectiva classificar amostras de linfoma não-Hodgkin de 45 gatos, de acordo com o esquema de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS). Foi ainda avaliada a expressão de três marcadores de imunofenótipo B (CD79 α cy, BLA.36 e Pax5) e um T (CD3) e realizada a caracterização histopatológica, tendo em conta o número de mitoses e no caso do linfoma GI foi, ainda, avaliada a extensão do tumor - mucosa ou transmural - e o epiteliotropismo.

2. Materiais e Métodos

2.1.Introdução

O presente trabalho foi realizado nas instalações laboratoriais do Instituto Português de Oncologia (IPO), Lisboa, Francisco Gentil. Para a sua realização foram recolhidas 49 amostras previamente diagnosticadas como linfoma não-Hodgkin (LnH) no gato fixadas em formol e incluídas em blocos de parafina a partir do arquivo de três diferentes laboratórios com serviço de histopatologia que, gentilmente, as cederam (VetPat [28 amostras], DNATech [9 amostras] e IPO–Lisboa [8 amostras]) entre os anos de 2008 e 2012 (apêndice II). Além disso, foram utilizados como controlos, para a análise posterior de imunohistoquímica, dois linfonodos normais, um linfonodo reativo, duas amostras de parede gástrica normal e uma tonsila de gatos saudáveis, obtidos do arquivo do laboratório VetPat. As amostras são provenientes de gatos submetidos a procedimentos cirúrgicos de diagnóstico e de necrópsia após morte por doença progressiva ou eutanásia.

Foram excluídas 4 amostras de LnH de gato dada a parca quantidade de tecido processado, falta de informação demográfica, tecido com elevada percentagem de autólise ou com má fixação. Todas as 45 amostras foram processadas nas instalações do IPO, Lisboa, segundo protocolo da Instituição, para posterior coloração hematoxilina-eosina (H&E), caracterização histopatológica, análise imunohistoquímica e classificação de acordo com a OMS baseada no estudo de Moore *et al.*, (2011).

2.1.1. População Estudada e Análise Histopatológica

Para cada animal foram registadas as seguintes características: raça, idade, género e localização anatómica do linfoma. No que diz respeito à classificação anatómica, no presente trabalho optou-se pelo seguinte esquema: Mediastínico, Nodal, Extranodal, Gastrointestinal e Inclassificável, sendo a última aplicada aos casos cuja origem primária se desconhece.

As amostras foram fixadas em formol a 10% e processadas para inclusão em blocos de parafina. Foram realizados, a partir dos blocos, cortes com 3 µm de espessura para consequente coloração com H&E, de acordo com a técnica de rotina do laboratório do IPO, Lisboa. Todas as amostras, previamente classificadas como linfoma por patologistas veterinários (Prof. Doutor Pedro Faísca, DNATech e Universidade

Lusófona de Humanidades e Tecnologias e Professora Doutora Maria Conceição Peleteiro, laboratório de anatomia patológica veterinária, VetPat) foram observadas ao microscópio ótico pelo autor e por um especialista em Hematopatologia humana do Instituto Português de Oncologia – Francisco Gentil, Lisboa, Dr. José Cabeçadas, com os objetivos de confirmar o diagnóstico de linfoma não-Hodgkin, avaliar diversas características histológicas dos linfomas e classificá-los morfológicamente.

Após confirmação do diagnóstico de linfoma foram avaliadas as seguintes características histológicas, previamente estabelecidas por Valli *et al.* (2000) e adaptadas pelo autor conforme definido a baixo:

Número de mitoses – visualização de 10 campos de observação com ampliação a 400x; E para o linfoma Gastrointestinal (GI) foi avaliado o padrão de distribuição das células neoplásicas na parede intestinal em: 1) Apenas a Mucosa e Lâmina Própria estão afetadas e 2) Envolvimento Transmural, em que a mucosa, a lâmina própria, a submucosa, a(s) camada(s) muscular(es) e serosa podem estar afetadas. Além disso, foi, ainda, avaliado o epiteliotropismo, confirmado pela imunohistoquímica.

2.1.2. Imunohistoquímica

Imunohistoquímica utilizando os marcadores CD3, CD79 α cy, Pax5, BLA.36

A imunohistoquímica foi aplicada às 45 amostras de LnH do gato, por forma a definir o fenótipo B vs T utilizando um anticorpo anti-CD3 (A452; Dako, Glostrup, Denmark, 1:500) para a identificação das células T, e anticorpos anti-CD79 α cy (M7051, clone HM57; Dako, Glostrup, Denmark, 1:200), anti-Pax5 (NCL-L-Pax5, Novocastra, UK, 1:40) e anti-BLA.36 (M0533; Dako, 1:50) para a identificação das células B. Foram realizados cortes com 3 μ m de espessura dos blocos de parafina. As lâminas foram aquecidas para a recuperação antigénica e desparafinação no módulo *PTLink* (Dako) com recurso a solução alcalina *Envision Flex*TM (Dako) durante 20 minutos a 94°C. A peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação das lâminas durante 20 minutos com a solução de bloqueio da Peroxidase *DakoReal*TM seguida por etapas de lavagem. Os anticorpos anti-CD3, anti-CD79 α cy, anti-Pax5, anti-BLA.36, foram diluídos no diluente de ligação de anticorpos primários (Leica, Bond) a 1:500, 1:200, 1:40 e 1:50, respetivamente, e aplicados sobre as amostras durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com *DakoReal*TM *Envision*® *HRP Rabbit/Mouse* durante 30 minutos. O cromogénico (castanho) utilizado para os anticorpos foi a 3,3'-Diaminobenzidina (Dab) e a hematoxilina de Mayer foi

utilizada como meio de contraste (azul); as lâminas foram montadas com recurso a Eukitt®. Como controlos positivos foram utilizados cortes de linfonodo normal, linfonodo reativo, tonsila e mucosa gástrica de gato; como controlo negativo foram utilizadas amostras sem anticorpo primário.

O resultado era considerado positivo para um marcador, quando mais de 75% das células apresentavam marcação específica para os antigénios estudados. A expressão de Pax5 foi considerada positiva se o núcleo das células neoplásicas revelasse marcação positiva, ao passo que a expressão de CD3, CD79 α cy e BLA.36 foi considerada positiva se a membrana citoplasmática revelasse a presença do marcador (castanho).

As amostras foram revistas ao microscópico pelo autor e pelo Dr. José Cabeçadas e seguidamente classificadas de acordo com o esquema de classificação OMS (Vezzali *et al.*, 2009; Moore, *et al.*, 2011; Valli *et al.*, 2011).

2.2. Análise Estatística Descritiva

Foi realizada análise estatística descritiva para os aspetos clínicos e laboratoriais dos 45 casos de linfoma não-Hodgkin do gato, com recurso ao programa informático Microsoft Office Excel 2010®.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra estudada e estatística descritiva

As características registadas para cada animal (raça, idade, género e localização anatómica do linfoma) estão representadas no apêndice II e resumidos na tabela 4. Resumidamente, a raça Europeu Comum está sobrerrepresentada nesta amostragem, representando 75,6% (34/45) dos gatos. Os machos representam 66,7% (30/45) dos gatos e as fêmeas apenas 33,3% (15/45). Dos machos, os castrados estão sobrerrepresentados, constituindo 40% (18/45). Dentro de todos os linfomas, o fenótipo predominante foi o B, representando 51,1% (23/45), tendo sido encontrados 48,9% (22/45) de linfomas T. Em relação à localização anatómica do linfoma, a mais frequente foi a gastrointestinal (62,2%, 28/45) e de entre este, o fenótipo T foi o predominante (64,3%, 18/28), verificando-se, ainda, maior prevalência no Jejuno 39,2% (11/28). A informação relativa à pesquisa de infeção por FIV e FeLV apenas foi possível em 55,5% (25/45) dos casos e de entre estes, apenas 4,4% (2/45) revelaram infeção por FeLV. De acordo com esquema de classificação da OMS a entidade Linfoma B Difuso

de Células Grandes (LBDCG) variante imunoblástica foi a mais prevalente na população estudada, representando 29% (13/45) dos casos. Dentro do grupo de linfomas gastrointestinais, a entidade Linfoma T Associado a Enteropatia (LTAE) foi a mais prevalente, representando 28,6% (8/28) dos casos. A idade dos pacientes felinos estudados variou de 1 a 17 anos de idade com média de 9,4 anos e desvio padrão de 3,2, existindo maior prevalência de linfoma gastrointestinal nos gatos idosos e outras localizações (extranodal, mediastínica e multicêntrica) com maior incidência em gatos jovens.

Relativamente às características histológicas estudadas (número de mitoses e particularmente para o linfoma gastrointestinal o grau de extensão do linfoma pelas suas paredes), identifica-se maior frequência de mitoses no linfoma B (mais de 20 mitoses por campo de observação a 400x em 30,4%, 7/23 dos linfomas B). Dos linfomas gastrointestinais de fenótipo B, apenas um (10%, 1/10) apresentava apenas envolvimento de mucosa e lâmina própria, os restantes revelaram envolvimento de todas as camadas intestinais e caráter histológico agressivo, com destruição da arquitetura das diferentes camadas do intestino. A entidade LTAE revelou maioritariamente padrão de distribuição em “aglomerados de linfócitos” (5/8 \approx 62,5%) seguido pelo padrão “em banda” (3/8 \approx 37,5%). O LBDCG e o LTTCP revelaram na maioria dos casos padrão de distribuição de “obliteração da lâmina própria”. Os resultados aqui descritos estão resumidos nos apêndices III e IV. Os resultados da análise de estatística descritiva estão resumidos nas tabelas 4 a 11, nas figuras 1 e 2 dos apêndices e apêndices VI a X.

Tabela 4. Resumo dos dados estatísticos para os 45 casos de LnH do gato estudados.

Variáveis	% dos casos	Número de casos
Raça		
Europeu Comum	76	34
Siamês	13	6
Bosques da Noruega	11	5
Gênero		
Fêmea	13	6
Macho	27	12
Fêmea Castrada	20	9
Macho Castrado	40	18
Fenótipo		
B	51	23
T	49	22
Linfoma GI 62% (28/45)		
T	64	18
B	36	10
FIV e FeLV		
FeLV positivo	4	2
FIV e FeLV negativo	51	23
Indeterminado	44	20
Localização do Linfoma		
Gastrointestinal	62	28
B	36	10
T	64	18
Multicêntrico	9	4
B	75	3
T	25	1
Mediastínico	2	1
T	100	1
Extranodal	27	12
B	100	12
Localização Anatômica		
Estômago	4	2
Duodeno	13	6
Jejuno	24	11
Íleo	13	6
Cólon	7	3
Nasal	2	1
Cutâneo	4	2
Sistema Nervoso Central	2	1
Membrana Nictitante	2	1
Mediastino	2	1
Nodal	9	4
Baço	7	3
Fígado	4	2
Traqueia	2	1
Rim	2	1
Classificação OMS		
LBDCG I	29	13
LBDCG C	16	7
LBNS	2	1
LF	2	1
LBPC	2	1
LTAE II	13	6
LTAE I	4	2
LTPNE	18	8
LTTCF	11	5
LLC/LL	2	1
Idade (Anos)	Mediana = 10 Min = 1 Max = 17	Média = 9,4 DP = 3,2
Idade (Anos)		
B	Mediana = 9 Min = 1 Max = 14	Média = 11 DP = 8,9
T	Mediana = 10 Min = 3 Max = 17	Média = 12 DP = 9,9

FeLV – Vírus da Leucemia Felina; **FIV** – Vírus da Imunodeficiência Felina; **LBDCG I** – Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Imunoblástica; **LBDCG C** – Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Centrobástica; **LBNS** – Linfoma B Não Subclassificável; **LF** – Linfoma Folicular Grau 1 / 2; **LBPC** – Linfoma B de Pequenas Células; **LTAE II** – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo II; **LTAE I** – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo I; **LTPNE** – Linfoma T Periférico Não Específico; **LTTCF** – Linfoma T Transmural de Pequenas Células; **LLC / LL** – Leucemia Linfocítica Crônica / Linfoma Linfocítico.

Tabela 5. Idade (anos) por grupos fenótipo: medidas de estatística descritiva

Idade				
	Mínimo	Máximo	Média	DP*
B	1	14	8,9	3,2
T	3	17	9,9	3,2

*DP=Desvio Padrão amostral

Tabela 6. Idade (anos) por localização do tumor: medidas de estatística descritiva

Idade			
	Mínimo	Média	DP*
GI (n=28)	5	10	2,8
Outros (n=17)	1	8,4	3,7

*DP – Desvio Padrão Amostral

Grau de extensão das células tumorais

Tabela 7. Extensão das células tumorais nos linfomas GI: frequência absoluta e relativa

Extensão: mucosa ou transmural	
Mucosa	Transmural
9 (32,1%)	19 (67,9%)

Epiteliotropismo e invasão nodal

Tabela 8. Epiteliotropismo nos linfomas GI: frequência absoluta e relativa

Epiteliotropismo	
sim	não
20 (71,4%)	8 (28,6%)

Tabela 9. Invasão nodal nos linfomas GI: frequência absoluta e relativa

Invasão nodal	
sim	não
13 (46,4%)	15 (53,6%)

Tabela 10. Apresentação do resumo das características histológicas dos linfomas estudados, com principal ênfase às entidades mais frequentemente identificadas (LBDCG C, LBDCG I, LTAE I e LTAE II).

Variáveis	Fenótipo		Classificação OMS			
	B (%)	T (%)	LBDCG C (%)	LBDCG I (%)	LTAE I (%)	LTAE II (%)
Mitoses						
0 – 5	4	4	0	9	0	5
5 – 10	11	20	4	17	0	18
10 – 20	20	16	9	17	9	5
>20	16	9	17	13	0	0
Linfoma GI (Extensão)						
1	4	29	4	0	0	21
2	32	43	11	21	7	0

OMS – Organização Mundial de Saúde; GI – Gastrointestinal; LBDCG C – Linfoma B Difuso de Células Grandes, variante Centrobástica; LBDCG I - Linfoma B Difuso de Células Grandes, variante Imunoblástica; LTAE I – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo I; LTAE II - Linfoma T Associado a Enteropatia tipo II.

3.1.1. Detecção das proteínas CD79 α cy, Pax5 e BLA.36 nas amostras de LnH de gato para determinação do fenótipo B

Os resultados da imunohistoquímica das 45 amostras de linfoma não-Hodgkin (LnH) do gato estão resumidos na tabela 11. Dos três marcadores de linhagem celular B, apenas o BLA.36 foi expresso em 100% dos linfomas de fenótipo B (23/23), seguido pelo CD79 α cy que marcou 82,6% (19/23) dos linfomas B e, por fim, o Pax5 que marcou 78,3% (18/23) dos linfomas B. O marcador BLA.36 apresentou expressão positiva em 9% (2/22) dos linfomas T e dos restantes marcadores de linhagem B nenhum revelou expressão positiva em linfomas T.

As amostras de linfoma B revelaram marcação consistente de membrana citoplasmática e citoplasma das moléculas BLA.36 e CD79 α cy e nuclear para a proteína Pax5 (Figura 5). Nos linfomas de fenótipo T, as células com expressão positiva de CD3 não revelaram co-expressão com Pax5 ou CD79 α cy; contudo, foram observadas células B (expressão de Pax5, CD79 α cy e BLA.36) entre as células neoplásicas T.

As amostras de linfoma B estudadas revelaram que 73,9% (17/23) expressam CD79 α cy e BLA.36 membranar/citoplasmático e Pax5 nuclear em simultâneo. A co-expressão de BLA.36 e CD79 α cy foi observada em 13,04% (3/23); 8,7% (2/23) apenas expressaram BLA.36 e Pax5; 4,3% (1/23) apenas expressou BLA.36. Os resultados encontram-se representados no apêndice V.

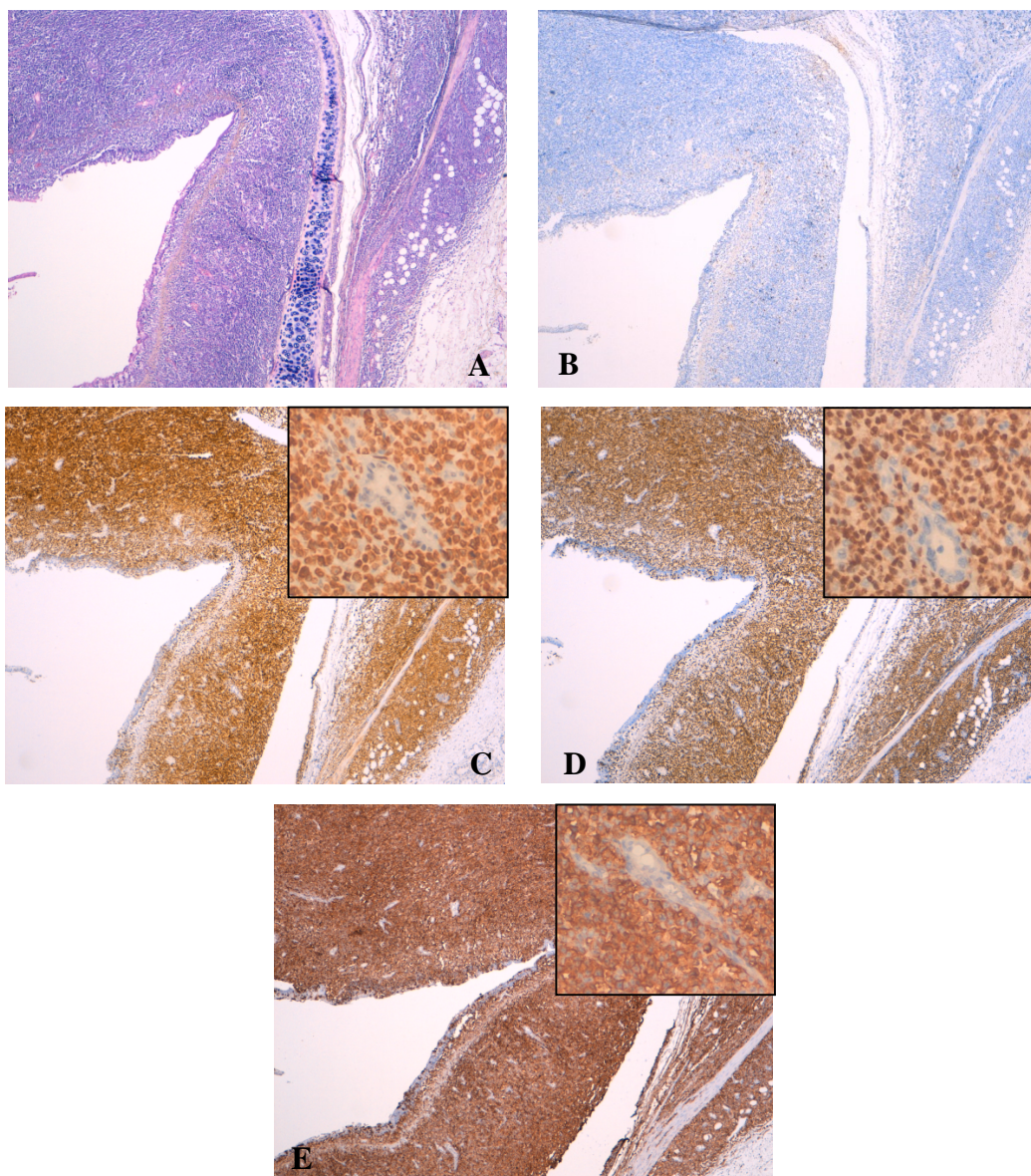


Figura 5. Linfoma número 9, Traqueia de gato. **A** – Coloração Hematoxilina-Eosina, com evidente padrão difuso com perda da arquitetura traqueal, ampliação 40x; **B** – Imunohistoquímica (IHQ) utilizando anticorpo anti-CD3 (A452; Dako, Glostrup, Denmark, 1:500), Imunomarcagem negativa, ampliação 40x; **C** – IHQ utilizando anticorpo anti-CD79acy (M7051, clone HM57; Dako, Glostrup, Denmark, 1:200), Imunomarcagem de membrana celular/citoplasma observada com objetiva de 40x. A caixa em destaque no canto superior direito corresponde a uma ampliação de 200x; **D** – IHQ utilizando anticorpo anti-Pax5 (NCL-L-Pax5, Novocastra, UK, 1:40), Imunomarcagem de membrana celular/citoplasma observada com objetiva de 40x. A caixa em destaque no canto superior direito corresponde a uma ampliação de 200x; **E** – IHQ utilizando anticorpo anti-BLA.36 (M0533; Dako, 1:50), Imunomarcagem de membrana celular/citoplasma observada com objetiva de 40x. A caixa em destaque no canto superior direito corresponde a uma ampliação de 200x.

Estas características são consistentes com linfoma B difuso de células grandes variante imunoblástico (LBDCG [I]), constituído por células neoplásicas maiores que os linfócitos normais, com núcleo laxo e nucléolo central evidente e ligeiramente eosinófilo (aspeto semelhante a imunoblastos, células imaturas da linhagem B), com várias mitoses e apoptoses por campo de observação; é considerado um subtipo de LBDCG de comportamento histológico e clínico agressivo. Fotografias originais do autor.

3.1.2. Detecção da proteína CD3 nas amostras de LnH de gato para determinação do fenótipo T

Das 45 amostras analisadas, 20 apenas expressaram a proteína CD3, indicando linhagem celular T ($20/45 \approx 44,44\%$). Duas amostras co-expressaram as proteínas CD3 e BLA.36 e foram consideradas linfoma de fenótipo T, dada a forte expressão de CD3. Mais de 60% das células das 22 amostras consideradas de fenótipo T demonstraram forte expressão da molécula CD3 na membrana citoplasmática (Figura 6). Tendo em conta que o linfoma gastrointestinal (GI) foi a localização anatômica mais frequente desta série ($28/45 \approx 62,2\%$), foi dada especial atenção à predominância do fenótipo T ($18/28 \approx 64,3\%$) e ao subtipo classificado como Linfoma T Associado a Enteropatia (LTAE) ($8/28 \approx 28,6\%$), representando 44,4% ($8/18$) dos linfomas T GI desta série de LnH de gato. Dentro do subtipo LTAE, o tipo II (envolvimento único da mucosa e lâmina própria), foi o tipo predominante ($6/8 \approx 75\%$); 100% destas amostras evidenciou epiteliotropismo bem como composição por células pequenas. Cinco dos linfomas gastrointestinais foram classificados como Linfoma T Periférico Não Especificado (LTPNE) dada a escassez de amostra, não sendo possível avaliar a presença de enteropatia associada e por isso não ser possível classificar como LTAE. A figura 6 representa um exemplo de linfoma T GI classificado como LTAE tipo I.

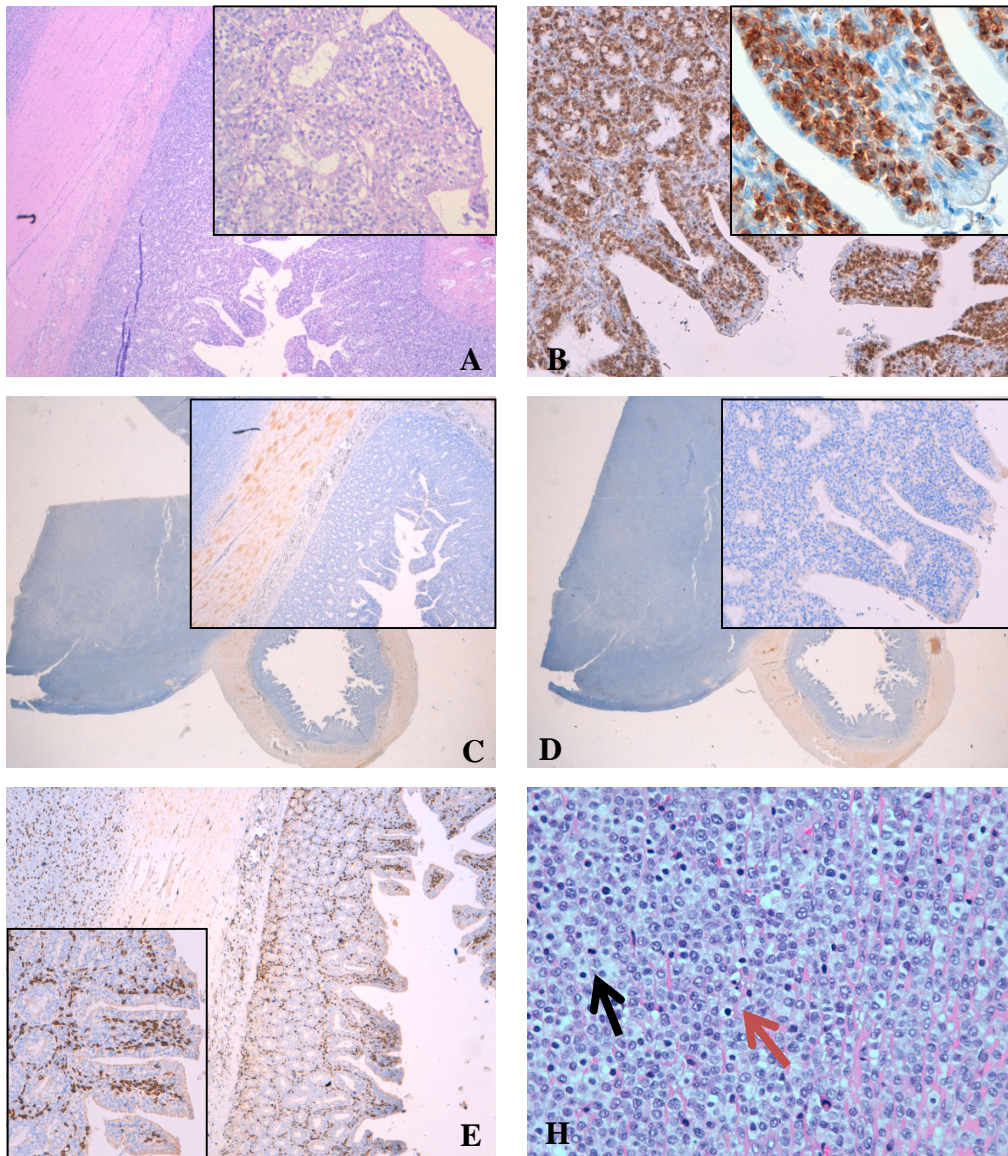


Figura 6. Linfoma número 44, Intestino Delgado, Jejunó de gato. **A** – Coloração Hematoxilina-Eosina, com evidente padrão difuso e perda da arquitetura intestinal, evidenciando-se encurtamento e fusão das vilosidades associada a diminuição da espessura da mucosa com aumento da espessura da lâmina própria e região glandular, devido à invasão por linfócitos neoplásicos; é evidente o envolvimento transmural; observação com objetiva de 40x. A caixa em destaque no canto superior direito corresponde a uma ampliação de 100x; **B** – Imunohistoquímica (IHQ) utilizando anticorpo anti-CD3 (*A452; Dako, Glostrup, Denmark, 1:500*), Imunomarcagem de membrana celular/citoplasma observada com objetiva de 40x. A caixa em destaque no canto superior direito corresponde a uma ampliação de 400x; **C** – IHQ utilizando anticorpo anti-CD79 α (*M7051, clone HM57; Dako, Glostrup, Denmark, 1:200*), Imunomarcagem de membrana celular/citoplasma negativa, ampliação à lupa e no canto superior direito com a objetiva de 40x; **D** – IHQ utilizando anticorpo anti-Pax5 (*NCL-L-Pax5, Novocastra, UK, 1:40*), Imunomarcagem nuclear negativa, ampliação à lupa e no canto superior direito com a objetiva de 40x; **E** – IHQ utilizando anticorpo anti-BLA.36 (*M0533; Dako, 1:50*), Imunomarcagem de membrana celular/citoplasma negativa, observação com objetiva de 40x e no canto inferior esquerdo com a objetiva de 100x; **H** – Coloração Hematoxilina-Eosina. A seta preta evidencia mitose e a seta vermelha uma apoptose, observação com objectiva de 100x. Estas características são consistentes com linfoma T associado a enteropatia tipo I (LTAE tipo I), constituído por células neoplásicas com dimensão semelhante à dos linfócitos normais, com núcleo laxo, cromatina densa e nucléolo pouco evidente, com algumas mitoses e apoptoses por campo de observação; é considerado um subtipo de LTAE de comportamento histológico agressivo dado o envolvimento transmural. Fotografias originais do autor.

Tabela 11. Apresentação dos dados clinico-patológicos das 45 amostras de LnH de gato estudadas.

Variáveis	Marcadores T e B			
	CD3 (%)	CD79 α y (%)	Pax5 (%)	BLA.36 (%)
Fenótipo				
B	0	87	83	100
T	100	0	0	9
Classificação OMS				
LBDCG I	0	77	77	100
LBDCG C	0	100	100	100
LBNS	0	100	0	100
LF grau 1/2	0	100	100	100
LBPC	0	100	100	100
LTAE I	100	0	0	0
LTAE II	100	0	0	33
LTPNE	100	0	0	0
LTTCP	100	0	0	0
LLC	100	0	0	0

LBDCG I – Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Imunoblástica; **LBDCG C** – Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Centroblástica; **LBNS** – Linfoma B Não Subclassificável; **LF grau 1/2**– Linfoma Folicular Grau 1 / 2; **LBPC** – Linfoma B de Pequenas Células; **LTAE II** – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo II; **LTAE I** – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo I; **LTPNE** – Linfoma T Periférico Não Específico; **LTTCP** – Linfoma T Transmural de Pequenas Células; **LLC / LL** – Leucemia Linfocítica Crónica / Linfoma Linfocítico. *A classificação foi realizada pelo autor e pelo hematopatologista de medicina humana Dr. José Cabeçadas de forma cega, existindo concordância em 100% dos casos. **Nota** – Cinco dos casos de Linfoma Gastrointestinal foram classificados como Linfoma T Periférico Não Específico pelo facto da amostra não apresentar mucosa, o que possibilitaria a classificação como LTAE caso existisse envolvimento da mesma.

4. Discussão

Os resultados obtidos coincidem com os descritos na literatura recente. A raça mais prevalente no presente estudo foi o Europeu Comum, possivelmente devido à sobre-representação desta raça na população felina propensa. Em relação à raça Bosques da Noruega é interessante referir que dos 4 linfomas gastrointestinais diagnosticados nesta raça, 1 foi do estômago, 2 do cólon e apenas 1 do intestino delgado (jejuno), existindo aparente sobre-representação do linfoma gástrico e do cólon, localizações menos frequentes no linfoma GI do gato (Moore *et al.*, 2011). Importa, no entanto, realçar que qualquer raça poder ser afetada, pelo linfoma (Louwerens *et al.*, 2005).

Não existem dados concretos na literatura no que diz respeito à predisposição do género em gatos; contudo, alguns autores sugerem que os gatos machos inteiros têm maior predisposição, dado o maior risco de infeção retroviral (Meinke *et al.*, 1972; Court *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998). Está descrito o potencial efeito protetor das hormonas femininas no LnH do Homem e do cão (Villamil *et al.*, 2009). No presente estudo, os machos representam 66,7% (30/45) (Tabela 4) dos casos estudados, sendo a maioria machos castrados (60%, 18/30) (Tabelas 4). Estes resultados podem estar associados a i) aumento da esperança média de vida dos gatos machos castrados ou ii) potencial ação protetora das hormonas femininas o que pode justificar a menor prevalência de fêmeas na população estudada, vindo ao encontro, também, ao já descrito para o cão e Homem.

De acordo com a literatura, o fenótipo mais frequente no linfoma do gato é controverso, principalmente em relação ao linfoma gastrointestinal, existindo estudos que definem o fenótipo B como o mais prevalente (Vail *et al.*, 1998; Patterson-Kane *et al.*, 2004; Pohlman *et al.*, 2009), o fenótipo T como mais prevalente (Cesari *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009; Kiupel *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011; Chino *et al.*, 2013) e prevalência semelhante entre ambos os fenótipos (Fondacaro *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1993, 1996). O presente trabalho revela prevalência semelhante dos fenótipos B e T na população estudada (fenótipo B em 51,1% (23/45) dos casos e fenótipo T em 48,9% (22/45) dos casos) (Tabela 4). No entanto, é evidente a predominância do fenótipo T na localização gastrointestinal, representando 64,3% (18/28) dos linfomas gastrointestinais estudados (Tabela 4). Resultado coincidente com os resultados de estudos recentes (Cesari *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009; Kiupel *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011). A baixa prevalência de linfoma GI T no gato, reportada em estudos anteriores, pode-se dever ao facto de não se ter determinado a clonalidade da população celular envolvida

(T vs B) através de imunohistoquímica, citometria de fluxo e/ou detecção de rearranjos do recetor de antigénio por PCR. Assim, é muito provável que, em estudos anteriores ao uso de técnicas moleculares para definição de clonalidade, a real incidência de linfoma gastrointestinal T, tenha sido subestimada, dada a difícil distinção entre linfoma gastrointestinal e doença idiopática intestinal linfoplasmocítica (Moore, *et al.*, 2011).

Relativamente à prevalência de infeção por retrovírus, apenas 4,4% (2/45) dos gatos com linfoma estudados apresentaram infeção por FeLV (Tabela 4). Os dois gatos envolvidos apresentavam idades entre o 1 e os 3 anos, e foram diagnosticados com linfoma da terceira pálpebra (extranodal) e mediastínico, respetivamente. Estes dados confirmam a tendência da infeção por FeLV em gatos jovens com as localizações mediastínica e extranodal (Spodnick *et al.*, 1992; Mahony *et al.*, 1995; Court *et al.*, 1997; Slawinski *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Vail *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Peaston *et al.*, 1999; Rassnick *et al.*, 1999; Louwerens *et al.*, 2005). Nenhum dos gatos com linfoma gastrointestinal demonstrou infeção por FeLV, sendo a sua média de idades de 10 anos. Teske *et al.*, (2002), por exemplo, reportam apenas quatro gatos infetados com FeLV e Linfoma numa população de 54 gatos testados, dos quais 22 apresentavam a localização mediastínica. A baixa prevalência de infeção por retrovírus pode dever-se a i) diminuição da prevalência de infeção na população de gatos domésticos, devido a maior preocupação dos proprietários em vacinação, esterilização e confinamento e ii) ausência de infeção ativa, associada a possível infeção crónica e presença de DNA viral (provirus) nos linfócitos neoplásicos (latência viral), o qual pode ser detetado através da técnica de PCR. Está reportado, a detecção por PCR, da existência de material genético viral em amostras de gatos com linfoma FeLV-antigénio-negativos (Jackson *et al.*, 1993). Contudo, outro estudo, recorrendo igualmente à técnica de PCR, reporta baixa prevalência de infeção (4,5%), semelhante ao que se verificou no presente estudo (Sheets *et al.*, 1993).

A localização anatómica mais prevalente na amostra estudada foi a gastrointestinal (GI), dos linfomas estudados, seguido pelas localizações extranodal, multicêntrica e mediastínica (Tabela 4), o que corresponde à prevalência reportada em estudos anteriores (30 a 70% dos casos). Dentro do trato gastrointestinal, a localização mais frequente foi o jejuno, representado 39,2% (11/28) dos linfomas estudados, tal como reportado na literatura (Richter, 2003; Pohlman *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011; Barrs & Beatty, 2012^a, 2012^b). A baixa prevalência da localização mediastínica pode ser devido a: i) diminuição de infeção por FeLV em gatos jovens

pertencentes a proprietários sensibilizados para a vacinação e esterilização, bem como para o acompanhamento médico veterinário, ou ii) ao facto da raça siamesa estar sub-representada na amostra estudada (predisposta para o desenvolvimento desta localização de linfoma; o único linfoma mediastínico da presente amostra foi diagnosticado num gato siamês de 3 anos de idade), ou iii) à idade dos pacientes (adultos a geriátricos), ou, ainda, iv) devido ao difícil acesso ao mediastino para obtenção de tecido, estando associando a procedimento de elevado risco; além de que post-mortem, alguns proprietários podem já não querer dispendir mais para a obtenção de um diagnóstico.

O linfoma extranodal foi a segunda localização de linfoma mais frequente, representando 26,7% (12/45) dos linfomas estudados (Tabela 4). O fenótipo B foi o predominante no linfoma extranodal, representando 100% (12/12) dos linfomas, confirmando a tendência para o fenótipo B das localizações extranodais (principalmente as localizações nasal e renal) previamente reportada (Tabela 4) (Vail *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Mukaratirwa *et al.*, 2001; Little *et al.*, 2007; Moore, 2013). As restantes localizações, multicêntrica e mediastínica estão representadas em reduzido número, verificando-se, porém, tendência do fenótipo B (75%) na localização multicêntrica e fenótipo T (100%) na mediastínica, como previamente reportado (Vail, 2013).

Relativamente à idade, vários estudos anteriores reportam que a média de idades dos gatos diagnosticados com linfoma é entre os 10 e 12 anos (Francis *et al.*, 1979; Hardy *et al.*, 1980; Vail *et al.*, 1998; Louwerens *et al.*, 2005; Vail & Young, 2007; Krick *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011). Estão descritos casos de linfoma diagnosticados em gatos com idades entre os 4 meses e 20 anos de idade (Court *et al.*, 1997; Meincke *et al.*, 1972). No presente trabalho, o gato mais jovem diagnosticado apresentava um ano de idade (fenótipo B) e o mais idoso apresentava 17 anos de idade (fenótipo T). De um modo geral a média de idades é semelhante à reportada na literatura (9-11 anos). No que diz respeito ao fenótipo, a média de idades dos gatos diagnosticados com linfoma B e T, não revelou variação significativa (Tabelas 4 e 5). Relativamente à localização anatómica, observa-se maior tendência para o desenvolvimento de linfoma mediastínico, multicêntrico e extranodal em gatos mais jovens, enquanto que o linfoma gastrointestinal foi identificado tendencialmente em gatos mais idosos, tal como reportado na literatura (Barrs & Beatty, 2012a) (Tabela 4). No linfoma GI, a média de idades para o linfoma B foi de 9,2 anos e para o linfoma T foi de 10,5 anos, verificando-se, tal como em estudos anteriores, média de idade superior no caso do linfoma GI (Tabelas 4 e 6) (Spodnick *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1994; Mahony *et al.*, 1995; Court *et*

al., 1997; Slawienski *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1998; Vail *et al.*, 1998; Zwahlen *et al.*, 1998; Gabor *et al.*, 1999; Peaston & Maddison, 1999; Rassnick *et al.*, 1999; Louwerens *et al.*, 2005).

De acordo com o esquema de classificação da OMS, a entidade mais prevalente na população estudada foi o Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG) variante imunoblástica. Esta entidade de linfoma é reconhecida como uma das mais frequentes em medicina humana (30 a 40%) e no cão (40 a 70%) (Vezzali *et al.*, 2009; Valli *et al.*, 2011; Martelli *et al.*, 2013; Valli *et al.*, 2013). No gato o LBDCG, dentro do fenótipo B é a entidade mais frequente (47%) (Vezzali *et al.*, 2009); porém dada a sobre-representação do linfoma gastrointestinal, a entidade Linfoma T Associada a Enteropatia (LTAE) (64%) sobrepõe-se ao LBDCG na localização gastrointestinal (Vezzali *et al.*, 2009). No presente estudo, observa-se predominância do LBDCG, seguido pelo LTAE e Linfoma T Periférico Não Específico (LTPNE) (Tabela 4), resultados discordantes em relação a um estudo recente que reporta predominância generalizada do linfoma T (Vezzali, *et al.*, 2009), contudo a percentagem de linfoma GI de fenótipo T é similar (64%). No que respeita ao linfoma T, verifica-se igual número de linfomas com classificação de LTAE e LTPNE. Dos oito linfomas classificados como LTPNE, cinco são gastrointestinais, tendo sido incluídos neste grupo por não apresentarem mucosa nos cortes histológicos. A presença de mucosa nos cortes histológicos é essencial para a avaliação da presença de enteropatia e infiltração de linfócitos neoplásicos nos espaços inter-epiteliais, para a classificação como LTAE (Kiupel *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011), razão pela qual esta entidade se apresenta sub-representada nesta população, quando comparada com outras (Moore *et al.*, 2011). Dentro do LBDCG estão identificadas duas variantes, imunoblástica e centroblástica. A primeira, habitualmente associada a mau prognóstico, com células com núcleo excêntrico com um ou mais nucléolos evidentes e associada a alto índice mitótico, foi a mais prevalente na presente amostra (29%, 13/45), o que indica elevada prevalência de LBDCG de comportamento biológico agressivo e elevado grau de malignidade no gato (Tabela 4). A variante centroblástica (15,6%, 7/45) (Tabela 4) é caracterizada pela presença de células grandes, cromatina dispersa, múltiplos nucléolos, por vezes fundidos à membrana nuclear e, habitualmente, associada a melhor prognóstico que a variante imunoblástica. A forma imunoblástica pode apresentar aspetos de diferenciação plasmocitária, estando, dessa forma, associada a estadio de maturação avançada da linhagem celular B (Martelli *et al.*, 2013). Dos quatro linfomas B que não expressam o

fator de transcrição Pax5, três são LBDCG variante predominantemente imunoblástica. O estadió avançado de maturação das células B pode justificar a expressão negativa de Pax5, que é apenas expresso nas células B maduras e nos seus estadios iniciais de maturação (Cobaleda *et al.*, 2007a).

Relativamente ao LTAE, estão descritos os tipos I e II, uma entidade incomum em medicina humana e frequente em gatos (Moore *et al.*, 2011). Esta entidade de linfoma é principalmente identificada em pacientes com sensibilidade ao glúten (doença celíaca). Esta entidade revela, frequentemente, encurtamento e fusão das vilosidades, aumento da espessura da lâmina própria e região glandular, infiltração por células pequenas no epitélio das vilosidades, epiteliotropismo dos linfócitos neoplásicos com reduzido citoplasma, núcleo redondo, de cromatina compacta e nucléolo pouco evidente (Vail & Young, 2007). Em medicina humana a distinção entre os dois tipos de linfoma é baseada na morfologia celular, expressão molecular de CD8, CD56, HLA-DQ2/-DQ8 e alterações genéticas pontuais (Swerdlow *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrada a compatibilidade destas entidades de linfoma T entre o Homem e o gato, com base nas características morfológicas celulares e distribuição das células neoplásicas (mucosa, LTAE tipo II; e transmural, LTAE tipo I) (Moore *et al.*, 2011). Não se conhecem os mecanismos exatos que promovem o aparecimento desta entidade de linfoma no gato, contudo, seria interessante, em estudos futuros analisar a possível evolução de IBD para linfoma e uma possível sensibilidade ao glúten, tal como reportado em medicina humana (Swerdlow *et al.*, 2008).

O número de mitoses foi reduzido nas entidades LTAE tipo II e Linfoma B de Pequenas Células (LBPC) (média 0 a 3 mitoses por campo de 200x), contrariamente ao LBDCG, Linfoma T Transmural de Pequenas Células (LTTCP) e LTPNE, que demonstraram maior número de mitoses (média 5 a 10 por campo de 200x) (Tabela 10 e apêndices III e IV). Foram observadas menos mitoses por campo de observação nos LTAE tipo II que nos LTAE tipo I, demonstrando importante diferença entre as duas entidades. O LBDCG predominantemente imunoblástico revelou maior índice mitótico e presença de mitoses atípicas que a variante centroblástica, tal como previamente reportado (Tabela 10 e apêndices III e IV) (Martelli *et al.*, 2013). Foi, ainda, observado maior índice mitótico nos linfomas com maior percentagem de necrose (Figura 7); no entanto, algumas amostras apresentam autólise secundária a fixação inadequada, o que tornou difícil a associação entre estas duas variáveis. A localização anatómica não revelou diferenças no índice mitótico, existindo, contudo, no linfoma GI uma

associação interessante entre este parâmetro e as entidades LBDCG e LTAE, sendo observado maior número de mitoses no primeiro, o que pode indicar comportamento biológico mais agressivo e maior grau de malignidade, tal como previamente reportado (Tabela 10 e apêndices III e IV) (Moore *et al.*, 2011). O índice mitótico é indiferente à idade dos gatos afetados. O número de mitoses pode ser influenciado pela infecção por FeLV (Valli *et al.*, 2000), sendo que, na presente amostra, apenas um dos dois gatos infetados revelou elevado índice mitótico (5 a 10 mitoses por campo de 200x) (Tabela 10 e apêndices III e IV).

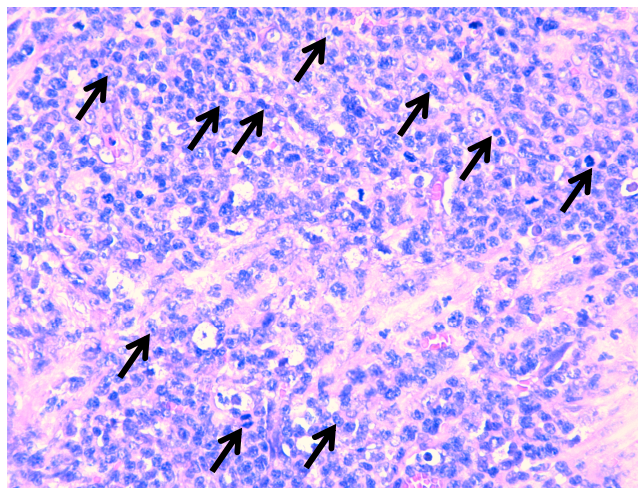


Figura 7.: Amostra nº4, estômago. Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Imunoblástica. Evidentes zonas de esclerose, necrose e várias mitoses (setas pretas) por campo de observação com a objetiva de 100x. Fotografia original do autor.

Em relação aos linfomas gastrointestinais foi, ainda, documentado o epiteliotropismo (vilosidades e/ou epitélio das criptas), tendo-se observado em 100% (8/8) dos LTAE tipo I e II. E embora menos frequente, foi, também, observado epiteliotropismo em 38,5% (5/13) dos LBDCG variante imunoblástica e 28,6% (2/7) dos LBDCG variante centroblastica (Tabela 8 e apêndice IV). O epiteliotropismo é uma característica normal dos linfócitos T no intestino delgado de muitas espécies, incluindo a felina, funcionando como uma das primeiras linhas de defesa da mucosa intestinal. Além disso, estes linfócitos desempenham importante função imunoreguladora limitando a inflamação num ambiente partilhado com inúmeros microrganismos comensais. Em gatos saudáveis a densidade dos linfócitos intraepiteliais varia entre 40 a 80 por 100 enterócitos, sendo ligeiramente superior à dos cães (20 linfócitos por 100 enterócitos). O número de linfócitos intraepiteliais pode variar entre gatos de diferentes áreas geográficas e com diferentes dietas (Waly *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2011). Nas

amostras estudadas o epiteliotropismo manifestou-se desde pequenos e discretos aglomerados celulares a infiltrados difusos do epitélio das criptas e/ou vilosidades. Os aglomerados de linfócitos intraepiteliais foram rapidamente identificados e a sua presença aumentou a sensibilidade para o reconhecimento do linfoma, tal como previamente reportado (Fondacaro *et al.*, 1999; Richter, 2003). Contudo, a imunohistoquímica foi essencial para a definição do fenótipo dos linfócitos intraepiteliais, tal como reportado em estudos anteriores (Carreras *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005; Roccabianca *et al.*, 2000, 2006). Para reduzir a subjetividade da análise de epiteliotropismo, este era apenas considerado positivo se por cada 100 enterócitos existissem no mínimo 40 linfócitos, valor sugerido por Carreras *et al.*, (2003). Segundo o mesmo autor, este valor permite aumentar a sensibilidade para o diagnóstico de linfoma, sendo a realização de imunohistoquímica essencial para a correta identificação e contabilização dos linfócitos (Carreras *et al.*, 2003). Além do linfoma GI, o epiteliotropismo foi avaliado para outras entidades de linfoma associados a epitélio (nasal, traqueal e cutâneo). Destes, nenhum evidenciou epiteliotropismo. Estudos anteriores referem que o epiteliotropismo é mais frequente nos linfomas T, podendo, menos frequentemente, surgir no linfoma B (Mukaratirwa *et al.*, 2001).

No presente trabalho foi, também, observado o padrão de distribuição de linfócitos na lâmina própria, previamente definido por Moore *et al.*, (2011), dada a sua importância para a avaliação do grau de malignidade do linfoma. O LTAE revelou maioritariamente padrão de distribuição dos linfócitos neoplásicos em “aglomerados” (em 62,5%, 5/8, dos LTAE) e em “bandas” (em 37,5%, 3/8 dos LTAE), estando estas duas entidades relacionadas com o linfoma de comportamento menos severo, podendo representar estádios iniciais do linfoma intestinal em gatos (Apêndices III e IV) (Fondacaro *et al.*, 1999; Richter, 2003). Em relação ao LTTCP foram observados padrões de distribuição linfóides monomórficos difusos e de células de tamanho pequeno a médio na lâmina própria das vilosidades, definidos como “obliteração da lâmina própria das vilosidades” e padrão de “obliteração da lâmina própria”. Estes últimos estão associados a estádios de linfoma mais avançados e podem constituir fator prognóstico negativo. O LBDCG apresentou o padrão de distribuição similar aos últimos; porém as células neste subtipo de linfoma B são grandes e com nucléolo(s) evidente(s). Além disso, foram observadas zonas de fusão de vilosidades nas entidades LTTCP e LBDCG.

Em 44,5% (20/45) dos linfomas estudados foi registado envolvimento nodal (Apêndice IV), tendo sido verificado com maior frequência nas entidades LBDCG variante imunoblástica (de origem gastrointestinal, maioritariamente), LTPNE e LTTCP. O comportamento mais agressivo destas entidades pode ser a justificação para o envolvimento ganglionar.

A fenotipagem do linfoma é essencial para a classificação de acordo com o esquema da OMS (Valli *et al.*, 2002). Para tal, as amostras foram submetidas a análise imunohistoquímica para deteção de moléculas específicas de células T (CD3) e de células B (CD79 α cy, Pax5 e BLA.36). A técnica de imunohistoquímica (IHQ) é uma das técnicas mais frequentemente aplicadas no linfoma do gato para a determinação do fenótipo predominante (Vail *et al.*, 1998; Roccabianca *et al.*, 2000; Mukaratirwa *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Valli *et al.*, 2002; Cesari *et al.*, 2009; Pohlman *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2011; Moore, 2013). Alguns estudos no linfoma do gato que utilizam unicamente os marcadores CD3 e CD79 para a definição de fenótipo T e B, reportam a existência de linfomas sem expressão de ambas as moléculas, sendo, por isso, identificados como linfoma de origem em células “*Natural Killer*”. No presente estudo, de forma a aumentar a sensibilidade na deteção de células B, foram utilizados três diferentes marcadores B (CD79 α cy, BLA.36 e Pax5). A reatividade dos três marcadores em simultâneo foi observada em, apenas, 74% (17/23) (Tabela 11 e apêndice V) dos linfomas B, o que pode indicar elevada heterogeneidade das células tumorais devido a: 1) ganho ou perda de marcadores de diferenciação durante a linfomagénesse, 2) diferentes estadios de maturação das células B, e 3) má qualidade dos tecidos (por processamento inadequado), o que pode perpetuar a reduzida afinidade dos anticorpos aos epitopos estudados. No linfoma do cão, a expressão de Pax5 demonstrou elevada concordância com a expressão de CD79 (100%) (Willmann *et al.*, 2008). No presente estudo o Pax5 falhou na identificação de 18% (4/23) de todos os linfomas B, enquanto que o CD79 α cy falhou na identificação de 13% (3/23) de todos os linfomas B (Tabela 11 e apêndice V). O BLA.36 identificou 100% (23/23) de todos os linfomas B e foi expresso em 9% (2/22) dos linfomas T (Tabela 11 e apêndice V). Estes resultados são interessantes dado que o Pax5 é uma molécula muito específica das células B, deixando de estar expresso, apenas, nos estadios de diferenciação plasmocitária das células B, o que pode ser a justificação para a expressão negativa do Pax5 nesses linfomas. Além disso, esses linfomas podem apresentar elevado grau de indiferenciação celular, possivelmente associada a alta agressividade biológica. O BLA.36 revelou

elevada sensibilidade para a detecção de células B. Contudo, foi observada a sua expressão em dois linfomas T, o que pode ser devido a: 1) expressão aberrante de marcadores B em linfomas T ou 2) conversão de células B maduras em células T por desdiferenciação, devido à perda de expressão de Pax5, o que possibilita a diferenciação das células B em células progenitoras indiferenciadas e, posteriormente, em células T. Estas células T derivadas de células B tanto podem apresentar expressão positiva de marcadores B (BLA.36, por exemplo) como rearranjo de genes das cadeias leve e pesada da imunoglobulina. A perda de expressão de Pax5 pode originar linfomas com origem em células progenitoras e de comportamento biológico agressivo (Cobaleda *et al.*, 2007b). Os dois linfomas T que apresentaram expressão positiva de BLA.36 foram classificados como LTAE tipo II. Em medicina humana está reportado que as células T $\gamma\delta$ (Recetor da Célula T com dupla cadeia gama/delta) podem expressar marcadores de células B, tal como o CD20 (Hultin *et al.*, 1993; Jubala *et al.*, 2005). Encontra-se, também, descrito que a entidade LTAE tipo II apresenta, com frequência, expressão do recetor das células T $\gamma\delta$ (Chan *et al.*, 2011). Estas observações podem justificar a expressão positiva de BLA.36 nos dois linfomas T desta amostragem. Contudo, não é conhecida a expressão de marcadores B em células T $\gamma\delta$, nem a frequência destas células na entidade LTAE tipo II do gato.

O marcador CD3 revelou elevada sensibilidade e especificidade para as células T (100%, 22/22 dos linfomas T) (Tabela 11 e apêndice V). Em relação aos diferentes marcadores B, tendo em conta Landis & Koch (1977), foi evidente maior concordância estatística entre Pax5 e CD79 α cy (Kappa de Cohen = 0,87, concordância quase perfeita) (apêndice X), o que confirma os resultados reportados para o linfoma do cão (Willmann *et al.*, 2008). É importante, contudo, utilizar diferentes marcadores B e T por forma a permitir a definição de um fenótipo para o linfoma do gato e definição do estadió de maturação celular. O uso de apenas um marcador para o fenótipo B e T, impede o estudo do estadió de diferenciação das células linfoides, pode levar à classificação incorreta dos linfomas (origem em células “*Natural Killer*”) e impede o reconhecimento de potenciais indicadores de prognóstico e alvos terapêuticos.

O presente trabalho apresenta algumas limitações, dadas as suas características retrospectivas, o reduzido número de amostras estudadas, a ausência de dados clínicos e representar apenas populações de 3 laboratórios de anatomia patológica. Em consequência da sua natureza retrospectiva, não foi possível a recolha de informação clínica completa o que não permitiu, por exemplo, a análise de sobrevivência. Ainda, a

pequena dimensão da amostra pode ser pouco representativa da população de gatos afetados.

É, portanto, essencial a realização, no futuro, de estudos com maior número de amostras, prospectivos, multicêntricos e aleatórios, por forma a garantir resultados representativos da população, que auxiliem no diagnóstico, definição de prognóstico e na identificação de possíveis alvos terapêuticos para o linfoma do gato.

5. Conclusões

O linfoma do gato é uma neoplasia hematopoiética complexa associada, com frequência, ao trato gastrointestinal e a diversos outros órgãos (extranodal) estando, menos frequentemente, associado à localização multicêntrica como no cão ou no homem. As características epidemiológicas discutidas no presente trabalho são consistentes com os resultados de estudos anteriores, no que diz respeito à média de idades aquando do diagnóstico de linfoma gastrointestinal (tendencialmente animais idosos) e de linfoma mediastínico (tendencialmente animais jovens). Além disso, foi evidente a baixa prevalência de infeção por FeLV nos gatos afetados. O fenótipo predominante, tendo em conta a amostra em geral, foi o B, sendo que, no linfoma gastrointestinal o fenótipo T foi o mais frequente. Quanto à classificação de acordo com a OMS, o LBDCG foi o mais prevalente na amostra estudada, seguido pela entidade LTAE como a mais prevalente no linfoma gastrointestinal. Verificou-se que a maioria dos casos de LBDCG apresentavam a variante imunoblástica, relacionada com linfomas mais agressivos, habitualmente com estadios de diferenciação de células B maduras em plasmócitos, podendo, por isso, estar associado à perda de expressão de Pax5. No linfoma GI a entidade LTAE revelou predominância do tipo II, associada ao envolvimento da mucosa e lâmina própria das vilosidades, sendo caracterizada pelo comportamento biológico menos agressivo. A região do trato GI mais afetada foi o jejuno, seguido pelo duodeno e íleo (região ileo-ceco-cólica). Foi demonstrada a predominância de epiteliotropismo nos linfomas T; contudo, esta característica foi evidente, também, em alguns linfomas B. A raça mais prevalente na amostra estudada foi o Europeu comum, provavelmente devido à sobre-representação da mesma na área geográfica estudada. Foram registados mais machos que fêmeas afetadas o que pode sugerir a ação protetora das hormonas femininas para o desenvolvimento de linfoma no gato.

A fenotipagem por imunohistoquímica revelou alta afinidade dos diferentes anticorpos utilizados para o tecido linfoide do gato, sugerindo a sua futura utilização para i) a determinação do fenótipo do linfoma desta espécie, ii) a avaliação do estadio de diferenciação das células B e iii) para a correta classificação do linfoma de acordo com o esquema da OMS.

Em suma, o presente trabalho, através da utilização da imunohistoquímica, uma técnica acessível ao clínico, pouco dispendiosa e eficaz na determinação do fenótipo do linfoma, permitiu obter resultados muito interessantes, nomeadamente i) a elevada

prevalência, no gato, de linfoma gastrointestinal de fenótipo T, frequentemente, subclassificado em Linfoma T Associado a Enteropatia, uma entidade muito semelhante à identificada no homem, ii) a eficiência do anticorpo anti-Pax5 na identificação de células B malignas no LnH do gato e que iii) o uso combinado de diferentes marcadores B pode contribuir para uma melhor caracterização fenotípica do LnH do gato.

Para o futuro, sugere-se a realização de estudos prospectivos, multicêntricos, com amostragem aleatória e mais representativa da população felina, que permitam obter resultados capazes de contribuir para o conhecimento clínico e patológico do linfoma do gato, tendo como base principal o estudo morfológico e fenotípico associado às características clínicas.

6. Referências Bibliográficas

- Abreu, M., Fukata, M., Arditi, M. (2005). TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 174(8): 4453-4460.
- Allen, H., Broussard, J., Noone, K. (1999). Nasopharyngeal diseases in cats: a retrospective study of 53 cases (1991-1998). *J Am Anim Hosp Assoc* 35(6): 457-461.
- Argyle, D., Saba, C., Paoloni, M. (2008). Feline Lymphoma and Leukemia. In.: Argyle, D., Brearley, M., Turek, M. (Eds), *Decision Making in Small Animal Oncology*, (1st Edition, pp. 197-210). Wiley-Blackwell.
- Ashley, P. & Bowman, L. (1999). Symmetric cutaneous necrosis of the hind feet and multicentric follicular lymphoma in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 214: 211-214.
- Avery, A. (2009). Molecular Diagnostics of Hematologic Malignancies. *Topics in Companion Animal Medicine* 24(3): 144-150.
- Avery, A. (2012). Molecular Diagnostics of Hematologic Malignancies in Small Animals. *Vet Clin Small Anim* 42: 97-110.
- Baker, J. & Scott, D. (1989). Mycosis fungoides in two cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 25(1): 97-101.
- Barnett, A., Wensel, D., Li, W., Fass, D., Cunningham, J. (2003). Structure and mechanism of a coreceptor for infection by a pathogenic feline retrovirus. *J Virol* 77(4): 2717-2729.
- Barrs, V. & Beatty, J. (2012a). Feline Alimentary Lymphoma: 1. Classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14: 182-190.
- Barrs, V. & Beatty, J. (2012b). Feline Alimentary Lymphoma: 2. Further diagnostics, therapy and prognosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14: 191-201.
- Barrs, V., Beatty, J., Mccandlish, I., Kipar, A. (2002). Hypereosinophilic paraneoplastic syndrome in a cat with intestinal T cell lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice* (43): 401-405.
- Beatty, J., Callanan, J., Terry, A., Jarrett, O., Neil, J. (1998a). Molecular and Immunophenotypical Characterization of a Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Associated Lymphoma: a Direct Role for FIV in B-Lymphocyte Transformation? *J Virol* 72(1): 767-771.
- Beatty, J., Lawrence, C., Callanan, J., Grant, C., Gault, E., Neil, J., *et al.* (1998b). Feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a potential role for immune dysfunction in tumourigenesis. *Vet Immunol Immunopathol* 65(2-4): 309-322.
- Beatty, J., Terry, A., MacDonald, J., Gault, E., Cevario, S., O'Brien, S., *et al.* (2002). Feline Immunodeficiency Virus Integration in Lymphoma Identifies a Candidate Tumor Suppressor Gene on B-Cell Human Chromosome 15q15. *Cancer Res* 62: 7175-7180.
- Bertone, E., Snyder, L., Moore, A. (2002). Environmental Tobacco Smoke and Risk of Malignant Lymphoma in Pet Cats. *Am J Epidemiol* 156(3): 278-273.
- Bird, B., Burnside, P., Browne, P., Cahil, M., Connolly, E., Crotty, G., Daly, P., *et al.* (2010). Lymphoma Forum of Ireland: Guidelines on Diagnosis and Treatment of Malignant Lymphomas. (2nd Edition, 2010) *Ireland, Roche Products*.
- Blackwood, L., German, A., Stell, A., O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *Journal of Small Animal Practice* 45: 259-262.
- Bloom, F. & Meyer, L. (1945). Malignant Lymphoma (So-Called Leukemia) in Dogs. *Am J Pathol* 21(4), 683-715.

- Bolliger, A., Graham, P., Richard, V., Rosol, T., Nachreiner, R. & Refsal, K. (2002). Detection of parathyroid hormone-related protein in cats with humoral hypercalcemia of malignancy. *Vet Clin Pathol* 31(1): 3-8.
- Bound, N., Priestnall, S., Cariou, M. (2011). Lingual and renal lymphoma in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13: 272-275.
- Brenn, S., Couto, S., Craft, D., Leung, C., Bergman, P. (2008). Evaluation of P-glycoprotein expression in feline lymphoma and correlation with clinical outcome. *Veterinary and Comparative Oncology* 6(3): 201-211.
- Bridgeford, E., Marini, P., Feng, Y., Parry, N., Rickman, B. & Fox, J. (2008). Gastric Helicobacter species as a cause of feline gastric lymphoma: A viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol* 123(1-2): 106-113.
- Briscoe, K., Krockenberger, M., Beatty J., Crowley, A., Dennis, M., Canfield, P., Dhand, N., *et al.* (2011). Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. *J Comp Pathol* 145(2-3): 187-198.
- Brown, L., Everett, G., Gibson, R., Burmeister, L., Schuman, L. & Blair, A. (1992). Smoking and risk of non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Cancer Causes Control* 3(1): 49-55.
- Buracco, P., Guglielmino, R., Abate, O., Bocchini, V., Cornaglia, E., DeNicolat, *et al.* (1992). Large Granular Lymphoma in a FIV-positive and FeLV-negative Cat. *Journal of Small Animal Practice* 33: 279-284.
- Burkitt, J., Drobotz, K., Hess, R. (2001). Intestinal Intussusception in Twenty cats. *J Vet Intern Med* 15(3): 313.
- Burkitt, J., Drobotz, K., Saunders, H., Washabau, R. (2009). Signalment, history, and outcome of cats with gastrointestinal tract intussusception: 20 cases (1986–2000). *J Am Vet Med Assoc* 234(6): 771-776.
- Caciolo, P., Hayes, A., Patnaik, A., Nesbitt, G., Pack, F. (1983). A case of mycosis fungoides in a cat and literature review. *J Am Anim Hosp Assoc* 19(4): 505-512.
- Caciolo, P., Nesbitt, G., Patnaik, A., Hayes, A. (1984). Cutaneous lymphosarcoma in the cat: a report of nine cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 20(3): 491-496.
- Cadile, C., Kitchell, B., Biller, B., Hetler, E., Balkin, R. (2001). Telomerase activity as a marker for malignancy in feline tissues. *Am J Vet Res.* 62(10): 1578-1581.
- Callanan, J., McCandlish, I., O'Neil, B., Lawrence, C., Rigby, M., Pacitti, A., *et al.* (1992). Lymphosarcoma in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *Vet Rec* 130(14): 293-295.
- Callanan, J., Jones, B., Irvine, J., Willett, B., McCandlish, I., Jarrett, O. (1996). Histologic Classification and Immunophenotype of Lymphosarcomas in Cats with Naturally and Experimentally Acquired Feline Immunodeficiency Virus Infections. *Vet Pathol* 33(3): 264-272.
- Cario, E. (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 54(8): 1182-1193.
- Carioto, L., Kruth, S., Betts, D., King, W. (2001). Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma. *Am J Vet Res.* 62(9): 1442-1446.
- Carreras, J., Goldschmidt, M., Lamb, M., McLear, R., Drobotz, K. & Sørenmo, K. (2003). Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997-2000). *J Vet Intern Med* 17(3): 326-331.
- Carter, R., Valli, V., Lumsden, J. (1986). The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. *Can J Vet Res* 50(2): 154-164.

- Cesari, A., Bettini, G., Vezzali, E. (2009). Feline Intestinal T-Cell Lymphoma: Assessment of Morphologic and Kinetic Features in 30 Cases. *J Vet Diagn Invest* 21: 277-279.
- Chan, J., Chan, A., Cheuk, W., Wan, S., Lee, W., Lui, Y., *et al.* (2011). Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma: a distinct aggressive lymphoma with frequent $\gamma\delta$ T-cell receptor expression. *Am J Surg Pathol* 35(10): 1557-1569.
- Charney, S., Valli, V., Kitchell, B. (2002). Histopathological phenotypic and molecular assessment of feline infiltrative enteric disease. A pilot study. *Veterinary Cancer Society Mid-Year Conference*, Galend (IL).
- Chew, D., Schaer, M., Liu, S. (1975). Pseudohyperparathyroidism in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 11: 46-52.
- Chino, J., Fugino, Y., Kobayashi, T., Kariya, K., Goto-Koshino, Y., Ohno, K., *et al.* (2013). Cytomorphological and Immunological Classification of Feline Lymphomas: Clinicopathological Features of 76 Cases. *J Vet Med Sci.* 75(6):701-7.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M. (2007a). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology* 8(5): 463-470.
- Cobaleda, C., Jochum, W., Busslinger, M. (2007b). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449(7161): 473-477.
- Codina, J. (2002). Linfomas B y T: Biología, Clínica e Tratamiento, (2.^a Edición) Roche.
- Correa, S., Mauldin, G., Mauldin, G., Mooney, S. (2001). Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 37(2): 153-158.
- Cotter, S., Hardy, W., Essex, M. (1975). Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 166(5): 449-454.
- Court, E., Watson, A., Peaston, A. (1997). Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J* 75(6): 424-427.
- Dank, G., Lucroy, M., Griffey, S., Gandour-Edwards, R., Madewell, B. (2002). Bcl-2 and MIB-1 labeling indexes in cats with lymphoma. *J Vet Intern Med* 16(6): 720-725.
- Darbès, J., Majzoub, M., Breuer, W., Hermanns, W. (1998). Large Granular Lymphocyte Leukemia/Lymphoma in Six Cats. *Vet Pathol* 35(5): 370-379.
- Davenport, D., Leib, N., Roth, L. (1987). Progression of lymphocytic-plasmacytic enteritis to gastrointestinal lymphosarcoma in three cats. Proceedings of the Veterinary Cancer Society 7th Annual Conference.
- Davies, C. & Forrester, S. (1996). Pleural effusion in cats: 82 cases (1987 to 1995). *J Small Anim Pract* 37(5): 217-224.
- Day, M. (1995). Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. *J Comp Pathol* 112(1): 79-96.
- Day, M. (1997). Review of thymic pathology in 30 cats and 36 dogs. *J Small Anim Pract.* 38(9): 393-403.
- Day, M., Kyaw-Tanner, M., Silkstone, M., Lucke, V., Robinson, W. (1999). T-cell-rich B-cell lymphoma in the cat. *J Comp Pathol* 120(2): 155-167.
- De Stefani, E., Fierro, L., Barrios, E., Ronco, A. (1998). Tobacco, alcohol, diet and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a case-control study in Uruguay. *Leuk Res* 22(5): 445-452.

- DeBoer, D., Turrel, J., Moore, P. (1990). Mycosis fungoides in a dog: demonstration of T-cell specificity and response to radiotherapy. *J Am Anim Hosp Assoc* 26(6): 566-572.
- Diehl, L. & Hoover, E. (1992). Early and progressive helper T-cell dysfunction in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5(12): 1188-1194.
- Dorn, C., Taylor, D., Schneider, R. (1970). The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibl Haematol* 36: 403-415.
- Dunbar, K. (2011). Inflammatory Bowel Disease in Cats. *Veterinary Technician*: 1-6.
- Durham, A., Pillitteri, C., San Myint, M., Valli, V. (2012). Two Hundred Three Cases of Equine Lymphoma Classified According to the World Health Organization (WHO) Classification Criteria. *Vet Pathol* 50(1): 86-93.
- Dust, A., Norris, A., Valli, V. (1982). Cutaneous lymphosarcoma with IgG monoclonal gammopathy, serum hyperviscosity and hypercalcemia in a cat. *Can Vet J* 23(8): 235-239.
- Elmslie, R., Ogilvie, G., Gillette, E., Mcchesney-Gillette, S. (1991). Radiotherapy with and without Chemotherapy for Localized Lymphoma in 10 Cats. *Veterinary Radiology* 32(6): 277-280.
- Endo, Y., Cho, K., Nishigaki, K., Momoi, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., et al. (1997). Molecular characteristics of malignant lymphomas in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol* 57(3-4): 153-167.
- Endo, Y., Cho, K., Nishigaki, K., Momoi, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., et al. (1998). Clinicopathological and immunological characteristics of six cats with granular lymphocyte tumors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 21(1): 27-42.
- Evans, S., Bonczynski, J., Broussard, J., Han, E., Baer, K. (2006). Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *J Am Vet Med Assoc* 229: 1447-1450.
- Fan, T. (2003). Lymphoma Updates. *Vet Clin Small Anim* 33: 455-471.
- Fan, T., Kitchell, B., Dhaliwal, R., Jones, P., Hintermeister, J. & Paria, B. (2002). Hematological toxicity and therapeutic efficacy of lomustine in 20 tumor-bearing cats: critical assessment of a practical dosing regimen. *J Am Anim Hosp Assoc* 38(4): 357-363.
- Farinha, P. & Gascoyne, R. (2005). Helicobacter pylori and MALT lymphoma. *Gastroenterology* 128(6): 1579-1605.
- Ferreri, A., Zinzani, P., Govi, S., Pileri, S. (2011). Enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 79(1): 84-90.
- Fleming, E., McCaw, D., Smith, J., Buening, G., Johnson, C. (1991). Clinical, hematologic, and survival data from cats infected with feline immunodeficiency virus: 42 cases (1983-1988). *J Am Vet Med Assoc* 199(7): 913-916.
- Fondacaro, J., Richter, K., Carpenter, J. (1999). Feline gastrointestinal lymphoma: 67 cases. *Eur J Comp* 4(2): 69-74.
- Fondevila, D., Vilafranca, M., Pumarola, M. (1998). Primary Central Nervous System T-cell Lymphoma in a Cat. *Vet Pathol* 35(6): 550-553.
- Forrester, S., Fossum, T., Rogers, K. (1991). Diagnosis and treatment of chylothorax associated with lymphoblastic lymphosarcoma in four cats. *J Am Vet Med Assoc* 198(2): 291-294.
- Foster, A., Evans, E., Kerlin, R., Vail, D. (1997). Cutaneous T-cell lymphoma with Sézary syndrome in a dog. *Vet Clin Pathol* 26(4): 188-192.

- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., *et al.* (2002). Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. *Vet Pathol* 39(1): 92-109.
- Francis, D., Cotter, S., Hardy, W., Essex, M. (1979). Comparison of Virus-positive and Virus-negative Cases of Feline Leukemia and Lymphoma. *Cancer Res* 39: 3866-3870.
- Franks, P., Harvey, J., Mays, M., Senior, D., Bowen, D. & Hall, B. (1986). Feline large granular lymphoma. *Vet Pathol* 23(2): 200-202.
- Freedman, D., Tolbert, P., Coates, R., Brann, E., Kjeldsberg, C. (1998). Relation of cigarette smoking to non-Hodgkin's lymphoma among middle-aged men. *Am J Epidemiol* 148(9): 833-841.
- Fry, M., Vernau, W., Pesavento, P., Brömel, C., Moore, P. (2003). Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Vet Pathol* 40(5): 556-562.
- Fujino, Y., Liao, C., Zhao, Y., Pan, J., Mathes, L., Hayes, K., *et al.* (2009). Identification of a novel common proviral integration site, flit-1, in feline leukemia virus induced thymic lymphoma. *Virology* 386(1): 16-22.
- Funaba, M., Matsumoto, C., Matsuki, K., Gotoh, K., Kaneko, M., Iriki, T., *et al.* (2002). Comparison of corn gluten meal and meat meal as a protein source in dry foods formulated for cats. *Am J Vet Res.* 63(9): 1247-1251.
- Gabor, L., Malik, R., Canfield, P. (1998). Clinical and anatomical features of lymphosarcoma in 118 cats. *Aust Vet J* 76(11): 725-732.
- Gabor, L., Canfield, P., Malik, R. (1999). Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J* 77(7): 436-441.
- Gabor, L., Canfield, P., Malik, R. (2000). Haematological and biochemical findings in cats in Australia with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 78(7): 456-461.
- Gabor, L., Love, D., Malik, R., Canfield, P. (2001). Feline immunodeficiency virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79(8): 540-545.
- Gieger, T. (2011). Alimentary Lymphoma in Cats and Dogs. *Vet Clin Small Anim* 41: 419-432.
- Gilbert, S., Affolter, V., Gross, T., Moore, P., Ihrke, P. (2004). Clinical, morphological and immunohistochemical characterization of cutaneous lymphocytosis in 23 cats. *Vet Dermatol* 15(1): 3-12.
- Goitsuka, R., Ohno, K., Matsumoto, Y., Hayashi, N., Momoi, Y., Okamoto, Y., *et al.* (1993). Establishment and Characterization of a feline Large Granular Lymphoma Cell Line Expressing Interleukin 2 Receptor α -Chain. *J Vet Med Sci* 55(5): 863-865.
- Goto, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Endo, Y., Baba, K., Momoi, Y., *et al.* (2000). Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 61(12): 1609-1613.
- Green, P. & Cellier, C. (2007). Medical Progress: Celiac Disease. *New Engl J Med* 357: 1731-1743.
- Greenlee, P., Filippa, D., Quimby, F., Patnaik, A., Calvano, S., Matus, R., Kimmel, M., *et al.* (1990). Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66, (480-490).
- Gribar, S., Anand, R., Sodhi, C., Hackam, D. (2008). The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leuk Biol* 83(3): 493-498.

- Grooters, A., Biller, D., Ward, H., Miyabayashi, T., Couto, C. (1994). Ultrasonographic appearance of feline alimentary lymphoma. *Vet Radiol Ultrasound* 35(6): 468-472.
- Grover, S. (2005). Gastrointestinal Lymphoma in Cats. *Compendium*: 741-751.
- Gruffydd-Jones, T., Gaskell, C., Gibbs, C. (1979). Clinical and radiological features of anterior mediastinal lymphosarcoma in the cat: a review of 30 cases. *Vet Rec* 104(14): 304-307.
- Hadden, A., Cotter, S., Rand, W., Moore, A., Davis, R. & Morrissey, P. (2008). Efficacy and toxicosis of VELCAP-C treatment of lymphoma in cats. *J Vet Intern Med* 22(1): 153-157.
- Hansen, K., Khanna, C. (2004). Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *Eur J Cancer* 40(6), 858-880.
- Hanson, J., Papageorges, M., Girard, E., Menard, M., Hebert, P. (2001). Ultrasonographic appearance of splenic disease in 101 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 42(5): 441-445.
- Hardy, W. (1981). Hematopoietic Tumors of Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 17: 921-940.
- Hardy, W., McClelland, A., Zuckerman, E., Snyder, H., MacEwen, E., Francis, D., *et al.*, (1980). Development of Virus non-producer lymphosarcomas in pet cats exposed to FeLV. *Nature* 288(5786): 90-92.
- Harris, N., Jaffe, E., Stein, H., Banks, P., Chan, J., Cleary, M., *et al.* (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84(5): 1361-1392.
- Harris, N., Jaffe, E., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H., Vardiman, J., *et al.* (2000). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 36: 69-86.
- Hart, J., Shaker, E., Patnaik, A., Garvey, M. (1994). Lymphocytic-Plasmacytic enterocolitis in cats: 60 cases (1988-1990). *J Am Anim Hosp Assoc* 30: 505-514.
- Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 143: 190-201.
- Hartmann, K. (2012). Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses* 4(11): 2684-2710.
- Henderson, S., Bradley, K., Day, M., Tasker, S., Caney, S., Moore, H., *et al.* (2004). Investigation of nasal disease in the cat--a retrospective study of 77 cases. *J Feline Med Surg* 6(4): 245-257.
- Henrich, M., Hecht, W., Weiss, A., Reinacher, M. (2009). A new subgroup of immunoglobulin heavy chain variable region genes for the assessment of clonality in feline B-cell lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol* 130(1-2): 59-69.
- Henry, C., Turnquist, S., Smith, A., Graham, J., Thamm, D., O'Brien, M., *et al.* (1999). Primary renal tumours in cats: 19 cases (1992-1998). *J Feline Med Surg* 1(3): 165-170.
- Herrinton, L. & Friedman, G. (1998). Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin's lymphoma subtypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7(1): 25-28.
- Hittmair, K., Krebitz-Gressl, E., Kubber-Heiss A., Mostl, K. (2001). Feline Alimentary Lymphosarcoma: radiological, ultrasonographical, histological and virological findings. *Eur J Compan Anim Practi* 11(2): 119-128.
- Honor, D., De Nicola, D., Turek, J., Render, J., Serra, D. (1986). A neoplasm of globule leukocytes in a cat. *Vet Pathol* 23(3): 287-292.

- Howlander, N., Noone, A., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Altekruse, S. *et al.* (2012). EER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). acessido em 15 Janeiro 2013 em, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/lymph.html#incidence-mortality>.
- Huang, S., Kozak, P., Kim, J., Habineza-Ndikuyeze, G., Meade, C., Gaurnier-Hausser, A., *et al.* (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology* 427(2): 107-117.
- Hultin, L., Hausner, M., Hultin, P., Giorgi, J. (1993). CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry* 14: 196-204.
- Hutson, C., Rideout, B., Pedersen N. (1991). Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of southern California. *J Am Vet Med Assoc* 199 (10): 1357-1362.
- Imam, A., Stathopoulos, E., Holland, S., Epstein, A., Taylor, C. (1990). Characterization of a Cell Surface Molecule Expressed on B-Lymphocytes and Hodgkin's Cells. *Cancer Res* 50: 1650-1657.
- Jackson, M., Haines, D., Meric, S., Misra, V. (1993). Feline Leukemia Virus Detection by Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tumor Tissue from Cats with Lymphosarcoma. *Can J Vet Res* 57: 269-276.
- Jackson, M., Wood, S., Misra, V., Haines, D. (1996). Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res* 60(3): 199-204.
- Jeglum, K., Whereat, A., Young, K. (1987). Chemotherapy of lymphoma in 75 cats. *J Am Vet Med Assoc* 190(2): 174-178.
- Jergens, A. (2012). Feline Idiopathic Inflammatory Bowel Disease : What we know and what remains to be unraveled. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14: 445-458.
- Jubala, C., Wojcieszyn, J., Valli, V., Getzy, D., Fosmire, S., Coffey, D., *et al.* (2005). CD20 Expression in Normal Canine B Cells and in Canine non-Hodgkin Lymphoma. *Vet Pathol* 42: 468-476.
- Kariya, K., Konno, A., Ishida, T. (1997). Perforin-like immunoreactivity in four cases of lymphoma of large granular lymphocytes in the cat. *Vet Pathol* 34(2): 156-159.
- Keller, E., MacEwen, E., Rosenthal, R., Helfand, S., Fox, L. (1993). Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 7(5): 289-295.
- Keller, S., Keller, B., Grest, P., Börger, C., Guscetti, F. (2007). Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 19: 652-659.
- Kelley, L., Mahaffey, E. (1998). Equine malignant lymphomas: morphologic and immunohistochemical classification. *Vet Pathol* 35(4): 241-252.
- Kiselow, M., Rassnick, K., McDonough, S., Goldstein, R., Simpson, K., Weinkle, T., *et al.* (2008). Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995–2005). *J Am Vet Med Assoc* 232(3): 405-410.
- Kiupel, M., Smedley, R., Pfent, C., Xie, Y., Xue, Y., Wise, A., *et al.*, (2011). Diagnostic Algorithm to Differentiate Lymphoma From Inflammation in Feline Small Intestinal Biopsy Samples. *Vet Pathol* 48(1): 212-222.

- Krecic, M. & Black, S. (2000). Epitheliotropic T-cell gastrointestinal tract lymphosarcoma with metastases to lung and skeletal muscle in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 216(4): 524-529.
- Krick, E., Little, L., Patel, R., Shofer, F., Sorenmo, K., Clifford, C., *et al.* (2008). Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of feline large granular lymphocyte lymphoma (1996– 2004). *Veterinary and Comparative Oncology* 6(2): 102-110.
- Krick, E., Moore, R., Cohen, R., Sorenmo, K. (2011). Prognostic significance of weight changes during treatment of feline lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13: 976-983.
- Kristal, O., Lana, S., Ogilvie, G., Rand, W., Cotter, S. & Moore, A. (2001). Single agent chemotherapy with doxorubicin for feline lymphoma: a retrospective study of 19 cases (1994-1997). *J Vet Intern Med* 15(2): 125-130.
- Laflamme, D. & Long, G. (2004). Evaluation of two diets in the nutritional management of cats with naturally occurring chronic diarrhea. *Vet Ther* 5(1): 43-51.
- Landis, J. & Koch, G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33(1): 159-174.
- Lane, S., Kornegay, J., Duncan, J., Oliver, J. (1994). Feline spinal lymphosarcoma: a retrospective evaluation of 23 cats. *J Vet Intern Med* 8(2): 99-104.
- Lauring, A., Cheng, H., Eiden, M., Overbaugh, J. (2002). Genetic and biochemical analyses of receptor and cofactor determinants for T-cell-tropic feline leukemia virus infection. *J Virol* 76(16): 8069-8078.
- LeBlanc, A., Cox, S., Kirk, C., Newman, S., Bartges, J. & Legendre, A. (2007). Effects of L-asparaginase on plasma amino acid profiles and tumor burden in cats with lymphoma. *J Vet Intern Med* 21(4): 760-763.
- Levy, J. (2000). CVT update: feline immunodeficiency virus. In.: Bonagura, J. (Ed.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice*. (13th Edition, pp. 284–288) WB Saunders. Philadelphia.
- Linnet, M., McLaughlin, J., Hsing, A., Wacholder, S., Co Chien, H., Schuman, L., *et al.* (1992). Is cigarette smoking a risk factor for non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma? Results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study. *Leuk Res* 16(6-7): 621-624.
- Lingard, A., Briscoe, K., Beatty, J., Moore, A., Crowley, A., Krockenberger, M., *et al.* (2009). Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11: 692-700.
- Little, L., Patel, R., Goldschmidt, M. (2007). Nasal and Nasopharyngeal Lymphoma in Cats: 50 Cases (1989-2005). *Vet Pathol* 44(6): 885-892.
- Louwerens, M., London, C., Pedersen, N., Lyons, L. (2005). Feline Lymphoma in the Post-Feline Leukemia Virus Era. *J Vet Intern Med* 19: 329-335.
- Lukes, R. & Collins, R. (1974). Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 34(4): 1488-1503.
- Lurie, D., Lucroy, M., Griffey, S., Simonson, E., Madewell, B. (2004). T-cell-derived malignant lymphoma in the boxer breed. *Veterinary and Comparative Oncology* 2(3): 171-175.
- Madewell, B., Griffey, S., Walls, J., Gandour-Edwards, R. (2001). Reduced Expression of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 in Feline Lymphoma. *Vet Pathol* 38(6): 698-702.

- Madewell, B., Gieger, T., Pesavento, P., Kent, M. (2004). Vaccine site-associated sarcoma and malignant lymphoma in cats: a report of six cases (1997-2002). *J Am Anim Hosp Assoc* 40(1): 47-50.
- Mahony, O., Moore, A., Cotter, S., Engler, S., Brown, D., Penninck, D. (1995). Alimentary lymphoma in cats: 28 cases (1988-1993). *J Am Vet Med Assoc* 207(12): 1593-1598.
- Malik, R., Gabor, L., Foster, S., McCorkell, B., Canfield, P. (2001). Therapy for Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79(12): 808-817.
- Marioni-Henry, K., Vite, C., Newton, A., Winkle, V. (2004). Prevalence of diseases of the spinal cord of cats. *J Vet Intern Med* 18(6): 851-858.
- Marioni-Henry, K., Winkle, V., Smith, S., Vite, C. (2008). Tumors affecting the spinal cord of cats: 85 cases (1980-2005). *J Am Vet Med Assoc* 232(2): 237-243.
- Marioni-Henry, K. (2010). Feline spinal cord diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40(5): 1011-1028.
- Markwell, P., Buffington C., Smith, B. (1998). The effect of diet on lower urinary tract diseases in cats. *J Nutr* 128(12 Supplement): 2735S-2757S.
- Martelli, M., Ferreri, A., Agostinelli, C., Rocco, A., Pfreundschuh, M., Pileri, S. (2013). Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*: 1-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.12.009>.
- Mayr, B., Winkler, G., Schaffner, G., Reifinger, M., Brem, G. (2002). N-ras mutation in a feline lymphoma. Low frequency of N-ras mutations in a series of feline, canine and bovine lymphomas. *Vet J* 163(3): 326-328.
- Mayr, B., Holzheu, M., Schaffner, G., Reifinger, M. (2003). N-ras mutation in a canine lymphoma: short communication. *Acta Vet Hung* 51(1): 91-94.
- McEntee, M., Horton, S., Blue, J., Meuten, D. (1993). Granulated round cell tumor of cats. *Vet Pathol* 30(2): 195-203.
- McKeever, P., Grindem, C., Stevens, J., Osborne, C. (1982). Canine cutaneous lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 180(5): 531-536.
- McMillan, F. (1985). Hypercalcemia associated with lymphoid neoplasia in two cats. *Feline Pract* 15: 31-34.
- Meinke, J., Hobbie, W., Hardy, W. (1972). Lymphoreticular malignancies in the cat: clinical findings. *J Am Vet Med Assoc* 160(8): 1093-1098.
- Miligi, L., Seniori, C., Crosignani, P., Fontana, A., Masala, G., Nanni, O., et al. (1999). Occupational, environmental, and life-style factors associated with the risk of hematolymphopoietic malignancies in women. *Am J Ind Med* 36(1): 60-69.
- Milman, G., Smith, K., Erles, K. (2011). Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Vet Microbiol* 150(1-2): 15-20.
- Milner, R., Peyton, J., Cooke, K., Fox, L., Gallagher, A., Gordon, P., et al. (2005). Response rates and survival times for cats with lymphoma treated with the University of Wisconsin-Madison chemotherapy protocol: 38 cases (1996-2003). *J Am Vet Med Assoc* 227: 1118-1122.
- Modiano, J., Breen, M., Burnett, R., Parker, H., Inusah, S., Thomas, R., et al. (2005). Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res* 65(13): 5654-5661.
- Mooney, S., Hayes, A., Matus, R., MacEwen, E. (1987). Renal lymphoma in cats: 28 cases (1977-1984). *J Am Vet Med Assoc* 191(11): 1473-1477.
- Mooney, S., Hayes, A., MacEwen, E., Matus, R., Geary, A. & Shurgot, B. (1989). Treatment and prognostic factors in lymphoma in cats: 103 cases (1977-1981). *J Am Vet Med Assoc* 194(5): 696-702.

- Moore, F., Emerson, W., Cotter, S., DeLellis, R. (1986). Distinctive peripheral lymph node hyperplasia of young cats. *Vet Pathol* 23(4): 386-391.
- Moore, A., Cotter, S., Frimberger, A., Wood, C., Rand, W. & L'Heureux, D. (1996). A comparison of doxorubicin and COP for maintenance of remission in cats with lymphoma. *J Vet Intern Med* 10(6): 372-375.
- Moore, P., Woo, J., Vernau, W., Kosten, S., Graham, P. (2005). Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 106(3-4): 167-178.
- Moore, P., Rodriguez-Bertos, A., Kass, P. (2011). Feline Gastrointestinal Lymphoma: Mucosal Architecture, Immunophenotype, and Molecular Clonality. *Vet Pathol* 49(4): 658-668.
- Moore, A. (2013). Extranodal Lymphoma in the Cat : Prognostic factors and treatment options. *J Feline Med Surg* 15: 379-390.
- Morris, J. & Dobson, J. (2001). Haematopoietic System. In: Morris, J. & Dobson, J., *Small Animal Oncology* (1st Edition, pp. 228-251). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Morrison, S. & Neuberger, M. (2001). Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. In: Janeway, C., Traver, P., Walport, M., Shlomchik, M, (Eds). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. (5th Edition, pp. 92-184). New York:, Garland Publishing.
- Morton, L., Hartge, P., Holford, T., Holly, E., Chiu, B., Vineis, P., *et al.* (2005). Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (interlymph). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(4): 925-933.
- Mukaratirwa, S., Linde-Sipman, V., J., Gruys, E. (2001). Feline nasal and paranasal sinus tumours: clinicopathological study, histomorphological description and diagnostic immunohistochemistry of 123 cases. *J Feline Med Surg* 3(4): 235-245.
- Nagata, K., Lamb, M., Goldschmidt, M., Duda, L., Walton, R. (2012). The usefulness of immunohistochemistry to differentiate between nasal carcinoma and lymphoma in cats: 140 cases (1986–2000). *Veterinary and Comparative Oncology*: 1-6.
- Nasir, L. & Argyle, D. (1999). Mutational analysis of the tumour suppressor gene p53 in lymphosarcoma in two bull mastiffs. *Vet Rec* 145(1): 23-24.
- Nasir, L., Devlin, P., Mckevitt, T., Rutteman, G., Argyle, D. (2001). Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia* 3(4): 351-359.
- National Cancer Institute. (1982). National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 49(10): 2112-2135.
- Neil, J., Hughes, D., McFarlane, R., Wilkie, N., Onions, D., Lees, G., *et al.* (1984). Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. *Nature* 308(5962): 814-820.
- Nielsen, S. & Holzworth, J. (1953). Visceral lymphosarcoma of the cat. *J Am Vet Med Assoc* 122(912): 189-197.
- North, S. & Banks, T. (2009). Tumours of the haemolymphatic system. In: North, S. & Banks T. (Eds), *Introduction to Small Animal Oncology* (1st Edition, pp. 225 - 236) Saunders Elsevier.

- Parker, A., Cerhan, J., Dick, F., Kemp, J., Habermann, T., Wallace, R., *et al.* (2000). Smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in a cohort of older women. *Leuk Lymphoma* 37(3-4): 341-349.
- Patterson-Kane, J., Kugler, B., Francis, K. (2004). The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Path* 130(2-3): 220-222.
- Peaston, A. & Maddison, J. (1999). Efficacy of doxorubicin as an induction agent for cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 77(7): 442-444.
- Penninck, D., Moore, A., Tidwell, A., Matz, M., Freden, G. (1994). Ultrasonography of alimentary lymphosarcoma in the cat. *Vet Radiol Ultrasound* 35(4): 299-304.
- Pohlman, L., Higginbotham, M., Welles, E., Johnson, C. (2009). Imuunophenotypic and Histologic Classification of 50 Cases of Feline Gastrointestinal Lymphoma. *Vet Pathol* 46(2): 259-268.
- Poli, A., Abramo, F., Baldinotti, F., Pistello, M., Da Prato, L. & Bendinelli, M. (1994). Malignant lymphoma associated with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *J Comp Path* 110(4): 319-328.
- Polton, G. (2010). Lymphoma basics in pet practice. *Irish Veterinary Journal* 61(8): 539-542.
- Ragaini, L., Aste, G., Cavicchioli, L., Boari, A. (2003). Inflammatory bowel disease mimicking alimentary lymphosarcoma in a cat. *Vet Res Commun* 27(Suppl 1): 791-793.
- Ramos-Vara, J. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42: 405-426.
- Rassnick, K., Mauldin, G., Moroff, S., Mauldin, G., McEntee, M. & Mooney, S. (1999). Prognostic value of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in feline intestinal lymphoma. *J Vet Intern Med* 13(3): 187-190.
- Rassnick, K., Gieger, T., Williams, L., Ruslander, D., Northrup, N., Kristal, O., *et al.* (2001). Phase I evaluation of CCNU (lomustine) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 15(3): 196-199.
- Renwick, M., Argyle, D., Long, S., Nixon, C., Gault, E. & Nasir, L. (2006). Telomerase activity and telomerase reverse transcriptase catalytic subunit expression in canine lymphoma: correlation with Ki67 immunoreactivity. *Veterinary and Comparative Oncology* 4(3): 141-150.
- Richter, K. (2003). Feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Clin Small Anim* 33: 1083-1098.
- Rissetto, K., Villamil, J., Selting, K., Tyler, J., Henry, C. (2011). Recent Trends in Feline Intestinal Neoplasia: an Epidemiologic Study of 1,129 Cases in the Veterinary Medical Database from 1964 to 2004. *J Am Anim Hosp Assoc* 47: 28-36.
- Roccabianca, P., Woo, J., Moore, P. (2000). Characterization of the diffuse mucosal associated lymphoid tissue of feline small intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 75(1-2): 27-42.
- Roccabianca, P., Vernau, W., Caniatti, M., Moore, P. (2006). Feline Large Granular Lymphocyte (LGL) Lymphoma with Secondary Leukemia: Primary Intestinal Origin with Predominance of a CD3/CD8 aa Phenotype. *Vet Pathol* 43(1): 15-28.
- Rohn, J., Linenberger, M., Hoover, E., Overbaugh, J. (1994). Evolution of feline leukemia virus variant genomes with insertions, deletions, and defective envelope genes in infected cats with tumors. *J Virol* 68(4): 2458-2467.

- Rojko, J., Kociba, G., Abkowitz, J., Hamilton, K., Hardy, W., Ihle, J., *et al.* (1989). Feline Lymphomas: Immunological and Cytochemical Characterization. *Cancer Res* 49: 345-351.
- Rosenberg, M., Hohenhaus, A., Matus, R. (1991a). Monoclonal gammopathy and lymphoma in a cat infected with feline immunodeficiency virus. *J Am Anim Hosp Assoc* 27(3).
- Rosenberg, M., Matus, R., Patnaik, A. (1991b). Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia. *J Vet Intern Med* 5(5): 268-271.
- Ruiz, F., Alessi, A., Chagas, C., Pinto, G., Vassallo, J. (2005). Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J Bras Patol Med Lab* 41(4): 263-270.
- Ruslander, D., Gebhard, D., Tompkins, M., Grindem, C., Page, R. (1997). Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 11(2): 169-172.
- Sartor, R. (2006). Microbial and dietary factors in the pathogenesis of chronic, immune-mediated intestinal inflammation. *Adv Exp Med Biol* 579(35-54).
- Savary, K., Price, G., Vaden, S. (2000). Hypercalcemia in cats: a retrospective study of 71 cases (1991-1997). *J Vet Intern Med* 14(2): 184-189.
- Schick, R., Murphy, G., Goldschmidt, M. (1993). Cutaneous lymphosarcoma and leukemia in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 203(8): 1155-1158.
- Schmiedt, C., Grimes, J., Holzman, G., McAnulty, J. (2009). Incidence and risk factors for development of malignant neoplasia after feline renal transplantation and cyclosporine-based immunosuppression. *Vet Comp Oncol* 7(1): 45-53.
- Seo, K., Choi, U-S., Bae, B-K., Park, M-S., Hwang, C-H., Kim, D-Y., *et al.* (2006). Mediastinal lymphoma in a young Turkish Angora cat. *J Vet Sci* 7(2): 199-201.
- Setoguchi, A., Sakai, T., Okuda, M., Minehata, K., Yazawa, M., Ishizaka, T., *et al.* (2001). Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *Am J Vet Res*. 62(3): 433-439.
- Sheets, R., Pandey, R., Jen, W., Roy-Burman, P. (1993). Recombinant feline leukemia virus genes detected in naturally occurring feline lymphosarcomas. *J Virol* 67(6): 3118-3125.
- Shelton, G., Linenberger, M., Grant, C., Abkowitz, J. (1990a). Hematologic manifestations of feline immunodeficiency virus infection. *Blood* 76(6): 1104-1109.
- Shelton, G., Grant, C., Cotter, S., Gardner, M., Hardy, W., DiGiacomo, R. (1990b). Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study (1968-1988). *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(6): 623-630.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2012). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 62: 10-29.
- Simon, D., Eberle, N., Laacke-Singer, L., Nolte, I. (2008). Combination Chemotherapy in Feline Lymphoma: Treatment Outcome, Tolerability, and Duration in 23 Cats. *J Vet Intern Med* 22: 394-400.
- Simpson, K., Fyfe, J., Cornetta, A., Sachs, A., Strauss-Ayali, D., Lamb, S., *et al.* (2001). Subnormal concentrations of serum cobalamin (vitamin B12) in cats with gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med* 15(1): 26-32.
- Simpson, C., Mansfield, C., Milne, M., Hodge, P. (2011). Central diabetes insipidus in a cat with central nervous system B cell lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13: 787-792.

- Slawiński, M., Mauldin, G., Mauldin, G., Patnaik, A. (1997). Malignant colonic neoplasia in cats: 46 cases (1990-1996). *J Am Vet Med Assoc* 211(7): 878-881.
- Sokołowska, J., Cywińska, A., Malicka, E. (2005). p53 expression in canine lymphoma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52(4): 172-175.
- Spodnick, G., Berg, J., Moore, F., Cotter, S. (1992). Spinal lymphoma in cats: 21 cases (1976-1989). *J Am Vet Med Assoc* 200(3): 373-376.
- Stagnaro, E., Ramazzotti, V., Crosignani, P., Fontana, A., Masala, G., Miligi, L., *et al.* (2001). Smoking and hematolymphopoietic malignancies. *Cancer Causes Control* 12(4): 325-334.
- Steele, K., Saunders, G., Coleman, G. (1997). T-cell-rich B-cell Lymphoma in a Cat. *Vet Pathol* 34(1): 47-49.
- Stein, T., Pellin, M., Steinberg, H., Chun, R. (2010). Treatment of Feline Gastrointestinal Small-Cell Lymphoma With Chlorambucil and Glucocorticoids. *J Am Anim Hosp Assoc* 46(6): 413-417.
- Stützer, B., Simon, K., Lutz, H., Majzoub, M., Hermanns, W., Hirschberger, J., *et al.* (2011). Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13: 81-87.
- Sueiro, F., Alessi, A., Vassallo, J. (2004). Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. *J Comp Pathol* 131(2-3): 207-213.
- Suess, R., Martin, R., Shell, L., Carrig, C., Moon, M. (1990). Vertebral lymphosarcoma in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 197(1): 101-103.
- Swanson, C., Smedley, R., Saavedra, P., Kiupel, M., Kitchell, B. (2012). Expression of the Bcl-2 apoptotic marker in cats diagnosed with inflammatory bowel disease and gastrointestinal lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 4: 741-745.
- Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., *et al.* (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. France, International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Takahashi, R., Goto, N., Ishii, H., Ogiso, Y., Saegusa, J. (1974). Pathological observations of natural cases of feline lymphosarcomatosis. *Nihon Juigaku Zasshi* 36(2): 163-173.
- Tams, T. (1993). Feline inflammatory bowel disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 23(3): 569-586.
- Taylor, S., Goodfellow, M., Browne, W., Walding, B., Murphy, S., Tzannes, S., *et al.* (2009). Feline extranodal lymphoma: response to chemotherapy and survival in 110 cats. *Journal of Small Animal Practice* 50: 584-592.
- Terry, A., Callanan, J., Fulton, R., Jarrett, O., Neil, J. (1995). Molecular analysis of tumours from feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: an indirect role for FIV? *Int J Cancer* 61(2): 227-232.
- Teske, E., van Heerde, P., Rutteman, G., Kurzman, I., Moore, P. & MacEwen, E. (1994a). Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 205(12): 1722-1728.
- Teske, E., Wisman, P., Moore, P., van Heerde, P., (1994b). Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp Hematol* 22(12): 1179-1187.

- Teske, E., van Straten, G., van Noort, R., Rutteman, G. (2002). Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisolone (COP) in cats with malignant lymphoma: new results with an old protocol. *J Vet Intern Med* 16(2): 179-186.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. (1997). A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89(11): 3909-3918.
- Thomas, R., Smith, K., Gould, R., Gower, S., Binns, M. & Breen, M., (2001). Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. *Chromosome Research* 9(8): 649-657.
- Thomas, R., Fiegler, H., Ostrander, E., Galibert, F., Carter, N. & Breen, M. (2003a). A canine cancer-gene microarray for CGH analysis of tumors. *Cytogenet Genome Res* 102(1-4): 254-260.
- Thomas, R., Smith, K., Ostrander, E., Galibert, F., Breen, M. (2003b). Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *Br J Cancer* 89(8): 1530-1537.
- Thrall, M., Macy, D., Snyder, S., Hall, R. (1984). Cutaneous lymphosarcoma and leukemia in a dog resembling Sézary syndrome in man. *Vet Pathol* 21(2): 182-186.
- Tobey, J., Houston, D., Breur, G., Jackson, M., Stubbington, D. (1994). Cutaneous T-cell lymphoma in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 204(4): 606-609.
- Troxel, M., Vite, C., Winkle, V., Newton, A., Tiches, D., Dayrell-Hart, B., *et al.* (2003). Feline intracranial neoplasia: retrospective review of 160 cases (1985-2001). *J Vet Intern Med* 17(6): 850-859.
- Tsatsanis, C., Fulton, R., Nishigaki, K., Tsujimoto, H., Levy, L., Terry, A., *et al.* (1994). Genetic Determinants of Feline Leukemia Virus-Induced Lymphoid Tumors: Patterns of Proviral Insertion and Gene Rearrangement. *J Virol* 68(12): 8296-8303.
- Twomey, L. & Alleman, A. (2005). Cytodiagnosis of Feline Lymphoma. *Compendium*: 17-32.
- Tzannes, S., Hammond, M., Murphy, S., Sparkes, A., Blackwood, L. (2008). Owners 'perception of their cats' quality of life during COP chemotherapy for lymphoma. *J Feline Med Surg* 10(1): 73-81.
- Vail, D., Kisseberth, W., Obradovich, J., Moore, F., London, C., MacEwen, E., *et al.* (1996). Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 24(7): 807-815.
- Vail, D., Moore, A., Ogilvie, G., Volk, L. (1998). Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med* 12(5): 349-354.
- Vail, D. & Young, M. (2007). Hematopoietic Tumors. In.: Withrow, S. & Vail, M. (Eds), *Small Animal Clinical Oncology*. (4th Edition, pp. 699-756). United States, Saunders Elsevier.
- Vail, D. (2013). Feline Lymphoma and Leukemia. In.: Withrow, S., Vail, M., Page, R. (Eds), *Small Animal Clinical Oncology*. (5th Edition, pp. 638-653). United States. Saunders.

- Valli, V., McSherry, B., Dunham, B., Jacobs, R., Lumsden, J. (1981). Histocytology of lymphoid tumors in the dog, cat and cow. *Vet Pathol* 18(4): 494-512.
- Valli, V., Jacobs, R., Norris, A., Couto, C., Morrison, W., McCaw, D., Cotter, S., *et al.* (2000). The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest* 12: 295-306.
- Valli, V., Jacobs, R., Parodi, A., Vernau, W., Moore, P. (2002). Tumors of the Lymphoid System. In: Valli, V., Jacobs, R., Parodi, A., Vernau, W., Moore, P. (Eds.), *Histological Classification of hematopoietic tumors of domestic animals*, (1st Edition, pp.). Armed Forces Institute of Pathology and the World Health Organization.
- Valli, V. (2007). The Evolution of Classification Systems for Hematopoietic Neoplasms. In: Valli, V. (Ed.), *Veterinary Comparative Hematopathology* (1st Edition, pp. 3-8). Oxford, Blackwell Publishing.
- Valli, V., Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., *et al.* (2011). Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol* 48(1): 198-211.
- Valli, V., Kass, P., Myint, M., Scott, F. (2013). Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Vet Pathol* 00(0): 1-11.
- .Veldhoen, N., Stewart, J., Brown, R., Milner, J. (1998). Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene* 16(2): 249-255.
- Vernau, W., Valli, V., Dukes, T., Jacobs, R., Shoukri, M., Heeney, J. (1992). Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute Working Formulation for human non-Hodgkin's lymphomas. *Vet Pathol* 29(3): 183-195.
- Vezzali, E., Parodi, A., Marcato, P., Bettini, G. (2009). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology* 8(1): 38-49.
- Villamil, J., Henry, C., Hahn, A., Bryan, J., Tyler, J. & Caldwell, C. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol* 2009(1): 1-7.
- Walton, R. & Hendrick, M. (2001). Feline Hodgkin's-like Lymphoma: 20 Cases (1992-1999). *Vet Pathol* 38(5): 504-511.
- Waly, N., Gruffydd-Jones, T., Stokes, C., Day, M. (2001). The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *J Comp Pathol* 124(2-3): 172-182.
- Waly, N., Gruffydd-Jones, T., Stokes, C., Day, M. (2005). Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *J Comp Pathol* 133(4): 253-260.
- Wang, J., Kyaw-Tanner, M., Lee, C., Robinson, W. (2001). Characterisation of lymphosarcomas in Australian cats using polymerase chain reaction and immunohistochemical examination. *Aust Vet J* 79(1): 41-46.
- Washabau, R., Day, M., Willard, M., Hall, E., Jergens, A., Mansell, J., *et al.*; WSAVA International Gastrointestinal Standardization Group., (2010). Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J Vet Intern Med* 24(1): 10-26.
- Weiss, A., Klopfleisch, R., Gruber, A. (2010). Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12: 929-935.

- Weiss, A., Klopfleisch, R., Gruber, A. (2011). T-cell receptor γ chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol* 144(2-3): 123-134.
- Wellman, M., Hammer, A., DiBartola, S., Carothers, M., Kociba, G. & Rojko, J. (1992). Lymphoma involving large granular lymphocytes in cats: 11 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc* 201(8): 1265-1269.
- Werner, J., Woo, J., Vernau, W., Graham, P., Grahn, R., Lyons, L., *et al.* (2005). Characterization of Feline Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for the Molecular Diagnosis of B-cell Neoplasia. *Vet Pathol* 42: 596-607.
- Willard, M., Mansell, J., Fosgate, G., Gualtieri, M., Olivero, D., Lecoindre, P., *et al.* (2008). Effect of sample quality on the sensitivity of endoscopic biopsy for detecting gastric and duodenal lesions in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 22(5): 1084-1089.
- Willmann, M., Müllauer, L., Arespachoga, A., Reifinger, M., Mosberger, I. & Thalhammer, J. (2008). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Vet Immunol Immunopathol*: 1-7.
- Wilson, H. (2008). Feline Alimentary Lymphoma: Demystifying the Enigma. *Topics in Companion Animal Medicine* 23(4): 177-184.
- Wooldridge, J., Gregory, C., Mathews, K., Aronson, L., Kyles, A. (2002). The prevalence of malignant neoplasia in feline renal-transplant recipients. *Vet Surg* 91(1): 94-97.
- Yazawa, M., Okuda, M., Kanaya, N., Hong, S., Takahashi, T., Ohashi, E., *et al.* (2003). Molecular cloning of the canine telomerase reverse transcriptase gene and its expression in neoplastic and non-neoplastic cells. *Am J Vet Res*. 64(11): 1395-1400.
- Yazawa, M., Okuda, M., Uyama, R., Nakagawa, T., Kanaya, N., Nishimura, R., *et al.* (2003). Molecular cloning of the feline telomerase reverse transcriptase gene and its expression in cell lines and normal tissues. *J Vet Med Sci* 65(5): 573-577.
- Yoon, J., Feeney, D., Cronk, D., Anderson, K., Ziegler, L. (2004). Computed tomographic evaluation of canine and feline mediastinal masses in 14 patients. *Vet Radiol Ultrasound* 45(6): 542-546.
- Zavlaris, M., Angelopoulou, K., Vlemmas, I., Papaioannou, N. (2009). Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression in canine mammary tissues: a specific marker for malignancy? *Anticancer Res* 29(1): 319-325.
- Zelenetz, A., Abramson, J., Advani, R., Andreadis, C., Bartlett, N., Bellam, N., Byrd, J. *et al.* (2011). Non-Hodgkin's Lymphomas. *J Natl Compr Canc Netw* 9(5): 484-560.
- Zwahlen, C., Lucroy, M., Kraegel, S., Madewell, B. (1998). Results of chemotherapy for cats with alimentary malignant lymphoma: 21 cases (1993-1997). *J Am Vet Med Assoc* 213(8): 1144-1149.
- Zwingenberger, A., Marks, S., Baker, T., Moore, P. (2010). Ultrasonographic Evaluation of the Muscularis Propria in Cats with Diffuse Small Intestinal Lymphoma or Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med* 24: 289-292.

Apêndices

Apêndice I. Resumo das principais características das diferentes entidades de linfoma GI do gato.

Comparação das características clínicas mais relevantes dos diferentes subtipos de linfoma GI em gatos			
	Linfoma GI de Intermédio/Alto Grau	Linfoma GI Baixo Grau	Linfoma de Células Granulares Grandes
Idade Média ao Diagnóstico	12 Anos	13 Anos	10 Anos
Estado Retroviral	FeLV negativo >70%	FeLV negativo >90%	FeLV negativo >90%
Sinais Clínicos	Perda de peso brusca, anorexia, vômito, diarreia, icterícia.	Perda de peso gradual, vômito, diarreia, perda de apetite.	Perda de peso brusca, anorexia, vômito, diarreia, icterícia.
Duração dos Sinais Clínicos	Tipicamente agudo (dias a semanas).	Tipicamente prolongado (semanas a meses).	Tipicamente agudo (dias a semanas).
Achados ao Exame Físico (Palpação abdominal)	Massas palpáveis focais são comuns; Lesões extraintestinais podem ser palpáveis: Hepatomegália; gânglios mesentéricos; massas no rim e/ou baço. Icterícia.	Pode estar normal; Ansas intestinais espessadas (difuso); massas palpáveis são incomuns (gânglios mesentéricos aumentados ou massa intestinal em 20 a 30% dos casos).	Massas palpáveis focais são comuns; Lesões extraintestinais podem ser palpáveis: Hepatomegália; gânglios mesentéricos; massas no rim e/ou baço. Icterícia.
Diagnóstico	Citologia Aspirativa das lesões detetadas ao exame físico e/ou ecografia abdominal: gânglios mesentéricos; fígado; baço; rins. A citologia é habitualmente diagnóstica.	Descartar causas não GI de perda de peso; Endoscopia versus biópsia cirúrgica de toda a espessura da parede; Biópsia é necessária para o diagnóstico definitivo.	Citologia Aspirativa das lesões detetadas ao exame físico e/ou ecografia abdominal: gânglios mesentéricos; fígado; baço; rins. A citologia é habitualmente diagnóstica.
Imunofenótipo	Linfoma B ou T	>90% são Linfoma T	>90% são Linfoma T
Problemas no diagnóstico e terapêutica	Lipidose Hepática e Pancreatite podem ser doenças concomitantes.	São frequentes falsos negativos aquando da citologia aspirativa dos gânglios mesentéricos reactivos. A histopatologia para diferenciar IBD de LL pode ser difícil.	Lipidose Hepática e Pancreatite podem ser doenças concomitantes.
Intervenção cirúrgica	Cirurgia terapêutica em caso de obstrução pela lesão.	Útil para a obtenção de amostras para o diagnóstico.	Cirurgia terapêutica em caso de obstrução pela lesão.
Protocolo de Quimioterapia	Protocolo Multi-fármacos (CHOP: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisolona ± L-asparaginase ± metotrexato), CCNU (lomustina), MOPP (Mecloretamina, vincristina, prednisolona, procarbazona); Radioterapia pode ser útil para aumentar o tempo de sobrevivência	Prednisolona e Clorambucil (Radioterapia pode ser útil para aumentar o tempo de sobrevivência)	Protocolo Multi-fármacos (CHOP: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisolona ± L-asparaginase ± metotrexato), CCNU (lomustina), MOPP (Mecloretamina, vincristina, prednisolona, procarbazona); Radioterapia pode ser útil para aumentar o tempo de sobrevivência
Via de Administração principal	Intravenosa	Quimioterapia Oral	Intravenosa
Resposta à terapêutica	Taxa de resposta de 50 a 60%	Taxa de resposta de 75 a 90%	Taxa de resposta de 50 a 60%
Taxa de Remissão Total	38-87%	56-96%	5%*
Tempo de Sobrevivência Média	7-10 Meses. Se se atingir remissão completa após terapia, existem 40% de probabilidade de viver por 1 ou mais anos.	19-29 Meses. A maioria dos gatos vivem mais de 2 anos e são tratados com quimioterapia a longo prazo.	17 Dias*

*Resultados de 20 gatos tratados com protocolo baseado em COP Adaptado de (Krick *et al.*, 2008; Gieger, 2011; Barrs & Beatty, 2012a).

Apêndice II. Apresentação dos dados relativos a raça, idade, género e localização anatômica do LnH das 45 amostras estudadas.

Número da amostra	Identificação dos Animais			Localização Anatômica
	Raça	Idade (anos)	Género	
1	Europeu Comum	11	Macho	Intestino Delgado – Jejuno
2	Europeu Comum	12	Fêmea Castrada	Intestino Delgado – Íleo
3	Europeu Comum	14	Macho Castrado	Intestino Delgado – Jejuno
4	Bosques da Noruega	10	Macho	Estômago
5	Europeu Comum	8	Macho Castrado	Baço
6	Bosques da Noruega	8	Fêmea Castrada	Cavidade Nasal
7	Siamês	5	Fêmea Castrada	Intestino Delgado - Duodeno
8	Europeu Comum	10	Macho Castrado	Intestino Delgado - Duodeno
9	Europeu Comum	11	Macho Castrado	Traqueia
10	Europeu Comum	8	Macho	Baço
11	Europeu Comum	10	Macho	Fígado
12	Europeu Comum	10	Fêmea	Pele
13	Europeu Comum	8	Fêmea	Rim
14	Europeu Comum	13	Macho Castrado	Intestino Delgado - Duodeno
15	Europeu Comum	14	Fêmea Castrada	Intestino Delgado – Jejuno
16	Europeu Comum	9	Fêmea Castrada	Intestino Delgado - Íleo e linfonodo Mesentérico
17	Europeu Comum	11	Macho Castrado	Pele
18	Siamês	17	Macho Castrado	Intestino Delgado – Jejuno
19	Siamês	10	Fêmea	linfonodo Mesentérico
20	Europeu Comum	1	Macho	Terceira Pálpebra
21	Europeu Comum	6	Macho Castrado	Linfonodo Poplíteo
22	Europeu Comum	8	Fêmea Castrada	Linfonodo
23	Europeu Comum	14	Macho	Baço
24	Europeu Comum	10	Fêmea Castrada	Linfonodo
25	Siamês	3	Macho Castrado	Massa Mediastínica
26	Europeu Comum	14	Macho Castrado	Fígado
27	Europeu Comum	9	Macho Castrado	Intestino Delgado – Jejuno
28	Europeu Comum	8	Macho	Intestino Grosso – Cólon
29	Europeu Comum	9	Macho	Intestino Delgado – Íleo
30	Europeu Comum	12	Fêmea Castrada	Intestino Delgado - Duodeno
31	Europeu Comum	10	Fêmea	Intestino Delgado – Jejuno
32	Europeu Comum	9	Macho Castrado	Intestino Delgado – Jejuno
33	Europeu Comum	6	Macho	Intestino Delgado – Íleo
34	Europeu Comum	2	Fêmea Castrada	Sistema Nervoso Central – Espinal Medula
35	Europeu Comum	7	Macho	Intestino Grosso – Cólon
36	Europeu Comum	8	Macho Castrado	Intestino Delgado – Jejuno
37	Europeu Comum	9	Macho	Intestino Delgado – Íleo
38	Europeu Comum	11	Macho Castrado	Intestino Delgado - Duodeno
39	Siamês	5	Fêmea	Intestino Grosso – Cólon
40	Europeu Comum	13	Fêmea	Intestino Delgado – Íleo
41	Bosques da Noruega	8	Macho Castrado	Intestino Delgado – Jejuno
42	Europeu Comum	9	Macho	Intestino Delgado – Jejuno
43	Europeu Comum	11	Macho Castrado	Intestino Delgado – Duodeno
44	Europeu Comum	11	Macho Castrado	Intestino Delgado – Jejuno
45	Siamês	11	Macho Castrado	Estômago

Apêndice III. Apresentação das características histológicas dos linfomas estudados.

Amostra	Fenótipo	Classificação de acordo com a OMS*	Características Histopatológicas	
			Mitoses	Linfoma GI (Extensão)
1	B	LBDCG I	5-10	2
2	T	LTAE tipo II	5-10	1
3	T	LTPNE	5-10	2
4	B	LBDCG I	10-20	2
5	B	LBNS	10-20	NA
6	B	LBDCG I	10-20	NA
7	T	LTAE tipo II	5-10	1
8	T	LTAE tipo II	5-10	1
9	B	LBDCG I	10-20	NA
10	B	LBDCG C	5-10	NA
11	B	LBDCG I	5-10	NA
12	B	LBDCG I	5-10	NA
13	B	LBDCG I	0-5	NA
14	T	LTTCP	5-10	2
15	T	LTTCP	0-5	2
16	T	LTTCP	10-20	2
17	B	LBDCG I	0-5	NA
18	T	LTTCP	>20	2
19	T	LTPNE	>20	2
20	B	LBDCG C	10-20	NA
21	T	LTPNE	>20	NA
22	B	LF grau 1 / 2	10-20	NA
23	B	LBDCG C	>20	NA
24	T	LTPNE	5-10	NA
25	T	LLC/LL	5-10	NA
26	B	LBPC	10-20	NA
27	B	LBDCG I	>20	2
28	T	LTTCP	10-20	2
29	B	LBDCG C	>20	2
30	T	LTPNE	10-20	2
31	T	LTAE tipo II	10-20	1
32	T	LTPNE	10-20	2
33	T	LTAE tipo II	5-10	1
34	B	LBDCG I	>20	NA
35	B	LBDCG C	>20	1
36	T	LTPNE	>20	2
37	B	LBDCG C	>20	2
38	T	LTAE tipo I	10-20	2
39	B	LBDCG C	10-20	2
40	B	LBDCG I	10-20	2
41	B	LBDCG I	5-10	2
42	T	LTPNE	5-10	2
43	T	LTAE tipo II	0-5	1
44	T	LTAE tipo I	10-20	2
45	B	LBDCG I	>20	2

NA – Não aplicável (ausência de material); GI – Gastrointestinal.

Apêndice IV. Apresentação dos resultados da observação ao microscópio ótico das características histopatológicas das 45 amostras de linfoma não-Hodgkin do gato estudadas e a relação entre si.

Correlação	Resultado
Diagnóstico Histológico e Fenótipo Localização anatômica Entidade OMS Frequência de mitoses Idade Epiteliotropismo Padrão de Infiltração da Lâmina Própria Envolvimento Nodal	<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma GI mais frequente (28/45 \approx 62,2%) com fenótipo T mais frequente (18/28 \approx 64,3%). - LBDCG I foi a entidade mais prevalente entre todos os linfomas (13/45 \approx 29%); Dos Linfoma GI a entidade mais prevalente foi o LTAE (8/28 \approx 28,6%). - LTAE II e LBPC com poucas mitoses (média 0 a 3 por campo de 200x); LBDCG, LTTCP e LTPNE com mitoses frequentes (média 5 a 10 por campo de 200x). - LBDCG foi mais frequente em gatos jovens (média de idades 8,7; Min = 1 Máx = 14) que LTAE (média de idades 10; Min = 5 Máx = 12). - Mais frequente no LTAE tipo I e II (8/8 = 100%); também identificado no LBDCG I (5/13 \approx 38,5%) e LBDCG C (2/7 \approx 28,6%). Das localizações extranodais, nenhuma revelou presença de epiteliotropismo. - A entidade LTAE revelou maioritariamente padrão de distribuição em “aglomerados” (5/8 \approx 62,5%) seguido pelo padrão “em banda” (3/8 \approx 37,5%). O LBDCG e o LTTCP revelaram na maioria dos casos padrão de distribuição de “obliteração da lâmina própria das vilosidades”. - Foi registada invasão nodal em 20/45 \approx 44,5% dos linfomas estudados, estando o LBDCG I, o LTPNE e o LTTCP, maioritariamente associados à metastização ganglionar.
Frequência de Mitoses Localização anatômica Idade FeLV	<ul style="list-style-type: none"> - LTAE apresenta, em média, menor frequência de mitoses (0 a 3 por campo de 200x); LBDCG intestinal com maior frequência de mitoses (5 a 10 por campo de 200x). - Número de mitoses independente da idade dos pacientes felinos. - Linfoma 25 (mediastínico) revela elevado índice de mitoses (5 a 20 mitoses por campo de 200x); Pacientes infetados com 1 e 3 anos de idade.
Localização anatômica Esclerose Idade	<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma da membrana nictitante, SNC, nodal e mediastínico associados a gatos mais jovens (1 a 8 anos de idade); linfoma GI e cutâneo associado a gatos idosos (5 a 17 anos de idade).

NA – Não aplicável (ausência de material); **GI** – Gastrointestinal.

Apêndice V. Apresentação dos dados clinico-patológicos das 45 amostras de LnH de gato estudadas.

Número da amostra	Expressão Antigénica				Fenótipo	Classificação de acordo com a OMS*
	CD3 ⁺	CD79 ⁺	Pax5 ⁺	BLA.36 ⁺		
1	-	+	+	+	B	LBDCG I
2	+	-	-	+	T	LTAE tipo II
3	+	-	-	-	T	LTPNE
4	-	+	+	+	B	LBDCG I
5	-	+	-	+	B	LBNS
6	-	+	+	+	B	LBDCG I
7	+	-	-	-	T	LTAE tipo II
8	+	-	-	-	T	LTAE tipo II
9	-	+	+	+	B	LBDCG I
10	-	+	+	+	B	LBDCG C
11	-	+	+	+	B	LBDCG I
12	-	+	-	+	B	LBDCG I
13	-	+	-	+	B	LBDCG I
14	+	-	-	-	T	LTTCP
15	+	-	-	-	T	LTTCP
16	+	-	-	-	T	LTTCP
17	-	+	+	+	B	LBDCG I
18	+	-	-	-	T	LTTCP
19	+	-	-	-	T	LTPNE
20	-	+	+	+	B	LBDCG C
21	+	-	-	-	T	LTPNE
22	-	+	+	+	B	LF grau 1 / 2
23	-	+	+	+	B	LBDCG C
24	+	-	-	-	T	LTPNE
25	+	-	-	-	T	LLC/LL
26	-	+	+	+	B	LBPC
27	-	+	+	+	B	LBDCG I
28	+	-	-	-	T	LTTCP
29	-	+	+	+	B	LBDCG C
30	+	-	-	-	T	LTPNE
31	+	-	-	-	T	LTAE tipo II
32	+	-	-	-	T	LTPNE
33	+	-	-	+	T	LTAE tipo II
34	-	-	-	+	B	LBDCG I
35	-	+	+	+	B	LBDCG C
36	+	-	-	-	T	LTPNE
37	-	+	+	+	B	LBDCG C
38	+	-	-	-	T	LTAE tipo I
39	-	+	+	+	B	LBDCG C
40	-	-	+	+	B	LBDCG I
41	-	-	+	+	B	LBDCG I
42	+	-	-	-	T	LTPNE
43	+	-	-	-	T	LTAE tipo II
44	+	-	-	-	T	LTAE tipo I
45	-	+	+	+	B	LBDCG I

LBDCG I – Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Imunoblástica; **LBDCG C** – Linfoma B Difuso de Células Grandes variante Centroblastica; **LBNS** – Linfoma B Não Subclassificável; **LF** – Linfoma Folicular Grau 1 / 2; **LBPC** – Linfoma B de Pequenas Células; **LTAE II** – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo II; **LTAE I** – Linfoma T Associado a Enteropatia tipo I; **LTPNE** – Linfoma T Periférico Não Específico; **LTTCP** – Linfoma T Transmural de Pequenas Células; **LLC / LL** – Leucemia Linfocítica Crónica / Linfoma Linfocítico. *A classificação foi realizada pelo autor e pelo hematopatologista de medicina humana Dr. José Cabeçadas de forma cega, existindo concordância em 100% dos casos. **Nota** – Cinco dos casos de Linfoma Gastrointestinal foram classificados como Linfoma T Periférico Não Específico pelo facto da amostra não apresentar mucosa, o que possibilitaria a classificação como LTAE caso existisse envolvimento da mesma.

Análise Estatística Descritiva

Figura 1: **A** - Gráfico de extremos e quartis (*boxplot*) da idade (em anos) dos gatos amostrados. O ponto vermelho representa a média aritmética. **B** - Gráfico de extremos e quartis (*boxplot*) da idade (em anos) por fenótipo. Os pontos vermelhos representam as médias aritméticas da idade em cada grupo.

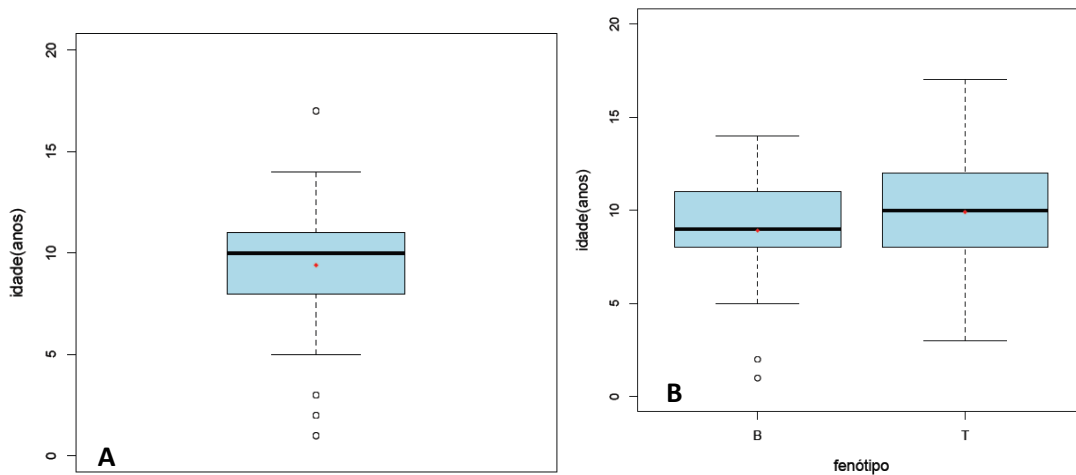
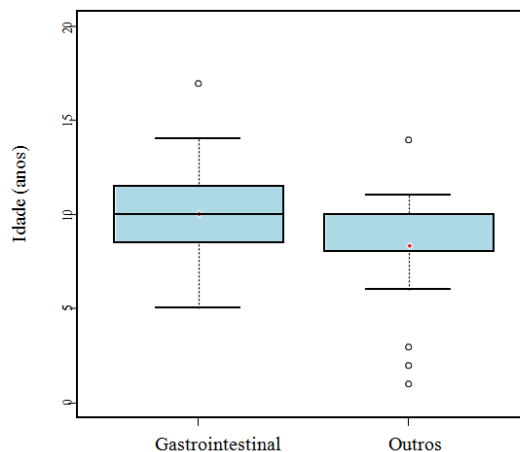


Figura 2. Gráfico de extremos e quartis (*boxplot*) da idade (em anos) por localização do tumor. Os pontos vermelhos representam as médias aritméticas da idade em cada grupo.



Expressão antigénica - concordância entre marcadores para fenótipo B: BLA.36, Pax5 e CD79acy

A medida **Kappa de Fleiss** é uma medida estatística usada para avaliar o grau de concordância entre os vários marcadores categóricos. A sua interpretação está simplificada na tabela 5.

Apêndice VI. Representação da interpretação dos resultados relativos à medida Kappa de Fleiss.

Kappa de Fleiss	Significado
0	Ausência de concordância
0,01 – 0,20	Concordância fraca
0,21 – 0,40	Concordância satisfatória
0,41 – 0,60	Concordância moderada
0,61 – 0,80	Concordância elevada
0,81 - 1	Concordância quase perfeita

Apêndice VII. Valor de Kappa de Fleiss, idicando o grau de concordância em relação aos 3 marcadores B (CD79 α cy, BLA.36 e Pax5) utilizados no presente estudo.

Amostras	Marcadores	Kappa	z	p-value
45	3	0,761	8,85	0

Com base no apêndice VI (Landis e Koch) o grau de concordância entre os três indicadores é elevado (Kappa de Fleiss = 0,76). A medida **Kappa de Cohen** mede o grau de concordância entre dois marcadores categóricos (concordância 2 a 2):

Concordância entre BLA.36 e Pax5:

Apêndice VIII. Valor de Kappa, indicando o grau de concordância entre dois marcadores B (BLA.36 e Pax5).

Amostras	Marcadores	Kappa	z	p-value
45	2	0,641	4,32	1.59e-05

Concordância entre BLA.36 e CD79 α cy:

Apêndice IX. Valor de Kappa, indicando o grau de concordância entre dois marcadores B (BLA.36 e CD79 α cy).

Amostras	Marcadores	Kappa	z	p-value
45	2	0,777	5,22	1.78e-07

Concordância entre Pax5 e CD79 α cy:

Apêndice X. Valor de Kappa, indicando o grau de concordância entre dois marcadores B (Pax5 e CD79 α cy).

Amostras	Marcadores	Kappa	z	p-value
45	2	0,866	5,86	4.54e-09

Interpretação de acordo com a tabela 5.:

De acordo com Landis e Koch, o grau de concordância entre os indicadores BLA.36 e Pax5 (Kappa de Cohen = 0,64) e entre BLA.36 e CD79 α cy (Kappa de Cohen = 0,78) é elevado e a concordância entre Pax5 e CD79 α cy (Kappa de Cohen = 0,87) é quase perfeita.

Anexos

Anexo I. Comparação entre diferentes métodos para diagnóstico de linfoma GI de baixo grau. Adaptado de Barrs & Beatty (2012a).

Diferenças das principais formas de obtenção de amostras do trato gastrointestinal para diagnóstico de linfoma			
	Biópsia de espessura total		Biópsia de espessura parcial
	Laparotomia	Laparoscopia	Endoscopia
Amostras das camadas da parede intestinal	Mucosa, submucosa, muscularis, serosa		Mucosa e submucosa
Acesso a outros órgãos	Observação do aspeto da superfície da serosa do trato GI e inspeção e/ou biópsia de outros órgãos		Observação do aspeto da superfície da mucosa do trato GI
Grau de invasão	Elevado; requer internamento pós-cirúrgico mais longo	Intermédio	Reduzido; requer menos dias de internamento pós-intervenção
Acesso a diferentes regiões do trato gastrointestinal	Todas	Todas, mas apenas o jejuno é alvo de recolha de amostras	Estômago, duodeno (gastroduodenoscopia), cólon, íleo (colonoscopia), o jejuno não é acessível
Requisitos para o início da quimioterapia	Atraso de 7 dias é essencial devido à possibilidade de deiscência de suturas aquando da recuperação pós-cirúrgica		Nenhum atraso é essencial
Experiência do operador	Não é necessário treino avançado	É essencial treino	Treino avançado para obtenção de amostras de qualidade do duodeno e íleo. O diagnóstico pode não ser possível se as amostras não forem de qualidade
Experiência na manipulação e interpretação das amostras pelo patologista	Biópsias de espessura total são mais facilmente orientadas que as obtidas via endoscopia, o que auxilia a sua interpretação.		Fraca qualidade das biópsias dificulta a sua interpretação. É necessária maior experiência do patologista.

Anexo II. Representação das características gerais mais comumente identificadas nas diferentes formas anatómicas do linfoma do gato na era pós-FeLV. Adaptado de Vail, (2013).

Características gerais das diferentes formas de linfoma do gato						
Forma Anatómica*	Frequência relativa	Idades médias (anos)	Antigenemia FeLV	Fenótipo B	Fenótipo T	Prognóstico
Gastrointestinal**						
Baixo grau/células pequenas	Comum	13	Raro	Raro	Comum	Bom
Alto grau/células grandes	Moderado	10	Raro	Comum	Raro	Mau
Nasal	Incomum	9,5	Raro	Comum	Incomum	Bom
Mediastínico	Incomum	2-4	Comum	Incomum	Comum	Mau a Razoável
Nodal Periférico	Incomum	7	Incomum	Moderado	Moderado	Razoável a Mau
Laríngeo/Traqueal	Raro	9	Raro	DI	DI	Bom a Razoável
Renal	Raro	9	Raro	Comum	Incomum	Mau a Razoável
Sistema Nervoso Central	Raro	4-10	Raro	DI	DI	Mau
Cutâneo	Raro	10-13	Raro	Raro	Comum	Razoável
Hepático (puro)	Raro	12	Raro	Incomum	Comum	Mau
FeLV, Vírus da Leucemia Felina; DI, Dados insuficientes. Comum >50% das apresentações clínicas; Moderado = 20 a 50% das apresentações clínicas; Incomum = 5-20% das apresentações clínicas; Raro <5% das apresentações clínicas. *Forma anatómica primária. ** Inclui os casos reportados como “intra-abdominal” nos quais a forma intestinal está documentada.						

Anexo III. Resumo da classificação do linfoma do cão e do gato resultante da Classificação de Revisão Europeia-Americana das Neoplasias Linfóides / Classificação da Organização Mundial de saúde das Neoplasias Linfóides. Adaptado de Valli *et al.*, (2011).

Neoplasias de Células B

Neoplasias de Células B Percussoras

Linfoma / Leucemia Linfoblástica de Células B Percussoras

Neoplasias de Células B Maturas (Periféricas)

Leucemia Linfocítica / Prolinfocítica Crônica de Células B

Linfoma / Leucemia Linfocítico(a) de Células Pequenas

Leucemia de Células B Prolinfocítica

Linfoma Linfoplasmocítico

Linfoma Esplénico de Células B da Zona Marginal

Plasmocitoma / Mieloma

Linfoma B Extranodal da Zona Marginal Associado ao Tecido Linfóide das Mucosas

Linfoma Nodal da Zona Marginal

Linfoma Folicular

Linfoma de Células do Manto

Linfoma B Difuso de Células Grandes

Linfoma B Mediastínico de Células Grandes

Linfoma de Burkitt / Leucemia de Células de Burkitt

Entidade Temporária: Linfoma de Células B de Alto-Grau

Tipo Burkitt

Linfoma de Efusão Primária

Neoplasias de Células T e *Natural Killer* (NK)

Neoplasias de Células T Percussoras

Linfoma / Leucemia Linfoblástico(a) de Células T Percussoras

Neoplasias de Células T e NK Maturas (Periféricas)

Leucemia Prolinfocítica de Células T

Leucemia de Linfócitos Grandes e Granulares (LLGG)

Leucemia Agressiva de Células NK

Linfoma T Periférico Não Especificado

Leucemia / Linfoma de Células T do Adulto

Linfoma T Intestinal com ou sem Enteropatia Associada

Linfoma Hépato-esplénico de Células T $\gamma\delta$

Linfoma T tipo-Paniculite Subcutânea

Mycosis fungoides / Síndrome de Sézary

Linfoma Anaplásico de Células Grandes, do tipo Cutâneo Primário T e NK

Linfoma T Periférico Não Especificado

Linfoma de Células T Angioimunoblástico

Linfoma de Células T Angiocêntrico