

JOANA BRANQUINHO RAMOS DE ALMEIDA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO LINFOMA
NO CÃO EM PORTUGAL: ANÁLISE DA
CASUÍSTICA EM DOIS CENTROS DE
REFERÊNCIA**

Orientador: Doutor Luís Lima Lobo
Co-Orientador: Dr. Joaquim Henriques
Responsável Externo: Dr. Hugo Gregório

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa
2012

JOANA BRANQUINHO RAMOS DE ALMEIDA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO LINFOMA
NO CÃO EM PORTUGAL: ANÁLISE DA
CASUÍSTICA EM DOIS CENTROS DE
REFERÊNCIA**

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: Doutor Luís Lima Lobo

Co-Orientador: Dr. Joaquim Henriques

Responsável externo: Dr. Hugo Gregório

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa
2012

Dedico este trabalho aos meus
pais por sempre me apoiarem
e por terem tornado possível
a realização deste sonho.

Agradecimentos

Ao Dr. Hugo Gregório, pelos conhecimentos que me transmitiu ao longo do estágio, pela sua disponibilidade, paciência e ajuda na realização desta dissertação, sem ele este trabalho não teria sido possível.

Ao meu co-orientador Dr. Joaquim Henriques, por me ter apoiado ao longo do curso, pela confiança depositada em mim mostrando-se sempre disponível durante esta etapa da minha vida e por ter sido o grande “impulsionador” na realização deste trabalho

Ao meu orientador Doutor Luís Lima Lobo, pelos conhecimentos transmitidos, por ter aceite ser meu orientador e pela ajuda na decisão do tema deste trabalho.

Ao Doutor Pedro Faísca pela ajuda com as fotografias das lâminas de linfoma.

Ao Dr. Mauro Bragança por ter ajudado na componente estatística deste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, em especial a todos os docentes e enfermeiras pela ajuda e sabedoria que me transmitiram ao longo destes anos.

A toda a equipa do Hospital Veterinário do Porto pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, em especial ao Dr. Lénio Ribeiro por me ter transmitido princípios e conhecimentos tão valiosos durante o meu estágio e à Natividade Silva, por tudo o que me ensinou e pelo seu espírito de ajuda e companheirismo.

A toda a equipa do CDVET, o meu muito obrigado pelo apoio durante estes últimos anos, em especial à Liliana pela ajuda e disponibilidade na realização deste trabalho.

A todos os meus colegas e estagiários, pelo espírito de entre-ajuda, amizade e partilha de experiências e conhecimento, muito obrigada.

À minha amiga Catarina Kemper pela sua amizade, apoio e ajuda incondicional durante estes longos anos de estudo e trabalho, foi sem dúvida um apoio fundamental.

Às minhas amigas Rita, Carolina e Miriam por todo o carinho que demonstraram e por me apoiarem em todos os momentos bons e maus desta etapa da minha vida.

À minha família e amigos, em especial aos meus pais e irmã, pelo amor que sempre tiveram, pela dedicação e por me terem apoiado incondicionalmente em todos os meus projectos, durante todo o meu percurso académico, foram e sempre serão um grande motivo de orgulho.

Resumo

O linfoma é um grupo heterogêneo de neoplasias que apresentam morfologia variável e apresentações clínicas diversas, exigindo diferentes abordagens diagnósticas e terapêuticas. O prognóstico difere bastante entre os canídeos afectados.

A presente dissertação refere-se a um estudo retrospectivo (2008-2012), de 50 canídeos com linfoma, com o objectivo de comparar os resultados obtidos com a bibliografia publicada, determinando ainda o impacto do imunofenótipo (B ou T) na sobrevida de cães com linfoma.

Foi registado o mesmo número de machos e fêmeas e as raças mais frequentes foram o Boxer, Rottweiler e Cocker Spaniel. O diagnóstico da doença foi realizado maioritariamente por histopatologia de linfonodo (56%), revelando 84% de linfomas da forma multicêntrica. Quando determinado, o imunofenótipo mais frequente foi o de células B (69%). A maioria dos canídeos estava em estadios avançados da doença (III-V) (98%) no momento do diagnóstico, revelando 54% dos casos sub-estadio "b" segundo a OMS.

O tratamento quimioterápico mais utilizado foi o protocolo CHOP (n=26) seguido do COP (n=9). A toxicidade hematológica e gastrointestinal secundárias à quimioterapia estiveram em igual número (22% cada), não se observando efeitos adversos em 56% dos cães com linfoma. Por último, o tempo médio de sobrevivência registado foi de 393 dias.

Não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre as variáveis (raça, sub-estadio e sexo) e o imunofenótipo de linfoma, sendo os tempos médios de sobrevivência de linfomas T e B semelhantes, 388 e 463 dias, respectivamente.

No nosso caso, as principais diferenças encontradas, relativamente à bibliografia publicada, foram uma quantidade elevada de pacientes em sub-estadio "b" e os tempos médios de sobrevivência semelhantes para os diferentes imunofenótipos.

Palavras-chave: Canídeo, Linfoma, Imunofenótipo, Quimioterapia, Efeitos adversos.

Abstract

Lymphoma is a heterogeneous group of neoplasms that have variable morphology and different clinical presentation, requiring specific diagnostic and therapeutic approaches. The prognosis differs greatly among affected dogs.

The present work relates to a retrospective study (2008-2012) of 50 dogs with lymphoma, in order to compare the results with published literature, and also determining the impact of the immunophenotype (B or T) on survival of dogs with lymphoma.

It was recorded the same number of males and females and the most common breeds were Boxer, Rottweiler and Cocker Spaniel. The diagnosis was carried out mainly by lymph node histopathology (56%), showing 84% of lymphomas multicentric form. When determined, the most frequent immunophenotype was B-cell lymphoma (69%). Most dogs were in advanced stages of disease (III-V) (98%) at diagnosis, revealing 54% of cases sub-stage "b" according to the WHO.

CHOP-protocol was the most used (n=26) followed by the COP-protocol (n=9). The hematologic and gastrointestinal toxicity resulting from chemotherapy were in equal number (22% each), with no significant adverse effects in 56% of dogs with lymphoma. Finally, the mean survival time was recorded for 393 days.

There was no statistically significant relationship between the variables (breed, sub-stage and sex) and immunophenotype of lymphoma, being the mean survival time of lymphoma T and B similar, 388 and 463 days respectively.

In our case, the main differences found in relation to the published literature, were a high number of patients in sub-stage "b" and similar median survival times for the different immunophenotypes.

key words: Dog, Lymphoma, Immunophenotype, Chemotherapy, Adverse effect.

Abreviaturas e símbolos

© – Símbolo de direitos de autor

® – Símbolo de marca registrada

> – Maior

< – Menor

≥ – Maior ou igual

≤ – Menor ou igual

% – Percentagem

μl – Microlitro

ACTD – Actinomicina-D

ADH – Hormona anti-diurética

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ALB – Albumina

ALT – Alanina aminotransferase

CID – Coagulação intravascular disseminada

COAP – Ciclofosfamida, Vincristina, Citosina arabinosido e Prednisolona

COP – Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisolona

CREA – Creatinina sérica

CHOP – Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisolona

DOX – Doxorubicina

EV – Via de administração endovenosa

FAS – Fosfatase alcalina sérica

FC – Frequência de casos

g – Grama

GGT – Gama glutamil transpeptidase

Kg – Quilograma

L – Litro

L-CHOP – L-asparaginase, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisolona

LM – Linfoma maligno

LMC – Linfoma maligno canino

LNH – Linfoma não Hodgkin

mg – Miligrama

MALT – Tecido linfóide associado às mucosas
MOPP – Mecloretamina, Vincristina, Procarbazina e Prednisolona
MIT - Mitoxantrona
MTX – Metrotrexato
m² – Metro quadrado
NK – Natural killers
OMS – Organização Mundial de Saúde
GLU – Glucose sanguínea
Ig- Imunoglobulina
TCR – Receptor de células T
TGI - Tracto gastro-intestinal
PAAF – Punção aspirativa por agulha fina
PARR – Rearranjos das cadeias de imunoglobulina
PCR – Reacção polimerase em cadeia
PO – *Per os*
PPY – Placas de Peyer
PT – Proteínas totais
p53 –Proteína 53
q2 semanas – Cada duas semanas
q24h – Cada vinte e quatro horas
q48h – Cada quarenta e oito horas
RC – Remissão completa
RP – Remissão parcial
SC – Subcutâneo
SNC – Sistema nervoso central
TAC – Tomografia axial computarizada
UREIA – Concentração de ureia no sangue
U-WM – Universidade de Wisconsin Madison
UI – Unidades internacionais
VCOG-CTCAE - Terminologia de critérios de efeitos adversos do grupo co-operativo de oncologia veterinária
VCR – Vincristina

Índice geral

1. Introdução.....	12
1.1. Anatomia e fisiologia do sistema linfático.....	12
1.2. Epidemiologia do linfoma no cão.....	16
1.2.1. Factores genéticos e moleculares.....	17
1.2.2. Factores infecciosos.....	18
1.2.3. Factores ambientais.....	19
1.2.4. Factores imunitários.....	20
1.3. Sistemas de classificação do linfoma.....	21
1.3.1. Classificação morfológica do linfoma.....	21
1.3.2. Evolução dos sistemas de classificação.....	21
1.4. Classificação topográfica do linfoma.....	25
1.4.1. Linfoma nodal.....	25
1.4.1.1. Forma multicêntrica.....	25
1.4.1.2. Forma tímica.....	26
1.4.2. Linfoma extra-nodal.....	27
1.4.2.1. Forma alimentar.....	28
1.4.2.2. Forma cutânea.....	28
1.4.3. Linfoma indolente.....	30
1.5. Diagnóstico.....	31
1.5.1. História e sinais clínicos.....	31
1.5.2. Alterações laboratoriais.....	33
1.5.3. Citologia e histologia.....	34
1.6. Imunofenotipagem.....	35
1.7. Imagiologia.....	36
1.8. Diagnósticos diferenciais de acordo com o tipo de linfoma.....	38
1.9. Tratamento.....	40
1.9.1. Tratamento cirúrgico.....	41
1.9.2. Tratamento médico.....	42
1.9.2.1. Protocolos mono-fármaco.....	42
1.9.2.2. Protocolos de múltiplos fármacos.....	44
1.9.2.3. Protocolos de resgate e re-indução.....	49

1.10. Radioterapia.....	50
1.11. Efeitos adversos secundários à quimioterapia.....	52
1.12. Prognóstico.....	54
1.13. Objectivos.....	57
2. Materiais e métodos.....	58
2.1. Canídeos.....	59
2.2. Recolha de dados.....	59
2.3. Tratamento.....	59
2.4. Avaliação de linfomas indolentes.....	60
2.5. Avaliação de efeitos adversos secundários à quimioterapia.....	60
2.6. Análise estatística.....	60
3. Resultados.....	60
4. Discussão.....	70
5. Conclusão.....	77
6. Bibliografia.....	80

Índice de tabelas

Tabela 1 – Classificação do linfoma segundo Gall & Mallory.....	22
Tabela 2 – Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos nos Animais Domésticos segundo a OMS.....	24
Tabela 3 – Estadiamento de LNH no cão, segundo a OMS.....	25
Tabela 4 – Diagnósticos diferenciais consoante o tipo de linfoma.....	39
Tabela 5 – Protocolo COP de alta e baixa dose.....	46
Tabela 6 – Protocolo CHOP curto, de 19 semanas, da Universidade de WM.....	47
Tabela 7 – Protocolo CHOP longo, de 25 semanas, da Universidade de WM.....	48
Tabela 8 – Indicações para radioterapia no linfoma.....	51
Tabela 9 – Tabela de efeitos adversos da quimioterapia, com base no VCOG-CTCAE.....	53
Tabela 10 – Factores de prognóstico associados ao linfoma.....	55
Tabela 11 – Distribuição da amostra (n=50) de acordo com a variável "raça".....	61
Tabela 12 – Distribuição da amostra segundo a variável "sub-estadio de linfoma".....	63
Tabela 13 – Distribuição da amostra consoante o efeito adverso associado à quimioterapia.....	65
Tabela 14 – Valores de média e mediana para a variável "Duração da primeira remissão".....	66
Tabela 15 – Relação entre o imunofenótipo e o género dos canídeos com linfoma.....	68
Tabela 16 – Relação entre o fenótipo e a raça dos canídeos com linfoma.....	68
Tabela 17 – Relação entre o fenótipo e o sub-estadio de linfoma segundo a OMS.....	69

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura interna de um Linfonodo.....	13
Figura 2 – Linfonodos palpáveis durante o exame físico.....	14
Figura 3 – Imagem histológica de imunohistoquímica para o marcador CD10 onde se observam vários centros germinativos, sendo visível a polaridade cromática do centro (A), a zona marginal na periferia (B).....	15
Figura 4 – Circulação dos linfócitos no organismo.....	15
Figura 5 – Esquema de evolução dos sistemas de classificação do linfoma maligno.....	21
Figura 6 – Imagem ecográfica de linfadenomegália mediastínica num cão com linfoma tímico.....	26
Figura 7 – Linfoma cutâneo, presença de múltiplas lesões na região dorsal do pescoço	29
Figura 8 – Linfoma cutâneo de células T, forma típica em "Donut".....	30
Figura 9 – Linfadenopatia pré-escapular num cão com linfoma multicêntrico (seta azul).....	31
Figura 10 – Imagem citológica de um linfonodo de um cão com linfoma.....	34
Figura 11 – Imagem histológica de um linfonodo de um cão com linfoma.....	35
Figura 12 – Imagem ecográfica de linfadenomegália mesentérica num cão com linfoma esplénico.....	37
Figura 13 – Imagem ecográfica de um linfoma alimentar no intestino delgado de um cão com linfoma.....	38
Figura 14 – Fotografia intra-cirúrgica de uma esplenectomia num cão com linfoma esplénico.....	41
Figura 15 – Distribuição da população de acordo com a variável "idade"	60
Figura 16 – Distribuição da população de acordo com a variável "tipo de linfoma".....	62
Figura 17 – Distribuição da amostra de acordo com a variável "estadio de linfoma segundo a OMS"	63

Figura 18 – Curva de Kaplan-Meier do tempo médio de sobrevivência da população total de cães com linfoma (curva azul), correspondente a 393 dias.....65

Figura 19 – Curvas de Kaplan-Meier do tempo médio de sobrevivência de acordo com o grupo de cães com imunofenótipo B (n=25 - curva verde), o grupo de cães com imunofenótipo T (n=11 - curva azul) e nos cães onde não foi determinado o imunofenótipo (n=14 - curva laranja).....67

1. Introdução

1.1. Anatomia e fisiologia do sistema linfático

Os linfócitos são células redondas e de pequena dimensão que predominam essencialmente em órgãos como o baço, os linfonodos e o timo. Estes órgãos são denominados órgãos linfóides, onde predominam os linfócitos T e os linfócitos B (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

A superfície dos linfócitos B é coberta por diversos receptores, designados de imunoglobulinas (Ig) que têm como função reconhecer e responder contra os vários antígenos. As células B, além do seu papel essencial na imunidade humoral, ainda regulam e medeiam outras funções essenciais à homeostase imunitária (LeBien & Tedder, 2008).

Os linfócitos T incluem os diferentes sub-grupos celulares: citotóxicos, de ajuda e de memória, que medeiam sobretudo respostas imunitárias do tipo celular (Tizard, 2004; LeBien & Tedder, 2008).

Os órgãos linfóides representam assim o local de interacção entre os linfócitos, as células apresentadoras de antígeno e os antígenos, promovendo uma resposta imunológica efectiva contra os antígenos processados (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

Os órgãos linfóides devem então ser classificados com base no seu papel de produzir linfócitos, de regular a sua produção, assegurando um local para capturar antígenos e para os processar. Assim, podemos dividir os órgãos do sistema linfático em dois grupos: os órgãos linfóides primários, constituídos pelo timo, medula óssea, placas de Peyer e complexos linfoglandulares; e os órgãos linfóides secundários, onde incluímos os linfonodos, o baço, as tonsilas e outros tecidos linfóides presentes no intestino, tracto respiratório e urogenital (Tizard, 2004).

Os órgãos linfóides primários regulam essencialmente a maturação dos linfócitos. Assim, as populações de linfócitos são divididas em células T e células B dependendo do órgão onde sofrem o processo de maturação, ou seja, no timo e na medula óssea, respectivamente. Os órgãos linfáticos primários desenvolvem-se na fase fetal inicial, contudo, estes não são os locais onde os linfócitos vão contactar com os antígenos, nem aumentam de dimensão em resposta à estimulação antigénica (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

O timo está localizado na cavidade torácica, mais concretamente no mediastino cranial. O tamanho do timo é variável, diminuindo de tamanho ao longo da vida dos animais,

sendo gradualmente substituído por gordura, contudo, mesmo com pequenas quantidades de tecido linfóide, continua funcional (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

As placas de Peyer (PPY) representam órgãos primários do tecido linfóide localizadas na parede do intestino delgado. A sua estrutura e função é variável consoante a espécie em questão. No cão, 80% a 90% das PPY estão localizadas no íleo, adquirindo o seu tamanho máximo e maturidade antes do nascimento. As PPY são locais onde ocorre uma proliferação rápida de linfócitos tipo B, cerca de 95% sofre apoptose e as células que sobrevivem são libertadas em circulação (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

Os complexos linfoglandulares podem ser encontrados no intestino grosso e ceco do cão. Estes consistem em porções de tecido linfóide localizado na submucosa, atravessadas por ramificações das glândulas mucosas. A sua função é desconhecida, contudo, visto que contêm plasmócitos, podem ser considerados como locais de produção de anticorpos (Tizard, 2004).

A medula óssea por sua vez, representa o local preferencial de produção e maturação dos linfócitos B (Tizard, 2004).

Quanto aos órgãos linfóides secundários, estes surgem na fase tardia do desenvolvimento fetal, persistindo nos animais adultos. Ao contrário dos órgãos linfóides primários, na presença de estimulação antigénica, ocorre aumento de tamanho. Caso haja necessidade de remoção cirúrgica de um órgão linfóide secundário, não há diminuição significativa da competência imunitária (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

Os linfonodos são estruturas redondas a ovais, constituídas pelo córtex, medula e uma região entre estes denominada paracórtex (figura 1) (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

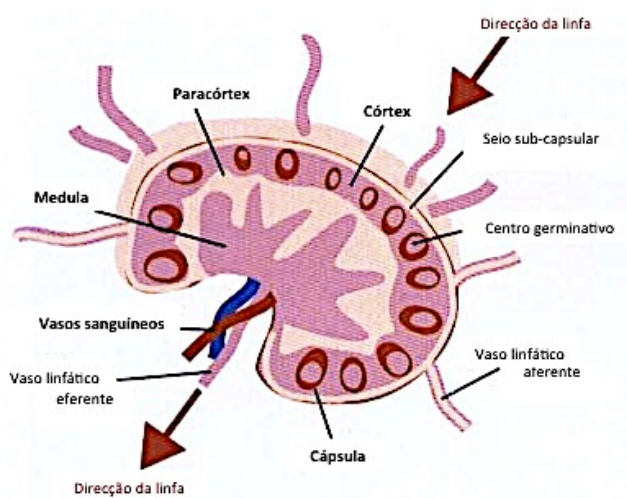


Figura 1 – Estrutura interna de um linfonodo (Adaptado de Tizard, 2004).

Os linfonodos estão estrategicamente posicionados para assegurar a filtração da linfa e dos antígenos, sendo os mais frequentemente palpados ao exame físico os sub-mandibulares, os cervicais, os pré-escapulares, os axilares, os inguinais e os poplíteos (figura 2) (Vail & Young, 2007).

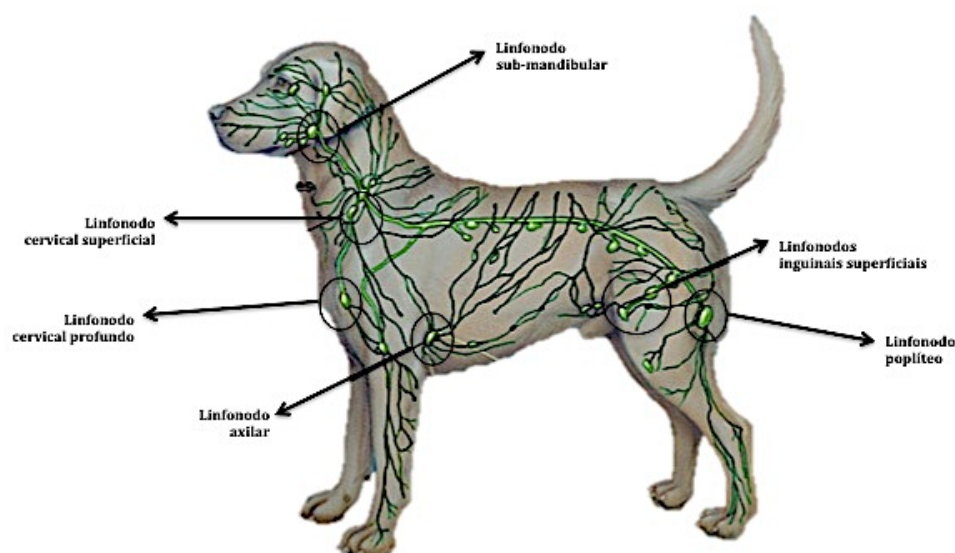


Figura 2 – Linfonodos palpáveis durante o exame físico (Adaptado de <http://pmhtherapy.com/wp-content/uploads/2012/03/canine-lymphatic-system2.jpg>).

Os linfócitos B predominam no córtex onde se organizam em centros germinativos, enquanto que os linfócitos T estão sobretudo na região do paracórtex (Tizard, 2004; LeBien & Tedder, 2008).

Os centros germinativos são focos de divisão celular localizadas no córtex do linfonodo, que podem aumentar em número e dimensão, após ocorrer estimulação antígenica (figura 3) (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

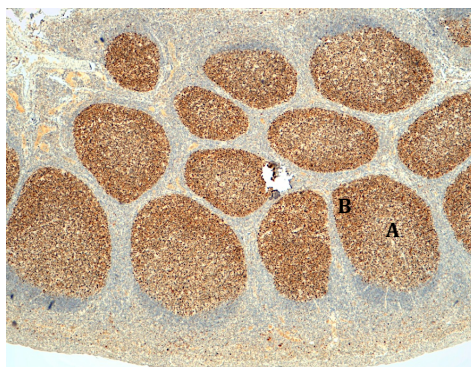


Figura 3 – Imagem histológica de imunohistoquímica para o marcador CD10 onde se observam vários centros germinativos, sendo visível a polaridade cromática do centro (A), a zona marginal na periferia (B) (Fotografia gentilmente cedida por Dr. Joaquim Henriques).

Tal como os linfonodos filtram os antígenos da linfa, o baço filtra o sangue. Este órgão linfático secundário filtra as partículas antigénicas do sangue, bem como as células que ultrapassaram o seu tempo de vida útil. O baço tem ainda funções de armazenamento de plaquetas e glóbulos vermelhos e de hematopoiese durante a vida fetal (Tizard, 2004).

Este órgão encontra-se dividido em dois compartimentos: a polpa vermelha, onde são armazenados glóbulos vermelhos e capturados os antígenos e a polpa branca, rica em linfócitos, onde ocorre a resposta imunitária (Junqueira & Carneiro, 2004; Tizard, 2004).

Os linfócitos encontrados no sangue podem assim representar as células recém formadas provenientes da medula óssea para os órgãos linfóides primários ou células que se deslocam dos órgãos linfáticos primários para os secundários. Contudo, a grande maioria destas células estão em constante circulação entre os linfonodos e a circulação sanguínea (figura 4) (Tizard, 2004).

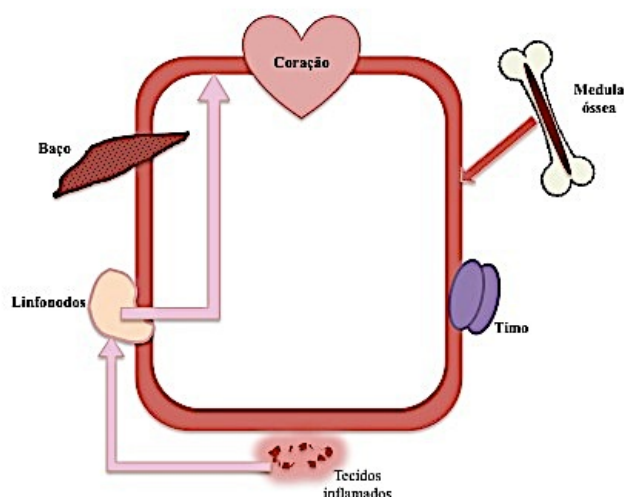


Figura 4 – Circulação dos linfócitos no organismo (Adaptado de Tizard, 2004).

1.2. Epidemiologia do linfoma no cão

Os termos linfoma, linfoma maligno canino (LMC) ou linfossarcoma, referem-se ao mesmo grupo de neoplasias que têm em comum a sua origem a partir de células do sistema linforeticular. O linfoma surge mais frequentemente em órgãos linfóides como baço, medula óssea e linfonodos, contudo, pode surgir em praticamente todos os tecidos do organismo (Vail & Young, 2007).

O linfoma é uma das neoplasias mais comuns do cão, representando 7 a 24% de todas as neoplasias caninas e 83% das neoplasias hematopoiéticas malignas (Kaiser, 1981; Moulton & Harvey, 1990).

O linfoma pode ser mencionado como linfoma não-Hodgkin (LNH), de acordo com a terminologia humana. A doença de Hodgkin não foi ainda reconhecida nesta espécie (Fournel-Fleury et al., 2002).

Segundo o trabalho de Bäckgren (1965), a incidência anual foi estimada em 13 a 24 casos por 100.000 cães em risco e as taxas de incidência anuais relacionadas com a idade estimam que 1,5 por cada 100.000 cães com menos de 1 ano e 84 por cada 100.000 cães entre 10 e 11 anos desenvolvem esta neoplasia (Vail & Young, 2007).

O linfoma afecta sobretudo cães de meia idade, principalmente entre os 6 e os 9 anos (Vail & Young, 2007; Argyle, 2008), embora esteja descrita uma associação entre o aumento da idade e a susceptibilidade para o desenvolvimento tumoral. Esta relação pode explicar-se em parte, devido ao aumento de lesões no ácido desoxirribonucleico (ADN) celular, que levam a uma transformação maligna das células e ao consequente desenvolvimento tumoral (Waters, 2006).

O linfoma pode aparecer em cães de qualquer idade, raça ou género, contudo, é evidente a relação entre a componente genética e o desenvolvimento desta neoplasia, sendo que, algumas linhagens sanguíneas e determinadas raças como Boxer, Basset Hound, Rotweiller, Cocker Spaniel, São Bernardo, Scottish Terrier e Airedale Terrier apresentam uma maior predisposição para o aparecimento da mesma. Por sua vez, raças como Teckel, Pomeranians, Pekinês, Poodle, Chihuahua e Spaniel apresentam menor predisposição para o desenvolvimento de linfoma (Vail & Young, 2007).

Embora grande parte da bibliografia consultada sugira que o género não constitui um factor de risco significativo (Modiano et al., 2005; Vail & Young, 2007; Argyle et al., 2008;

Nelson & Couto, 2009), um trabalho realizado por Moreno et al. (2007), verificou uma maior frequência de linfoma em machos e pelo contrário, Teske et al. (1994), registou um maior número de linfoma em fêmeas.

Num outro trabalho realizado por Villamil et al. (2009), concluiu-se que existe de facto uma relação entre o género e o aparecimento de linfoma no cão, semelhante ao que ocorre nos humanos, existindo a hipótese do nível de hormonas sexuais em fêmeas não esterilizadas diminuírem o risco de aparecimento de linfoma. A etiologia desta associação deve ser futuramente investigada (Villamil, 2009).

1.2.1. Factores genéticos e moleculares

Avanços recentes na área da citogenética molecular, incluindo técnicas de microchip de genes têm sido aplicadas para investigar as alterações nos cromossomas de cães com linfoma (Vail & Young, 2007).

Segundo o trabalho de Thomas et al. (2003), as alterações detectadas incluíam ganhos nos cromossomas 13 e 31 e perdas no cromossoma 14 de um total de 25 casos analisados.

Por outro lado, num estudo de 61 cães com linfoma, houve evidência de aumento na duração da remissão do primeiro tratamento e tempo de sobrevivência de cães com trissomia do cromossoma 13 (25% dos animais estudados) (Hahn et al., 1994).

A publicação do genoma canino e a disponibilidade comercial de chip's de genes de cão vai de certo contribuir para avanços no domínio da compreensão dos eventos genéticos na base do desenvolvimento do linfoma num futuro próximo (Lindblad-Toh et al., 2005).

Outras mutações genéticas somáticas e da linha germinativa, apesar de raras, foram anteriormente detectadas em alguns cães com linfoma, nas quais se verificou mutação da proteína supressora tumoral p53 e do gene *N-ras* em cães de raça Bull mastiff e num cão com linfoma, respectivamente (Veldhoen et al., 1998; Mayr et al., 2003).

Segundo as investigações de Veldhoen et al. (1998), as mutações do gene p53 estavam associadas a diversas neoplasias de origem não linfóide no cão, acreditando-se assim que o estado do gene p53 no linfoma apresenta um modelo clínico válido para investigar a eficácia de vários protocolos quimioterápicos bem como para avaliar o seu potencial oncogénico. Os resultados publicados neste mesmo estudo indicam que mutações na linha

germinativa do gene p53 têm um papel no desenvolvimento de neoplasias caninas e poderá em parte explicar a predisposição de algumas raças e linhagens para desenvolverem determinados processos neoplásicos (Veldhoen et al., 1998).

Ainda no âmbito dos factores de risco relacionados com a heritabilidade, foi demonstrada a associação entre determinados imunofenótipos de linfoma e raças específicas de canídeos, como o caso dos Boxer, Airedale Terrier e Sharpei que apresentam sobretudo linfoma de células T, e o caso dos Basset Hound e Cocker Spaniel que apresentam sobretudo linfoma de células B (Lurie et al., 2004; Modiano et al., 2005).

1.2.2. Factores infecciosos

Num estudo recente, realizado por Huang et al. (2012), foi confirmada a associação do γ -herpesvírus Epstein-Barr (EBV) e o desenvolvimento de linfoma de células B no cão.

Através de serologia, foram detectados anticorpos contra as cápsides de EBV. Por outro lado, e através de microscopia electrónica, foi também observada a presença de partículas virais nos linfonodos dos cães afectados, confirmando esta associação (Huang et al., 2012).

De acordo com os exemplos humanos, infeções por *Helicobacter* estão directamente associadas ao desenvolvimento de linfoma gástrico, contudo, esta relação não foi até à data demonstrada como definitiva no cão. A evidência indica que a infeção laboratorial por *Helicobacter* em Beagles resulta na formação de folículos linfóides reactivos no estômago, que é considerado um precursor do linfoma do tecido linfóide associado às mucosas (MALT) nos humanos (Rossi et al., 1999).

À semelhança da Schistomatose humana, há ainda registo de um caso de infeção por *Heterobilharzia americana*, um tremátode, e o desenvolvimento de linfoma numa cadela de 11 anos (Stone et al., 2011).

Embora a associação entre linfoma e parasitas hemáticos, esteja ainda pouco documentada, foi descrito por Manzillo et al. (2008), um caso de linfoma extra-nodal de células T- $\gamma\delta$, num canídeo macho de 8 anos de idade com leishmaniose. Não só as células T- $\gamma\delta$ parecem estar envolvidas na resposta do hospedeiro contra este parasita, como também o facto de haver estimulação antigénica prolongada e imunossupressão crónica, tipicamente

provocada pela leishmaniose, parecem ter um papel importante na etiopatogénese do linfoma de células T (Manzillo et al., 2008).

Ainda no âmbito dos parasitas hemáticos, existe registo de um canídeo fêmea de 5 anos de idade, que desenvolveu um linfoma de células B, no decorrer do tratamento para ehrlichiose e histoplasmose sistémicas. Neste caso, o linfoma foi associado à inflamação crónica provocada pela ehrlichiose e histoplasmose (Brunker & Hoover, 2007).

Por último, Duncan et al. (2008), num trabalho realizado com cães de raça Golden Retriever, verificou através de análises de PCR que estava presente a mesma percentagem da bactéria *Bartonella* em linfonodos de cães com linfoma e em cães do grupo controlo que se encontravam saudáveis, não havendo assim associação directa entre a infecção por *Bartonella* e a presença de linfoma. O autor sugere a realização de outros estudos que demonstrem de que forma a bactéria *Bartonella* poderá estar relacionada com o desenvolvimento do linfoma no cão (Duncan et al., 2008).

1.2.3. Factores ambientais

O papel dos factores ambientais como o caso dos herbicidas e o seu potencial causador de neoplasias do sistema hematopoiético tem vindo a ser objecto de estudo ao longo dos anos (Vail & Young, 2007).

O desenvolvimento de linfoma associado à exposição prévia ao herbicida 2,4 ácido-dicloro-fenoacético (2,4D), foi estudado por alguns autores, (Hayes et al., 1991; Zahm & Blair, 1992; Kaneene et al., 1999), contudo, são necessários estudos futuros mais representativos, pois não foi confirmada a associação dose-resposta deste herbicida e do desenvolvimento de linfoma.

A associação entre o linfoma em animais que habitavam em zonas industriais, com exposição a químicos domésticos foi também avaliada, demonstrando uma idade mais precoce no desenvolvimento desta neoplasia para os animais residentes nestas zonas e expostos aos químicos, comparativamente aos não expostos a este tipo de agentes (Gavazza et al., 2001).

Num estudo publicado por Pastor et al. (2009), afirmou-se que as incineradoras de lixo, locais poluídos e lixo radioactivo devem ser considerados como indicadores de risco para o linfoma no cão.

Embora trabalhos epidemiológicos demonstrem que o uso de alguns produtos químicos na manutenção da relva aumentem o risco de linfoma, são ainda necessários estudos que confirmem quais os compostos químicos implicados nestes produtos que estão directamente relacionados com o aparecimento desta neoplasia (Takashima-Uebelhoer et al., 2012).

1.2.4. Factores imunitários

No que diz respeito à medicina humana, estão descritos alguns estudos que relatam o aparecimento de linfoma secundário a doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crónicas (Smedby et al., 2006; Goldin & Landgren, 2009).

Também os doentes sujeitos a transplantes de órgãos e células estaminais, apresentaram um risco acrescido no desenvolvimento de linfoma, sendo 20-120% superior, comparativamente à população em geral (Jagadeesh et al., 2012).

Em medicina veterinária, suspeita-se de que algumas alterações do sistema imunitário do cão (ex: doenças auto-imunes), não relacionadas com idade ou género, representem um risco acrescido no desenvolvimento de linfoma, comparativamente a populações normais (Foster et al., 2000).

Está ainda descrito um caso de aparecimento de linfoma num cão depois de ter sido realizado um tratamento com ciclosporina; apesar de ser apenas um caso, este pode indicar uma relação efectiva entre o uso de terapias imunossupresoras e o aparecimento de linfoma nesta espécie (Blackwood et al., 2004).

Aguardam-se mais estudos que confirmem estas associações.

1.3. Sistemas de classificação do linfoma

1.3.1. Classificação morfológica do linfoma

O linfoma é um grupo heterogêneo de neoplasias com características morfológicas distintas, várias manifestações clínicas possíveis e com diversos tratamentos e prognóstico (Vail & Young, 2007).

Por esta razão, ao longo dos anos, têm sido feitos esforços para estabelecer uma classificação adequada e racional deste tipo de tumores, tanto na medicina veterinária como na medicina humana (figura 5). Visto que existem inúmeras semelhanças entre os animais e o homem, as classificações para o linfoma no cão têm sido adaptadas com base nos esquemas de classificação do linfoma no homem (Parodi, 2001; Valli, et al., 2002; Valli, et al., 2011).

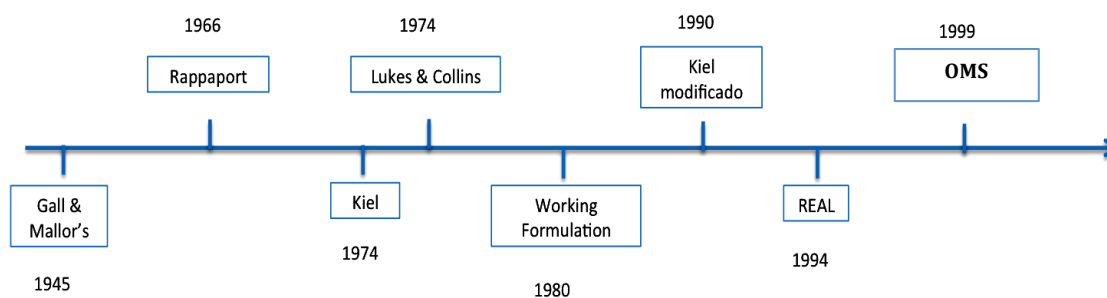


Figura 5 – Esquema de evolução dos sistemas de classificação do linfoma (Adaptado de Parodi, 2001).

1.3.2. Evolução dos sistemas de classificação do linfoma

A primeira tentativa de classificação do linfoma no homem foi feita por Gall & Mallory em 1942, tendo sido aplicada ao cão por Bloom et al. em 1945. Esta classificava de forma básica os tipos de linfoma, tal como descrito na tabela 1 (Parodi, 2001).

Tabela 1 – Classificação do linfoma segundo Gall e Mallory (Adaptado de Parodi, 2001).

Classificação segundo Gall & Mallory
- Linfoma de células estaminais
- Linfoma (monocítico) clasmotócico
- Linfoma linfoblástico
- Linfoma linfocítico
- Linfoma Hodgkin
- Sarcoma Hodgkin
- Linfoma folicular

Em 1966, Henry Rappaport apresentou uma classificação com base na morfologia celular e no padrão de crescimento do tecido neoplásico. Assim, introduziu-se a ideia de que a arquitetura do tecido neoplásico apresentava prognóstico clínico do tumor, distinguindo para cada tipo citológico a forma folicular, nodular ou difusa. Tal como a classificação anterior de Gall e Mallory, esta incluía o linfoma do tipo histiocítico. Visto que a maioria dos animais com linfoma foram classificados como tumores difusos com morfologia celular histiocítica, a classificação da Rappaport demonstrou pouco valor de prognóstico em medicina veterinária (Parodi, 2001; Vail & Young, 2007).

No final dos anos 60, foram realizadas novas investigações no âmbito do sistema imunitário e da fisiologia das células linfóides, promovendo novas orientações conceptuais e dando origem a novos sistemas de classificação como o de Robert Lukes (num conceito Americano) e o de Karl Lennert (numa visão mais Europeia). Assim, pela primeira vez, foi possível diferenciar os linfomas, segundo o imunofenótipo, com origem nas células B ou nas células T (Parodi, 2001; Vail & Young, 2007).

Em 1974, Kiel Lennert e o seu grupo de trabalho, apoiados pelo clube europeu do linfoma publicaram a classificação de Kiel, que foi fundamental para descrever os diferentes tipos celulares, tendo sido usada mundialmente em oncologia veterinária, com maior destaque na Europa. Neste mesmo período, Lukes e Collins descreveram o conceito da célula centro-folicular, propondo que o centro folicular era o local de transformação de células do tipo B. Esta classificação era essencialmente funcional, sem divisão consoante o grau de malignidade

e apesar de todos os esforços, estes dois tipos de classificação demonstraram pouca relevância clínica para o linfoma no cão (Parodi, 2001; Valli, et al., 2002; Vail & Young, 2007; Vezzali, et al., 2009).

No início dos anos 70, surgiram várias propostas de classificação do LNH humano e no intuito de harmonizar todas estas propostas, foi realizado em 1980, nas instalações do Instituto Nacional do Cancro, nos Estados Unidos da América, um estudo internacional multicêntrico, denominado projecto de classificação patológica do LNH. Foram analisados 1250 casos de LNH, por patologistas experientes, resultando na “Working Formulation” de uso clínico para LNH. Foi introduzida uma sub-divisão em LNH de baixo grau, de grau intermédio e de alto grau, contudo, este sistema de classificação não incluía a separação em células segundo o imunofenótipo (tipo B ou T) (Parodi, 2001; Vail & Young, 2007).

Em 1990, foi publicada a classificação actualizada de Kiel. Esta, tal como inicialmente, para além de se basear no critério morfológico das células tumorais, adicionou a separação entre os linfomas de baixo grau e de alto grau, introduzindo ainda a identificação imunofenotípica dos novos sub-tipos de linfoma, especialmente do grupo derivado das células T. A nova classificação de Kiel não parou por aqui, revelando a classificação de LNH extranodal. Este sistema de classificação caracterizou assim um importante factor de prognóstico dos LNH, baseando-se no imunofenótipo e afirmando que o linfoma de células T apresentava pior prognóstico (Parodi, 2001; Valli, et al., 2002; Vail & Young, 2007).

Pouco tempo depois, em 1994, o grupo internacional de estudo do linfoma (ILSG) publicou a classificação REAL (Revisão do Linfoma, Europeu e Americano), combinando a morfologia das células tumorais, o imunofenótipo, factores genéticos e manifestações clínicas, tendo sido esta última um dos aspectos mais recentes do grupo ILSG. O sistema REAL considerou tanto a relação entre o grau histológico e a agressividade clínica, como a diferença entre tumores de células B e T com arquitectura histológica e citomorfológica semelhante (Parodi, 2001; Vail & Young, 2007; Vezzali, et al., 2009).

Por último, a nova classificação humana de neoplasias do sistema hematopoiético e tecidos linfóides da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2002) foi finalizada, incorporando o LNH e a doença de Hodgkin, bem como todas as neoplasias derivadas do tecido hematopoiético (tabela 2) (Valli et al., 2002; Vezzali, et al., 2009).

Tabela 2 – Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos nos Animais Domésticos segundo a OMS (Adaptado de Valli et al., 2002).

Tumores do sistema linfóide	
Neoplasias linfóides das células B	Neoplasias linfóides das células T
Neoplasia de células B precursoras	Neoplasia de células T e NK precursoras
Leucemia/ linfoma linfoblástico de células B	Leucemia/ linfoma linfoblástico de células T
Neoplasia de células B maduras	Neoplasia de células T/NK maduras
Leucemia/linfoma linfocítico crónico de células B	Distúrbios de células grandes e granulares: - Leucemia linfocítica crónica de células T ou NK - Leucemia linfoproliferativa de células T grandes granulares
Linfoma linfocítico de tipo intermédio de células B	Neoplasias cutâneas de células T: - Linfoma cutâneo epiteliotrópico/não-epiteliotrópico
Linfoma linfoplasmocítico	Linfoma de células T extranodal/periférico: - Do tipo linfóide ou inflamatório misto
Linfomas foliculares: - Linfoma das células do manto - Linfoma folicular de células centrais do tipo I, II ou III - Linfoma nodal ou esplénico da zona marginal	Linfoma/leucemia de células adultas tipo células T
Linfoma extranodal da zona marginal do MALT	Linfoma angioimunoblástico
Leucemia de <i>hairy cells</i>	Linfoma angiotrópico
- Plasmocitoma indolente ou anaplásico - Mieloma de células plasmáticas	Linfoma intestinal de células T
- Linfoma de células B grandes rico em células T - Linfoma imunoblástico de células grandes - Linfoma difuso de células B grandes - Linfoma tímico de células B grandes (mediastínico)	Linfoma anaplásico de células grandes
Linfoma de células B de alto grau de tipo <i>Burkitt</i>	

Esta classificação da OMS representou um passo bastante importante em oncologia, veterinária, uma vez que permitiu a identificação de várias entidades oncológicas, revistas com base em conhecimentos científicos recentes e critérios de uniformização (Valli et al., 2002; Vail & Young, 2007; Vezzali, et al., 2009).

Este sistema de classificação considera 5 estadios, de acordo com a extensão da doença, sendo cada estadio posteriormente sub-dividido, de acordo com as alterações clínicas

do paciente, conforme descrito na tabela 3. Apesar disso, são necessárias mais investigações e estudos nesta área que demonstra avanços científicos constantes, no intuito de classificar mais especificamente cada tipo de linfoma (Vail & Young, 2007).

Tabela 3 – Estadiamento de LNH no cão, segundo a OMS (Adaptado de Vail & Young, 2007).

Estadio (Inclui localização anatômica):	Localização anatômica:
I – Envolvimento de apenas um linfonodo ou tecido linfóide num único órgão. II – Envolvimento de vários linfonodos numa área regional (com ou sem tonsilas) III – Envolvimento generalizado dos linfonodos (com ou sem estágio III) IV – Envolvimento do fígado ou baço V – Manifestação no sangue ou envolvimento da medula óssea e/ou outros sistemas orgânicos (com ou sem estadio I a IV)	A – Generalizado B – Alimentar C – Tímico D – Cutâneo E – Leucemia (verdadeira) F – Outros
Sub-estadio (adicionar a cada estadio):	
a – Com sinais sistêmicos de doença b – Sem sinais sistêmicos de doença	

1.4. Classificação topográfica do linfoma

1.4.1. Linfoma nodal

O linfoma nodal refere-se a todas as formas de linfoma que afectem 1 ou mais linfonodos, sendo a forma mais comum a multicêntrica (Vail & Young, 2007).

1.4.1.1. Forma multicêntrica

Segundo Jacobs et al. (2002) e Vail & Young (2007), 80% dos cães com linfoma desenvolvem a forma multicêntrica. Esta forma de linfoma distingue-se pela presença de

linfadenopatia generalizada (com aumentos de 5 a 15 vezes o tamanho normal), móvel, não dolorosa, podendo inicialmente estar localizada nos linfonodos sub-mandibulares e pré-escapulares, progredindo para os restantes linfonodos (Nelson & Couto, 2009).

A manifestação secundária mais comum dos linfomas multicêntricos é a infiltração hepato-esplénica, sendo esta associada a casos avançados da doença. Em 27% a 34% dos canídeos afectados existe também envolvimento pulmonar, com infiltração difusa visível no exame radiológico (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

1.4.1.2. Forma mediastínica

O linfoma tímico (ou mediastínico) ocorre em cerca de 5% dos animais com linfoma (Vail & Thamm, 2005).

Esta forma é caracterizada por aumento dos linfonodos crânio-mediastínicos, sendo os sinais clínicos proporcionais à extensão da doença (figura 6) (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

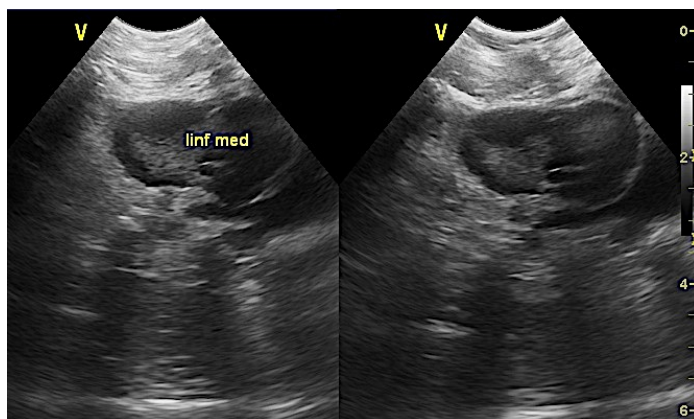


Figura 6 – Imagem ecográfica de linfadenomegália mediastínica num cão com linfoma tímico (Fotografia gentilmente cedida por Dra. Carolina Brito Monteiro).

Cães com linfoma mediastínico podem apresentar sinais respiratórios, incluindo dispneia e abafamento dos sons cardíacos, poliúria e polidipsia, sendo estas duas últimas alterações secundárias a hipercalcémia (Rosenberg et al., 1991; Vail & Young, 2007).

Alguns casos podem ainda manifestar síndrome pré-cava secundário a compressão da veia cava cranial pelo tumor, com edema da cabeça, pescoço e membros anteriores. (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007).

Segundo um estudo realizado por Rosenberg et al. (1991) 43% dos canídeos com linfossarcoma mediastínico apresentavam hipercalcemia.

O tempo médio de sobrevivência associado a este tipo de tumor, com tratamento, ronda os 5 a 8 meses (Turek et al., 2008).

1.4.2. Linfoma extra-nodal

As formas extra-nodais primárias, podem ocorrer em qualquer localização fora do sistema linfático, em órgãos como os olhos, o sistema nervoso central (SNC), o osso, os testículos, a bexiga, o coração e a cavidade nasal (Vail & Young, 2007).

Os sinais clínicos estão normalmente associados à localização e severidade das lesões (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

No caso de linfoma primário do SNC podem ocorrer convulsões, paralisia ou parésia, dependendo se o envolvimento é focal ou multifocal (Couto & Nelson, 1984; Dallman & Saunders, 1986).

No caso de linfoma ocular, pode ser detectada infiltração e espessamento da íris, uveíte, hipopion, hifema, sinéquia posterior e glaucoma (Vail & Thamm, 2005; Swanson, 1990).

Num estudo realizado por Massa et al. (2002), em 102 casos de uveíte, 17% eram secundários ao linfoma.

Num outro estudo, onde foram incluídos 94 cães com linfoma multicêntrico canino, 37% apresentaram alterações compatíveis com uveíte (Krohne et al., 1987).

As alterações como uveíte anterior são normalmente observadas em cães com estadio avançado de doença (estadio V segundo a OMS) (Vail & Young, 2007).

1.4.2.1. Forma alimentar

A forma alimentar de linfoma é a segunda mais diagnosticada, representando 5% a 7% de todos os linfomas caninos (Coyle & Steinberg, 2004; Couto et al., 1998).

O linfoma alimentar ocorre mais frequentemente em machos do que em fêmeas e muitos dos canídeos afectados exibem sintomatologia não específica como perda de peso, anorexia, sinais de má absorção, vômito, diarreia e pan-hipoproteïnemia, sendo esta última um factor de prognóstico negativo (Couto et al., 1989; Nelson & Couto, 2009; Bryan, 2010).

O linfoma alimentar pode surgir na forma focal ou multifocal e ocasionalmente pode ocorrer ruptura da massa intestinal, com peritonite ou obstrução intestinal secundária. O principal diagnóstico diferencial para este tipo de neoplasia é a enterite linfo-plasmocítica, contudo, ao contrário do que ocorre no linfoma alimentar, nestes casos não há envolvimento da camada muscular (Bryan, 2010).

Segundo um estudo realizado por Coyle & Steinberg (2004), onde foram avaliados 44 casos de linfoma alimentar canino, a localização mais frequente foi o intestino delgado, seguindo-se o estômago e o fígado. Este estudo retrospectivo revelou ainda que a forma de linfoma gastrointestinal primário canino mais frequente era a de células T (75% dos casos).

Os tempos médios de sobrevivência para o linfoma alimentar são aproximadamente 4 meses, com realização de quimioterapia (Turek et al., 2008).

1.4.2.2. Forma cutânea

Apesar do linfoma ser a neoplasia do sistema hematopoiético mais diagnosticada no cão, a forma cutânea de linfoma é pouco frequente, representando apenas 3 a 8% de todos os linfomas nesta espécie (Bouchard, 2000).

O linfoma cutâneo é uma neoplasia espontânea da pele e mucosas, que ocorre especialmente em animais idosos, não havendo uma predisposição racial para o seu aparecimento (Bouchard, 2000; Vail & Young, 2007).

Existem vários nomes para esta neoplasia, sendo denominada por alguns autores como o “grande imitador”, mas na verdade não são mais do que o reflexo das diferentes manifestações clínicas existentes para a mesma entidade (*Mycosis fungoides*, síndrome de

Sézary, Reticulose pagetóide e doença de Worringer-Kolopp) (Bouchard, 2000; Fontaine et al., 2009).

As lesões podem ser focais ou múltiplas, ligeiras, equizematosas, em forma de placas ou mesmo tumores nodulares de grandes dimensões. As lesões podem ou não ser pruríticas, surgindo em qualquer localização (figura 7) (Vail & Thamm, 2005).

O termo *Mycosis fungoides* surgiu pela aparência em cogumelo destes tumores nos humanos, contudo, o termo linfoma epiteliotrópico parece ser mais adequado para caracterizar populações anormais de linfócitos localizadas na epiderme (figura 8) (Bouchard, 2000).

Assim, o linfoma canino epiteliotrópico tem origem nas células T e pode ser definido como uma neoplasia espontânea da pele e membranas mucosas, que ocorre especialmente em cães idosos (média de idade 11 anos) (Moore et al., 1994).



Figura 7 – Linfoma cutâneo, presença de múltiplas lesões na região dorsal do pescoço (Fotografia gentilmente cedida por Dr. Hugo Gregório).

O linfoma cutâneo pode ainda ser caracterizado segundo o imunofenótipo em origem nas células B ou T, sendo este último raro e associado a um pior prognóstico, com tempos médios de sobrevivência de alguns meses a 2 anos de vida, demonstrando uma baixa resposta ao tratamento (Fontaine, 2009).



Figura 8 – Linfoma cutâneo de células T, forma típica em "Donut" (Fotografia gentilmente cedida por Dr. Hugo Gregório).

1.4.3. Linfoma indolente

A classificação de um linfoma como indolente baseia-se essencialmente numa associação entre a classificação morfológica e o comportamento clínico do linfoma, tendo em conta a progressão da doença e a sua resposta ao tratamento. Todos os tipos de linfoma podem apresentar este carácter, representando aproximadamente 29% de todos os linfoma no cão (Flood-Knapik et al., 2012).

Segundo a caracterização histopatológica da OMS, o linfoma indolente pode ser caracterizado no tipo folicular, zona do manto, zona marginal e o linfoma T de células pequenas. Os linfomas indolentes de células B e T partilham uma taxa mitótica baixa e uma velocidade de progressão clínica lenta. Em estadios avançados, os linfomas indolentes apresentam as mesmas características citomorfológicas do linfoma não indolente, contudo, perdem a arquitectura folicular. Por este motivo, a natureza indolente pode não ser evidente na avaliação histológica (Flood-Knapik et al., 2012).

Os linfomas indolentes aparecem geralmente após um longo período de hiperplasia benigna e tendem a apresentar esclerose medular e capsular (Valli et al., 2006; Flood-Knapik et al., 2012).

Num estudo recente, onde foram analisados 75 linfomas indolentes em cães, sendo os mais frequentes, os do sub-tipo histológico interfolicular e da zona marginal com 61.7% e 25%, respectivamente, demonstrando uma maior sobrevivência quando eram utilizados protocolos quimioterápicos baseados no CHOP (Flood-Knapik et al., 2012).

1.5. Diagnóstico

1.5.1. História e sinais clínicos

O diagnóstico de linfoma é geralmente simples e intuitivo, contudo, os sinais clínicos são extremamente variáveis, dependendo não só da localização da doença e sua progressão como também da extensão da lesão e envolvimento orgânico (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007).

Na maioria dos casos, os cães com linfoma multicêntrico apresentam-se à consulta hígidos, (sub-estadio “a” segundo a OMS), embora, 20% a 40% dos casos tenha história de perda de peso, anorexia, letargia e episódios febris (sub-estadio “b” segundo a OMS) com linfadenopatia generalizada, não dolorosa e não associada a febre (figura 9) (Vail & Young, 2007; Nelson & Couto, 2009; Bryan, 2010).



Figura 9 – Linfadenopatia pré-escapular num cão com linfoma multicêntrico (seta) (Fotografia gentilmente cedida por Dr. Joaquim Henriques).

Pode verificar-se edema sub-cutâneo por compromisso da drenagem linfática, sendo os restantes sintomas extremamente variáveis, dependendo dos órgãos afectados e da presença ou não de síndromes para-neoplásicas (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007; Couto & Nelson, 2009).

No que diz respeito ao exame físico, este deve ser detalhado, procurando alterações em todas as regiões anatómicas, incluindo o exame de exploração rectal. Aproximadamente 50% dos casos apresentam esplenomegália, podendo também estar presentes alterações como poliúria e polidipsia, remetendo-nos para prováveis alterações renais ou hipercalcémia. Na presença de febre, anemia, palidez, trombocitopénia, petéquias ou linfócitos atípicos no esfregaço de sangue, devemos suspeitar de envolvimento da medula óssea (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Quanto ao linfoma alimentar, os sintomas são variáveis, desde ausência de manifestação da doença a perda de peso e diarreia. Em casos iniciais pode mesmo ser difícil de distinguir uma enterite linfoplasmocítica e um linfoma alimentar (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Outros achados sugestivos de linfoma, neste caso durante a auscultação torácica, incluem taquipneia e/ou dispneia, bem como abafamento dos sons cardíacos, sugerindo massas mediastínicas ou derrame pleural, remetendo-nos para um possível linfoma mediastínico (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007).

Durante o exame oftalmológico, devem ser procuradas alterações como infiltrados oculares, uveíte, hifema ou hemorragia da retina (Vail & Thamm, 2005).

No caso de estarmos perante um caso de linfoma do SNC pode haver história de convulsões, paralisia ou parésia, dependendo se o envolvimento é focal ou multifocal e da progressão da doença (Couto & Nelson, 1984; Dallman & Saunders, 1986).

Por último, na forma cutânea, existe uma grande diversidade de sintomas, podendo haver lesões focais, multifocais, generalizadas e por vezes pruríticas (Jacobs et al., 2002; Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

1.5.2. Alterações laboratoriais

Hematologia

A maior parte dos cães com linfoma apresenta valores normais de hemograma no momento do diagnóstico, contudo, por vezes surgem alterações como anemia normocítica e normocrômica moderada, (atribuída a doença crónica) (Vail & Young, 2007).

Esta alteração pode ser observada em cerca de um terço dos cães com linfoma, tratando-se do síndrome para-neoplásico mais frequentemente associado a esta neoplasia (Jacobs et al., 2002).

No caso de invasão da medula óssea, pode haver alterações como rubricitose, contudo, raramente se verifica anemia hemolítica (Madewell & Feldman, 1980; Jacobs et al., 2002).

Cerca de 25% a 40% dos cães com linfoma apresentam alterações como neutrofilia, contudo, linfocitose e linfopénia são observadas em apenas 20% dos casos, respectivamente. Por outro lado, a detecção de linfócitos neoplásicos em circulação é um fenómeno bastante raro (Jacobs et al., 2002).

Quanto às plaquetas, podem ser observadas alterações como trombocitopénia em 30% a 40% dos cães com linfoma, apesar da ocorrência de hemorragia espontânea ser extremamente rara (Jacobs et al., 2002).

Bioquímicas

Em animais assintomáticos, o perfil bioquímico básico (ALT, FAS, GGT, UREIA, CREA, GLU, ALB, PT) está frequentemente normal, contudo, e dependendo da extensão das lesões, este pode revelar alguns indicadores de falha orgânica, como alterações da função renal, hepática ou outras (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007).

A hipercalcémia é a alteração electrolítica mais frequentemente associada ao linfoma, sobretudo no imunofenótipo T, estando presente em aproximadamente 10% dos casos (Meuten et al., 1983).

Urianálise

No que diz respeito à urianálise, esta vai-nos dar informação relativa à função renal e trato urinário. É importante referir que isoestenúria em cães com azotémia e hipercalcémia, por si só não justifica uma patologia renal, visto que os níveis elevados de cálcio interferem com as capacidades de concentração tubular, devido a falhas no controlo da hormona anti-diurética (ADH) (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007).

1.5.3. Citologia e histologia

Na maioria dos casos, o diagnóstico de linfoma realiza-se facilmente a partir da avaliação de amostras retiradas através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodos ou de outros tecidos afectados. Devem ser evitados linfonodos de regiões mais reactivas como os sub-mandibulares, sendo os gânglios pré-escapulares ou poplíteos os mais indicados (Vail & Thamm, 2005; Vail & Young, 2007).

Numa citologia típica, a maioria das células são linfóides e de grandes dimensões (maiores do que neutrófilos) podendo apresentar citoplasma e nucléolo basofílico visível ou cromatina fina com nucléolo não distinguível (figura 10). Nos casos de hiperplasia reactiva marcada em que se observam células linfóides de grandes dimensões poderá ser difícil de as diferenciar de um processo neoplásico, embora nestes casos a população celular seja maioritariamente heterogénea. Nos casos dúbios é aconselhado realizar outros exames complementares de diagnóstico como a avaliação histopatológica da lesão (Vail & Young, 2007).

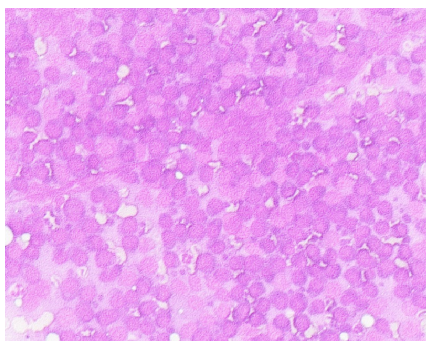


Figura 10 – Imagem citológica de um linfonodo de um cão com linfoma. Corado com Hematoxilina & Eosina, ampliação de 40x (Fotografia gentilmente cedida por Dr. Joaquim Henriques).

No que diz respeito à histopatologia, deverá ser retirado e enviado para análise um linfonodo completo ou parcial, incluindo a cápsula. A amostra deverá ser armazenada e fixada em formol e submetida ao patologista para análise histopatológica (Vail & Young, 2007).

No caso de estar presente uma hiperplasia linfóide, pode ocorrer colonização da cápsula do linfonodo, contudo, os seios periféricos permanecem intactos. Em contraste, em caso de neoplasia, os seios periféricos estão normalmente destruídos, particularmente no linfoma de alto grau (figura 11) (Jacobs et al., 2002).

As técnicas de ultrassonografia podem ser utilizadas para realizar biópsias ecoguiadas ou PAAF, sobretudo quando se trata de órgãos como fígado, baço ou linfonodos abdominais (Llabrés-Díaz, 2004; Vail & Young, 2007).

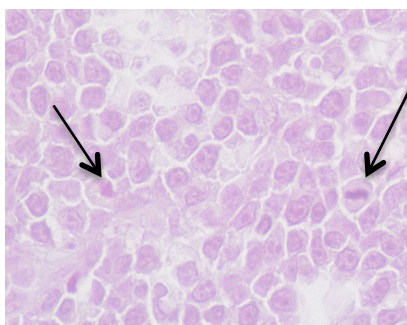


Figura 11 – Imagem de um corte histológico proveniente de um linfonodo de um cão com linfoma, onde se observam algumas figuras mitóticas (setas) ampliação de 100x (Fotografia gentilmente cedida por Dr. Joaquim Henriques).

1.6. Imunofenotipagem

Um dos métodos mais utilizados para distinguir uma população de linfócitos neoplásica de uma população de linfócitos reactivos é a imunofenotipagem, contudo, o diagnóstico de linfoma através desta técnica apresenta sérias limitações (Avery & Avery, 2004).

Esta é uma técnica que permite diferenciar o grau de diversidade dos linfócitos dentro de uma população em CD3 ou CD79, caracterizando assim as neoplasias como de origem nas células T ou nas células B, respectivamente. Uma população de linfócitos fenotipicamente homogénea sugere um processo neoplásico em vez de reactivo (Avery & Avery, 2004; Argyle et al., 2008; Williams et al., 2008).

Num trabalho realizado por Thilakaratne et al. (2010), o fenótipo foi identificado com base em rearranjos clonais detectados por PCR (reação em cadeias de polimerase) nas amostras recolhidas, onde se concluiu que a presença de clonalidade do gene da Imunoglobulina (Ig) indicava fenótipo de células B, enquanto que a detecção de genes receptores de células T (TCR) rearranjados clonalmente indicavam fenótipo de células T. A técnica de PCR representa assim um método alternativo de caracterização do fenótipo em canídeos com linfoma, tendo sido utilizada para complementar o diagnóstico, estadiamento, e estabelecer o prognóstico de casos de linfoma (Williams et al., 2008; Thilakaratne et al., 2010).

Dobson et al. (2001), demonstrou que o imunofenótipo não estava associado à resposta tumoral, contudo, havia uma forte influência sobre a sobrevivência do paciente, sendo o fenótipo de células T associadas com tempos livre de doença significativamente menores. Os resultados publicados demonstraram ainda que a maioria dos linfomas eram correspondentes ao imunofenótipo de células B.

Existem actualmente laboratórios que realizam a técnica de imunofenotipagem através de citometria de fluxo, no intuito de determinar o prognóstico de doenças linfoproliferativas caracterizadas por linfocitose. Uma das vantagens desta técnica é o facto de ser mais rápida comparativamente à citologia ou histologia, podendo demonstra-se de maior aplicabilidade na clínica diária. Esta afirmação é válida sobretudo para a espécie canina onde a natureza de células neoplásicas num linfonodo tende a ser semelhante, ao contrário do que ocorre na espécie felina e equina (Williams et al., 2008).

Por outro lado, é possível analisar uma grande quantidade de células ao mesmo tempo, com critérios estatísticos bastante rigorosos (Gibson et al., 2004).

Independentemente da técnica utilizada, podemos afirmar que o conhecimento do imunofenótipo tem demonstrado um papel importante na caracterização e prognóstico de cães com linfoma.

1.7. Imagiologia

A radiografia, ultrassonografia ou tomografia axial computadorizada (TAC) constituem ferramentas úteis para a abordagem diagnóstica diferencial e estadiamento clínico de linfoma, determinando a progressão da doença. Os resultados da investigação imagiológica são, na

maioria dos casos, extremamente valiosos, podendo afectar o prognóstico e a decisão terapêutica (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Em todos os pacientes oncológicos e para um estadiamento adequado da doença, devem ser realizados 3 planos radiográficos de tórax, incluindo uma vista em decúbito lateral esquerdo, direito e uma vista ventro-dorsal (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

A avaliação de radiografias torácicas e abdominais pode ser importante para determinar a progressão da doença e para completar o processo de estadiamento clínico (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Segundo alguns estudos publicados, cerca de 60% a 75% dos canídeos com linfoma multicêntrico apresentam lesões no exame radiográfico de tórax. Um terço dos animais apresenta evidência de infiltrados pulmonares e dois terços tem linfadenopatia torácica (linfonodos esternais e traqueo-brônquicos) com aumento do mediastino cranial (MacEwen et al., 1981; Hawkins et al., 1993; Blackwood et al., 1997).

Segundo um trabalho de Starrak et al. (1997), 20% dos canídeos com linfoma apresentavam linfadenopatia do mediastino cranial, que estava relacionado com um factor de prognóstico negativo, em relação ao tempo de remissão e ao tempo de sobrevida (Vail & Thamm, 2005).

No que diz respeito ao exame imagiológico abdominal, aproximadamente 50% dos casos revelam aumento dos linfonodos mesentéricos e/ou sub-lombares (ilíacos), bem como do baço ou fígado (figura 12) (Blackwood et al., 1997; Starrak et al., 1997).

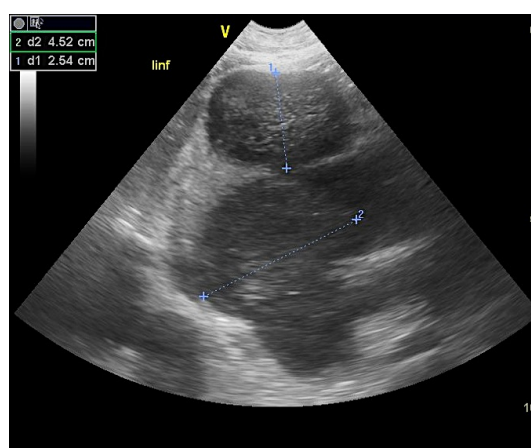


Figura 12 – Imagem ecográfica de linfadenomegália mesentérica num cão com linfoma esplênico (Fotografia gentilmente cedida por Dra. Carolina Brito Monteiro).

Em termos práticos e segundo Vail & Young (2007), nos casos típicos de linfoma multicêntrico canino, a investigação imagiológica limita-se à realização de planos radiográficos torácicos, pois não existe diferença no que diz respeito ao prognóstico de cães com estadio III em relação aos que apresentam estágio IV da doença (ex: envolvimento do fígado ou baço). Por outro lado, a presença de linfadenopatia crânio-mediastínica apresenta um elevado factor de prognóstico.

No caso de estarem presentes sinais clínicos alusivos a patologia abdominal, deve ser realizada uma investigação imagiológica mais pormenorizada, nomeadamente com o auxílio de ultrassonografia, na qual, caso haja indicação, podem ser retiradas amostras eco-guiadas para complementar o diagnóstico. Estas técnicas são especialmente úteis para o diagnóstico de linfoma hepato-esplénico e alimentar (figura 13) (Fry et al., 2003; Pennincket al., 2003; Cienava et al., 2004).

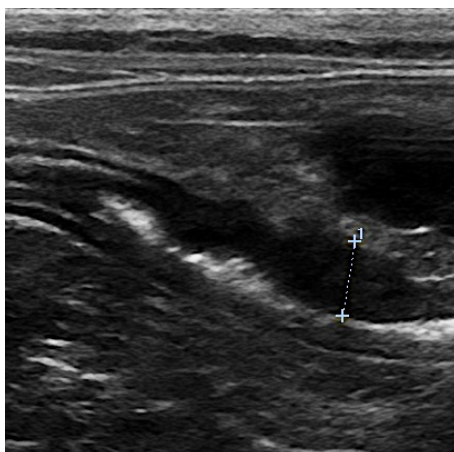


Figura 13 – Imagem ecográfica de um linfoma alimentar no intestino delgado de um cão com linfoma (Fotografia gentilmente cedida por Dra. Carolina Brito Monteiro).

1.8. Diagnósticos diferenciais de acordo com o tipo de linfoma

Virtualmente, o linfoma pode surgir em qualquer órgão do corpo, com ou sem linfadenopatia periférica e com possível invasão simultânea de outros órgãos. Assim, é necessário incluir o linfoma na lista de diagnósticos diferenciais de qualquer alteração

orgânica que seja possivelmente compatível com o mesmo (tabela 4). Devemos ter sempre presente que o linfoma pode mimetizar inúmeras patologias (Vail, 2011).

Tabela 4 – Diagnósticos diferenciais consoante o tipo de linfoma (Adaptado de Vail, 2011).

Localização anatômica	FC*	Sinais clínicos	Diagnóstico diferencial
Multicêntrico (nodal)	80%	- Linfadenopatia não dolorosa. Sinais não específicos (letargia, anorexia, perda de peso). ± Hepato e esplenomegália.	- Infecções disseminadas - Alterações imuno-mediadas - Tumores metastizados em linfonodos - Outros tumores do sistema hematopoiético
Alimentar	7%	- Sinais não específicos relacionados com o TGI (vômito, diarreia e perda de peso). Massa abdominal/ansas intestinais espessadas possivelmente palpáveis.	- Enterites primárias e secundárias severas. - Enterites infiltrativas (enterite linfoplasmocítica) - Outros tumores GI, corpo estranho, linfangiectasia, ulceração gastro-intestinal
Cutâneo	6%	- Generalizado ou focal. Alterações cutâneas inespecíficas (alopécia a formas ulcerativas espessadas, eritematosas e lesões em placas.	- Dermatite infecciosa (ex: pioderma avançado) - Dermatite imuno-mediada (penphigus) - Outras neoplasias cutâneas
Mediastínico	3%	- Dispneia/taquipneia devido ao efeito massa ou efusão pleural. - Síndrome pré-cava (edema da cabeça).	- Outras neoplasias (timoma, quemodectoma, carcinomatose pleural, granulomatose linfomatoide pulmonar) - Doença infecciosa (doença granulomatosa, piotórax) - Falha cardíaca, quilotórax, hemotórax)
Extra-nodal	3%	- Consoante a localização. Inclui SNC, osso, coração, cavidade nasal, ocular.	- Variável, dependendo do órgão ou sistema envolvido
*FC – Frequência de casos.			

1.9. Tratamento do linfoma

Visto que o linfoma é uma doença sistêmica, é necessário realizar quimioterapia sistêmica na maioria dos casos. Estima-se que 80% a 90% dos cães atinjam valores médios de sobrevivência de 12 meses com a realização de protocolos específicos constituídos por vários fármacos (Vail & Young, 2007; Argyle, 2008).

Existem vários protocolos quimioterápicos, e ao longo dos anos têm sido realizados vários estudos no intuito de estudar qual a associação de fármacos que apresenta melhores resultados no tratamento do linfoma. Estes vão desde a utilização de um único agente à combinação de vários fármacos, sendo o Wisconsin Madison (WM) o protocolo mais utilizado actualmente e o que apresenta melhores taxas de remissão e sobrevivência (Vail & Young, 2007).

A abordagem terapêutica a um paciente com linfoma é determinada não só pelo estadio e sub-estadio da doença, pela presença ou ausência de doença para-neoplásica, pela condição física do paciente e compromisso do proprietário, como também pela experiência do médico veterinário e acessibilidade aos fármacos (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Sem tratamento, a esperança média de vida da maioria dos cães é inferior a 10 semanas; por sua vez, animais que realizam quimioterapia vivem entre 6 a 12 meses, podendo este valor ser superior em alguns casos. Os animais adultos tendem a sobreviver mais tempo do que os jovens (Jacobs et al., 2002; Turek et al., 2008).

Os protocolos constituídos por vários fármacos apresentam uma eficácia superior no tratamento do linfoma, demonstrando maiores tempos de remissão, comparativamente aos protocolos de agente único, contudo, são mais dispendiosos e clinicamente mais agressivos. Os protocolos de agente único são normalmente considerados protocolos paliativos, excepto os que utilizam a doxorrubicina, visto que apresentam uma resposta e tempos de remissão inferiores, comparativamente aos protocolos de múltiplos agentes, contudo, são menos dispendiosos, menos tóxicos e requerem menos visitas ao médico veterinário (Vail & Young, 2007).

1.9.1. Tratamento cirúrgico

Embora a maioria dos casos de linfoma sejam da forma multicêntrica, estando indicada a realização de quimioterapia sistêmica, existem algumas situações específicas em que a cirurgia faz parte do plano de tratamento do linfoma no cão. Estes casos ocorrem raramente e representam sobretudo as formas solitárias de linfoma (estádio I), ou extra-nodais solitárias, como por exemplo alguns linfomas orais, alimentares, oculares, compressivos do SNC ou cutâneos (figura 14) (Vail & Young, 2007; Nelson & Couto, 2009).

Nesses casos, é extremamente importante investigar o possível envolvimento multicêntrico, antes de partir para uma abordagem terapêutica cirúrgica local, visto que grande parte dos linfomas que aparentemente são solitários apresentam algum grau de envolvimento sistêmico (Vail & Young, 2007; Nelson & Couto, 2009; Bryan, 2010).

Os potenciais benefícios da esplenectomia em casos de linfoma esplênico, permanecem desconhecidos, resultando em taxas de sobrevivência de até 14 meses. Pode haver algumas complicações, nomeadamente, morte por coagulação intravascular disseminada (CID), sobretudo nas semanas seguintes à cirurgia (Brooks et al., 1987).

A esplenectomia deve ser ponderada, em casos específicos de linfomas solitários não responsivos à quimioterapia, ou como tratamento de trombocitopênia persistente e anemia hemolítica não controlável em cães com linfoma (Brooks et al., 1987; Vail & Young, 2007; Couto & Nelson, 2009).

Segundo alguns autores, a cirurgia está indicada quando o tumor em questão é fácil de retirar e desde que o procedimento cirúrgico não implique riscos consideráveis para o paciente, devendo este ser posteriormente tratado com quimioterapia (Nelson & Couto, 2009).



Figura 14 – Fotografia intra-cirúrgica de uma esplenectomia num cão com linfoma esplênico (Fotografia original).

1.9.2. Tratamento médico

1.9.2.1. Protocolos mono-fármaco.

O tratamento paliativo mais comum baseia-se na utilização de um único agente quimioterápico, associado ou não a terapia com glucocorticóides. Este tipo de abordagem terapêutica é variável, podendo ser realizada apenas prednisolona, lomustina, clorambucil ou a combinação de ambos (prednisolona e um agente citotóxico) (Turek et al., 2008).

Apesar desta modalidade terapêutica apresentar menores taxas de remissão, esta é escolhida por alguns proprietários, sobretudo pela simplicidade e conveniência do tratamento e pela diminuição de custos.

A doxorubicina é o fármaco mais eficaz, quando usado isoladamente, no tratamento do linfoma (Turek et al., 2008; Vali, 2011).

Prednisolona

A prednisolona tem sido associada a uma remissão completa (RC) ou parcial em cerca de 50% dos canídeos, apresentando tempos de remissão e de sobrevida mais curtos, de 2 a 4 meses, com melhorias clínicas significativas após a sua administração (Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008).

Um dos problemas decorrentes do uso isolado de glucocorticóides é o facto de estes poderem influenciar negativamente a duração da remissão e a resposta a terapias posteriores no caso de se introduzir um protocolo quimioterápico mais agressivo (Turek et al., 2008), contudo, o mecanismo causador desta resistência às drogas quimioterápicas permanece sob investigação (Legendre, 2007).

A dose de prednisolona é de 2 mg/kg PO, uma vez por dia durante 7 dias, seguida de 1 mg/kg PO uma vez por dia (Turek et al., 2008).

Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) é o fármaco mais eficaz, quando os proprietários pretendem um protocolo mais curto e económico. Se utilizada isoladamente, proporciona taxas de remissão na ordem dos 70% com sobrevivências médias de 5 a 7 meses (Vali, 2011).

A DOX deve ser administrada por via endovenosa lenta a cada 21 dias num total de 5 doses ao longo de 15 semanas, diluindo a dose a administrar em solução salina (NaCl 0.9%) (Turek et al., 2008; Bryan, 2010).

A dose recomendada é de 30 mg/m² EV, sendo que em cães com peso inferior a 10 kg a dose é de 1 mg/kg. Esta redução na dose deve-se ao aumento da toxicidade quando a dosagem é feita com base na superfície corporal (Lana, 2003).

Visto que este fármaco apresenta toxicidade cardíaca, os cães que apresentem doença cardíaca persistente ou diminuição da contractilidade cardíaca não devem realizar tratamento com este fármaco, podendo este ser substituído por fármacos como a epirrubicina ou mitoxantrona (Turek et al., 2008; Kitchell, 2005; McKnight, 2003).

A dose máxima cumulativa da DOX é de 180 a 240 mg/m², sendo que doses acima deste limite aumentam a probabilidade de insuficiência cardíaca (Kisseberth, 2003).

Lomustina

A lomustina, apesar de ser normalmente utilizada em situações de relapso de linfoma e para linfoma cutâneo epiteliotrópico (*Mycosis fungoides*), pode ser utilizada numa abordagem terapêutica de agente único se o proprietário do animal pretender um tratamento mais simples e conveniente, no entanto, este deve ser alertado para um menor tempo de sobrevivência, em média de 3 meses (Moore et al., 1999).

Este fármaco é normalmente utilizado na dose de 65 a 70 mg/m² PO a cada 3 semanas, até ocorrer progressão de doença ou ser detectada hepatotoxicidade (Turek et al., 2008).

Clorambucil

O clorambucil apresenta uma eficácia inferior na indução da remissão quando comparado com a ciclofosfamida. Duma maneira geral é utilizado em doses variáveis (0,1 mg/kg e 2-8 mg/m²) (Lana, 2003).

1.9.2.2. Protocolos de múltiplos fármacos

A terapia mais indicada para o linfoma baseia-se na utilização de vários agentes quimioterápicos, que segundo um protocolo adequado, oferece maiores taxas de remissão e sobrevivência (Turek et al., 2008; Vail & Young, 2007).

Apesar da vasta gama de fármacos no mercado, este tipo de protocolos utiliza sobretudo as seguintes drogas: Prednisolona, Vincristina (Oncovin[®]), Ciclofosfamida (Cytosan[®]) e Doxorubicina (Adriamycin[®]) (Turek et al., 2008; Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Os fármacos de segunda linha são a L-asparaginase, a Vinblastina, a Actinomicina-D, a Mitoxantrona, o Clorambucil, o Metotrexato, a Lomustina, a Citosina arabinosido e a Gemcitabina (Vail & Young, 2007).

Estes fármacos podem ser incluídos no tratamento do linfoma, em protocolos como ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e prednisolona (COAP), lomustina (CCNU) ou mecloretamina, vincristina, procarbazona e prednisolona (MOPP) tanto numa abordagem inicial, como após a indução com os fármacos de primeira linha, contudo, não apresentam grandes vantagens comparativamente aos protocolos COP e CHOP, daí serem menos utilizados (Rassnick et al., 2007; Hosoya et al., 2007).

Na abordagem terapêutica do linfoma, os principais objectivos da quimioterapia são induzir uma primeira remissão completa (RC) e de longa duração (superior a 6 meses) (fase de *indução*); de seguida, reinduzir uma remissão após ocorrer relapso do tumor após a fase de remissão (*reindução*) e finalmente, induzir remissões quando a neoplasia falha na resposta aos protocolos convencionais utilizados na *indução* ou *reindução*, denominando-se fase de *resgate* (Vail & Young, 2007).

Os protocolos mais utilizados são o COP (ciclofosfamida, vincristina e prednisolona) e o CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisolona e doxorubicina) (Turek et al., 2008; Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

COP

O COP é um protocolo bem tolerado pela maioria dos pacientes caninos e eficaz no tratamento do linfoma induzindo uma RC em 60% a 70% dos canídeos com linfoma multicêntrico e taxas de sobrevivência médias de 6 a 7 meses (Argyle, 2008; Turek et al., 2008).

Este protocolo foi descrito por Mellanby et al. (2002) como o mais utilizado por veterinários de primeira opinião em Inglaterra.

O COP, pode ser de baixa dose, utilizando Vincristina (VCR) na dose de 0.5-0.7 mg/m², semanalmente durante 8 semanas e na semana 10; Ciclofosfamida na dose de 50 mg/m², dia sim, dia não durante as 8 semanas e na semana 10 de tratamento e prednisolona na dose de 2mg/Kg, uma vez por dia durante 7 dias, passando para 1mg/Kg dia sim, dia não (Turek et al., 2008).

Por outro lado, no protocolo COP de alta dose, a VCR mantém-se na mesma dose mas durante 4 semanas consecutivas, repetindo-se na semana 7 e na semana 10. A ciclofosfamida aumenta a dose para 250 mg/m², uma vez a cada 3 semanas e a prednisolona mantém-se como no protocolo anterior (Tabela 5) (Turek et al., 2008).

Tabela 5 – Protocolo COP de alta e baixa dose (Adaptado de Turek et al., 2008).

Semana	Vincristina		Ciclofosfamida		Prednisolona	
1	•	•	•	•	•	•
2	•	•	•		•	•
3	•	•	•		•	•
4	•	•	•	•	•	•
5	•		•		•	•
6	•		•		•	•
7	•	•	•	•	•	•
8	•		•			•
9						•
10	•	•	•	•	•	•
• COP de baixa dose – Na 8ª semana, as sessões reduzem para a cada 2 semanas durante 4 meses. Se passado 6 meses se verificar RC, as sessões passam a ser a cada 3 semanas até 1 ano. • COP de alta dose – Na 4ª semana, inicia-se um ciclo de VCR e ciclofosfamida, de 3 em 3 semanas, até atingir 1 ano. Depois, cada ciclo realiza-se de 4 em 4 semanas, por mais 6 meses.						

CHOP

Apesar do COP ser um protocolo razoável em termos de combinação de fármacos, foi claramente estabelecido que os melhores protocolos incluem a DOX (Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008).

Este tipo de protocolos resulta, na maioria dos casos, em taxas de remissão de 80% a 90% e tempos de sobrevivência média de 12 meses (Turek et al., 2008).

Cerca de 20% a 25% dos cães vive 2 anos ou mais após iniciar o tratamento com o protocolo CHOP (Vail & Young, 2007).

Apesar de a maioria destes protocolos incluírem a L-asparaginase numa fase inicial de tratamento, estudos publicados indicam que não existe aumento na taxa de remissão, velocidade de atingir remissão ou duração da primeira remissão clinicamente relevantes, e por esse motivo, esta droga é normalmente utilizada para situações de resgate (Jeffreys et al., 2005).

Tal como ocorre no COP, o protocolo CHOP pode ser de baixa ou alta dose, e de curta ou longa duração (Tabela 6 e 7). Um exemplo de um protocolo baseado no CHOP é o da Universidade de Wisconsin Madison (U-WM) (Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008).

Tabela 6 – Protocolo CHOP curto, de 19 semanas, da universidade de Wisconsin-Madison (Adaptado de Turek et al., 2008).

	Semana															
Protocolo	1	2	3	4	6	7	8	9	11	12	13	14	16	17	18	19
Vincristina (0.5-0.7 mg/m² IV)	X		X		X		X		X		X		X		X	
Ciclofosfamida (250 mg/m² PO dividido em 2-4 dias)		X				X				X				X		
Doxorrubicina ^a (30 mg/m² ou 1 mg/Kg se <10Kg IV)				X				X				X				X
Prednisona ^b	X	X	X	X	^a Administrar em 30 ml de solução salina 0.9%, durante 30 minutos ^b 2 mg/Kg PO q24h, 7 dias; 1.5 mg/Kg PO q24h, nos 7 dias seguintes; 1 mg/Kg PO q24h nos 7 dias seguintes e 0.5 mg/Kg PO q24h nos 7 dias seguintes											

Neste protocolo, a quimioterapia pode ser descontinuada à semana 19 de tratamento, no caso do animal se encontrar em RC. Após descontinuar a quimioterapia, os cães devem ser avaliados mensalmente, com a realização de um exame físico, procurando alterações como linfadenomegália ou outras alterações que indiquem progressão da doença e saída de remissão (Vali, 2011).

Outra alternativa do protocolo CHOP é a realização de quimioterapia durante 25 semanas em vez do protocolo de U-WM de 19 semanas acima referido, como descrito na tabela 7.

Tabela 7 – Protocolo CHOP longo, de 25 semanas, da universidade de Wisconsin-Madison (Adaptado de Bryan, 2008).

	Semana															
Protocolo	1	2	3	4	6	7	8	9	11	13	15	17	19	21	23	25
L-Asparaginase (10.000 UI/m ² IM/SC)	X															
Vincristina (0.7 mg/m ² IV)	X		X		X		X		X		X		X		X	
Ciclofosfamida (250 mg/m ² PO dividido em 4 dias)		X				X				X				X		
Doxorrubicina ^a (30 mg/m ² ou 1 mg/Kg se <10Kg IV)				X				X				X				X
Prednisona ^b	X	X	X	X	^a Administrar em 30 ml de solução salina 0.9%, durante 30 minutos ^b 2 mg/Kg PO q24h, 7 dias; 1.5 mg/Kg PO q24h, nos 7 dias seguintes; 1 mg/Kg PO q24h nos 7 dias seguintes e 0.5 mg/Kg PO q24h nos 7 dias seguintes											

Ao longo dos últimos anos têm sido estudados vários protocolos na tentativa de avaliar o papel da fase de manutenção no tratamento do linfoma (Chun et al., 2000; Moore et al., 2001; Garrett et al., 2002; Simon et al., 2006).

Assim, Garrett et al. (2002) verificaram que uma versão modificada do protocolo U-WM sem fase de manutenção, apresentava uma RC e resultados no tempo de sobrevivência semelhantes a um protocolo idêntico, mas com uma fase de manutenção prolongada. Esta abordagem terapêutica foi bem tolerada pelos animais, encontrando-se 92% em RC ao fim dos 6 meses de tratamento. Após a recidiva, a administração do mesmo protocolo para a reindução permitiu que 100% dos cães entrassem na segunda remissão.

Deste modo, Garrett et al. (2002) afirmaram que em protocolos que conjugam agentes múltiplos incluindo a DOX, a fase de manutenção não tem vantagens significativas na sobrevivência dos pacientes.

Mais recentemente foi estudado um outro protocolo CHOP de 12 semanas, sem fase de manutenção, numa tentativa não só de avaliar a sua eficácia e toxicidade, como também de

limitar os custos e a duração da terapêutica. A RC obtida foi em cerca de 76% dos cães e a duração média da primeira remissão foi de 243 dias. Apesar dos outros protocolos apresentarem tempos de remissão superiores, os resultados deste estudo suportam, mais uma vez, a conclusão de que a terapia de manutenção não traz vantagens na duração da primeira remissão ou o tempo de sobrevivência dos cães com linfoma, comparativamente aos protocolos sem esta fase de tratamento (Simon et al., 2006).

No mesmo âmbito, Chun (2009b), afirma que o uso de fase de manutenção prolongada já não está recomendado, pois esta fase representa um custo mais elevado, com maior toxicidade e mais probabilidade de resistência aos fármacos.

Um outro protocolo CHOP bem tolerado pelos pacientes caninos, sem fase de manutenção é o que utiliza apenas 19 semanas de tratamento, tendo sido também usado com êxito por alguns clínicos (Vail & Young, 2007).

No caso de se tratar de um linfoma extra-nodal, como o caso do SNC, os protocolos têm de ser adaptados relativamente ao protocolo CHOP convencional, adicionando quimioterápicos como a lomustina ou a citosina arabinosido, no intuito de atravessarem a barreira hematoencefálica (Vail & Young, 2007; Rassnick, 2007).

Em casos de linfoma cutâneo pode ser utilizado como protocolo inicial o CHOP, contudo, pode-se recorrer a alguns fármacos como a lomustina e retinóides como a isotretinoína e etretinato, no caso de falha à quimioterapia inicial ou de relapso do tumor (Vail & Young, 2007).

No caso de se optar pela terapia com retinóides, deve-se tomar especial atenção à toxicidade (White et al., 1993).

Num trabalho recente, Fontaine et al. (2009), refere que os protocolos mais promissores para o linfoma cutâneo são os que usam Lomustina, sendo a dosagem recomendada para o linfoma de células-T 60-70 mg/m² PO, uma vez a cada 3 semanas, com uma média de 4 tratamentos.

1.9.2.3. Protocolos de resgate e re-indução

A maioria dos canídeos em tratamento para o linfoma, que atingem a remissão, relapsam ou apresentam recidiva do tumor. Este acontecimento representa normalmente o

desenvolvimento de clones tumorais resistentes à quimioterapia, que sobreviveram ao tratamento inicial (Vail & Young, 2007).

Estas células denominam-se clones MDR (resistência a múltiplas drogas), onde se incluem as células que eram resistentes inicialmente ou as que se tornaram resistentes depois da exposição a determinados agentes quimioterápicos (Vail & Young, 2007).

Numa primeira situação de relapso, na *reindução* deverá ser utilizado o mesmo protocolo que foi eficaz inicialmente, com especial atenção atribuída à dose máxima cumulativa de DOX. Com base na utilização dos protocolos baseados no CHOP, é esperada uma taxa de reindução próxima dos 90% (Garrett et al., 2002).

Se a *reindução* falhar, podemos recorrer aos fármacos denominados de resgate ou a protocolos de resgate, onde estão incluídos fármacos diferentes dos utilizados nos protocolos baseados no CHOP (Vail & Young, 2007).

Os protocolos de resgate mais frequentemente utilizados no linfoma incluem agentes únicos como actinomicina-D (ACTD), mitoxantrona, DOX (quando esta não foi incluída no protocolo inicial), combinação de DOX e dacarbazina, lomustina, L-asparaginase e a combinação de VCR, mecloretamina, procarbazina e prednisolona (MOPP) (Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008).

Geralmente, as taxas de resposta aos protocolos de resgate reportadas são de 40% a 50%, contudo, estas são menos duráveis, com tempos médios de resposta na ordem de 1.5 a 2.5 meses. Podem ainda ser observadas durações de resgate superiores num número restrito de animais (Vail & Young, 2007).

Na preocupação de proporcionar a melhor qualidade de vida ao paciente, surge a necessidade do desenvolvimento de protocolos que reduzam o número de visitas à clínica, assim como os custos e a toxicidade do tratamento (Moore et al., 2001).

1.10. Radioterapia

O papel da radioterapia no controlo do linfoma no cão permanece sob investigação (Vail & Young, 2007).

Esta modalidade terapêutica pode ser realizada localmente, em metade do corpo ou no corpo inteiro, com ou sem transplante de medula óssea, associada ou não a quimioterapia

sistêmica e recorrendo a baixa ou alta dose de radiação (Vail & Thamm, 2005; Lurie et al., 2009).

Na maioria dos casos, a radioterapia realiza-se localmente, sendo o seu uso limitado a alguns casos específicos de linfoma multicêntrico (tabela 8). No entanto, uma vez que os linfoblastos são células radiosensíveis, a radioterapia acaba por exercer um papel relevante em alguns casos de linfoma (Vail & Young, 2007).

Um estudo realizado por Williams et al. (2004), foi avaliada a realização de radioterapia de metade do corpo, depois de 11 semanas de quimioterapia e observaram-se taxas de resposta de 78%, com a duração média da primeira remissão de 311 dias de duração. No entanto, este aumento não foi suficiente para ser considerado clinicamente relevante e para justificar os custos inerentes a este tipo de tratamento (Williams et al., 2004).

Um outro trabalho avaliou o efeito da realização de radioterapia de metade do corpo após um protocolo CHOP com L-asparaginase (L-CHOP), demonstrando que não houve vantagens desta abordagem terapêutica comparativamente à realização dos protocolos convencionais com base unicamente no CHOP (Rassnick et al., 2007).

Tabela 8 – Indicações para radioterapia no linfoma (Adaptado de Vail & Young, 2007).

Doença local (estadio I ou II)	Ex: linfoma nasal, linfoma do SNC e cutâneo.
Tratamento paliativo	Ex: linfadenopatia mandibular, linfoma rectal, linfoma mediastínico acompanhado por síndrome pré-cava, envolvimento ósseo localizado.
Irradiação de corpo inteiro	Com ou sem transplante de medula óssea ou células estaminais.
Irradiação de metade do corpo	Depois de remissão induzida por quimioterapia.

1.11. Efeitos adversos secundários à quimioterapia

De uma maneira geral, os agentes quimioterápicos são fármacos não selectivos, provocando a destruição das células tumorais e de algumas células normais (Couto, 2009).

A toxicidade está geralmente associada a órgãos onde a divisão celular é mais rápida, como a medula óssea e enterócitos, sendo a mielossupressão e a toxicidade gastrointestinal os efeitos adversos mais frequentes. Outras alterações que podem estar associadas à realização de quimioterapia incluem as reacções anafiláticas, toxicidade dermatológica e pulmonare, pancreatite, toxicidade cardíaca, neurotoxicidade, urotoxicidade e hepatopatotoxicidade (Couto, 2009; Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Além das alterações provocadas nos diferentes sistemas de órgãos, a morte rápida das células tumorais pode causar alterações metabólicas súbitas provocando sinais clínicos agudos (prostração, vômito, diarreia), mimetizando a toxicidade do fármaco. Esta síndrome é conhecida como síndrome da lise tumoral aguda (Couto, 2009).

Um trabalho recente realizado por Tomiyasu et al. (2010), avaliou os efeitos adversos associados ao protocolo UW-25, segundo a terminologia de critérios de efeitos adversos do grupo co-operativo de oncologia veterinária (VCOG-CTCAE) (tabela 9).

Tomiyasu et al. (2010), depois de analisar 40 cães com linfoma multicêntrico, concluiu que a toxicidade associada à VCR foi semelhante à observada na DOX e Ciclofosfamida, num protocolo de múltiplos agentes. Curiosamente, houve mais pacientes a demonstrarem efeitos secundários depois da primeira administração de VCR do que na DOX, sobretudo em pacientes com grau V da doença.

Neste mesmo estudo, foram detectadas alterações de sangue e medula óssea como neutropénia e trombocitopénia, em 57.5%, 41% e 8.1% dos cerca de 40 cães tratados com VCR, CICLO e DOX, respectivamente. No que dizia respeito a alterações gastro-intestinais, dos 40 cães tratados para linfoma, aproximadamente metade dos casos apresentaram alterações gastrointestinais como diarreia, vômito ou diminuição do apetite.

Tabela 9 – Tabela de efeitos adversos secundários à quimioterapia, com base no VCOG-CTCAE (Adaptado de Tomiyasu et al., 2010).

	Efeitos adversos	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Alterações Gastro-intestinais	Anorexia	Inapetência parcial	Apetite significativamente diminuído	Fluidoterapia EV necessária	Alimentação parenteral necessária	Morte
	Vômito	1 episódio em 24h	2-5 episódios em 24h (fluidoterapia EV ou SC necessária)	≥ 6 episódios em 24h ou necessidade de fluidoterapia EV	Risco de vida/necessidade de cuidados intensivos (ex: colapso hemodinâmico)	Morte
	Diarreia	Aumento de <4 episódios de fezes do valor normal	Aumento de 4-6 episódios de fezes do valor normal (fluidoterapia IV ou SC necessária)	Aumento de ≥7 episódios de fezes, incontinência, ou fluidoterapia EV necessária	Risco de vida/necessidade de cuidados intensivos (ex: colapso hemodinâmico)	Morte
Alterações de medula	Neutropénia	≥1,500 a < 2,900 neutrófilos/μL	≥1,000 a < 1,500 neutrófilos/μL	≥500 a < 1,000 neutrófilos/μL	<500 neutrófilos/μL	
	Trombocitopénia	≥75,000 a < 117,000 plaquetas/μL	≥50,000 a < 75,000 plaquetas/μL	≥10,000 a < 50,000 plaquetas/μL	< 10,000 plaquetas/μL	

Curiosamente, num estudo realizado por Vaughan et al. (2007), os cães que desenvolveram neutropénia pós-quimioterapia e que consequentemente necessitaram de atraso ou diminuição da dose de quimioterapia, apresentaram uma primeira remissão superior em comparação com os cães que não desenvolveram neutropénia e que estiveram sujeitos a protocolos quimioterápicos com doses mais elevadas.

Este artigo alerta-nos para a necessidade de ponderar a redução das doses dos fármacos quimioterápicos durante o protocolo e coloca-nos a questão da necessidade efectiva de realizar protocolos com doses tão elevadas, mesmo em animais que não desenvolvem este tipo de efeitos adversos (Vaughan et al., 2007).

No mesmo intuito e mais recentemente, foi avaliado o uso do protocolo CHOP de 15 semanas, onde os cães que apresentaram efeitos adversos e necessitaram de adiar os tratamentos quimioterápicos apresentaram tempos livres de doença superiores

comparativamente aos restantes. Este aspecto deixa-nos a questão da necessidade de realizar estudos futuros que utilizem protocolos com doses quimioterápicas específicas para cada paciente (Burton et al., 2012).

1.12. Prognóstico

Apesar de serem raros os casos de cura de linfoma (<10%), é frequente conseguir-se uma boa resposta à terapêutica e uma boa qualidade de vida durante o tempo de remissão (Vail & Young, 2007).

Como referido anteriormente, um animal que não realize tratamento apresenta um pior prognóstico, sendo o tempo de vida esperado inferior a 10 semanas (Jacobs et al., 2002).

Por outro lado, uma quimioterapia com múltiplos fármacos está associada a um melhor prognóstico comparativamente a protocolos com um único fármaco (Turek et al., 2008).

Existem numerosos factores, muitos deles controversos, que influenciam a evolução da doença, tornando o prognóstico bastante variável e difícil de estabelecer (Vail & Young, 2007).

Alguns factores que foram descritos como tendo influência na sobrevivência dos animais e o seu grau de associação ao prognóstico encontram-se descritos na tabela 10.

Os dois factores que apresentam um valor de prognóstico mais consistente no linfoma são o sub-estadio da OMS e o imunofenótipo celular (Vail & Young, 2007).

Assim e de uma maneira geral, os cães com linfoma de origem nas células T (Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2004) e/ou pertencentes ao sub-estadio "b" (Chun et al., 2000; Garrett et al., 2002) apresentam tempos de remissão e de sobrevivência menores.

Tabela 10 – Factores de prognóstico associados ao linfoma (Adaptado de Vail & Young, 2007).

Factor	Impacto dos factores de prognóstico
Imunofenótipo	Forte
Localização anatómica	Forte
Estadio clínico da OMS	Forte
Linfadenomegália mediastínica cranial	Forte
Tratamento prévio com córticoesteroides	Forte
Sub-estadio clínico da OMS	Forte
Hipercalecémia	Moderado*
Expressão da P-glicoproteína	Moderado*
Histopatologia	Moderado*
Índices proliferativos	Moderado*
Género	Fraco
* Requer mais investigações	

O tumor pode ser classificado em alto, intermédio ou baixo grau de malignidade, sendo que esta característica tumoral tem sido descrita em alguns estudos, estando os linfomas de alto grau associados a índices de RC maiores e a recidivas mais tardias (Ponce et al., 2004).

Contudo, a capacidade de prever a resposta aos tratamentos com base nestes sub-tipos histopatológicos continua a ser ainda bastante limitada (Vail & Young, 2007).

A localização anatómica tem também uma importância considerável no prognóstico da doença, na medida em que, a forma digestiva, cutânea, hepato-esplénica e do SNC (Vail & Young, 2007), assim como a presença concomitante de linfadenomegália mediastínica (Starrak et al., 1997) estão associados a um prognóstico mais reservado.

A hipercalecémia apresenta-se como um factor negativo principalmente quando relacionada com o fenótipo T ou com a diminuição da função renal (Kaiser et al., 2007).

Por outro lado, conforme referido, também a medicação com glucocorticóides, antes da instituição de protocolos quimioterápicos de múltiplos agentes, está associada a tempos de remissão mais curtos (Turek et al., 2008), contudo, o papel da dose e duração de terapia com glucocorticóides antes do tratamento com quimioterápicos e o mecanismo causador desta resistência às drogas permanece sob investigação (Legendre, 2007).

Além dos factores já referidos, num estudo de Garrett et al. (2002), o peso do animal surge com um valor de prognóstico significativo, sendo que animais de pequenas dimensões apresentam tempos médios de sobrevivência superiores aos cães de grande porte. Isto poderá dever-se ao facto de as doses serem feitas com base na área corporal, recebendo assim os cães mais pequenos doses proporcionalmente mais intensas de quimioterapia.

Num estudo recente, Miller et al. (2009) verificaram a associação entre um menor tempo de sobrevivência em cães com linfoma e a presença de anemia numa fase inicial do diagnóstico. A existência de anemia demonstra-se assim como um importante factor de mau prognóstico da doença.

Existem ainda outros factores moleculares que por norma não são avaliados do ponto de vista clínico, sendo apenas investigados quando o objectivo é maioritariamente científico, por exemplo, a medição da actividade proliferativa das células tumorais através do Ki-67, do índice AgNOR, marcadores CD3 e CD79 e proteínas denominadas survivinas, que estão amplamente relacionadas com a apoptose e proliferação de células tumorais (Kiupel et al., 1999; Phillips et al., 2000; Valdovich et al., 2004; Rebhun et al., 2008).

1.13. Objectivos

Na presente dissertação foi realizado um estudo retrospectivo de 4 anos (2008-2012) sobre o linfoma, incluindo canídeos observados em consulta de referência no Centro de Diagnóstico Veterinário (CDvet-Oncovet) e no Hospital Veterinário do Porto (HVP).

O objectivo geral deste trabalho foi caracterizar uma série de casos de linfoma no cão, e comparar os resultados obtidos com a literatura publicada. Foram também propostos alguns objectivos específicos:

- Determinar o impacto do imunofenótipo (B ou T) na sobrevida de cães com linfoma.
- Estudar a relação entre as variáveis sexo, raça, e sub-estadio OMS, e o imunofenótipo de linfoma.

2. Materiais e métodos

2.1. Canídeos

Inicialmente foram analisados retrospectivamente 82 registos de consultas de canídeos com linfoma, no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2008 e 1 de Janeiro de 2012, contudo, para a realização deste estudo retrospectivo foram apenas incluídos 50 canídeos, tendo sido excluídos os canídeos que não apresentava informação completa das variáveis sujeitas a estudo neste trabalho.

Para determinar a relação entre o imunofenótipo e as variáveis raça, sexo e sub-estadio OMS, foram apenas utilizados os animais com resultado de imunofenótipo (T ou B) da amostra total (n=36), tendo sido excluídos os 14 canídeos que não tinham realizado esta técnica.

2.2. Recolha de dados

A informação utilizada para a realização deste estudo retrospectivo foi obtida através da análise dos registos de consultas efectuadas no Centro de Diagnóstico Veterinário - Oncovet (com o programa WINVET[®]) e no Hospital veterinário do Porto - serviço de oncologia (com o programa QVET[©]).

Foi então criada uma base de dados no programa SPSS[®] (Statistical Package for Social Sciences[®], versão 20 para Macintosh), constituída pelas seguintes variáveis: idade, raça, sexo, peso, tipo de linfoma, estadio, sub-estadio, imunofenótipo, realização de citologia de medula óssea, método de diagnóstico utilizado, data de morte, causa de morte, protocolo de tratamento inicial, protocolo de tratamento de resgate, carácter indolente, necessidade de internamento e efeitos adversos secundários à quimioterapia.

2.3. Tratamento

Ao analisar retrospectivamente os registos dos canídeos incluídos no estudo, observamos que estes foram tratados de acordo com as possibilidades dos proprietários, sendo utilizados protocolos constituídos por vários fármacos (COP ou CHOP), ou protocolos constituídos por agentes únicos como Doxorrubicina, Metrotrexato ou Clorambucil. Em todos os casos foi utilizada prednisolona e nenhum dos animais realizou

terapia com este fármaco antes de iniciar o protocolo de tratamento.

2.4. Avaliação de linfomas indolentes

Os linfomas indolentes foram classificados com base no imunofenótipo e na morfologia celular. Apenas 4 linfomas na totalidade da amostra (n=50) foram confirmados como apresentarem características de linfoma indolente. Os restantes permaneceram suspeitas clínicas.

2.5. Avaliação de efeitos adversos secundários à quimioterapia

Os efeitos adversos foram avaliados com base na tabela VCOG-CTCAE acima descrita (tabela 8), e para completar a informação relativa aos efeitos adversos e toxicidade secundária à quimioterapia incluímos ainda a informação relativa à presença de anemia (<25%) no momento do diagnóstico. Os hemogramas foram realizados semanalmente e antes de cada sessão do tratamento.

2.6. Análise estatística

A base de dados e análise estatística foram realizadas com o programa SPSS® (Statistical Package for Social Sciences®, versão 20 para Macintosh).

O tempo de sobrevivência foi definido como o período desde o início da sintomatologia até à morte do animal.

A duração da primeira remissão foi definida como o espaço de tempo entre o início de tratamento e a data do 1º relapso do tumor.

Para determinar os tempos de sobrevivência entre os diferentes grupos foram utilizadas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier e utilizado o teste de Log-rank para comparar diferentes curvas de sobrevivência.

Realizámos ainda uma análise descritiva dos dados, através de estatística descritiva com análise univariada dos dados recolhidos, tabelas e gráficos.

Foram também utilizados os testes do Chi-quadrado e de Fisher para comparação de frequências.

Considerou-se uma correlação estatisticamente significativa de P -Value (P) <0,05.

3. Resultados

Caracterização geral da população em estudo

A população total avaliada neste estudo (n=50) correspondeu a 25 canídeos do sexo feminino e 25 canídeos do sexo masculino, com peso mediano de 24.89 Kg (mínimo 3 Kg e máximo 60 Kg).

A mediana de idades dos canídeos presentes no estudo foi de 9.5 anos (média de 8.9 anos), sendo a idade mínima 3 anos e a idade máxima 17 anos, na altura do diagnóstico (figura 15).

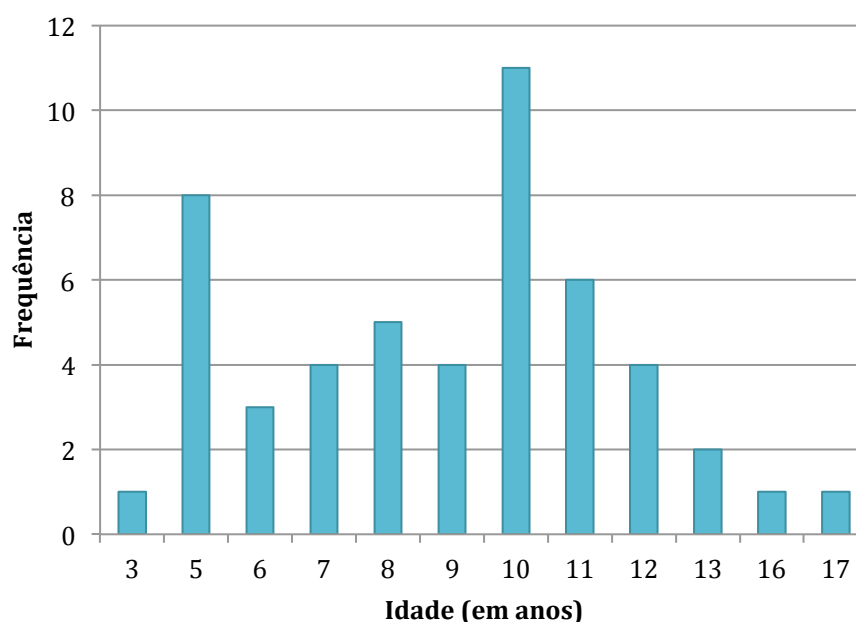


Figura 15 – Distribuição da população de acordo com a variável "Idade".

No que diz respeito à distribuição de raças da nossa amostra, as mais frequentes foram o Boxer (n=5), o Cocker Spaniel (n=5) e o Rottweiler (n=5), sendo 14 animais de raça indeterminada. As restantes raças estiveram representadas segundo a tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição da amostra (n=50) de acordo com a variável "raça".

Raça	Frequência	Percentagem (%)	% válida	% cumulativa
Boxer	5	10,0	10,0	10,0
Golden Retriever	2	4,0	4,0	14,0
Rottweiler	5	10,0	10,0	24,0
Cocker spaniel	5	10,0	10,0	34,0
Indeterminado	14	28,0	28,0	62,0
Fox Terrier	1	2,0	2,0	64,0
Sharpei	1	2,0	2,0	66,0
Dobberman	2	4,0	4,0	70,0
Serra da Estrela	3	6,0	6,0	76,0
Podengo Analuz	1	2,0	2,0	78,0
Yorkshire Terrier	2	4,0	4,0	82,0
Perdigueiro de Burgos	1	2,0	2,0	84,0
Basset Hound	2	4,0	4,0	88,0
Staffordshire	1	2,0	2,0	90,0
Bull Dog Francês	1	2,0	2,0	92,0
Pastor das montanhas de berna	1	2,0	2,0	94,0
Pastor Alemão	1	2,0	2,0	96,0
West High White Terrier	1	2,0	2,0	98,0
Setter Irlandês	1	2,0	2,0	100,0
Total	50	100,0	100,0	

Dos 50 casos de linfoma analisados, 84% eram da forma multicêntrica, 10% correspondiam à forma extra-nodal e por último 6% dos casos eram linfomas cutâneos (figura 16).

■ Multicêntrico ■ Extra-nodal ■ Cutâneo

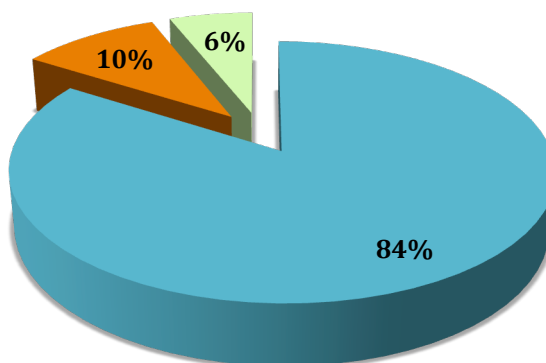


Figura 16 – Distribuição da população de acordo com a variável "tipo de linfoma".

Quanto aos linfomas imunofenotipados (n=36), 69% dos linfomas apresentou imunofenótipo das células B e 33% imunofenótipo das células T.

Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico de linfoma foi realizado através de histopatologia de linfonodo em 56% dos casos, PAAF de linfonodo em 34% dos casos e através da conjugação de ambas as técnicas nos restantes 10% dos casos.

A citologia de medula foi realizada em 4 animais, demonstrando infiltração por células malignas em 2 dos 4 casos. Nos restantes 46 animais não foi realizado este exame complementar de diagnóstico.

De acordo com o estadiamento OMS para o linfoma, 1 animal apresentou estadio I da doença, 17 estadio III, 29 estágio IV e 3 estágio V (figura 17).

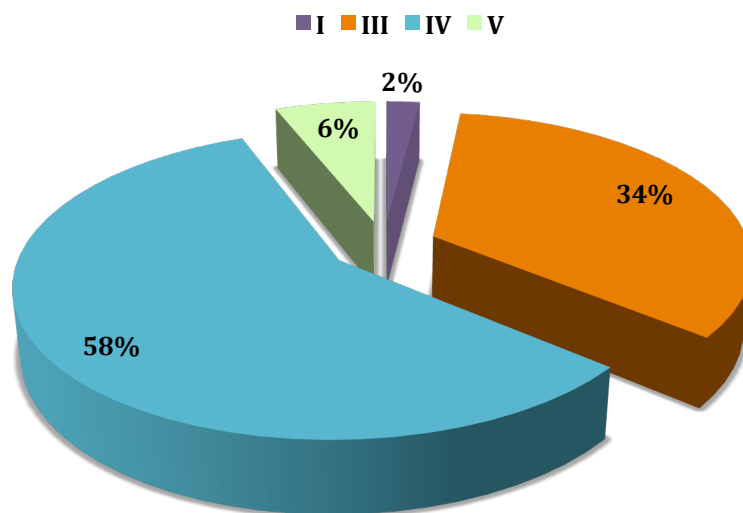


Figura 17 – Distribuição da amostra de acordo com a variável "estadio de linfoma segundo a OMS".

Enquanto que 23 cães se apresentaram sem alterações do estado geral no momento do diagnóstico (sub-estadio “a” segundo a OMS), os restantes 27 cães manifestavam envolvimento do estado geral secundário à doença (sub-estadio “b” segundo a OMS) (tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição da amostra segundo a variável "sub-estadio de linfoma".

Sub-Estadio	Frequência	Percentagem (%)
a	23	46,0
b	27	54,0
Total	50	100,0

Tratamento

No que diz respeito ao tratamento, o protocolo CHOP foi o mais utilizado na primeira abordagem terapêutica do linfoma (n=26). Em segundo lugar, surgiu o protocolo COP (n=18) e de seguida a utilização de prednisolona como único fármaco do tratamento (n=5). Outros protocolos menos utilizados foram a realização de prednisolona associada a doxorrubicina (n=2), doxorrubicina como único agente (n=1), clorambucil associado a prednisolona (n=2) e por último, vincristina associada a prednisolona (n=2).

Quanto aos dados relativos ao protocolo de resgate usado no linfoma, o mais frequente foi o CHOP (n=9), do COP (n=5), do CHOP com L-asparaginase em 2 cães e por último a mitoxantrona em 2 canídeos. Apesar destes valores, não foi realizado qualquer protocolo de resgate em 32 cães.

Efeitos adversos da quimioterapia

Quanto aos efeitos adversos provocados pela quimioterapia, 56% dos animais incluídos no estudo não demonstraram sinais de efeitos adversos no decorrer do tratamento quimioterápico, 10% apresentou vômitos e diminuição do apetite de grau 2 e o mesmo número (10%) apresentou diarreia de grau 2. Apenas um animal apresentou sinais mais severos de efeitos adversos como vômito e diarreia de grau 3. Quanto a alterações relacionadas com a medula óssea, 1 animal apresentou trombocitopenia de grau 2, enquanto que 9 animais apresentaram neutropenia de grau 1 em conjunto com anemia e 1 animal do estudo apresentou apenas anemia como alteração relacionada com a medula óssea (Tabela 13).

Apesar de todos os efeitos adversos registados, apenas 20% dos canídeos foram hospitalizados durante o tratamento quimioterápico, não sendo necessário adiar o tratamento em nenhum animal.

Tabela 13 – Distribuição da amostra consoante o efeito adverso associado à quimioterapia.

Efeito adverso	Frequência	Percentagem (%)	% Cumulativa
Sem efeitos adversos	28	56,0	56,0
Anemia	1	2,0	58,0
Trombocitopénia grau 2	1	2,0	60,0
Vômitos e anorexia grau 2	5	10,0	70,0
Diarreia grau 2	5	10,0	80,0
Anemia e neutropenia grau 1	9	18,0	98,0
Vômito e diarreia grau 3	1	2,0	100,0
Total	50	100,0	

Análise de sobrevivência

No que diz respeito ao tempo médio de sobrevivência da nossa amostra de cães com linfoma (n=50), este foi de 393 dias (figura 18).

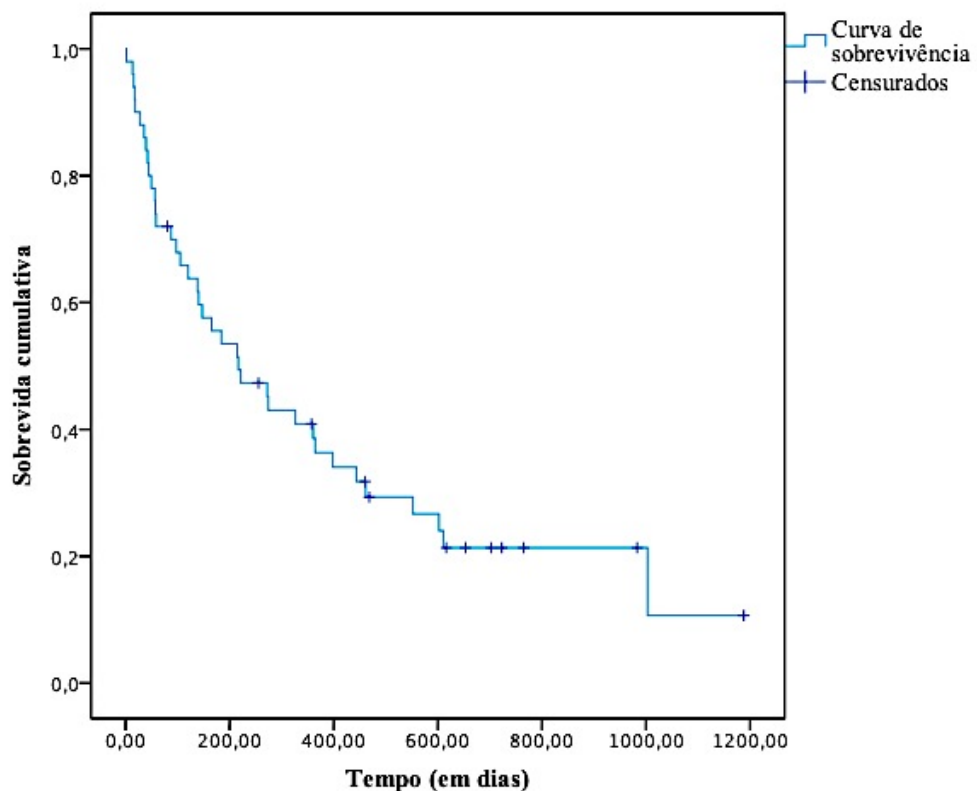


Figura 18 – Curva de Kaplan-Meier do tempo médio de sobrevivência da população total de cães com linfoma (curva azul), correspondente a 393 dias.

No que diz respeito à duração média da primeira remissão da amostra total, esta foi de 175 dias (intervalo de confiança de 95% com limite inferior de 127 dias e limite superior de 223 dias) (tabela 14).

Tabela 14 – Valores de média e mediana para a variável "duração da primeira remissão".

Média ^a				Mediana			
Estimado	Desvio Padrão	95% Intervalo de confiança		Estimado	Desvio Padrão	95% Intervalo de confiança	
		Limite inferior	Limite superior			Limite inferior	Limite superior
175,875	24,547	127,763	223,987	147,000	10,379	126,656	167,344
a. O valor estimado é limitado ao maior tempo de sobrevivência se este for censurado.							

Impacto do imunofenótipo

Relativamente ao imunofenótipo, o tempo médio de sobrevivência dos linfomas de células T foi de 388 dias, enquanto que o tempo médio de sobrevivência dos linfomas de células B foi de 463 dias. A diferença observada entre o tempo de sobrevivência dos dois grupos não foi considerada estatisticamente significativa ($P= 0.07$) (figura 19).

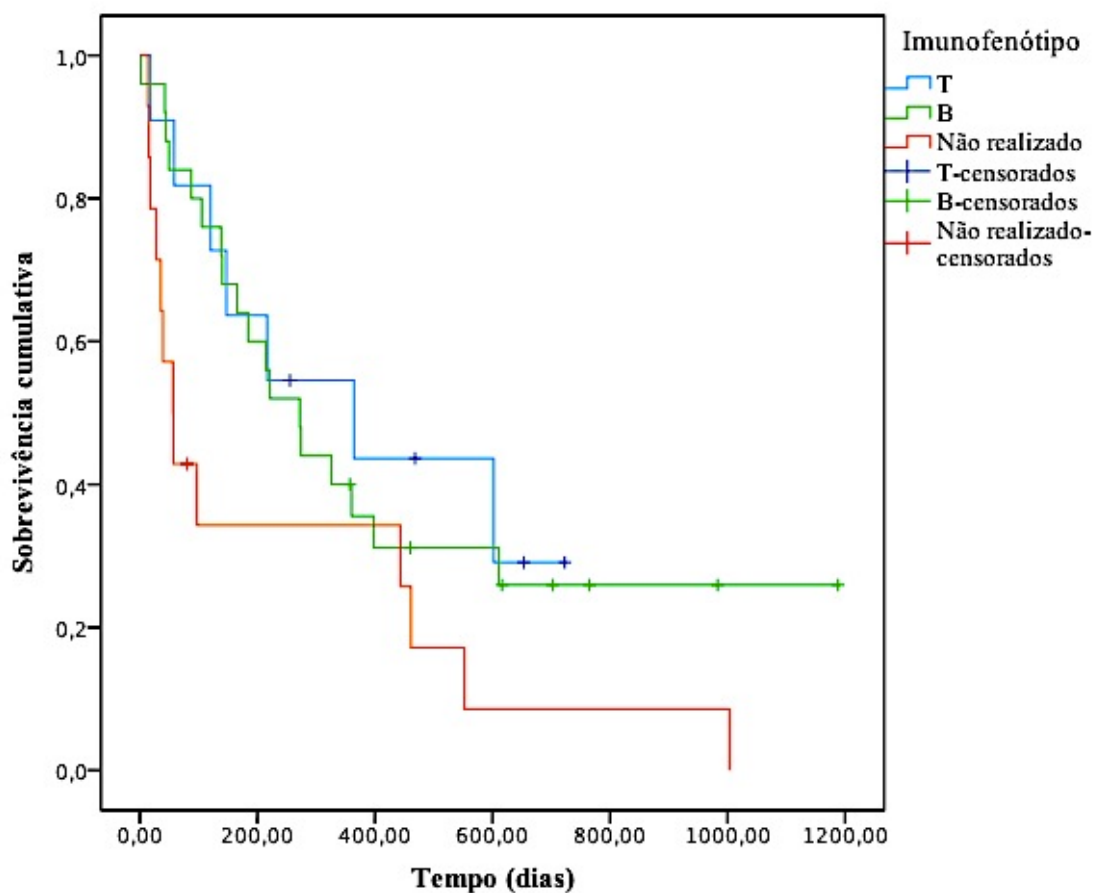


Figura 19 – Curvas de Kaplan-Meier do tempo médio de sobrevivência de acordo com o grupo de cães com imunofenótipo B (n=25 - curva verde), o grupo de cães com imunofenótipo T (n=11 - curva azul) e nos cães onde não foi determinado o imunofenótipo (n=14 - curva laranja). A diferença entre os grupos não foi considerada estatisticamente significativa ($P=0.07$).

Quanto à influência do género no imunofenótipo, 66.7% dos canídeos fêmeas apresentaram imunofenótipo B e 33.3% imunofenótipo T, por outro lado, 73.3% dos machos apresentaram imunofenótipo B e 26.7% imunofenótipo T. Contudo, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($P=0.72$) (tabela 15).

Tabela 15 – Relação entre o imunofenótipo e o género dos canídeos com linfoma. A diferença entre fêmeas e machos não foi considerada estatisticamente significativa ($P=0.72$).

			Fenótipo		Total
			T	B	
Género	Feminino	Contagem:	7	14	21
		% dentro do Género	33,3%	66,7%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	63,6%	56,0%	58,3%
	Masculino	Contagem:	4	11	15
		% dentro do Género	26,7%	73,3%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	36,4%	44,0%	41,7%
Total		Contagem:	11	25	36
		% dentro do Género	30,6%	69,4%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	100,0%	100,0%	100,0%

Relativamente à associação entre a raça e o imunofenótipo, 67.9% dos canídeos do grupo raça pura pertenciam ao imunofenótipo B, enquanto que 32.1% apresentaram imunofenótipo T. Quanto aos animais do grupo raça indeterminada, 75% correspondiam ao imunofenótipo B enquanto que os restantes 25% apresentaram imunofenótipo T. Esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($P>0.9$) (tabela 16).

Tabela 16 – Relação entre o fenótipo e a raça dos canídeos com linfoma. A diferença entre o grupo raça pura e o grupo raça indeterminada não foi considerada estatisticamente significativa ($P>0.9$).

			Fenótipo		Total
			T	B	
Raça	Pura	Contagem:	9	19	28
		% dentro da Raça	32,1%	67,9%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	81,8%	76,0%	77,8%
	Indeterminada	Contagem:	2	6	8
		% dentro da Raça	25,0%	75,0%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	18,2%	24,0%	22,2%
Total		Contagem:	11	25	36
		% dentro da Raça	30,6%	69,4%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	100,0%	100,0%	100,0%

Procurámos ainda saber se havia alguma relação entre o sub-estadio OMS e o imunofenótipo de linfoma, sendo 72.2% dos animais em sub-estadio "a" de fenótipo B e 27.8% dos canídeos de fenótipo T. Por outro lado, dentro dos animais com sub-estadio "b", 66.7% eram do imunofenótipo B e os restantes 33.3% do imunofenótipo T (tabela 17).

Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa que justificasse as diferenças observadas no tempo médio de sobrevivência ($P=0.71$).

Tabela 17 – Relação entre o fenótipo e o sub-estadio de linfoma segundo a OMS. A diferença entre o sub-estadio "a" e sub-estadio "b" não foi considerada estatisticamente significativa ($P=0.71$).

			Fenotipo		Total
			T	B	
Sub-estadio OMS	Sub-estadio "a"	Contagem:	5	13	18
		% dentro do Sub-estadio	27,8%	72,2%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	45,5%	52,0%	50,0%
	Sub-estadio "b"	Contagem:	6	12	18
		% dentro do Sub-estadio	33,3%	66,7%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	54,5%	48,0%	50,0%
Total		Contagem:	11	25	36
		% dentro do Sub-estadio	30,6%	69,4%	100,0%
		% dentro do Fenótipo	100,0%	100,0%	100,0%

4. Discussão

No que diz respeito aos objectivos gerais propostos para este trabalho, verificou-se uma igual frequência de linfoma no sexo feminino (n=25) e no sexo masculino (n=25). A influência do género no desenvolvimento de linfoma é controversa, sendo que para alguns autores este factor não parece ser relevante, (Modiano et al., 2005; Vail & Young, 2007; Argyle et al., 2008; Nelson & Couto, 2009), Moreno et al. (2007) encontraram uma prevalência superior em machos, ao contrário de Teske et al. (1994), onde registou um maior número de linfoma em fêmeas.

Na nossa amostra não conseguimos apurar qualquer tipo de associação entre o género e o linfoma, pois tivemos o mesmo número de fêmeas e machos. A informação relativa ao estado fértil dos animais não foi registada, pois esse dado não estava disponível na maioria dos registos clínicos avaliados, excluindo desde início esta variável.

A mediana de idade da nossa amostra foi de 9.5 anos, revelando uma população adulta a sénior, tal como já observado por outros autores (Vail & Young, 2007; Couto, 2009; Bryan, 2010). Este facto está de acordo com a associação existente entre o aumento da idade e a susceptibilidade para o desenvolvimento tumoral (Waters, 2006), podendo em parte ocorrer devido ao aumento de lesões no ADN celular (Waters, 2006).

Apesar de 82% dos animais estudados ter idade situada entre os 6 e 12 anos de idade, tal como sugerido por Couto (2009), verificou-se uma grande variação de idades, dos 3 aos 17 anos, sendo esta amplitude de idades muito semelhante à obtida por Teske et al. (1994).

Relativamente à variável raça, o Boxer, o Rottweiler e o Cocker Spaniel foram as raças mais frequentes na nossa amostra (10% cada uma), verificando-se também que a maioria dos canídeos incluídos neste estudo eram de raça pura (72%).

Noutros estudos foi igualmente observado um maior aparecimento de linfoma em canídeos de raça pura (Modiano et al., 2005; Moreno et al., 2007; Couto, 2009).

Tal como sugerido por Fournel-Fleury et al. (2002), Lurie et al. (2004), Vail & Young (2007) e Turek et al. (2008), também na nossa amostra a raça Boxer aparece associada ao maior número de doentes com linfoma.

As raças representadas nesta amostra podem reflectir as preferências da população portuguesa para determinadas raças e temperamento de cães. Por outro lado, obtivemos um número considerável de animais de raça indeterminada (28%). Este dado pode indicar que

apesar da maioria dos animais ser de raça pura, muitos proprietários portugueses continuam a optar por cães de raça cruzada para animal de companhia.

A forma de linfoma mais observada foi a multicêntrica com 84%, seguida da forma extra-nodal com 10% dos cães afectados e por último 6% de linfomas cutâneos, sendo estes resultados compatíveis com a maioria da bibliografia consultada, onde 80% dos linfomas são da forma multicêntrica (Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008; Bryan, 2010), sendo a forma cutânea bastante mais rara com 3% a 8% dos casos de linfoma no cão (Bouchard, 2000).

Quanto ao imunofenótipo, o tipo celular mais frequente foi o de células B (69%), seguido do fenótipo de células T com 33% dos casos, não tendo sido determinado o imunofenótipo em 14% dos animais. Estes resultados são compatíveis com o previamente publicado por vários autores (Dobson et al., 2001; Turek et al., 2008), onde está descrito que os linfomas de células B são os mais prevalentes.

Quanto ao método de diagnóstico mais utilizado, 56% dos linfomas foram diagnosticados por histopatologia de linfonodo, enquanto que 34% foram diagnosticados por citologia realizada por PAAF e os restantes 10% por conjugação de ambas as técnicas.

Segundo alguns autores, na maioria dos casos, o diagnóstico de linfoma é fácil e pode ser realizado através de citologia do linfonodo afectado ou de outra lesão sugestiva de linfoma, sendo a biópsia e consequente avaliação histopatológica reservada para alguns casos que necessitem de confirmação ou para realizar métodos complementares de diagnóstico e estadiamento como a imunofenotipagem, bem como para ajudar a estabelecer um prognóstico da doença (Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008; Bryan, 2010). No nosso estudo, o diagnóstico realizado por biópsia pode estar sobre-representado pois grande parte dos cães foram incluídos num estudo de doutoramento, tendo sido realizadas biópsias para uma melhor caracterização do linfoma em grande parte dos pacientes.

No que diz respeito à análise citológica de medula óssea, esta foi apenas realizada em 4 animais, verificando-se invasão da medula óssea por células malignas em apenas 2 animais. A avaliação de medula como parte do estadiamento no linfoma é discutível, visto que, se não se observarem células neoplásicas em circulação é pouco provável que estas se venham a encontrar na medula. Por outro lado, acaba por ser difícil de distinguir numa citologia de medula os blastos precursores, dos blastos neoplásicos. Este procedimento acaba por ficar reservado às situações em que se observa anemias ou outras citopenias ou células suspeitas em circulação (Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008).

Relativamente ao estadiamento clínico da OMS no momento do diagnóstico, foi observada uma maior frequência do estadios IV (n=29) e III (n=17) seguido do V (n=3) e por último 1 caso de estadio I, o que pode explicar a grande capacidade de disseminação do linfoma para diferentes órgãos, sendo estes resultados compatíveis com o descrito no trabalho de Garrett et al. (2002) e Vail & Young (2007), onde mais de 80% dos cães se apresenta em estadio III ou IV da doença, segundo a OMS.

É importante salientar que a maior parte dos proprietários reconhece a presença de sinais da doença numa fase avançada da doença, quando já existe um comprometimento generalizado, com sintomatologia clínica associada.

Em relação ao estadio mais avançado desta doença, (estadio V) surgem alguns factores que podem influenciar a baixa percentagem registada (n=3). Salienta-se que para a inclusão no estadio V é muitas vezes necessária a realização de punção de medula óssea. No nosso estudo, apenas 4 animais foram submetidos a este exame e, apesar das 4 punções realizadas, apenas 2 foram positivas. Desta forma, neste e noutros estudos, o estadio V pode estar sub-representado, não havendo uma maior prevalência pela ausência de análise à medula óssea ou por resultados inconclusivos (Moreno et al., 2007).

O sub-estadio “b” segundo a OMS esteve presente em 54%, enquanto que o sub-estadio “a” surgiu em 46% dos animais estudados, realçando mais uma vez que, na maioria dos casos, o diagnóstico de linfoma é realizado numa fase tardia e quando já existem manifestações clínicas evidentes desta doença. Estes resultados contrariam um pouco o descrito por alguns autores (Vail & Young, 2007; Nelson & Couto, 2009; Bryan, 2010), nos quais a apresentação clínica descrita como mais frequente é um paciente com linfadenomegália não dolorosa e sem outros sinais clínicos de linfoma (sub-estadio “a” Segundo a OMS).

Esta diferença de resultados pode também estar relacionada com o facto de haver mais campanhas de sensibilização e educação dos proprietários no estrangeiro, realizando mais exames periódicos e consultas de rotina, mesmo quando não há sinais clínicos de doença, detectando assim a doença em fase inicial e sem envolvimento do estado geral.

Por outro lado, este resultado pode estar influenciado pelo facto da referência de casos clínicos no nosso país ser por vezes realizada tardiamente, permitindo a progressão da doença e posterior aparecimento de sinais clínicos.

No que diz respeito ao esquema terapêutico mais utilizado numa primeira abordagem do linfoma, verificou-se que os protocolos constituídos por vários fármacos quimioterápicos

foram os mais utilizados, sendo os mais escolhidos o CHOP (n=26) e COP (n=9), seguido dos protocolos considerados paliativos, como o uso de prednisolona a título de único fármaco do tratamento (n=5), prednisolona associada a doxorrubicina (n=2), doxorrubicina como único agente (n=1), clorambucil associado a prednisolona (n=2) e por último, vincristina associada a prednisolona (n=2).

De acordo com a bibliografia analisada, verifica-se uma grande variação nos protocolos aplicados no linfoma (Chun et al., 2000; Moore et al., 2001; Garrett et al., 2002; Simon et al., 2006; Vail & Young, 2007; Couto, 2009).

Nos Médicos Veterinários de primeira opinião em Inglaterra predomina o uso de COP (Mellanby et al., 2002), contrariamente ao registado no nosso trabalho.

Os nossos resultados vão de encontro ao descrito num estudo realizado por Henriques & Branquinho (2010), onde se procurou apurar qual o tratamento de linfoma mais utilizado pelos médicos veterinários Portugueses, sendo o protocolo CHOP o mais utilizado com 47% seguido do COP com 38%.

Relativamente ao protocolo de resgate mais utilizado, o CHOP foi o mais realizado (n=9), seguido do COP (n=5), do L-CHOP (n=2) e por último da Mitoxantrona (n=2). Por outro lado, não foi realizado qualquer protocolo de resgate em 32 cães.

Quanto os protocolos de resgate mais utilizados, os nossos resultados são semelhantes aos descritos na literatura, onde deve ser utilizado o mesmo protocolo do utilizado inicialmente, podendo posteriormente incluir outros fármacos como a L-Asparaginase ou Mitoxantrona (Garrett et al., 2002; Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008). Por sua vez, a grande percentagem de animais onde não foi realizado nenhum protocolo de resgate (n=32), representa os animais que morreram logo após a primeira remissão, os que não chegaram a entrar em remissão, ou os cães que morreram de outras doenças não relacionadas com o linfoma.

Quanto aos efeitos adversos observados durante a quimioterapia, 56% dos animais incluídos no estudo não demonstraram sinais de efeitos adversos no decorrer do tratamento quimioterápico, 10% apresentou vômitos e diminuição do apetite de grau 2 e o mesmo número (10%) apresentou diarreia de grau 2. Apenas um animal (2%) apresentou sinais mais severos de efeitos adversos como vômito e diarreia de grau 3. Quanto a alterações relacionadas com a medula óssea, 1 animal apresentou trombocitopenia de grau 2 (2%), enquanto que 18% dos animais apresentaram neutropenia de grau 1 em conjunto com anemia

e 2% dos canídeos do nosso estudo apresentaram anemia como única alteração relacionada com a medula óssea.

Desta forma foi verificado um igual número de efeitos adversos relacionados com a medula óssea (22%) e com o tracto gastrointestinal (22%), semelhante ao que ocorreu no trabalho de Tomiyasu et al. (2010), onde os principais efeitos adversos registados durante o tratamento foram os hematológicos (57.5%), seguido dos efeitos adversos relacionados com o tracto gastrointestinal (50%). No entanto, graus severos de efeitos adversos (3 ou mais) foram apenas registados num animal (2%), contrariamente ao que ocorreu no mesmo trabalho de Tomiyasu et al. (2010), onde as percentagens foram um pouco superiores para este tipo de alterações, (17.5%).

Esta discrepância de valores pode ser explicada em parte pelo facto de no estudo de Tomiyasu et al. (2010), 75% dos cães serem classificados como grau V (segundo a OMS), comparativamente aos nossos resultados onde apenas 6% dos animais estavam em estadio V da doença (segundo a OMS), suportando melhor o tratamento quimioterápico.

Apesar dos efeitos adversos supracitados, apenas 20% dos canídeos foram hospitalizados durante o tratamento quimioterápico, não tendo sido necessário adiar o tratamento em nenhum animal.

Os nossos resultados vão de encontro ao publicado na bibliografia, onde a presença de neutropénias clinicamente relevantes, associadas a febre ou sépsis, são raras nos pacientes caninos, sendo que apenas 10% destes episódios resultam em hospitalizações (Vaughan et al., 2007). Num outro trabalho, concluiu-se que a presença de toxicidades graves (citopenias e sintomatologia gastrointestinal) associadas à quimioterapia e que provoquem hospitalização são pouco frequentes, ocorrendo apenas em 16% dos casos (Rassnick et al., 2007).

Quanto à análise de sobrevivência, o tempo médio de sobrevivência registado na população estudada foi de 393 dias, após o momento do diagnóstico, sendo estes resultados compatíveis com os dados registados por alguns autores, onde os animais tratados com protocolos CHOP apresentam um tempo médio de sobrevivência de 12 meses após o início da quimioterapia (Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2004; Argyle, 2008; Turek et al., 2008; Bryan, 2010).

Quanto à duração da primeira remissão, foi registado um valor médio de 175 dias, contudo, este resultado poderá ter sido condicionado pois a amostra é relativamente pequena e heterogénea, tendo sido incluídos todos os animais independentemente do tratamento ou estadio/sub-estadio, podendo desta forma ter condicionado o resultado.

No entanto, e apesar da heterogeneidade da nossa amostra, os nossos resultados estão de acordo com o publicado por Hosoya et al. (2007), onde foram registados 174 dias de duração média de primeira remissão, relativamente ao uso de protocolos com base no CHOP.

Relativamente ao objectivos específicos deste trabalho, quanto ao imunofenótipo, o tempo médio de sobrevivência dos linfomas de células T foi de 388 dias, enquanto que o tempo médio de sobrevivência dos linfomas de células B foi de 463 dias. Apesar desta diferença não ter sido considerada estatisticamente significativa ($P=0.07$), o resultado não está de acordo com o publicado na literatura, onde os linfomas de células B apresentam sobrevidas superiores aos linfomas de células T (Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2004; Argyle, 2008; Turek et al., 2008). Por outro lado, o tempo médio de sobrevivência dos linfomas de células T (388 dias) foi superior ao publicado por Turek et al. (2008) que relata 5 a 6 meses de tempo médio de sobrevivência.

Isto pode dever-se em parte pelo facto dos nossos linfomas indolentes serem sobretudo de fenótipo T, diminuindo a sua agressividade clínica, por outro lado, os linfomas de células B podem ter realizado apenas terapia com protocolos paliativos, diminuindo assim a longevidade dos mesmos. Na opinião dos autores é fundamental saber mais acerca da morfologia do linfoma, para poder incluir os linfomas em grupos mais homogéneos.

Embora os autores não tenham encontrado nenhum estudo que relacionasse o impacto do sexo no imunofenótipo de linfoma, com a realização deste trabalho tentámos investigar a possibilidade de existir uma associação entre estas duas variáveis. Apesar de nos nossos resultados em termos percentuais os machos e fêmeas apresentarem um maior registo de linfomas de fenótipo B, 73.3% e 66.7% respectivamente, não se conseguiu encontrar uma associação estatisticamente significativa entre o género e o imunofenótipo ($P=0.72$).

Pelo contrário, tendo em consideração que já existem estudos que associam a variável raça e o imunofenótipo (Fournel-Fleury et al., 2002; Lurie et al., 2004), no nosso trabalho esta associação não foi considerada estatisticamente significativa ($P>0.9$).

Provavelmente este resultado sem significado estatístico relevante é fruto de termos considerado o grupo raça pura como representativo de todas as raças puras, não tendo sido determinada a associação entre o imunofenótipo e cada raça específica, o que planeamos fazer futuramente, com amostras maiores, onde se possa aferir a distribuição real das raças.

Outro resultado interessante é a grande percentagem de animais de raça indeterminada e linfomas de imunofenótipo B (75%). Apesar de o resultado não ser estatisticamente significativo ($P>0.9$), este valor pode dever-se ao facto de haver uma maior

prevalência de linfomas de células B na população canina em geral (Dobson et al., 2001; Vail & Young, 2007; Turek et al., 2008).

Por último, quanto à relação entre o sub-estadio OMS e o imunofenótipo de linfoma, apesar de haver mais canídeos em sub-estadio "a" e "b" com linfoma de células B, 72.2% e 66.7%, respectivamente, não houve diferença estatisticamente significativa que justificasse as diferenças observadas no tempo médio de sobrevivência ($P=0.71$).

Assim, o sub-estadio OMS parece não estar relacionado com imunofenótipo de linfoma, ao contrário do descrito por (Nelson & Couto, 2009; Bryan, 2010), mas talvez esteja relacionado com o tempo que o paciente leva desde o estabelecimento do diagnóstico de linfoma, até ao início do tratamento desta neoplasia, influenciando a caracterização do sub-estadio com o aparecimento de sinais clínicos associados à progressão da doença.

As principais dificuldades encontradas na realização deste trabalho foram a avaliação retrospectiva dos registos clínicos dos cães com linfoma e a ausência de informação em grande parte dos mesmos, levando à exclusão de um grande número de pacientes, diminuindo consideravelmente o tamanho da nossa amostra, e por outro lado, a inclusão de uma amostra muito heterogénea que veio a condicionar os resultados.

5. Conclusão

A componente prática do estágio curricular, realizada no Hospital Veterinário do Porto, permitiu a aquisição de conhecimentos valiosos para o futuro desenvolvimento da actividade profissional na área de clínica de animais de companhia.

O contacto com os diferentes proprietários e respectivas condições sócio-económicas foi essencial para compreender a necessidade de selecção de métodos de diagnóstico e tratamentos que melhor se adaptem a cada caso clínico.

No linfoma, este aspecto é extremamente importante na medida em que muitas vezes é necessária a realização de vários métodos de diagnóstico e exames complementares, para a confirmação da doença e seu estadiamento, bem como a necessidade de realizar protocolos terapêuticos prolongados e dispendiosos.

Além deste factor, e relativamente ao tema escolhido para a presente dissertação, várias outras limitações surgiram ao longo do estudo. O facto de ser um estudo retrospectivo, limitou um pouco o acesso a informação que era bastante importante para a realização de um estudo mais completo.

A heterogeneidade nos dados da amostra foi também uma das limitações encontradas, revelando alguma falta de uniformidade nos meios de diagnóstico realizados e a falta de cumprimento da terapia por parte de alguns proprietários, podendo ter condicionado os resultados.

Por outro lado, e embora seja a maior amostra de linfoma alguma vez estudada em Portugal, continua a ser pequena para conseguir apurar algumas características e determinadas variáveis, que sejam representativas da realidade nacional, contudo, fica assim descrita uma visão mais actual deste tipo de neoplasia, permitindo a conclusão de vários aspectos.

Quanto aos objectivos gerais propostos para a realização deste trabalho, no que diz respeito às variáveis género, raça, idade e peso, concluímos que a nossa população foi semelhante às analisadas anteriormente, por diferentes autores.

A forma de linfoma mais comum foi a multicêntrica (84%), o imunofenótipo mais frequente foi o de células B (69%), e os estadios OMS mais observados foram o III (34%) e o IV (58%). Este último resultado em conjunto com um maior número de canídeos em sub-estadio "b" no momento do diagnóstico (54%) são dados importantes que nos alertam para a necessidade de realizar mais campanhas de sensibilização dos proprietários de canídeos e desenvolvimento de rastreios oncológicos periódicos que ajudem a detectar esta e outras

neoplasias em fase inicial, aumentando o sucesso do tratamento e melhorando significativamente o prognóstico.

O diagnóstico de linfoma desta série de casos foi realizado sobretudo por histopatologia (56%), permitindo a possível realização de exames complementares de diagnóstico como a imunofenotipagem ou outras técnicas de imunomarcção, por forma a aprofundar a caracterização das diferentes linhagens celulares do linfoma, integrando a informação do nosso país em estudos internacionais, de modo a contribuir para o avanço científico em oncologia veterinária.

A citologia de medula foi raramente realizada (8%), demonstrando que a importância diagnóstica deste exame complementar é discutível, devendo apenas ser realizado em casos específicos de linfoma, quando estão presentes alterações que o justifiquem, nomeadamente hematológicas.

Através da presente dissertação concluiu-se também, no que diz respeito ao tratamento do linfoma, que não existe um esquema terapêutico ideal e uniformizado, sendo a informação bastante variável entre autores. No nosso trabalho, os protocolos mais utilizados numa primeira abordagem e em situações de resgate, foram o CHOP e o COP. Estes protocolos são idênticos aos utilizados pelos diferentes autores, demonstrando uma maior aceitabilidade por parte dos proprietários a estes esquemas terapêuticos e também um bom conhecimento, por parte dos clínicos, dos protocolos mais indicados para tratar cães com linfoma.

Quanto aos efeitos adversos observados durante a quimioterapia, os mais comuns foram os gastrointestinais e os hematológicos (22% cada), sendo que apenas 20% dos canídeos necessitaram de internamento durante o tratamento, não sendo necessário adiar nenhuma sessão quimioterápica.

Neste mesmo âmbito, surgem cada vez mais trabalhos que procuram descobrir qual o melhor protocolo para o tratamento do linfoma e aquele que provoca menos efeitos secundários, aparecendo recentemente o conceito da necessidade de se criarem protocolos específicos com doses calculadas para cada indivíduo, que na opinião da autora será a chave para um maior sucesso futuro nos tratamentos quimioterápicos em oncologia veterinária.

Os tempos médios de sobrevivência (393 dias) e valores de primeira remissão (175 dias), estiveram dentro dos valores esperados, revelando boas práticas clínicas por parte dos Médicos Veterinários Portugueses e uma boa receptividade dos proprietários no tratamento desta neoplasia

Quanto aos nossos objectivos específicos, concluiu-se que na nossa série de casos de linfoma no cão, houve valores médios de sobrevivência semelhantes para linfomas pertencentes ao imunofenótipo B e T, 463 e 388 dias, respectivamente, contrariando um pouco o observado em estudos anteriores. Na opinião da autora serão necessários estudos futuros que apoiem a natureza desta afirmação, passando por um conhecimento mais aprofundado das diferentes linhagens celulares, bem como das características morfológicas e imunológicas que diferenciem os diferentes tipos de linfoma dentro dos mesmos imunofenótipos (B ou T).

Concluimos ainda que na nossa amostra não houve uma ligação entre as variáveis sexo, factor raça pura e sub-estadio OMS, e o desenvolvimento de determinados imunofenótipos de linfoma, contudo, a autora refere que é importante apurar a possibilidade da associação entre estas variáveis e o desenvolvimento de determinados imunofenótipos de linfoma, realizando estudos futuros que incluam um maior número de animais e amostras bem caracterizadas.

É importante reter que a prevalência de neoplasias está a aumentar nos animais de companhia em parte devido ao aumento da esperança média de vida. Assim, e tendo em conta que o linfoma é a neoplasia do sistema hematopoiético mais comum nos cães e que representa um dos tumores que melhor responde à quimioterapia, devem ser desenvolvidos conhecimentos científicos nesta mesma área, de modo a aconselhar da melhor maneira os proprietários, estabelecendo uma boa relação com os mesmos, aumentando assim a adesão ao tratamento.

Por último, e com a realização deste trabalho, conseguimos contribuir para o estudo do linfoma no cão em Portugal, não esquecendo que o conhecimento científico desta neoplasia está em constante progresso, requerendo um trabalho contínuo. É também de salientar a necessidade da realização de estudos multicêntricos e cooperação entre diferentes Médicos Veterinários no nosso país, de modo a obter resultados mais representativos da realidade nacional.

6. Bibliografia

Argyle, D.J. (2008). What is new in canine and feline lymphoma. *In: Proceedings of the 33rd world small animal veterinary congress*, Dublin.

Aubry, O.A., Spangler, E.A., Schleis, S.E. & Smith, A.N. (2012). Evaluation of bone marrow aspirates from multiple sites for staging of canine lymphoma and mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*.

Avery, P.R. & Avery, A.C. (2004). Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Vet Clin Pathol*, 33(4), 196-2007.

Bäckgren, A.W. (1965). Lymphatic leukemia in dogs: an epizootiological clinical and hematological study. *Acta Vet Scand*, 3-12.

Blackwood, L., Sullivan, M. & Lawson, H. (1997). Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases. *J Small Anim Pract*, 38(2), 62-69.

Blackwood, L., German, A.J., Stell A.J. & O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *J Small Anim Pract*, 45(5), 259-262.

Bouchard, H. (2000). Epitheliotropic lymphoma in a dog. *Can Vet J*, 41(8), 628-630.

Brunker, J.D. & Hoover, J.P. (2007). B-cell lymphoma in a dog with ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) and systemic histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*). *Can Vet J*, 48(3), 292-295.

Burton, J.H., Garrett-Mayer, E. & Thamm, D.H. (2012). Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol*, May 2. doi: 10.1111/j.1476-5829.2012.00324.x.

Chun, R. (2009a). Revisiting canine lymphoma: streamlining diagnosis and treatment. *Veterinary information network*.

Chun, R. (2009b). Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? *Top Companion Anim Med*, 24(3), 157-62.

Cienava, E.A., Barnhart, K.F., Brown, R., Mansell, J., Dunstan, R. & Credille, K. (2004). Morphologic immunohistochemical, and molecular characterization of hepatosplenic T-cell lymphoma in dog. *Vet Clin Pathol*, 33(2), 105-110.

Couto, C.G., Cullen, J., Pedroia, V. & Turrel, J.M. (1984). Central nervous system lymphosarcoma in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, 184, 809-813.

Couto, C.G., Rutgers, H.C., Sherding, R.G. & Rojko, J. (1989). Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs: a retrospective study. *J Vet Intern Med*, 3(2), 73-78.

Couto, C.G. (2009). Lymphoma in the cat and dog. In: Nelson, R.W. & Couto C.G. (Eds.), *Small animal internal medicine*. (4^a Ed., pp.1174-1186), St. Louis: Mosby Elsevier.

Coyle, K.A. & Steinberg, H. (2004). Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet pathol*, 41(2), 141-146.

Dallman, M.J. & Saunders, G.K. (1986). Primary spinal cord lymphosarcoma in ten dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 189(10), 1348-1349.

Dobson, J.M., Blackwood, L.B., McInnes, E.F., Bostock, D.E., Nicholls, P., Hoather, T.M. et al. (2001). Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract*, 42(8), 377-384.

Duncan, A.W., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., Maggi, R.G., Williams, L.E., Correa, M.T., et al. (2008). Bartonella DNA in the blood and lymph nodes of Golden Retrievers with lymphoma and in healthy controls. *J Vet Intern Med*, 22(1), 89-95

Flood-Knapik, K.E., Durham, A.C., Gregor, T.P., Sánchez, M.D., Durney, M.E., Sorenmo, K.U. (2012). Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Vet Comp Oncol*, doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00317

Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Guglielmino, R., Gradoni, L., Restucci, B. & Oliva, G. (2008). Extranodal gammadelta-T-cell lymphoma in a dog with leishmaniasis. *Vet Clin Pathol*, 37(3), 298-301.

Fontaine, J., Bovens, C., Bettenay, S. Mueller, R.S. (2009). Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Vet Comp Oncol*, 7(1), 1-14.

Foster, A.P., Sturgess, C., Gould, D.J., Iwasaki, T. & Day, M.J. (2000). Pemphigus foliaceus in association with systemic lupus erythematosus and subsequent lymphoma in a cocker spaniel. *J Small Anim Pract*, 41(6), 266-270.

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 cases. *Vet Pathol*, 39(1), 92-109.

Fry, M.M., Vernau, W., Pesavento, P.A., Brömel, C. & Moore, P.F. (2003). Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Vet Pathol*, 40(5), 556-562.

Garrett, L.D., Thamm, D.H., Chun, R., Dudley, R. & Vail, D.M. (2002). Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*, 16(6), 704-709.

Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G. & Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med*, 15(3), 190-195.

Gentilini, F., Calzolari, C., Turba, M.E., Agnoli, C., Fava, D., Forni, M., et al. (2005). Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma

activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. *Leuk Res*, 29(11), 1263-1269.

Gibson, D., Aubert, I., Woods, J.P., Abrams-Ogg, A., Kruth, S., Wood, R.D., et al. (2004). Flow cytometric immunophenotype of canine lymph node aspirates. *J Vet Intern Med*, 18(5), 710-717.

Goldin, L.R. & Landgren, O. (2009). Autoimmunity and lymphomagenesis. *Int J Cancer*. 124, 1497-1502.

Gustafson, N.R., Lana, S.E., Mayer, M.N. & LaRue, S.M. (2004). A preliminary assessment of whole-body radiotherapy interposed within a chemotherapy protocol for canine lymphoma. *Vet Comp Oncol*, 2(3), 125-131.

Hahn, K.A., Richardson, R., Hahn, E.A., & Chrisman, C.L. (1994). Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. *Vet Pathol*, 31(5), 528-540.

Hayes, H.M., Tarone, R.E., Cantor, K.P., Jessen, C.R., McCurnin, D.M. & Richardson, R.C. (1991). Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J Natl Cancer Inst*, 83(17), 1226-31.

Hawkins, E.C., Morrison, W.B., DeNicola, D.B. & Blevins, W.E. (1993). Cytologic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from 47 dogs with multicentric malignant lymphoma. *J Am Vet Med Assoc*, 203(10), 1418-1425.

Henriques, J & Branquinho, J. (2010). *Diagnóstico e tratamento do linfoma maligno canino em Portugal: resultados preliminares*. Comunicação apresentada no I Encontro de Formação OMV, Portugal.

Hosoya, K., Kisseberth, W.C., Lord, L.K., Alvarez, F.J., Lara-Garcia, A., Kosarek, C.E. et al. (2007). Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *J Vet Intern Med*, 21(6), 1355-63.

Huang, S.H., Kozak, P.J., Kim, J., Habineza-Ndikuyeze, G., Meade, C., Gaurnier-Hausser, A., et al. (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology*, 427(2), 107-17

Jacobs, R.M., Messick, J.B. & Valli, V.E. (2002). *Tumors of the skin and hemolymphatic system*, Meuten, D.J. (Eds.) In: Tumors in domestic animals. (4^a Ed.), Iowa: Iowa State Press.

Jagadeesh, D., Woda, B.A., Draper, J. & Evens, A.M. (2012). Post transplant lymphoproliferative disorders: risk, classification, and therapeutic recommendations. *Curr Treat Options Oncol*, 13(1), 122-6.

Jeffreys, A.B., Knapp, D.W., Carlton, W.W., Thomas, R.M., Bonney, P.L., Degortari, A. et al. (2005). Influence of asparaginase on a combination chemotherapy protocol for canine multicentric lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*, 41(4), 221-6.

Junqueira, L.C. & Carneiro J. (2004). Sistema imunitário e órgãos linfáticos. In *Histologia Básica*. (10^aEd.), (pp. 254-283). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kaiser, C.I., Fidel, J.L., Roos, M. & Kaser-Hotz, B. (2007). Reevaluation of the University of Wisconsin 2-year protocol for treating canine lymphosarcoma. *J Am Hosp Assoc*, 43 (2), 85-92.

Kaneene, J.B. & Miller, R. (1999). Re-analysis of 2,4-D use and the occurrence of canine malignant lymphoma. *Vet Hum Toxicol*, 41(3):164-70.

Keller, E.T., MacEwen, E.G., Rosenthal, R.C., Helfand, S.C. & Fox, L.E. (1993). Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med*, 7(5), 289-295.

Kitchell, B.E. (2005). Practical chemotherapy-An overview [versão electrónica]. In *Proceedings of the 30th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association*, Mexico City, Mexico, 11-14, May, 2005. Acedido em 10 de Maio de 2012, disponível em: <http://ivis.org/proceedings/wsava/2005/88.pdf>

Kiupel, M., Teske, E. & Bostock, D. (1999). Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma. *Vet Pathol*, 36(4), 292-300.

Llabrés-Díaz, F.J. (2004). Ultrasonography of the medial iliac lymph nodes in the dog. *Vet Radiol Ultrasound*, 45(2), 156-165.

LeBien, T.W. & Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(15), 1570-1579.

Legendre, A.M. (2007). Treatment of dogs with lymphoma: A work in progress. *J Vet Int Med*, 21(6), 1166-1167.

Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karisson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M. et al (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), 803-819.

Lurie, D.M., Lucroy, M.D., Griffey, S.M., Simonson, E. & Madewell B.R. (2004). T-cell-derived malignant lymphoma in the boxer breed. *Vet Comp Oncol*, 2(3), 171-175.

Lurie, D.M., Gordon, I.K., Théon, A.P., Rodriguez, C.O., Suter, S.E. & Kent, M.S. (2009). Sequential low-dose rate half-body irradiation and chemotherapy for the treatment of canine multicentric lymphoma. *J Vet Intern Med*, 23(5), 1064-70.

Massa, K.L., Gilger, B.C., Miller, T.L. & Davidson, M.G. (2002). Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Vet Ophthalmol*, 5(2), 9-98.

Mayr, B., Holzheu, M., Schaffner, G., & Reifinger, M. (2003). N-ras mutation in canine lymphoma. *Acta Vet Hung*, 51(1), 91-94.

McKnight, J.A. (2003). Principles of Chemotherapy. *Clinic Tec Small Anim Pract*, 18(2):67-72.

Mellanby, R.J., Herrtage, M.E. & Dobson, J.M. (2002). Treatment of canine lymphoma by veterinarians in first opinion practice in England. *J Small Anim Pract*, 43(5), 198-202.

Meuten, D.J., Kociba, G.J., Capen, C.C., Chew, D.J., Segre, G.V. et al. (1983). Hypercalcemia in dogs with lymphosarcoma. Biochemical, ultrastructural, and histomorphometric investigations. *Lab Invest*, 49(5), 553-562.

Miller, A.G., Morley, P.S., Rao, S., Avery, A.C., Lana, S.E. & Olver, C.S. (2009). Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*, 23(1), 116-122.

Modiano, J.F., Breen, M., Burnett, R.C., Parker, H.G., 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.

Moore, P.F., Olivry, T. & Nadydan, D. (1994). Canine Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma (Mycosis Fungoides) Is a Proliferative Disorder of CD8+ T Cells. *Am J Pathol*, 144(2), 421-429.

Moreno, K., Frederico, A. P., Loureiro, R. (2007). Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. *Br J Vet Res Anim Scienc*, 44, 46-52. Acedido em 15 de Fevereiro de 2012, disponível em <http://www.fumvet.com.br/novo/revista/44/suplemento/46-52.pdf>

Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C., et al. (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's

lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med*, 23(2), 301-310.

Penninck, D., Smyers, B., Webster, C.R., Rand, W. & Moore, A.S. (2003). Diagnostic value of ultrasonography in differentiating enteritis from intestinal neoplasia in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, 44(5), 570-575.

Philips, B.S., Kass, P.H., Naydan, D.K., Winthrop, M.D., Griffey, S.M. & Madewell, B.R. (2000). Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest*, 12(2), 111-117.

Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K. & Fournel- Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J*, 167(2), 158-166.

Rebhun, R.B., Lana, S.E., Ehrhart, E.J., Charles, J.B., & Thamm, D.H. (2008). Comparative Analysis of Survivin Expression in Untreated and Relapsed Canine Lymphoma. *J Vet Intern Med*, 22(4), 989-995.

Raskin, R.E. & Krehbiel, J.D. (1989). Prevalence of leukemic blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. *J Am Hosp Assoc*, 194(10), 1427-1429.

Rassnick, K.M., McEntee, M.C., Erb, H.N., Burke, B.P., Balkman, C.E., Flory, A.B. et al. (2007). Comparison of 3 Protocols for Treatment after Induction of Remission in Dogs with Lymphoma. *J Vet Intern Med*, 21(6), 1364-1373.

Rosenberg, M.P., Matus, R.E. & Patnaik, A.K. (1991). Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia. *J Vet Intern Med*, 5(5), 268-271.

Rossi, G., Rossi, M., Vitali, C.G., Fortuna, D., Burroni, D., Pancotto, L., et al. (1999). A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 67(6), 3112-3120.

Simon, D., Nolte, I., Eberle, N., Abbrederis, N., Killich, M. & Hirschberger, J. (2006). Treatment of Dogs with Lymphoma Using a 12-Week, Maintenance-Free Combination Chemotherapy Protocol. *J Vet Intern Med*, 20(4), 948-954.

Simon, D., Moreno, S.N., Hirschberger, J., Moritz, A., Kohn, B., Neumann, S., et al. (2008). Efficacy of a continuous, multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent protocol in dogs with lymphoma. *J Am Vet Med Assoc*, 232(6), 879-885.

Smedby, K.E., Hjalgrim, H., Askling, J., Chang, E.T., Gregersen, H., Porwitt-MacDonald, A. et al. (2006). Autoimmune and Chronic Inflammatory Disorders and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma by Subtype. *J Nat Canc Inst*, 98(1), 51-60.

Starrak, G.S., Berry, C.R., Page, R.L., Johnson, J.L. & Thrall, D.E., et al. (1997). Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dog with lymphosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound*, 38(6), 411-418.

Stone, R.H., Frontera-Acevedo, K., Saba, C.F., Ambrose, D., Moorhead, A.R. & Brown, C.A. (2011). Lymphosarcoma associated with *Heterobilharzia americana* infection in a dog. *J Vet Diagn Invest*, 23(5), 1065-1070.

Swanson, J.F. (1990). Ocular manifestations of systemic disease in the dog and cat: recent developments. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 20(3), 849-867.

Takashima-Uebelhoer, B.B., Barber, L.G., Zagarins, S.E., Procter-Gray, E., Gollenberg, A.L., Moore, A.S., et al. (2012). Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma. *Environ Res*, 112, 171-176.

Teske, E., Van Heerde, P., Rutteman, G., Kurzman, I.D., Moore, P. F. & MacEwen, E. G. (1994). Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 205(12), 1722-1728.

Thilakaratne, D.N., Mayer, M.N., MacDonald, V.S., Jackson, M.L., Trask, B.R. & Kidney, B.A. (2010). Clonality and phenotyping of canine lymphomas before chemotherapy and during remission using polymerase chain reaction (PCR) on lymph node cytologic smears and peripheral blood. *Can Vet J*, 51(1), 79-84.

Thomas, R., Smith, K.C., Ostrander, E.A. Galibert, F. & Breen, M. (2003). 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.

Tizard, I.R. (2004). Organs of the Immune System. In: Tizard, I.R. (Eds.), *Veterinary immunology: An introduction*. (7^aEd., pp. 78-92), Philadelphia: Saunders.

Tomiyasu, H., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2010). Gastrointestinal and hematologic adverse events after administration of vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin in dogs with lymphoma that underwent a combination multidrug chemotherapy protocol. *J Vet Med Sci*, 72(11), 1391-1397.

Turek, M.M., Saba, C., Melissa, C.P. & Argyle, D.J. (2008). Canine lymphoma and leukemia. In: Argyle, D.J., Brearley, M.J. & Turek, M.M. (Eds.), *Decision making in small animal oncology* (pp. 171-196)., Singapore: Wiley-blackwell.

Vail, D.M. & Thamm, D.H. (2005). Hematopoietic Tumors. In: S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6^aEd., pp. 732-747), Missouri: Elsevier Saunders.

Vail, D.M. & Young, K.M. (2007). Hematopoietic Tumors. In: Withrow, S.J. & MacEwen, E.G. *Small Animal Clinical Oncology*, (4^aEd., pp. 699-717), Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Vail, D.M. (2011). Tumours of the hematopoietic system. In: Dobson, J.M. & Lascelles, B.D.X. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*, (3^a Ed., pp.285-291), England: BSAVA.

Valdovich, P., Psáder, R., Tóth, Z.A. & Perge, E. (2004). Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Vet Pathol*, 41(4), 338-345.

Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L., Vernau, W. & Moore, P.F. (2002). Histological Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals. In *World Health Organization International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals*.

Valli, V.E., Vernau, W., de Lorimier, L.P., Graham, P.S. & Moore, P.F. (2006). Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol*, 43(3), 241-256.

Valli, V.E., San 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.

Vaughan, A., Johnson, J.L., Williams, L.E. (2007). Impact of chemotherapeutic dose intensity and hematologic toxicity on first remission duration in dogs with lymphoma treated with a chemoradiotherapy protocol. *J Vet Intern Med*, 21, 1332–1339.

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.

Vezzali, E., Parodi, A.L., Marcato, P.S., & Bettini G. (2009). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol*, 8(1), 38-49.

Villamil, J.A., Henry, C.J., Hahn, A.W., Bryan, J.N., Tyler, J.W. & Caldwell, C.W. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol*

Waters, D.J. (2006). Cancer Regulation in senior animals [versão electrónica]. In: *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, 7-11*, pp. 846-847.

Weidmann, E. (2000). Hepatosplenic T cell lymphoma: a review of 45 cases since the first report describing the disease as a distinct lymphoma entity in 1990. *Leukemia*, 14(6), 991-997.

White, S.D., Rosychuk, R.A., Scott, K.V., Trettien, A.L., Jonas, L. & Denerolle, P. (1993). Use of isotretinoin and etretinate for treatment of benign cutaneous neoplasia and cutaneous lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 202(3), 387-391.

Williams, L.E., Johnson, J.L., Hauck, M.L., Ruslander, D.M., Price, G. et al. (2004). Chemotherapy followed by half-body radiation therapy for canine lymphoma. *J Vet Intern Med*, 18(5), 703-709.

Williams, M.J., Avery, A.C., Lana, S.E., et al. (2008). Canine lymphoproliferative disease characterized by lymphocytosis: immunophenotypic markers of prognosis. *J Vet Intern Med*, 22(), 596-601.

Zahm, S.H. & Blair, A. (1992). Pesticides and non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, 52(19), 5485-5488.