

INÊS SOFIA MAGALHÃES PEREIRA

**LINFOMA CANINO: CARACTERIZAÇÃO E
RELAÇÃO COM LEISHMANIOSE (2017-2019)**

Orientador: Professor Doutor Rui Pedro Faísca

Co-Orientadora: Dra. Ana Sofia Teixeira Enes das Eiras

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária Lisboa

Lisboa

2019

INÊS SOFIA MAGALHÃES PEREIRA

**LINFOMA CANINO: CARACTERIZAÇÃO E RELAÇÃO COM
LEISHMANIOSE (2017-2019).**

Dissertação defendida 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, no dia 3 de Dezembro de 2019, com o despacho Reitoral nº 287/2019, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Joana Oliveira

Orientador: Professor Doutor Rui Pedro Faísca

Co-Orientadora: Dra. Ana Eiras

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

LISBOA

2019

Go as far as you can see; when you get there,
you'll be able to see further.

Thomas Carlyle

Agradecimentos

À Dra. Ana Eiras, um especial agradecimento, por todo o carinho, apoio, paciência e, sobretudo, amizade. Pela ajuda na realização desta dissertação e acompanhamento ao longo do estágio curricular. Pela exigência e transmissão de conhecimentos. Obrigada por ser uma inspiração, pessoal e profissional.

Ao Professor Doutor Rui Pedro Faísca, por ter aceite orientar esta dissertação. Pela procura do tema. Por toda a ajuda e compreensão.

À Professora Raquel Matos pela disponibilidade e ajuda na realização da estatística.

A toda a brilhante equipa do Hospital Veterinário do Restelo, por me terem aceite e recebido tão bem. Pela partilha de conhecimentos, exemplar profissionalismo e exigência.

À excelente equipa com que tive a oportunidade de trabalhar e partilhar conhecimentos durante a minha estadia na *University of Tennessee College of Veterinary Medicine*. Por me terem integrado por completo na equipa e por acreditarem nas minhas capacidades. Aos tutores por terem confiado no meu trabalho.

Ao Nuno, por me ter acompanhado sempre ao longo deste percurso, desde o primeiro ao último dia. Por ter as palavras certas na altura certa. Por todo o apoio, carinho e companheirismo.

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim. Sem vocês a concretização deste sonho não seria possível.

Aos meus amigos que sei que levo para a vida. Pelas boas memórias que irão ficar guardadas para sempre.

Ao Archie, Susan e Dianne por me terem apoiado e acolhido como parte da família. Por toda a bondade e carinho. Por me ensinarem a ver a vida e os outros de outra forma. Um enorme obrigada.

Resumo

A melhor compreensão da medicina veterinária e os avanços tecnológicos na mesma têm permitido o aumento do tempo de vida dos animais domésticos, aumentando consequentemente a incidência de determinadas enfermidades, nomeadamente neoplasias. O linfoma é das neoplasias mais comuns no cão, originando-se principalmente em órgãos linfohematopoiéticos sólidos. A etiologia do linfoma não está ainda bem esclarecida, todavia, acredita-se numa causa multifatorial, envolvendo fatores genéticos, infecciosos, ambientais e imunológicos.

A presente dissertação, realizada no âmbito da conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, pretende caracterizar o linfoma canino e estudar a sua relação com a leishmaniose, com o intuito de compreender se esta poderá ter influência no seu desenvolvimento. Foi realizado um estudo retrospectivo observacional em canídeos com diagnóstico de linfoma, durante o período de 2017 a 2019.

A amostra do presente estudo foi composta por 139 canídeos. Verificou-se maior prevalência de linfoma em machos, sendo uma grande parte da amostra composta por canídeos sem raça definida. Dos canídeos em estudo, 71% apresentavam localização multicêntrica, sendo o imunofenótipo mais comum de células B. Relativamente à terapêutica instituída, o protocolo mais utilizado foi o CHOP, tendo-se verificado um período médio de sobrevivência de $6,2 \pm 4,9$ meses nos animais que receberam este tratamento. Quanto à relação entre linfoma e leishmaniose, apenas uma pequena percentagem da população em estudo apresentava informações relativamente ao seu estatuto para esta enfermidade (35%). Deste subgrupo verificou-se uma prevalência de 15% de leishmaniose.

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos demonstrados por outros autores. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma relação associativa direta entre linfoma e leishmaniose, observou-se uma prevalência de leishmaniose superior à descrita por outros autores.

Palavras chave: Linfoma, canídeo, imunofenótipo, leishmaniose canina.

Abstract

The increase of the lifetime of domestic animals, as a result of a better understanding of veterinary medicine and technological advances, has allowed the intensification of the incidence of certain diseases, namely neoplasms. Lymphoma is one of the most common neoplasms in dogs, originating essentially from solid lymphohematopoietic organs. The aetiology of lymphoma is multifactorial, involving genetic, infectious, environmental and immunological factors.

The aims of this dissertation, carried out as part of the conclusion of the master's degree in Veterinary Medicine, were to characterize canine lymphoma and to study its interaction with leishmaniasis. A retrospective study was performed with data from canine lymphoma diagnosed from 2017 to 2019.

A total of 139 canine lymphoma cases were included in this study. The results showed that males were predominant and mixed breed dogs were most common affected. From the total sample, the multicenter form of lymphoma was the most common (71%), and from those immunophenotyped, B-cell immunophenotype was predominant. Regarding the elected therapy, CHOP protocol was the one preferred by veterinary doctors. The dogs that received this protocol achieved an average of survival time of $6,2 \pm 4,9$ months. Considering the association between lymphoma and leishmaniasis, only a small percentage of the study population provided information about their status for this disease (35%). A prevalence of 15% of leishmaniasis was shown in this group.

The results obtained in the present study are similar to those presented by other authors. It wasn't possible to establish an associative connection amongst lymphoma and leishmaniasis but the interaction between the 2 is possible.

Keywords: Lymphoma, dog, immunophenotype, canine leishmaniasis.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

$\geq$	Maior ou igual que
$\leq$	Menor ou igual que
®	Símbolo de marca registada
$\gamma\delta$	Gamma Delta
μL	Microlitro
%	Percentagem
<	Menor que
>	Maior que
Ac	Anticorpos
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
CAMV	Centro de Atendimento Médico-Veterinário
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CF	Citometria de Fluxo
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisolona
CMD	Cardiomiopatia dilatada
DMAC	Dexametasona, Melfalano, Actinomicina D e Citarabina
	Arabinosídeo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio padrão
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>Et al.</i>	E outros, da locução latina “ <i>et alli</i> ”
GGT	Gama glutamil transpeptidase
h	Horas
HVR	Hospital Veterinário do Restelo
IM	Índice mitótico
IMH	Imunohistoquímica
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
L-CHOP	L-Asparaginase, Vincristina, Ciclofosfamida, Doxorrubicina e Prednisona
m^2	Metros quadrados
MALT	Tecido linfoide associado à mucosa

mg	Miligrama
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIMV	Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
MOMP	Mecloretamina, Vincristina, Melfalano e Prednisona
MOPP	Mecloretamina, Vincristina, Procarbazona e Prednisona
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i>
NCI-WF	<i>National Cancer Institute - Working Formulation</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PARR	<i>PCR for antigen receptor gene rearrangement</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PO	Por via oral, da locução latina “ <i>per os</i> ”
PTH-rP	Proteína relacionada com hormona Paratiroide
RC	Remissão completa
REAL	<i>Revised European–American Lymphoma</i>
RP	Remissão parcial
SC	Subcutâneo
SID	Uma vez ao dia, da locução latina “ <i>semel in die</i> ”
SNC	Sistema Nervoso Central
sp.	Espécie
SRD	Sem raça definida
TAC	Tomografia axial computadorizada
TC	Tomografia computadorizada
US FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UTCVM	<i>University of Tennessee College of Veterinary Medicine</i>
VCOG-CTCAE	<i>Veterinary cooperative oncology group- common terminology criteria for adverse events</i>
VS.	Versus
WHO	<i>World Health Organization</i>

Índice geral

ÍNDICE DE TABELAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE GRÁFICOS	11
DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1. Sistema Imunitário	17
1.1 Órgãos sistema imunitário.....	17
1.2 Imunidade inata e Imunidade adaptativa.....	18
1.3 Linfócitos	19
2. Linfoma Canino	20
2.1 Etiologia	21
2.1.1 Fatores Infeciosos.....	21
2.1.2 Fatores Ambientais.....	23
2.1.3 Fatores Imunológicos	23
2.1.4 Fatores Genéticos	24
2.2 Classificação	24
2.2.1 Classificação com base na localização anatómica	24
2.2.2 Classificação histológica	25
2.3. Diagnóstico	28
2.3.1 Apresentação e sinais clínicos.....	28
2.3.2 Abordagem diagnóstica e estadiamento	29
2.3.2.1 Exame Físico.....	30
2.3.2.2 Alterações laboratoriais.....	30
2.3.2.5 Métodos diagnóstico imagiológicos.....	31
2.3.2.3 Citologia e Histologia	32
2.3.2.3.1 Imunofenotipagem	33
2.3.2.3.2 Técnicas de laboratório avançadas	33
2.4. Tratamento	34
2.4.1. Tratamento de linfoma nodal/multicêntrico	35
2.4.2 Protocolos de Resgate	38
2.4.3 Tratamento de linfoma extra-nodal	41
2.4.4 Radioterapia	41
2.5. Prognóstico.....	41
MATERIAL E MÉTODOS	44

1. Critérios de inclusão.....	44
2. Amostra em estudo.....	44
3. Critérios exclusão.....	44
4. Análise estatística.....	44
RESULTADOS.....	46
1.1 Caracterização da amostra em estudo	46
1.2 Caraterização do linfoma da amostra em estudo.....	48
1.3 Tratamento implementado.....	50
1.4 Tempo médio de sobrevivência.....	50
1.5 Interação com Leishmaniose.....	52
DISCUSSÃO.....	53
1.1 Caracterização da amostra em estudo	53
1.2 Caraterização do linfoma da amostra em estudo.....	54
1.3 Tratamento implementado.....	56
1.4 Tempo médio de sobrevivência.....	56
1.4 Interação com leishmaniose	58
1.5 Limitações do estudo.....	59
CONCLUSÃO	60
BIBLIOGRAFIA.....	62

Índice de tabelas

Tabela 1. Descrição da frequência absoluta de consultas e cirurgias no estágio realizado no HVR.	13
Tabela 2. Descrição da frequência absoluta de casos acompanhados no estágio realizado na UTCVM.	16
Tabela 3. Resumo classificação histológica de linfoma canino segundo WHO/REAL.....	27
Tabela 4. Diagnósticos diferenciais de linfoma canino conforme a sua localização anatómica	29
Tabela 5. Sistema de estadiamento do linfoma canino segundo WHO.....	30
Tabela 6. Descrição das diferentes respostas ao tratamento.	35
Tabela 7. Descrição protocolo CHOP	36
Tabela 8. Descrição protocolo MOMP para tratamento de recidiva de linfoma.....	39
Tabela 9. Descrição efeitos secundários à administração de quimioterapia segundo VCOG-CTCAE.....	40
Tabela 10. Fatores de prognóstico de linfoma canino.....	42
Tabela 11. Descrição da população segundo a raça	47
Tabela 12. Caracterização do linfoma da amostra populacional.....	49
Tabela 13. Caracterização da amostra em estudo com resultado positivo para leishmaniose.....	52

Índice de Figuras

Figura 1. Representação do desenvolvimento embrionário do sistema linfático.....	17
Figura 2. Estrutura interna de um linfonodo	18
Figura 3. Representação colorida dos diferentes territórios linfáticos.....	18
Figura 4. Diferenciação do linfócito B no linfonodo.	19
Figura 5. Distribuição geográfica de leishmaniose canina na Europa	22
Figura 6. Imagem citológica de PAAF de linfonodo de um cão com linfoma multicêntrico.	32
Figura 7. Realização de radioterapia como tratamento de linfoma mediastínico	41

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Frequência relativa das consultas assistidas por área no HVR.	14
Gráfico 2. Frequência relativa das cirurgias assistidas por área no HVR.	14
Gráfico 3. Caracterização da amostra segundo a variável “idade”.	46
Gráfico 4. Representação geográfica da população em estudo.	47
Gráfico 5. Representação da população segundo a variável "localização anatómica".....	48
Gráfico 6. Caracterização da população segundo a variável “Imunofenótipo”.	48
Gráfico 7. Caracterização da amostra segundo o parâmetro “tratamento implementado”.	50
Gráfico 8. Gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier da amostra em estudo segundo o imunofenótipo B ou T.	51
Gráfico 9. Gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier da amostra em estudo segundo o tratamento implementado.	51
Gráfico 10. Prevalência de leishmaniose na população em estudo que realizou testes de diagnóstico (n=48).	52

Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi realizado em duas instituições por mim escolhidas – no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), em Lisboa, e no *John and Tickle Small Animal Hospital*, na *University of Tennessee College of Veterinary Medicine* (UTCVM), no Tennessee, Estados Unidos.

O estágio no HVR decorreu no período entre 17 de setembro de 2018 e 10 de março de 2019, com a duração total aproximada de 1090 horas. Durante o período de estágio, foram realizadas rotações quinzenais em diferentes especialidades, nomeadamente, Medicina Interna, Cirurgia (x2), Oncologia (x3), Internamento, Dermatologia, Cardiologia, Medicina de exóticos, Oftalmologia, Neurologia e Ortopedia.

Em cada rotação foi possível acompanhar um médico veterinário da especialidade, assistindo a consultas ou procedimentos cirúrgicos, e discutindo ativamente todos os casos clínicos acompanhados. Foi também possível acompanhar e auxiliar procedimentos do serviço de imagiologia, nomeadamente, ecografia abdominal, ecocardiograma, radiografia, tomografia axial computadorizada (TAC) e endoscopia do aparelho respiratório e gastrointestinal. Perante permissão do médico veterinário responsável, foi permitida a recolha da anamnese, realização de exame físico de estado geral, recolha de sangue, administração de fármacos (por via oral, subcutânea, intramuscular e endovenosa) e realização de análises clínicas (hemograma, bioquímicas, ionograma, micro-hematócrito e testes rápidos). Com a supervisão do médico veterinário responsável foi também possível a punção de linfonodos periféricos, realização de cistocentese, toracentese e abdominocentese.

No serviço de internamento, para além das atividades descritas, foi também possível a alimentação dos animais internados, colocação de cateteres endovenosos e sistemas de venoclise, algaliação de cães e gatos, medição de glicémia e pressão arterial, limpeza e desbridamento de feridas, monitorização do animal e preparação de altas clínicas.

A casuística respetiva de cada rotação está descrita na Tabela 1, onde estão discriminados o número de consultas e cirurgias acompanhadas no HVR. No serviço de cirurgia de tecidos moles foi possível a observação e auxílio em procedimentos de enterectomia, gastrotomia, esplenectomia, laparotomia de urgência, colecistectomia, colocação de bypass, cistotomia, ovariopneumotomia, mastectomia, nodulectomia, orquiectomia, resolução de hermafroditismo e anoplastia.

Para além das áreas supracitadas, foi também permitido o acesso ao laboratório do HVR onde foram executadas e interpretadas citologias e esfregaços sanguíneos, bem como análises de urina.

Tabela 1. Descrição da frequência absoluta de consultas e cirurgias no estágio realizado no HVR.

Especialidade		Número de casos
Consultas		
Oncologia		67
Medicina preventiva		42
Medicina Interna	Gastroenterologia	21
	Urologia/Nefrologia	17
	Pneumologia	10
	Endocrinologia	5
	Hematologia	5
	Total: 37	
Cardiologia		33
Oftalmologia		26
Neurologia		15
Dermatologia		14
Pré-cirúrgica		12
Ortopedia		6
Animais exóticos		6
Reprodução		2
		Total: 260
Cirurgia		
Tecidos Moles		32
Ortopedia		7
Neurologia		6
Oftalmologia		4
Destartarização/extração dentária		3
		Total: 52

Nos seguintes gráficos encontra-se descrita a frequência relativa das consultas (Gráfico 1) e das cirurgias (Gráfico 2) acompanhadas ao longo do estágio realizado no HVR.

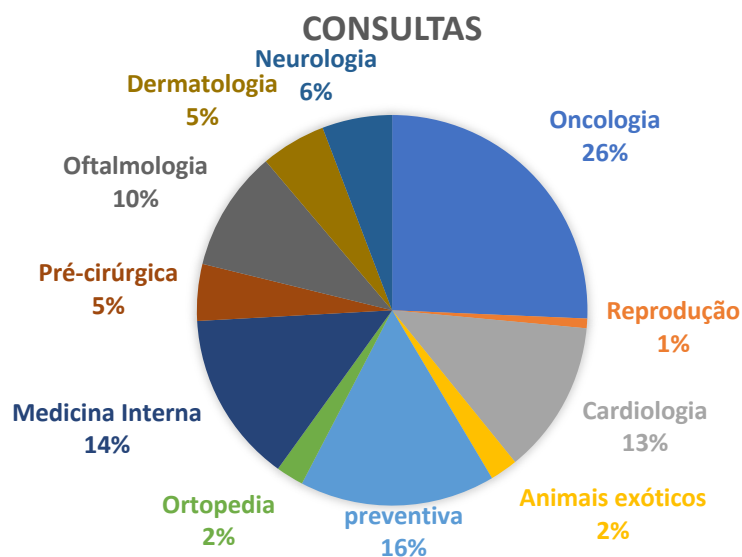


Gráfico 1. Frequência relativa das consultas assistidas por área no HVR.

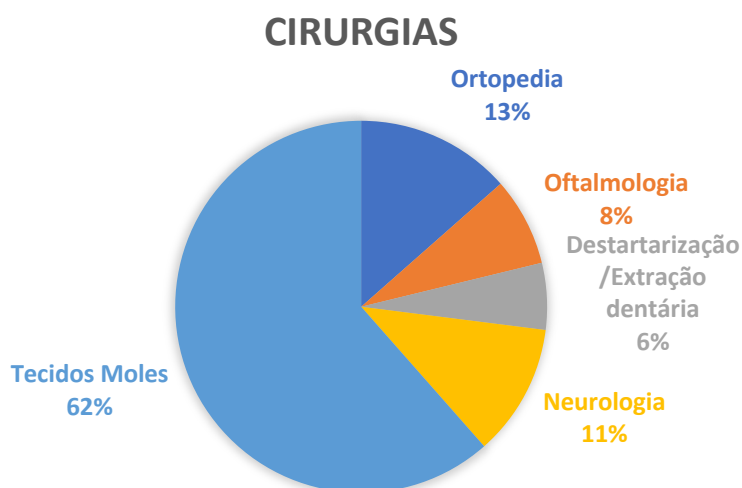


Gráfico 2. Frequência relativa das cirurgias assistidas por área no HVR.

O estágio realizado no HVR foi sem dúvida muito enriquecedor a nível académico. O método de organização do período de estágio proposto pelo HVR é incentivador e permite não só aplicar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do MIMV como também fomenta a descoberta e interesse por outras áreas. Considero o estágio realizado muito marcante e impulsionador, tanto a nível profissional como pessoal.

O estágio na UTCVM decorreu no período entre 13 de Maio de 2019 e 5 de Julho de 2019, com a duração total aproximada de 410 horas. Durante o decorrer do estágio foram realizadas rotações quinzenais nas áreas de Oncologia (x2), Medicina Interna e Radiologia. Em todos os serviços foi possível a completa integração na equipa, a qual era constituída por 3-5 alunos séniores, um clínico especialista residente e um clínico especialista. Era responsabilidade do aluno o primeiro contacto com tutor, a recolha da anamnese, exame físico de estado geral, plano de diagnóstico e tratamento a realizar, bem como a realização da alta clínica.

Nos serviços de oncologia e medicina interna eram realizadas rondas em conjunto, tanto no período da manhã como no período da tarde, para discussão dos casos clínicos e apresentação de tópicos relacionados com os casos acompanhados ao longo deste período. No serviço de oncologia foi possível não só a realização das tarefas supracitadas, mas também a punção de nódulos, realização de biópsias cutâneas, toracocentese, administração de quimioterapia e observação e auxílio na realização de radioterapia. Durante a rotação de medicina interna, foi possível também a observação de endoscopia das vias respiratórias, a realização de biópsia nasal, cistocentese e punção articular para recolha de líquido sinovial. Durante ambas as rotações foi autorizado o acesso ao laboratório para observação de citologias.

No serviço de radiologia, foi possível o contacto com meios de diagnóstico imagiológicos, nomeadamente, ecografia, radiografia, TAC e ressonância magnética. Era responsabilidade do aluno a preparação dos animais para a realização do exame imagiológico (administração de fármacos por via endovenosa, contenção e posicionamento) e a interpretação do exame realizado. No período da manhã eram realizadas rondas em grupo acerca de determinados tópicos bem como avaliações escritas à cerca das mesmas. As avaliações escritas consistiam na resolução de casos clínicos acerca de radiologia óssea, torácica e abdominal de cães, gatos, ruminantes e cavalos.

Na Tabela 2 está descrita a casuística de cada rotação (medicina interna e oncologia), discriminando o número de casos acompanhados durante o período de estágio na UTCVM.

Tabela 2. Descrição da frequência absoluta de casos acompanhados no estágio realizado na UTCVM.

Especialidade		Número de casos
Medicina Interna	Úreter ectópico	1
	Tumor nasal	1
	Mucocelo biliar	2
	Hiperadrenocorticismo	2
	Diabetes Mellitus	1
	Doença renal crónica	1
		Total: 8
Oncologia	Linfoma	15
	Mastocitoma	5
	Sarcoma de tecidos moles	4
	Adenocarcinoma das glândulas apócrinas dos sacos anais	3
	Melanoma	2
	Osteossarcoma	1
	Mesotelioma	1
		Total: 31
		<u>Total: 39</u>

O estágio realizado na UTCVM foi sem dúvida uma experiência académica enriquecedora e desafiante, tanto pela responsabilidade exigida como pela confiança oferecida pela equipa. O sentimento de integração na equipa foi deveras importante e motivador no acompanhamento de casos clínicos desafiantes. A realização deste estágio permitiu um enorme progresso tanto a nível profissional como pessoal.

Revisão Bibliográfica

1. Sistema Imunitário

O sistema imunitário define-se como um conjunto de células e tecidos que têm como função não só a defesa do organismo contra potenciais agentes patogénicos, mas também a prevenção do desenvolvimento de determinadas neoplasias (Abbas *et al.*, 2016).

1.1 Órgãos sistema imunitário

De forma simplificada, o conjunto de tecidos que formam o sistema imunitário pode ser dividido em órgãos linfoides primários e órgãos linfoides secundários (Jaffe *et al.*, 2016). Entendem-se por órgãos linfoides primários a medula óssea e o timo. Estes têm como principal função a formação e maturação dos linfócitos, ocorrendo no timo o processamento dos linfócitos T e na medula óssea dos linfócitos B. Por outro lado, os órgãos linfoides secundários são os linfonodos, baço e tecido linfoide associado às mucosas (MALT) (Abbas *et al.*, 2016). É nestes órgãos que os linfócitos maduros encontram os antígenos e desenvolvem diferentes tipos de respostas imunológicas (Jaffe *et al.*, 2016).

Relativamente à embriologia, os vasos do sistema linfático derivam da mesoderme, tal como o sistema cardiovascular. No período embrionário, existem 6 sacos linfáticos que mais tarde, através da agregação de tecido linfoide, se transformam em linfonodos (McGeady *et al.*, 2017).

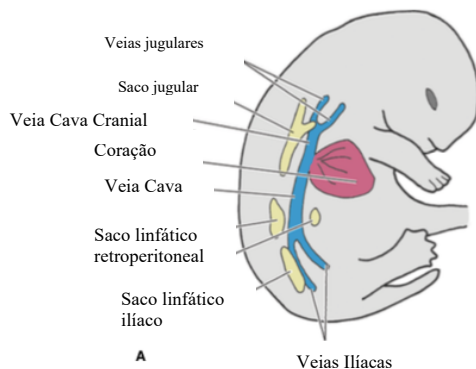


Figura 1. Representação do desenvolvimento embrionário do sistema linfático (Adaptado de McGeady *et al.*, 2017).

Os linfonodos são estruturas encapsuladas compostas por um conjunto de células reticulares que contêm inúmeros linfócitos. Estes órgãos estão localizados de forma estratégica ao longo do corpo recebendo, através de uma rede de vasos linfáticos, a linfa proveniente dos tecidos (McGeady *et al.*, 2017).

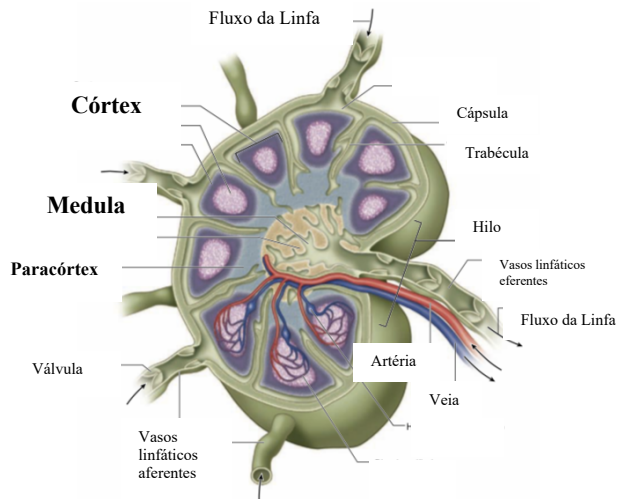


Figura 2. Estrutura interna de um linfonodo (Adaptado de Mescher, 2016).

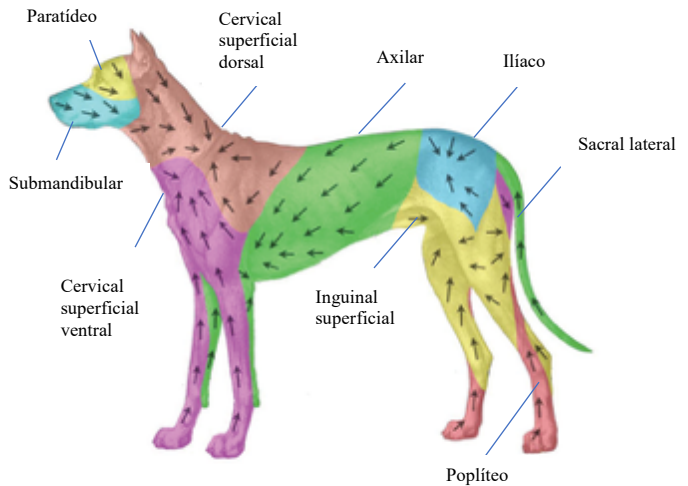


Figura 3. Representação colorida dos diferentes territórios linfáticos (Adaptado de Suami *et al.*, 2013)

1.2 Imunidade inata e Imunidade adaptativa

O mecanismo de defesa do hospedeiro contra potenciais invasores pode ser classificado de 2 formas, nomeadamente, imunidade inata ou imunidade adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, sendo constituída por um conjunto de barreiras físicas, tais como barreiras epiteliais e mucosas, e células fagocitárias, nomeadamente, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células *natural killer* (NK) (Abbas *et al.*, 2016).

Por outro lado, a imunidade adaptativa é desenvolvida ao longo da vida do animal e providencia uma resposta mais específica contra determinados agentes (Abbas *et al.*, 2016). Ou seja, este tipo de resposta é orientado contra antígenos específicos que são apresentados por complexos principais de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) aos linfócitos B (Jaffe *et al.*, 2016). Após reconhecerem os antígenos invasores, os linfócitos B proliferam e diferenciam-se em células efectoras, que levam à secreção de plasmócitos produtores de anticorpos que eliminam os agentes patogénicos, e em células de memória imunológica (Abbas *et al.*, 2016).

1.3 Linfócitos

Os linfócitos representam cerca de um terço do número total de leucócitos, e apesar de morfologicamente semelhantes entre si, apresentam diferentes linhagens, funções e imunofenótipos. No geral, classificam-se principalmente como linfócitos B, T e células NK (Abbas *et al.*, 2016). Os linfócitos B são as únicas células responsáveis pela produção de anticorpos (Ac), os quais podem ser encontrados por todo o corpo e constituem uma parte importante da defesa dos mamíferos contra agentes invasores (Mescher, 2016). Tal como supracitado, são fundamentais na resposta imune adaptativa uma vez que quando ativados, diferenciam-se em plasmócitos e células de memória (Abbas *et al.*, 2016). Os linfomas B têm origem nos linfócitos B, podendo ocorrer uma mutação em qualquer fase do ciclo celular (Kuppers, 2005).

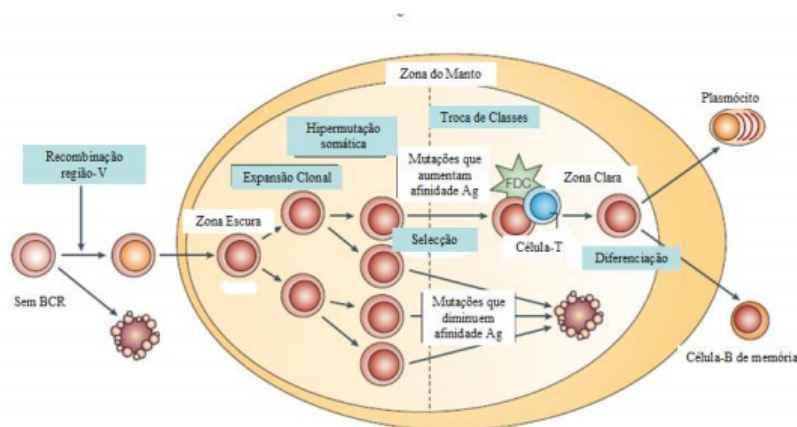


Figura 4. Diferenciação do linfócito B no linfonodo (Adaptado de Kuppers, 2005).

Por outro lado, os linfócitos T são responsáveis pela imunidade celular, tendo um papel importante na resposta imune através da libertação de citocinas e através da indução da apoptose de células infetadas pelo patógeno (Mescher, 2016).

A sua diferenciação é possível através da utilização de técnicas que permitem a identificação de determinadas moléculas na superfície celular, classificadas de acordo com um sistema de complexos proteicos, denominados como marcadores de *cluster of differentiation* (CD) (Tizzard, 2013).

As células NK desempenham um papel fundamental na resposta imune inata, respondendo não só contra agentes patogénicos como contra células tumorais. Após ativadas, libertam grânulos citotóxicos que destroem as células agressoras (Male *et al.*, 2006).

2. Linfoma Canino

Nos últimos tempos, tem-se verificado um aumento significativo da incidência de neoplasias nos animais domésticos. Esta afirmação estará certamente relacionada com o aumento da esperança média de vida dos animais promovida pela implementação de planos nutricionais e vacinais cada vez mais completos, e pelo contínuo desenvolvimento de melhores técnicas de diagnóstico e tratamento (Paoloni & Khanna, 2007).

O linfoma é uma das neoplasias mais comuns na prática clínica de pequenos animais, sendo a 3^a neoplasia mais diagnosticada em cães, representando cerca de 83% dos tumores hematopoiéticos e 24% de todos os tumores caninos (Vail *et al.*, 2013; Ruple *et al.*, 2016). O termo linfoma abrange um grupo de neoplasias que têm em comum a sua origem nas células linforeticulares, desenvolvendo-se através da proliferação maligna das mesmas, por norma nos tecidos linfóides, podendo, no entanto, desenvolver-se em qualquer tecido (Vail *et al.*, 2013).

Em termos epidemiológicos, esta enfermidade afeta principalmente cães com faixa etária compreendida entre os 6 e os 9 anos de idade (Fournel-Fleury *et al.*, 2002). Não parece haver uma predisposição diretamente relacionada com o género feminino ou masculino, no entanto, estudos realizados por Villamil *et al.* (2009) relativamente ao impacto hormonal e sexual no desenvolvimento de linfoma canino, demonstraram uma menor prevalência em fêmeas não esterilizadas. Relativamente à predisposição racial, diferentes estudos evidenciaram maior prevalência em determinadas raças, no entanto, estes dados podem variar conforme a localização geográfica dos animais (Yau *et al.*, 2017). No geral, as raças com maior prevalência são o boxer, bull mastiff, basset hounds, São Bernardo, scotish terrier e bulldog (Priester & McKay, 1980; Edward *et al.*, 2003).

Apesar do linfoma canino ser objeto de contínuo estudo, a sua classificação, tratamento e prognóstico são ainda matérias de difícil compreensão em medicina veterinária (Ito *et al.*, 2014). Várias investigações foram realizadas na tentativa de identificar fatores relacionados com o tumor e com o animal que possam ter valor preditivo na resposta ao tratamento e prognóstico do animal. Entendem-se por fatores inerentes ao animal a idade, género, raça e condição corporal. Apesar destes fatores serem importantes, não existe ainda evidência de que estejam diretamente relacionados com o prognóstico.

A implementação de protocolos de quimioterapia cada vez mais completos tem tornado o linfoma umas das neoplasias com maior taxa de resposta e remissão (Parodi, 2001; Ito *et al.*, 2014).

2.1 Etiologia

A investigação de fatores com potencial carcinogénico em populações caninas permite não só averiguar quais os fatores predisponentes para o desenvolvimento de tumores no cão, como também auxiliar o estudo de potenciais agentes em medicina humana. O linfoma canino em particular tem sido alvo de grande pesquisa devido à sua semelhança com o linfoma não-Hodgkin's humano (Yau *et al.*, 2017). Existem várias hipóteses de que certos agentes infecciosos, anormalidades cromossómicas ou exposição a determinados químicos possam ter influência no desenvolvimento desta enfermidade. No entanto, apesar de várias investigações, não foi ainda identificada uma etiologia precisa para o linfoma canino (Lobetti, 2009; Vail, 2011; Mortier *et al.*, 2012).

2.1.1 Fatores Infecciosos

Em medicina veterinária, é notória a escassez de estudos que comprovam a relação entre a infeção por diferentes agentes patogénicos e o desenvolvimento de tumores hematopoiéticos em cães. Por outro lado, em medicina humana, várias investigações realizadas suportam a evidência de que agentes infecciosos, tais como, vírus, bactérias e protozoários, possam influenciar o desenvolvimento de neoplasias (Lax & Thomas, 2002). Efetivamente, dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 25% das neoplasias mundiais poderão ser secundárias a uma infeção crónica viral, bacteriana ou protozoária (Organização Mundial de Saúde [OMS], 2017). Um exemplo desta relação, em medicina humana, é a associação demonstrada entre a infeção pelo agente *Helicobacter* sp. e o desenvolvimento de linfoma MALT gástrico. Esta infeção está também fortemente associada ao desenvolvimento de carcinoma gástrico (Farinha & Gascoyne, 2005). Apesar de estudos realizados, esta associação não está ainda bem documentada em medicina veterinária. Um estudo realizado com cães da raça beagle demonstrou que a infeção por *Helicobacter* sp. leva à formação de folículos linfoides gástricos, os quais estão identificados como precursores de linfoma MALT em humanos (Rossi *et al.*, 1999).

Em medicina humana existem inúmeros relatos de casos clínicos que suportam a relação entre o desenvolvimento de linfoma e a infeção com leishmaniose. A leishmaniose é uma doença parasitária que afeta principalmente cães e pessoas, podendo, no entanto, afetar outros mamíferos (Ferro *et al.*, 2013). Este parasita, do género *Leishmania*, é transmitido através da picada do flebótomo e replica-se nas células do sistema mononuclear fagocítico, nomeadamente nos macrófagos (Corral-Caridad & Alunda, 2013; Ferro *et al.*, 2013; Griensven *et al.*, 2014).

Está documentada em medicina humana a existência concomitante de leishmaniose e uma neoplasia (Bezerra *et al.*, 2018). Segundo Kopterides *et al.* (2007), as hipóteses que sustentam a presença simultânea destas duas enfermidades são que pela semelhança dos sinais clínicos, a leishmaniose pode camuflar a existência de uma neoplasia, neste caso linfoma; a leishmaniose pode ser de difícil diagnóstico e tratamento nos animais que estão a receber quimioterapia; nos animais imunodeprimidos, é possível obter ambos os diagnósticos numa amostra de tecido; e por fim, a imunossupressão crónica característica da leishmaniose pode levar ao desenvolvimento neoplasias hematopoiéticas.

Em cães, esta doença é provocada pela *Leishmania infantum*, podendo desenvolver-se sob a forma cutânea e visceral (Corral-Caridad & Alunda, 2013; Ferro *et al.*, 2013). A leishmaniose canina é uma doença crónica, com um período de incubação de pelo menos dois meses e apresenta maior prevalência na zona mediterrânica de Europa, América Central e do Sul, Médio Oriente e China. A distribuição da *L. infantum* na Europa encontra-se representada na figura 5. Uma vez que a *L. infantum* é também responsável pela forma visceral em humanos, os cães infetados constituem um reservatório da doença, sendo uma contante ameaça à saúde pública (Campino & Maia, 2010; Corral-Caridad & Alunda, 2013).

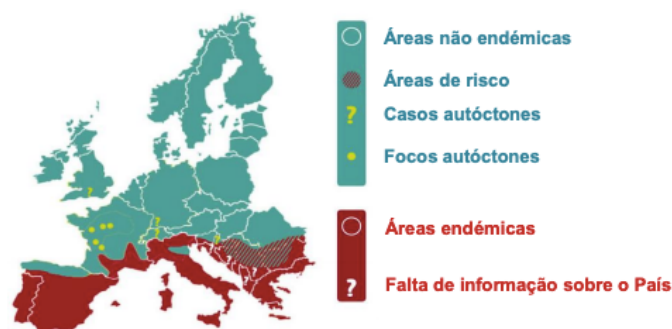


Figura 5. Distribuição geográfica de leishmaniose canina na Europa (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011)

O quadro clínico destes animais abrange diferentes sistemas. Os sinais clínicos mais observados são linfadenomegália periférica, caquexia, lesões cutâneas e lesões oculares (Manzillo *et al.*, 2008). Podem ser observados sinais de insuficiência renal secundários a nefrite intersticial e glomerulonefrite (Corral-Caridad & Alunda, 2013).

Apesar de vários casos descritos, não existe ainda em medicina veterinária evidência da interação entre estas duas enfermidades. Manzillo *et al.* (2008), descreveram um caso de linfoma extranodal num cão com leishmaniose. Os autores indicam que, com base na sua experiência profissional, a prevalência de linfoma multicêntrico em cães portadores de leishmaniose é de 1:300. A teoria proposta para esclarecer esta interação foi que o

desenvolvimento de linfoma seria desencadeado pela estimulação antigénica e imunossupressão crónica provocada pela leishmaniose (Ferrick *et al.*, 1995).

Estudos realizados em medicina humana verificaram um aumento de linfócitos $\gamma\delta$ -T no sangue e a presença dos mesmos em lesões cutâneas dos animais infetados com *Leishmania* sp. (Modlin *et al.*, 1989; Russo *et al.*, 1993). No estudo de Manzillo *et al.* (2008) supôs-se que como consequência destes mecanismos ocorreria primeiro o aumento dos linfócitos T e posteriormente a modificação maligna destas células.

Para além do linfoma estão também descritos casos de mieloma múltiplo, hemangiossarcoma, carcinoma das células escamosas e tumor venéreo transmissível associados a infeção por leishmaniose e hemoparasitas (Albanese *et al.*, 2002; Geigy *et al.*, 2013).

2.1.2 Fatores Ambientais

Está documentado, tanto em medicina humana como em veterinária, que o tipo de dieta, a exposição a tabaco, poluição e certos produtos químicos, nomeadamente herbicidas de ácido diclorofenoxiacético 2 e 4 D, tenham influência no desenvolvimento de linfoma (Pastor *et al.*, 2009). O cão constitui um bom modelo de estudo e de identificação de novos agentes com potencial carcinogénico uma vez que se encontra exposto ao mesmo meio ambiente que o ser humano (Van der Schalie *et al.*, 1999; Backer *et al.*, 2001).

Estudos realizados demonstraram que os cães residentes em áreas industriais e os que estão expostos a agentes químicos, tais como tintas ou solventes, apresentam um risco maior de desenvolver linfoma (Gavazza *et al.*, 2001). Também a exposição a herbicidas 2, 4 D está associada a um maior risco de desenvolvimento deste tumor (Vail *et al.*, 2013).

2.1.3 Fatores Imunológicos

Estudos realizados concluíram um maior risco de desenvolvimento de linfoma em cães com função imunitária comprometida. Por exemplo, está descrito que cães portadores de trombocitopenia imunomediada apresentam uma maior prevalência de linfoma comparativamente a cães saudáveis, independentemente da sua idade ou género (Keller, 1992; Pastor *et al.*, 2009). Apesar de uma maior associação a mastocitomas, o trabalho de Santoro *et al.* (2007) propôs que cães com dermatite atópica estariam mais suscetíveis ao desenvolvimento de linfoma epiteliotrópico devido ao tratamento utilizado com fármacos imunossupressores, como prednisona ou ciclosporina, ou pela imunodesregulação causada por esta doença.

2.1.4 Fatores Genéticos

As evoluções contínuas das técnicas utilizadas na área da citogenética molecular têm permitido um estudo cada vez mais completo das alterações genéticas presentes em cães com linfoma.

O facto de diferentes raças apresentarem prevalências diferentes em relação ao imunofenótipo B ou T demonstra que pode existir um risco hereditário. Modiano *et al.* (2005), verificou maior prevalência de linfoma de células T em boxers e golden retriever, e de células B em cães da raça dobermann. Também um estudo realizado por Comazzi *et al.* (2018), complementou que a raça labrador aparenta estar predisposta para o desenvolvimento de linfoma de células T de alto grau e a raça rottweiler para linfoma de células B.

2.2 Classificação

Linfoma é um termo que abrange um amplo e diverso grupo de neoplasias que têm em comum a sua origem nos linfócitos. O linfoma canino é classificado com base na sua localização anatómica, critério histológico, imunofenótipo e estadio (Vail *et al.*, 2013). O método de classificação histológica mais utilizado foi desenvolvido pela organização mundial de saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*). Esta metodologia caracteriza o linfoma com base no tipo de células, fenótipo e aspetos genéticos e moleculares (Marconato *et al.*, 2013).

2.2.1 Classificação com base na localização anatómica

Relativamente à localização anatómica de linfoma em cães, é mais comum, por ordem decrescente, a forma multicêntrica, seguida da alimentar, cutânea e, por fim, mediastínica (Vail *et al.*, 2013).

A forma multicêntrica representa cerca de 84% de todos os linfomas caninos. A apresentação clínica mais comum destes animais é a presença de linfadenomegália generalizada indolor, sem manifestação de outros sinais clínicos (Madewell & Thesen, 1987). Outros possíveis sinais clínicos no momento de diagnóstico, embora pouco comuns, são inapetência, letargia, perda de peso, poliúria e polidipsia (Vail, 2017).

A forma alimentar é menos comum que a anterior e representa cerca de 7% dos linfomas caninos (Vail, 2011). As raças mais afetadas são o boxer e shar-pei (Steinberg *et al.*, 1995; Coyle & Steinberg, 2004). Um estudo realizado por Jemal *et al.* (2004), demonstra maior incidência de neoplasias do trato gastrointestinal em homens do que em mulheres. No entanto, em medicina veterinária não há evidência desta diferença relativamente ao linfoma alimentar.

A apresentação clínica destes animais é caracterizada pela manifestação de sinais clínicos específicos do trato gastrointestinal, tais como, vômito, diarreia, perda de peso e inapetência (Vail, 2017). O linfoma alimentar afeta, por norma, múltiplos segmentos, provocando espessamento da parede, estreitamento do lúmen e ulceração da mucosa (Couto *et al.*, 1989; Ozaki *et al.*, 2006).

A forma cutânea representa cerca de 6% dos linfomas caninos e é, por norma, classificada como epiteliotrópica ou não epiteliotrópica (Gross *et al.*, 2005;). O linfoma epiteliotrópico, tal como se verifica em humanos, tem origem nos linfócitos T e manifesta-se pela presença de dermatite eritematosa exfoliativa (Vail *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2009). O linfoma não epiteliotrópico caracteriza-se pela presença de placas ou nódulos dérmicos ou subcutâneos, que podem ser solitários ou múltiplos (Gross *et al.*, 2005).

A forma mediastínica representa cerca de 3% dos linfomas caninos e manifesta-se pelo aumento dos linfonodos mediastínicos craniais e/ou timo (Vail, 2017; Vail *et al.*, 2013). O linfoma mediastínico está por norma associado ao imunofenótipo T (Vail *et al.*, 1996; Ruslander *et al.*, 1997). Os principais sinais clínicos observados no momento de diagnóstico são dispneia e abafamento dos sons cardíacos. Uma vez que cerca de 50% dos cães com linfoma mediastínico desenvolvem hipercalcémia paraneoplásica, poliúria e polidipsia poderão também fazer parte do quadro clínico dos animais afetados (Vail, 2017).

Por fim, as outras formas extra-nodais são menos frequentes, representando apenas 3% dos linfomas caninos (Vail *et al.*, 2013). Os sinais clínicos dependerão da localização do tumor, a qual poderá ocorrer em qualquer local fora do sistema linfático, nomeadamente, ocular, óssea, cardíaca, cavidade nasal, sistema nervoso central (SNC) entre outros (Vail, 2011).

2.1.2 Classificação histológica

A classificação do linfoma tem sido objeto de grande estudo e controvérsia. Ao longo do tempo, foram já desenvolvidos, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, inúmeros métodos de classificação de linfoma de acordo com a morfologia celular e imunofenótipo (Vail *et al.*, 2013). As classificações existentes tentaram estabelecer uma relação entre o tipo histológico e o comportamento biológico de diferentes linfomas, permitindo a determinação de um prognóstico e tratamento adequado (Parodi, 2011).

Em medicina humana, o método de classificação mais utilizado é o sistema WHO, estando o mesmo em contínua evolução (Swerdlow *et al.*, 2017).

Em medicina veterinária, um dos primeiros sistemas de classificação utilizado foi o método de Rappaport, estabelecido em 1966 (Rappaport, 1966). Mais tarde, a melhor

compreensão das características das células linfoides permitiu o desenvolvimento de novos sistemas de classificação, nomeadamente o sistema de classificação de Kiel, desenvolvido na Europa, e o Lukes-Collins, desenvolvido na América do Norte (Lukes *et al.*, 1974; Lennert & Mohri, 1978). Ambos os sistemas foram desenvolvidos com as mesmas bases, no entanto, com intuito de evitar futuros erros e de unir estes dois sistemas, o *National Cancer Institute* publicou um estudo definido como *Working Formulation* (*National Cancer Institute* [NCI], 1982).

O sistema desenvolvido pelo *National Cancer Institute-Working Formulation* (NCI-WF), classifica o linfoma de acordo com o seu padrão, difuso ou folicular, e tipo de células, não incluindo, no entanto, informação relativa ao imunofenótipo (*National Cancer Institute* [NCI], 1982). Neste sistema, a determinação dos subtipos de linfoma tem em conta o comportamento biológico e tempo de sobrevivência do animal (Vail *et al.*, 2013). O sistema NCI-WF acabou por se tornar bastante utilizado na América do Norte enquanto que o sistema de Kiel continuou a ser utilizado na Europa (Parodi, 2001).

Tanto o sistema de Kiel como NCI-WF classificam os linfomas de acordo com o seu grau de malignidade, ou seja, baixo grau, grau intermédio e alto grau. Os linfomas de baixo grau caracterizam-se pela presença de células de pequeno tamanho e de baixo índice mitótico. Estes progridem, por norma, de forma lenta e estão associados a tempos de sobrevivência superiores em relação aos de alto grau. Por outro lado, os linfomas de alto grau, caracterizam-se pela presença de um elevado índice mitótico com progressão rápida. Apresentam uma maior resposta ao tratamento e assim, superiores taxas de remissão. Uma desvantagem do sistema de Kiel e de NCI-WF é o facto de não limitarem os linfomas extra-nodais numa categoria separada dos nodais (Vail *et al.*, 2013)

Devido a estas limitações, o *International Lymphoma Study Group* (ILSG) propôs a *Revised European American Lymphoma* (REAL). A WHO, com base na REAL, publicou um sistema de classificação de neoplasias hematopoiéticas em animais domésticos (Vezzali *et al.*, 2010; Vail *et al.*, 2013). O sistema WHO não tem em conta o local de origem da neoplasia (medula óssea ou linfonodos), mas sim o comportamento biológico e grau de malignidade (Valli *et al.*, 2000; Valli *et al.*, 2011; Valli, 2013). Para tal, este sistema considera critérios anatómicos, histológicos e imunofenotípicos com o fim de providenciar um diagnóstico preciso e reprodutível (Vail *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Valli *et al.* (2011), com o intuito de avaliar a precisão e credibilidade da aplicação do sistema de classificação WHO por médicos veterinários patologistas, não especializados na área da hematologia, demonstrou um consenso de 83%. Na

tabela 3 encontram-se descritos os diferentes tipos de linfoma com base na sua classificação histológica.

Tabela 3. Resumo classificação histológica de linfoma canino segundo WHO/REAL (Adaptado de Valli et al., 2011)

Neoplasias células B	Neoplasias células T /NK
Neoplasia de células B precursoras	Neoplasia de células T precursoras
Neoplasia células B maduras	Neoplasia de células T/ NK maduras
Leucemia/ Linfoma linfocítico células pequenas	Leucemia/ linfoma linfoblástico de células T precursoras
Linfoma linfoplasmocítico	Mycosis fungoides
Linfoma folicular	Linfoma hepatosplénico de células $\gamma\delta$ -T
Linfoma difuso células grandes tipo B	Linfoma de células T periférico
Linfoma mediastínico células grandes tipo B	Linfoma angioimunoblástico de células T
Linfoma alto grau de células B	Linfoma angiotrópico de células T

Tendo em conta o imunofenótipo, cerca de 60 a 70% dos linfomas caninos são de células B, 30 a 40% são de células T e menos de 1% não se classificam como B nem T (Ponce *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2013). O tipo mais comum de linfoma canino é o linfoma difuso de células grandes de alto grau tipo B (Vezzali *et al.*, 2009; Valli *et al.*, 2011).

Para além dos tipos de linfoma referidos, existe ainda um subgrupo, denominado de linfoma indolente. Este é caracterizado por uma taxa mitótica baixa e progressão clínica lenta (Valli *et al.*, 2006). O linfoma indolente representa cerca de 29% de todos os linfomas caninos e abrange na sua denominação linfomas T ou linfomas foliculares derivados de células B, nomeadamente, linfoma folicular, linfoma marginal e linfoma de células do manto (Flood-Knapik *et al.*, 2012).

A utilização de métodos de classificação morfológica das células em combinação com as técnicas que nos permitem determinar o imunofenótipo, possibilitam a determinação de uma classificação adequada para o tipo de linfoma do animal. Estas informações são determinantes na seleção do melhor tratamento e decisão do prognóstico (Vail, 2011).

2.3. Diagnóstico

2.3.1 Apresentação e sinais clínicos

A apresentação clínica dos animais dependerá da localização e envolvimento do linfoma. No caso do linfoma multicêntrico, o qual é o mais comum em cães, é característica a presença de linfadenomegália indolor, não apresentando, por norma, os animais afetados outros sinais clínicos de doença sistémica (sub-estadio “a” segundo WHO). Contudo, uma pequena percentagem de animais pode apresentar sinais clínicos (sub-estadio “b” segundo WHO). Estes são inespecíficos e caracterizam-se por febre, anorexia, vômito, diarreia, perda de peso, edemaciação e ascite (Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017).

Por outro lado, os animais com linfoma de células T têm maior probabilidade de desenvolver sinais clínicos, especialmente devido a um síndrome paraneoplásico denominado hipercalecémia maligna (Vail *et al.*, 2013). Este síndrome ocorre devido à produção anormal da proteína relacionada com hormona paratiroide (PTH-rP, do inglês “parathyroid hormone-related protein”) pelas células neoplásicas e afeta cerca de 15% dos cães com linfoma e 50% dos cães com linfoma mediastínico ou de células T (Vail, 2011; Seelig *et al.*, 2014). Os cães com linfoma mediastínico apresentam-se por norma com sinais clínicos relativos ao sistema respiratório, designadamente, dispneia e abafamento dos sons cardíacos, e/ou edema da cabeça, pescoço e membros torácicos secundária à compressão da veia cava cranial pelo tumor (Vail, 2017).

Tal como descrito anteriormente, os cães com linfoma alimentar apresentam por norma, sinais específicos do sistema gastrointestinal, nomeadamente, vômito, diarreia e perda de peso (Couto *et al.*, 1989; Gieger, 2011). O linfoma na sua forma cutânea pode manifestar-se por distintas lesões cutâneas, as quais podem aparecer em qualquer parte do corpo, incluindo cavidade oral (Vail, 2017).

Por fim, as outras formas de linfoma extra-nodal (SNC, ocular, renal, entre outros), podem manifestar-se de qualquer maneira, de acordo com a sua localização (Vail, 2017).

Encontram-se descritos na tabela 4 os diagnósticos diferenciais associados a cada tipo de linfoma de acordo com a sua localização anatómica.

Tabela 4. Diagnósticos diferenciais de linfoma canino conforme a sua localização anatômica. (Adaptado de Vail *et al.*, 2013)

Localização anatômica do Linfoma	Diagnósticos diferenciais
Multicêntrica	Infeções sistêmicas bacterianas, virais, parasitárias ou fúngicas.
	Processos imunomediados – vasculite, poliartrite, lúpus eritematoso.
	Metástases linfonodos.
	Outros tumores hematopoiéticos – leucemia, mieloma múltiplo.
Mediastínica	Outros tumores – timoma, quemodectoma, carcinoma ectópico tiróide, carcinomatose pleural.
	Doenças infecciosas – granuloma, piotórax.
	Quilotórax, hemotórax, doença cardíaca congestiva.
Alimentar	Outros tumores gastrointestinais – carcinoma, mastocitoma.
	Corpo estranho, enterite linfoplasmocitária, ulceração gastrointestinal.
Cutânea	Dermatite infecciosa – bacteriana, fúngica, parasitária.
	Dermatite imunomediada – penfigus foliáceo.
Extra-nodal	Dependente da localização.

2.3.2 Abordagem diagnóstica e estadiamento

O diagnóstico de linfoma pode ser um procedimento simples e intuitivo uma vez que o sinal clínico mais comum é a presença de linfadenomegália periférica generalizada, e a realização de citologia é na maioria dos casos diagnóstica. Contudo, a presença de outros sinais clínicos poderá dificultar o seu diagnóstico (Vail, 2011). No caso de suspeita de linfoma é importante realizar-se um exame físico completo, hemograma completo, perfil bioquímico, idealmente com medição de cálcio ionizado, e urianálise. Para a obtenção de um diagnóstico definitivo é essencial a realização de citologia e/ou biópsia dos tecidos afetados (Vail, 2017). O sistema de estadiamento atualmente utilizado encontra-se descrito na tabela 5.

Tabela 5. Sistema de estadiamento do linfoma canino segundo WHO (Adaptado de Vali *et al.*, 2013).

Localização anatómica	Estadio (deverá incluir localização anatómica)
A – Multicêntrica	I – Envolvimento de um só linfonodo ou tecido linfoide num único órgão.
B – Alimentar	II – Envolvimento de vários linfonodos numa área regional.
C – Mediastínica	III – Envolvimento generalizado dos linfonodos.
D – Cutânea	IV – Envolvimento do fígado e/ou baço (+/- estadio III).
E – Leucemia	V – Manifestação no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou outros órgãos (+/- estadio I-IV).
F – Outras localizações	
Sub-estadio (deverá ser adicionado a cada estadio)	
a) Sem manifestação de sinais clínicos.	
b) Manifestação de sinais clínicos.	

2.3.2.1 Exame Físico

Tal como supracitado, é importante a realização de um exame físico completo, o qual deverá incluir a palpação cuidada de todos os linfonodos periféricos bem como exame retal, para avaliação dos linfonodos ilíacos e investigação de possíveis nódulos retais (Vail, 2017). Uma vez que condições como anemia e trombocitopenia poderão fazer parte do leque de síndromes paraneoplásicas provocados pelo linfoma, é importante a avaliação das mucosas para averiguar a presença de palidez, petéquias, icterícia e ulceração (Vail *et al.*, 2013). A palpação abdominal é também útil pois permite averiguar a presença de organomegália, linfadenomegália mesentérica e/ou espessamento da parede intestinal (Vail, 2017).

A realização de um exame oftalmológico básico não deve ser desprezada uma vez que 30 a 50% dos cães poderão apresentar alterações oftalmológicas, nomeadamente, uveíte e infiltração ocular neoplásica (Nerschbach *et al.*, 2013).

2.3.2.2 Alterações laboratoriais

A anemia é a alteração hematológica mais comum em cães com linfoma (Vail *et al.*, 2013). Caracteriza-se, por norma, como normocítica normocrómica não-regenerativa. Em cerca de 30 a 50% dos casos, poderá também observar-se trombocitopenia (Madewell & Feldman, 1980). A observação de linfócitos atípicos em circulação poderá ser indicativa de envolvimento da medula óssea ou de leucemia. Assim sendo, é relevante a realização de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de medula óssea para avaliação citológica para efeitos de estadiamento e prognóstico (Vail, 2017).

As alterações no perfil bioquímico básico, nomeadamente, alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (ALP, do inglês “*alkaline phosphatase*”), ureia, creatinina, glucose, albumina e proteínas totais, e cálcio ionizado, podem refletir a localização anatómica do tumor. Por exemplo, a elevação das enzimas hepáticas poderá levar o clínico a suspeitar de infiltração neoplásica no parênquima hepático, e a elevação da ureia e creatinina de infiltração renal neoplásica. Estas alterações podem também estar relacionadas com a manifestação de síndromes paraneoplásicas, sendo o mais comum hipercalcémia maligna (Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017).

A realização de urianálise poderá ser útil no momento de diagnóstico para avaliação da função renal, importante na seleção e monitorização de protocolos quimioterápicos. No entanto, é importante ter em atenção que esta poderá estar alterada (isostenúrica) se o animal apresentar hipercalcémia, uma vez que elevados níveis de cálcio poderão interferir na capacidade de concentração tubular (Vail *et al.*, 2013).

2.3.2.5 Métodos diagnóstico imagiológicos

Após o diagnóstico de linfoma é fundamental a realização de exames imagiológicos para a determinação de um estadio correto e para avaliação da resposta ao tratamento (Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017). No geral, deverão ser realizadas, pelo menos, radiografias torácicas e abdominais, e ecografia abdominal, ou tomografia computadorizada (TC) (Flory *et al.*, 2007). Todavia, caso se trate de um linfoma nodal periférico, e a menos que se verifiquem sinais clínicos que justifiquem a exploração imagiológica abdominal, são necessárias apenas radiografias torácicas, pois não existe diferença de prognóstico entre estadio III e IV (Vail, 2017). A realização de radiografias torácicas é sempre indispensável uma vez que 60 a 75% dos cães com linfoma multicêntrico apresentam alterações torácicas, nomeadamente, infiltrados pulmonares e linfadenomegália, e porque o envolvimento mediastínico influenciará o prognóstico (Blackwood *et al.*, 1997; Starrak *et al.*, 1997; Vail, 2017).

A realização de ecografia é especialmente útil nos casos de linfoma gastrointestinal e na obtenção de amostras ecoguiadas (Vail, 2017). A avaliação ecográfica, incluindo a utilização do Doppler, é também importante na avaliação dos linfonodos periféricos e abdominais pois poderá fornecer informações complementares na diferenciação entre linfonodos benignos ou malignos (Nyman *et al.*, 2006; Kinns & Mai, 2007; De Swarte, 2011). Todas estas técnicas não permitem, no entanto, identificar infiltração neoplásica em órgãos normodimensionados (LeBlanc *et al.*, 2009).

A realização de tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês “*Positron emission tomography*”) permite a identificação precoce de áreas afetadas pelo tumor uma vez que reconhece alterações metabólicas nos tecidos (Lawrence *et al.*, 2009). Em medicina humana, é habitual a realização deste exame na prática clínica para estadiamento e monitorização de linfoma. No entanto, existem várias barreiras para a sua utilização em oncologia veterinária devido ao seu elevado custo e pouca disponibilidade radioisotópica (Lawrence *et al.*, 2009; Vail, 2017).

2.3.2.3 Citologia e Histologia

A avaliação morfológica das células e tecidos neoplásicos é essencial no diagnóstico de linfoma. O meio de diagnóstico complementar mais comum é a realização de PAAF dos linfonodos periféricos ou de outro tecido afetado. Devem ser evitados os linfonodos localizados em zonas mais reativas, particularmente, os linfonodos sub-mandibulares, exceto quando estes são os únicos aumentados. A imagem citológica característica de linfoma define-se pela presença de células linfóides grandes (superiores a 2 vezes o diâmetro de um eritrócito ou superiores a um neutrófilo), verificando-se nucléolo visível e citoplasma basófilo (Vail *et al.*, 2013). A citologia é um método de diagnóstico pouco invasivo, rápido, preciso e de baixo custo e, por norma, suficiente para a obtenção de um diagnóstico final de linfoma. A precisão e sensibilidade deste método podem ser aumentadas com realização de citometria de fluxo (Comazzi & Gelain, 2011).

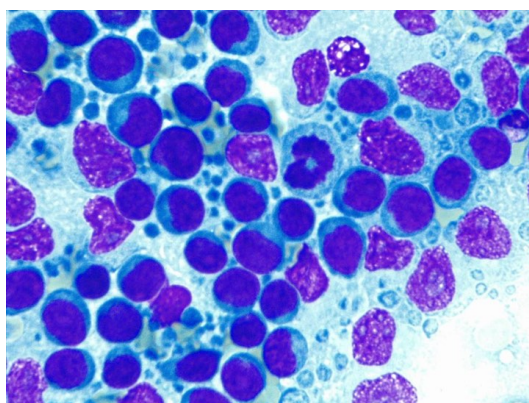


Figura 6. Imagem citológica de PAAF de linfonodo de um cão com linfoma multicêntrico (Figura gentilmente cedida pelo HVR).

Mesmo que tenha sido obtido um diagnóstico citológico de linfoma, não se deverá desconsiderar a avaliação histológica dos tecidos afetados. Esta permite a avaliação estrutural da arquitetura dos tecidos, a qual é especialmente importante no diagnóstico de linfoma de células pequenas de baixo grau e linfoma marginal (Valli *et al.*, 2006, Stefanello *et al.*, 2011).

Para a obtenção de uma amostra adequada para envio para histopatologia, deverá ser removido todo o linfonodo, incluindo a cápsula, e depois armazenado num recipiente com formol. No caso de se tratar de um linfoma extra-nodal, deverá realizar-se biópsia dos tecidos afetados (Vail *et al.*, 2013).

2.3.2.3.1 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem é essencial para a obtenção de um diagnóstico e classificação corretos. Diferentes técnicas, nomeadamente imunocitoquímica, imunohistoquímica (IMH) e CF podem fornecer informações relativamente ao imunofenótipo, sendo a técnica de IMH considerada o *gold standard* (Thalheim *et al.*, 2013; Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017). O conjunto das técnicas utilizadas permitem não só saber o imunofenótipo, mas também o tamanho celular, taxa de proliferação do tumor e sub-tipo (baixo grau/indolente, grau intermédio ou alto grau) (Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017).

A identificação do imunofenótipo permite determinar qual o tipo de células que constituem o tumor (linfócitos B, T, ou não B e não T) através da expressão de moléculas específicas para cada tipo de linfócito, por exemplo CD79a, CD20 e CD21 para linfócitos B, e CD3, CD4 e CD8 para linfócitos T (Wilkerson *et al.*, 2005; Marconato *et al.*, 2012).

A CF é uma técnica que permite a medição e caracterização de propriedades físico-químicas das células num fluxo. A utilização desta técnica apresenta determinadas vantagens, nomeadamente a necessidade de uma pequena quantidade de amostra, medição simultânea de diversos parâmetros, capacidade de avaliar diversos antígenos numa única célula e deteção de células T raras e fenotipicamente aberrantes. Este método permite detetar e subclassificar neoplasias linfoides através da identificação de características imunofenotípicas específicas do tumor por perfis de expressão atípica e de antígenos (Demurtas *et al.*, 2010; Seelig *et al.*, 2016). Outra vantagem desta técnica é que pode ser realizada a partir de amostras de PAFF de linfonodos, não sendo necessária a realização de biópsia (Avery *et al.*, 2013).

2.3.2.3.2 Técnicas de laboratório avançadas

A realização de clonalidade, PARR (do inglês “*Polimerase Chain Reaction for antigen receptor gene rearrangements*”), é útil quando não é possível, através dos métodos de CF ou IMH, determinar se uma população linfoproliferativa é benigna ou maligna (Wang & Raffeld, 2019). É possível realizar esta técnica através de amostras sanguíneas, PAAF de medula óssea, de linfonodos ou de outras estruturas, e efusões (Vaughn *et al.*, 2016).

Segundo Vail *et al.* (2013), a clonalidade define-se como um marcador de malignidade, ou seja, segundo o autor uma população celular maligna será proveniente do

crescimento de um único clone, com características celulares malignas, composto uma região específica de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”) para o tumor em questão. A técnica de PARR permite detetar, aproximadamente, 1:100 células neoplásicas (Avery *et al.*, 2013). No entanto, a sensibilidade e especificidade da mesma poderá variar conforme o laboratório e verificou-se que, 5% dos resultados obtidos através deste método poderão ser falso-positivos ou falso-negativos. Assim, é importante salientar que a obtenção de um diagnóstico final deverá ser fundamentada em todos os exames complementares executados e não apenas num só (Vail, 2017).

A realização de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “*Polimerase Chain Reaction*”) em tempo real pode ser também interessante. A realização desta técnica poderá ser uma importante ferramenta na avaliação da taxa de resposta ao tratamento em animais a realizar quimioterapia, uma vez que poderá determinar o número de células tumorais numa amostra sanguínea (Avery *et al.*, 2013). Um estudo realizado por Yamazaki *et al.* (2008) com o intuito de avaliar a doença residual mínima (MRD, do inglês “*Minimal residual disease*”) demonstrou que, os 7 cães em estudo que atingiram remissão completa (RC) com a realização de quimioterapia, apresentavam pelo menos 1: 10 000 células tumorais no sangue periférico.

2.4. Tratamento

A escolha da melhor abordagem terapêutica de um cão com linfoma está dependente do estadio e sub-estadio, tipo histológico do tumor, condição física do animal e disponibilidade financeira dos tutores. (Vail *et al.*, 2013). Uma vez que o linfoma é considerado uma doença sistémica, a implementação de uma terapêutica sistémica será a melhor abordagem para atingir taxas de remissão e sobrevivência satisfatórias. Sem a realização de tratamento, a esperança média de vida de um cão com linfoma será cerca de 4 a 6 semanas (Vail, 2017). A abordagem cirúrgica poderá ser também indicada em alguns casos, nomeadamente nos casos de linfoma de estadio 1 nodais ou extra-nodais (Vail *et al.*, 2013). Na tabela 6 encontram-se esclarecidas as possíveis respostas do animal ao tratamento.

Independente do protocolo quimioterápico eleito, uma vez que a maioria dos citostáticos têm como principal efeito secundário a indução de mielossupressão, deverá ser realizado um hemograma completo antes de cada sessão. Para que o animal esteja apto a receber o tratamento, recomenda-se um mínimo de 1500 neutrófilos/ μ L e 50,000 plaquetas/ μ L. Estes valores poderão variar conforme o autor (Vail *et al.*, 2013).

Tabela 6. Descrição das diferentes respostas ao tratamento. (Adaptado de Vail, 2017).

Resposta ao tratamento	Definição
Remissão completa (RC)	100% de redução das alterações detetadas inicialmente
Remissão parcial (RP)	>50% e <100% de redução das alterações detetadas inicialmente.
Doença estável	<50% de redução ou sem redução e sem lesões novas.
Doença progressiva	>25% de aumento das alterações iniciais ou novos focos neoplásicos.

2.4.1. Tratamento de linfoma nodal/multicêntrico

No caso do linfoma, a implementação de um protocolo de quimioterapia tem como principais funções a indução de remissão por um período de tempo razoável (> 6 meses), reindução de remissão nos casos de reincidência do tumor e, por fim, utilização de protocolos de resgate quando a primeira indução ou a reindução não apresentaram os efeitos desejáveis (Vail *et al.*, 2013).

O protocolo quimioterápico constituído por ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona (CHOP, do inglês “*Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone*”), é considerado o *gold standard* no tratamento de linfoma canino (Harding *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Carter *et al.* (1987) indica que a implementação deste protocolo em cães com linfoma multicêntrico de grau intermédio a alto apresenta uma taxa de resposta de 85 a 95% e esperança mediana de vida de 10 a 12 meses. O protocolo CHOP tem a duração de 19 semanas, assumindo que o animal se encontre em remissão completa, e encontra-se descrito na tabela 7 (Vail *et al.*, 2013).

Existem inúmeras adaptações do protocolo CHOP, nomeadamente a inclusão de L-Asparaginase (L-CHOP), a qual poderá ser administrada no início ou ao longo do protocolo (Vail *et al.*, 2013; Lautscham *et al.*, 2017). Todavia, estudos realizados indicam que a inclusão deste fármaco no protocolo não terá benefícios na taxa de remissão ou tempo de remissão (Valerius *et al.*, 1997; Piek *et al.*, 1999; Jeffreys *et al.*, 2005; MacDonald *et al.*, 2005). Por outro lado, um estudo realizado por Marquardt *et al.* (2019) indica que a substituição de doxorrubicina por mitoxantrona neste protocolo apresenta os mesmos efeitos que o CHOP convencional, apresentando uma taxa de resposta de 97.4% e esperança mediana de vida de 234 dias (7 a 8 meses).

Tabela 7. Descrição protocolo CHOP (Adaptado de Vail *et al.*, 2013).

Semana	Fármaco	Dosagem	Via de Administração
1	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
	Prednisona	2 mg/Kg sid	PO
2	Ciclofosfamida*	250 mg/m ²	IV
	Prednisona	1.5 mg/Kg sid	PO
3	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
	Prednisona	1 mg/Kg sid	PO
4	Doxorrubicina**	30 mg/m ²	IV
	Prednisona	0.5 mg/Kg sid	PO
5	(Pausa)		
6	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
7	Ciclofosfamida*	250 mg/m ²	IV
8	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
9	Doxorrubicina**	30 mg/m ²	IV
10	(Pausa)		
11	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
12	Ciclofosfamida*	250 mg/m ²	IV
13	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
14	Doxorrubicina**	30 mg/m ²	IV
15	(Pausa)		
16	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
17	Ciclofosfamida*	250 mg/m ²	IV
18	Vincristina	0.7 mg/m ²	IV
19	Doxorrubicina**	30 mg/m ²	IV
*Deverá administrar-se em conjunto com Furosemda 1 mg/Kg IV			
**Em cães <15Kg a dose deverá ser reduzida para 1 mg/Kg			

Nos casos em que o protocolo CHOP não é uma opção viável, por questões financeiras ou logísticas dos tutores, o protocolo com doxorrubicina é também uma hipótese uma vez que é menos dispendioso e implica menos visitas hospitalares. Este protocolo consiste na administração intravenosa (IV) de doxorrubicina na dose de 30 mg/m² a cada 3 semanas para um total de 5 tratamentos, apresentando uma taxa de resposta de 50 a 75% e esperança mediana de vida de 6 a 8 meses (Postorino *et al.*, 1989; Valerius *et al.*, 1997; Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017). Os efeitos secundários da doxorrubicina incluem mielossupressão, distúrbios gastrointestinais e cardiotoxicidade. Devido aos seus efeitos irreversíveis, a cardiotoxicidade é o efeito adverso mais preocupante, sendo um fator de risco em animais com doença cardíaca pré-existente (Doroshov, 2011). As manifestações clínicas de cardiotoxicidade incluem

arritmias e diminuição da função sistólica, resultando em cardiomiopatia dilatada (CMD) (Mauldin *et al.*, 1992; Doroshov, 2011; Hallman *et al.*, 2019).

No caso de os tutores estarem reticentes quando à utilização de quimioterapia IV, existe também a opção de administração da mesma sob a forma oral. Os protocolos disponíveis são o protocolo de lomustina na dose de 70 mg/m² administrado PO (via oral, do latim “per os”) a cada 3 semanas num total de 5 tratamentos ou ciclofosfamida na dose de 250-300 mg/m² por via oral a cada 2 a 3 semanas (Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017).

A prednisona é um medicamento corticosteróide incluído, por norma, nos protocolos de quimioterapia, tanto injetáveis como orais, para tratamento de linfoma (Vail *et al.*, 2013). Apesar de não completamente esclarecido, acredita-se que este composto induza apoptose das células hematopoiéticas tumorais (Greenstein *et al.*, 2002). Caso os tutores estejam hesitantes quanto à administração de citostáticos ou não possuam as condições financeiras necessárias, a administração de prednisona é uma boa opção. Esta será administrada na dose de 2 mg/kg por dia PO. Contudo, é necessário salientar que a eleição deste protocolo resultará em períodos de remissão curtos, nomeadamente 1 a 2 meses, e que caso os tutores decidam mais tarde optar por um protocolo quimioterápico, a taxa de remissão e esperança mediana de vida serão menores pelo desenvolvimento de resistência à quimioterapia (Khanna *et al.*, 1998; Browder *et al.*, 2000; Marconato *et al.*, 2011; Vail *et al.*, 2013).

As opções terapêuticas apresentadas são adequadas para o tratamento de linfoma de células B de grau intermédio ou alto. Os linfomas de baixo grau ou indolentes são menos frequentes e como tal existem poucos esclarecimentos quanto à melhor terapêutica a instituir (Valli *et al.*, 2011; O’Brien *et al.*, 2013). Na presença de sinais clínicos, recomenda-se tratamento com clorambucilo a cada 2 semanas na dose 20 mg/m² PO, ou ciclofosfamida a cada 2 a 3 semanas na dose 250 mg/m², juntamente com prednisona. Nos canídeos com linfoma indolente confinado a um único gânglio ou ao baço, a cirurgia sem outro tratamento adjuvante é a opção mais indicada (Vail, 2017).

O linfoma de células T pode ser também categorizado como indolente ou de alto grau (Elliott & Baines, 2019). O linfoma indolente de células T apresenta um melhor prognóstico e ou não necessita de tratamento ou pode ser tratado com o protocolo de clorambucilo (Valli *et al.*, 2013; Zandvliet, 2016). Por outro lado, devido ao seu comportamento agressivo, o tratamento de linfoma de células T de alto grau requer terapêutica sistémica. Apesar de o protocolo CHOP ser o mais utilizado, não existe ainda um consenso quanto ao protocolo mais adequado para este imunofenótipo. Estudos realizados demonstram que os resultados obtidos

pela implementação do protocolo CHOP no tratamento deste tipo de linfoma não são os mesmos que os obtidos quando se trata de um linfoma de células B (Brodsky *et al.*, 2009; Goodman *et al.*, 2016; Moore, 2016; Brown *et al.*, 2017). Um estudo realizado por Elliott & Baines (2019), demonstrou melhores resultados aquando da substituição de ciclofosfamida por lomustina no protocolo CHOP. Também um estudo realizado por Beaver *et al.* (2010) verificou menor taxa de resposta a doxorubicina nos canídeos com linfoma de células T quando comparados com linfoma de células B.

2.4.2 Protocolos de Resgate

Tal como descrito anteriormente, a eleição de protocolos completos, como é o caso do protocolo CHOP ou L-CHOP, permite atingir taxas de RC em cerca 65-97% dos casos. Contudo, a reincidência de linfoma é frequente, mesmo em animais que atingiram RC, a qual perdura por um período de 140 a 385 dias (Stone *et al.*, 1991; Myers *et al.*, 1997; MacDonald *et al.*, 2005).

Os protocolos de resgate são utilizados com o intuito de estabelecer remissão em animais que não responderam à primeira linha de tratamento ou em animais que recidivaram com o protocolo adotado. Por norma, estes protocolos não são tão efetivos como os descritos anteriormente, apresentando taxas de resposta de 7 a 72% por um período de 1 a 5 meses (Baskin *et al.*, 2000; Rassnick *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2006).

O protocolo constituído por mecloretamina, vincristina, procarbazina e prednisona. (MOPP, do inglês “*Mustargen, Oncovin, Procarbazine, Prednisone*”) é um dos protocolos disponíveis e um estudo retrospectivo realizado por Rassnick *et al.* (2002) em 117 cães, demonstrou que 31% dos cães atingiu RC por um período médio de 63 dias e 34% dos cães remissão parcial (RP) por um período médio de 47 dias. A procarbazina, um dos fármacos utilizados neste protocolo, é extremamente dispendiosa, constituindo um obstáculo na utilização deste protocolo. O melfalano é um fármaco de fácil administração, bem tolerado pelos animais, menos dispendioso e semelhante à procarbazina, podendo assim ser utilizado como substituição da mesma (Furner *et al.*, 1977; Mastromauro *et al.*, 2017). O protocolo composto por mecloretamina, vincristina, melfalano e prednisona (MOMP, do inglês “*Mustargen, Oncovin, Melphalan, Prednisone*”) tem a duração de 28 dias e encontra-se descrito na tabela 8. Um estudo realizado por Back *et al.* (2015) demonstrou uma taxa de resposta de 51.1% por um período de 56 dias aquando da eleição do protocolo MOMP.

Tabela 8. Descrição protocolo MOMP para tratamento de recidiva de linfoma (Adaptado de Back *et al.*, 2015).

Fármaco	Dose	Via Administração	Dia
Mecloretamina	3 mg/m ²	IV	0,7
Vincristina	0.75 mg/m ²	IV	0,7
Melfalano	1.5 mg/m ²	PO	0-13
Prednisona	30 mg/m ²	PO	0-13

Mastromauro *et al.* (2017) realizaram um estudo acerca da eficácia do melfalano oral utilizado como agente único no tratamento de recidiva de linfoma. Contudo, os autores verificaram uma taxa de resposta baixa (15.8%), sem nenhum animal ter atingido RC.

O protocolo formado por dexametasona, melfalano, actinomicina D e citarabina arabinosídeo (DMAC) é também outra opção disponível apresentando uma taxa de resposta de cerca de 72% por um período de 61 dias (Alvarez *et al.*, 2006).

O Tanovea® (rabacfosadina) é um fármaco aprovado pelo departamento que regulariza a indústria alimentar e farmacêutica dos Estados Unidos (US FDA, do inglês “*U. S. Food and Drug Administration*”), não disponível na União Europeia, eficaz no tratamento de linfoma em cães, tanto de células B como T, e de recidiva de linfoma de células B (De Clercq, 2018). Um estudo realizado por Saba *et al.* (2018) demonstrou que este fármaco, quando utilizado na dose de 0.82 - 1 mg/Kg IV a cada 21 dias num total de 5 tratamentos, permite obter uma taxa de resposta de 74% por um período de 203 dias. Neste estudo, 45% dos cães atingiram RC. Os efeitos secundários deste fármaco incluem, por ordem decrescente, dermatopatia, neutropenia, sinais gastrointestinais e fibrose pulmonar (Vail *et al.*, 2009; Thamm *et al.*, 2014).

Para além dos protocolos mencionados, existem ainda outros disponíveis (Vail *et al.*, 2013).

Os efeitos adversos mais comuns, relativos à administração de quimioterapia segundo o consenso do grupo de oncologia cooperativa (VCOG-CTCAE, do inglês “*Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events*”), encontram-se descritos na tabela 9.

Tabela 9. Descrição efeitos secundários à administração de quimioterapia segundo VCOG-CTCAE (Adaptado de *Veterinary cooperative oncology group* [VCOG], 2016)

	Efeito adverso	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV	Grau V
Alterações gastro-intestinais	Anorexia	Apetite diminuído.	Apetite diminuído ≤3 dias.	>3 dias duração, perda de peso (≥10%)	>5 dias duração	Morte
	Tratamento	Necessidade de alteração da dieta para manter apetite.	Estimulante de apetite.	Fluidoterapia IV. Alimentação forçada.	Alimentação parenteral necessária.	
	Vômito	<3 episódios em 24 horas (h).	3-10 episódios em 24h.	Múltiplos episódios >48h.	Risco de vida.	
	Tratamento	Tratamento não necessário.	Fluidoterapia SC ou IV.	Fluidoterapia IV.	Cuidados intensivos.	
	Diarreia	Aumento de 2 episódios de defecação do valor normal.	Aumento de 3-6 episódios de defecação do valor normal.	Aumento de >6 episódios de defecação do valor normal.	Risco de vida	
	Tratamento	Tratamento não necessário.	Medicação necessária; Fluidoterapia IV ou SC	Fluidoterapia IV, hospitalização.	Cuidados intensivos	
Alterações medulares	Neutropénia	1500 a <2900 µ/L	1000-1499 µ/L	500-999 µ/L	<500µ/L	
	Trombocitopénia	100 000 a 200 000 µ/L.	50 000 a 99 000 µ/L	25 000 a 49 000 µ/L	<25 000 µ/L	

2.4.3 Tratamento de linfoma extra-nodal

A escolha do tratamento mais adequado de linfoma extra-nodal está dependente da sua localização, sendo assim importante a realização de um estadiamento completo. Nos casos em que o tumor está localizado numa única região ou órgão, a realização de terapia local, especificamente cirurgia e radioterapia, é a mais indicada. Por outro lado, caso se verifique múltiplos focos de doença ou impossibilidade de terapia local, poderá optar-se por terapia sistémica, utilizando os protocolos previamente descritos (Vail *et al.*, 2013; Vail, 2017).

2.4.4 Radioterapia

A radioterapia poderá ser vantajosa no tratamento de linfoma em determinados casos, principalmente no tratamento de animais em estadio I e no tratamento paliativo local, no caso de linfoma retal e linfoma mediastínico. No entanto, devido ao seu elevado custo e acessibilidade limitada, não é, por norma, um meio de tratamento regularmente utilizado (Meleo, 1997; Vail *et al.*, 2013).



Figura 7. Realização de radioterapia como tratamento de linfoma mediastínico (Fotografia gentilmente cedida pelo departamento de oncologia da UTCVM)

2.5. Prognóstico

Entendem-se por fatores de prognóstico, dados que poderão ser utilizados para prever como é que um determinado animal com linfoma irá evoluir ao longo do tratamento. Os fatores mais importantes de prognóstico são o sub-estadio clínico (“a” ou “b” segundo WHO), imunofenótipo (B vs. T), envolvimento mediastínico, hipercalcémia, resposta ao tratamento e pré-tratamento com prednisona (Vail *et al.*, 2013). Os fatores de prognóstico de linfoma canino estão descritos na tabela 10.

Tabela 10. Fatores de prognóstico de linfoma canino (Adaptado de Vail, 2017).

Fatores relevantes	Notas
Sub-estadio WHO	Sub-estadio “b” associado com menor tempo de sobrevivência.
Histopatologia	Alto grau/intermédio associados a maior taxa de resposta, mas menor sobrevivência. Linfoma indolentes relacionados com maior tempo de sobrevivência.
Imunofenótipo/Características CF	Linfoma de células T associado a menor sobrevivência.
Anemia	Indicador de prognóstico negativo
Pré-tratamento com esteroides	Aumenta resistência à quimioterapia.
Linfadenopatia mediastínica	Indicador de prognóstico negativo.
Localização anatómica	Linfoma cutâneo difuso, alimentar difuso e hepatoesplênico associados a pior prognóstico.
Fatores menos relevantes	Notas
Estadio WHO	Estadio I e II mais favoráveis.
Sexo	Alguns estudos indicam que as fêmeas terão melhor prognóstico.

A presente dissertação pretendeu contribuir para o estudo do linfoma canino, bem como averiguar se a leishmaniose canina estaria diretamente implicada na patogénese e desenvolvimento de lesões malignas. Está descrito na literatura que a inflamação crónica poderá ser um promotor da carcinogénese (Kopterides *et al.*, 2007). Assim colocou-se a hipótese de que a estimulação antigénica crónica e a imunossupressão, características da leishmaniose, poderiam ter influência no desenvolvimento de neoplasias, nomeadamente, linfoma (Manzillo *et al.*, 2008).

Pretendeu-se realizar um estudo retrospectivo, com o intuito de complementar a caracterização do linfoma canino, num hospital veterinário e laboratório de referência, no período de janeiro de 2017 a janeiro de 2019 (2 anos), bem como averiguar a possível interação com leishmaniose.

Mais especificamente, os objetivos deste estudo consistiram em:

- Analisar as variáveis género, raça, idade, localização anatómica e imunofenótipo e estudar a sua relação.
- Avaliar os protocolos de tratamento de linfoma mais utilizados e relacionar com o tempo de sobrevivência do animal.
- Averiguar uma possível relação entre a infeção por *Leishmania infantum* e linfoma.

Material e Métodos

Os dados recolhidos para a realização deste estudo foram obtidos através das fichas clínicas dos animais do HVR, com a utilização de um sistema de base de dados denominado QVet®, e através da análise da base de dados do laboratório DNAtch, com a utilização do sistema eDEIA®. O diagnóstico de linfoma foi realizado através de citologia e/ou histopatologia e a determinação do imunofenótipo através de imunohistoquímica. Os testes de diagnóstico de leishmaniose realizados foram testes serológicos, nomeadamente teste rápido e/ou teste de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

1. Critérios de inclusão

Para a realização do presente estudo, foram analisadas as bases de dados de 2 instituições de referência diferentes, nomeadamente, HVR e laboratório DNAtch. Através da base de dados, foram selecionados todos os canídeos com diagnóstico de linfoma, obtido através de métodos complementares de diagnóstico, nomeadamente, citologia e histopatologia, durante o período de Janeiro de 2017 a Janeiro de 2019 (2 anos).

2. Amostra em estudo

A amostra inicial do presente estudo era constituída por 145 canídeos. Destes foram excluídos 6 por não apresentarem informação relativa à idade.

Ambas as amostras contemplaram canídeos de várias idades, de ambos os géneros e de todas as raças. A informação relativa aos parâmetros em estudo foi obtida através das fichas clínicas dos animais.

3. Critérios exclusão

No presente estudo, não foram incluídos os canídeos que não apresentavam informação relativa à idade, raça ou sexo.

4. Análise estatística

Após a recolha dos dados necessários à realização do presente estudo, os mesmos foram organizados de forma a criar uma base de dados no programa *Microsoft Office Excel* ® versão 2016. Foram utilizados métodos de estatística descritiva para a apresentação das variáveis em estudo em tabelas e gráficos.

Com o intuito de avaliar a relação entre o género e imunofenótipo, e raça e imunofenótipo utilizou-se o programa *SPSS* ®. Para o estudo da relação entre o género e o imunofenótipo, e raça e imunofenótipo, recorreu-se ao teste exato de Fisher. Considerou-se como valor estatisticamente significativo $p < 0,05$.

Nas variáveis numéricas, a média foi apresentada com o respetivo desvio padrão (DP), como média $\pm$ DP. Foram calculadas as médias de idade para cada grupo da amostra, e para o período médio de sobrevivência.

Resultados

1.1 Caracterização da amostra em estudo

O grupo estudado compreende 139 canídeos, dos quais 64 são fêmeas (46%) e 75 são machos (54%), com idades compreendidas entre os 4 meses e os 16 anos no momento do diagnóstico. Verificou-se uma média de idade de $8,7 \pm 3,2$ anos e uma mediana de 9 anos. A frequência absoluta das idades encontra-se representada no gráfico 3.

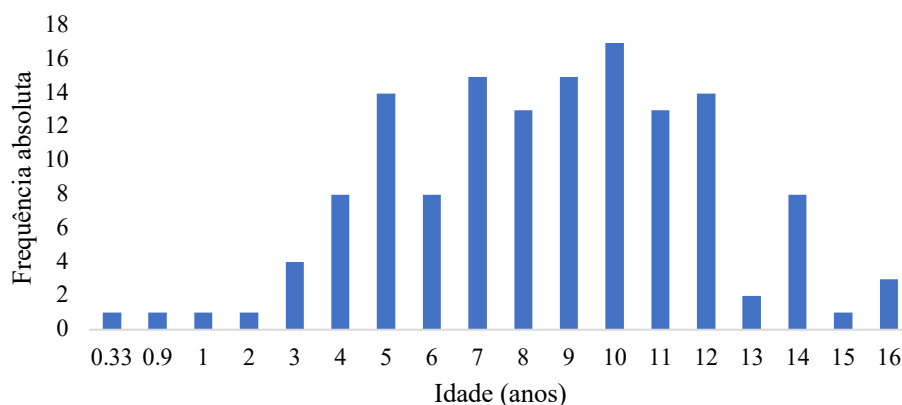


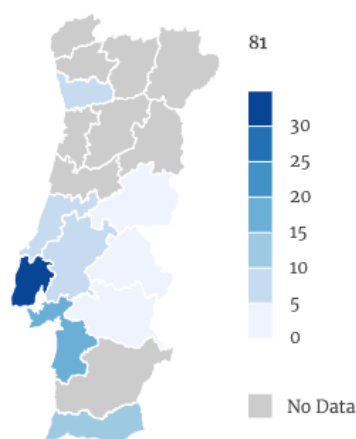
Gráfico 3. Caracterização da amostra segundo a variável “idade”.

A população canina do presente estudo é maioritariamente representada por canídeos sem raça definida, sendo as raças mais frequentes labrador, golden retriever, pastor alemão e pitbull. As restantes raças incluídas no presente estudo encontram-se representadas na tabela 11.

Tabela 11. Descrição da população segundo a raça (n=139).

Raça	Frequência absoluta	Raça	Frequência absoluta
SRD	48	West Highland Terrier	1
Labrador	12	Cão de Água Português	1
Golden Retriever	10	Teckel	1
Pastor Alemão	9	Terra Nova	1
Pitbull	8	Bichon Maltês	1
Rafeiro Alentejano	5	Boerboel	1
Cocker	4	Jack Russel	1
Caniche	3	Chihuahua	1
Bulldog Francês	3	Perdigueiro	1
Epagneul Breton	3	Fox Terrier	1
Yorkshire	3	Pug	1
Basset Hound	3	Bull Mastiff	1
Serra da Estrela	2	Rottweiler	1
Dogue Alemão	2	Sharpei	1
Boxer	2	Schnauzer	1
Bull terrier	2	Pastor Belga	1
Beagle	2	Doberman	1
Podengo	1		

A distribuição geográfica da população canina em estudo encontra-se representada no gráfico 4. Verificou-se uma maior prevalência no distrito de Lisboa e menor nos distritos de Portalegre e Castelo Branco. Apesar de não representados no gráfico 4, também se verificaram casos nos arquipélagos da Madeira (n=1) e Açores (n=2).

**Gráfico 4.** Representação geográfica da população em estudo.

1.2 Caraterização do linfoma da amostra em estudo

Relativamente à caracterização da amostra segundo a localização anatómica do tumor, dos 139 canídeos em estudo, 99 apresentavam linfoma multicêntrico, 14 localização nodal, 12 cutânea, 9 alimentar, 4 extra-nodal e 1 mediastínica. A frequência relativa do parâmetro em estudo encontra-se representado no gráfico 5.

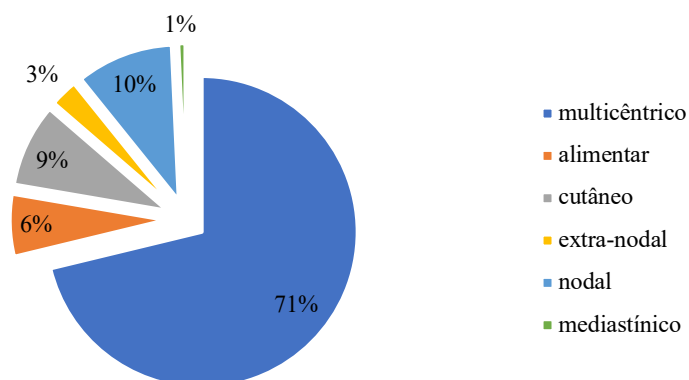


Gráfico 5. Representação da população segundo a variável "localização anatómica".

Em relação ao imunofenótipo, 69% dos canídeos em estudo não apresentavam exames complementares de diagnóstico para determinação do imunofenótipo. No gráfico 6 está representada a população que possuía informações relativamente a este parâmetro, nomeadamente, linfoma de células B ou de células T. Dos canídeos em estudo, não se verificou nenhum caso de linfoma de células não B e não T.

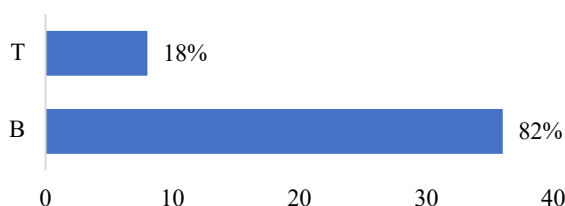


Gráfico 6. Caracterização da população segundo a variável "Imunofenótipo".

Na tabela 12, encontra-se representada a população segundo a raça, faixa etária e localização anatómica do linfoma, de acordo com o género e imunofenótipo.

Tabela 12. Caracterização do linfoma da amostra populacional.

	Total	M	F	Imunofenótipo				
				Total	B		T	
					M	F	M	F
Raças mais comuns								
SRD	48	27	21	14	9	5	1	0
Labrador retriever	12	7	5	2	0	2	0	0
Golden retriever	10	7	3	6	3	2	0	1
Pastor Alemão	9	5	4	3	3	0	0	0
Pitbull	8	4	4	3	3	0	0	0
Localização anatômica								
Multicêntrica	99	55	44	35	21	11	2	1
Nodal	14	6	8	4	3	0	0	1
Alimentar	9	5	4	3	1	1	0	1
Cutânea	12	7	5	2	0	0	1	1
Mediastínica	1	1	0	0	0	0	0	0
Outras extra-nodais	4	2	2	0	0	0	0	0
Idade								
0-4	16	11	5					
5-9	65	31	34					
10-14	54	31	23					
>14	4	2	2					

Pretendeu-se estabelecer uma relação entre o género do animal e imunofenótipo, não se tendo verificado uma relação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ($p=0,236$). Pretendeu-se também avaliar a relação entre a raça do animal e imunofenótipo. Não se verificou uma relação estatisticamente associativa entre as duas variáveis ($p=0,759$). Ambos os valores foram obtidos através da realização do teste exato de Fisher.

1.3 Tratamento implementado

Relativamente ao esquema terapêutico eleito, apenas foram considerados os animais observados no HVR (n=43). Desta amostra, 15 dos canídeos foram excluídos por não terem realizado nenhum tipo de tratamento. O mesmo não foi realizado por fatores inerentes ao animal nomeadamente fraca condição corporal e/ou distúrbios gastrointestinais, ou por opção dos tutores, por questões financeiras ou pela opção da eutanásia após o diagnóstico de linfoma. Da amostra em estudo (n=28), verificou-se que o tratamento mais escolhido pelos médicos da área de oncologia deste CAMV foi o protocolo CHOP, tendo sido administrado a 22 animais. Da amostra em estudo, 2 animais receberam quimioterapia oral, 1 com clorambucilo e outro com ciclofosfamida, por apresentarem linfoma folicular de células B. Os restantes tratamentos implementados encontram-se descritos no gráfico 7.

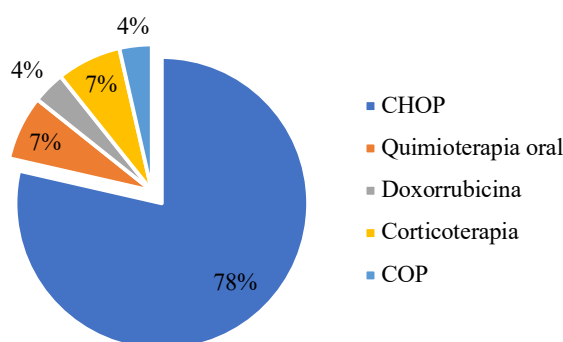


Gráfico 7. Caracterização da amostra segundo o parâmetro “tratamento implementado”.

1.4 Tempo médio de sobrevida

Relativamente à sobrevida, foram apenas analisados os animais observados no HVR. Reconheceu-se como análise da sobrevida o período de tempo desde o diagnóstico de linfoma até à morte do animal. Da amostra em estudo, 3 canídeos não apresentavam informações por perda de acompanhamento.

O tempo de sobrevida de acordo com o imunofenótipo B ou T encontra-se representado no gráfico 8. Foram apenas considerados os animais observados no HVR com informação relativa ao imunofenótipo (n=11). Para esta análise apenas se teve em conta o imunofenótipo, sem considerar o tipo de linfoma ou o tratamento implementado. Dos canídeos em estudo, verificou-se um período médio de sobrevivência de $9,1 \pm 6,4$ meses para os canídeos com linfoma de células B (n=9) e de $4,5 \pm 3,5$ meses para os de células T (n=2). No entanto não se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre as duas variáveis ($p=0,272$).

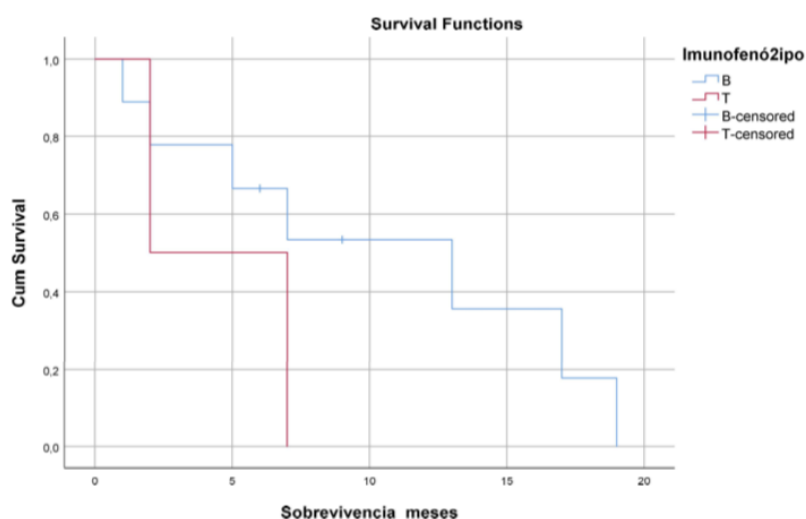


Gráfico 8. Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier da amostra em estudo segundo o imunofenótipo B ou T.

Pretendeu-se também avaliar a sobrevivência tendo em conta a terapêutica instituída. Para tal consideraram-se os animais observados no HVR que realizaram um dos tipos de tratamento disponíveis ($n=28$). Considerou-se o período de tempo entre o início do tratamento e a morte do animal. A análise da sobrevivência conforme o tipo de terapêutica instituída encontra-se representada no gráfico 9. Para a realização desta análise apenas foi tido em conta o tratamento instituído, sem se considerar a localização anatômica, tipo ou imunofenótipo.

O protocolo CHOP foi o mais utilizado tendo os animais que receberam o mesmo atingido um período médio de sobrevivência de $6,2 \pm 4,9$ meses. Entre as diferentes variáveis não se verificou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,808$).

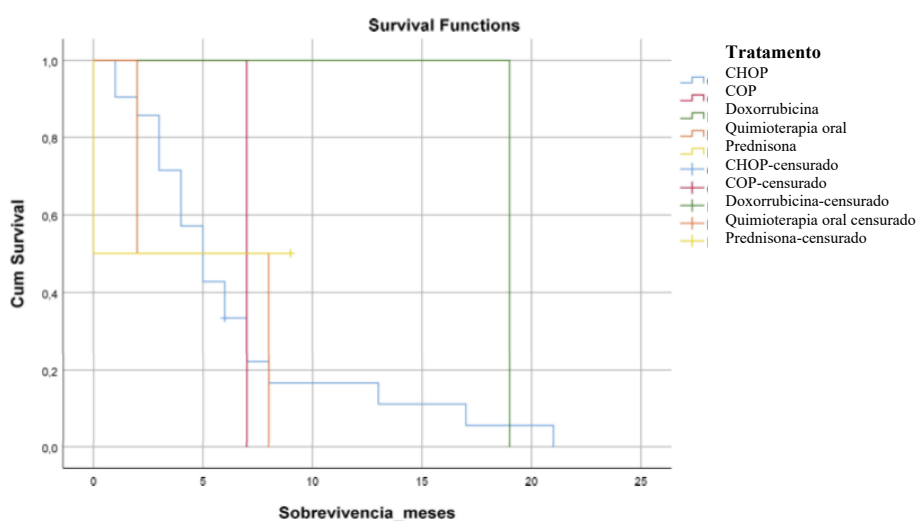


Gráfico 9. Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier da amostra em estudo segundo o tratamento implementado.

1.5 Interação com Leishmaniose

Pretendeu-se averiguar a relação entre linfoma e leishmaniose. Para tal, da amostra inicial averiguou-se se os canídeos possuíam testes de diagnóstico para leishmaniose. Dos 139 canídeos em estudo, 48 apresentavam dados relativamente a este parâmetro, sendo que 7 canídeos já tinham tido resultado positivo para leishmaniose e 41 resultado negativo. No gráfico 10 encontra-se representada a frequência relativa dos animais que realizaram testes diagnósticos para leishmaniose. Todos os canídeos com resultado positivo para leishmaniose já haviam sido testados antes do diagnóstico de linfoma.

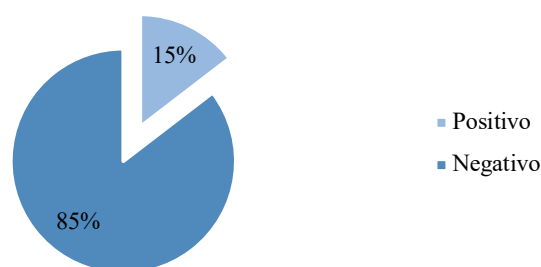


Gráfico 10. Prevalência de leishmaniose na população em estudo que realizou testes de diagnóstico (n=48).

Os canídeos com resultado positivo para leishmaniose encontram-se representados na tabela 12. A amostra em estudo compreende 7 canídeos, dos quais 4 são fêmeas e 3 são machos, com idade compreendida entre os 4 e 13 anos, sendo a média de idade de $9,4 \pm 3.2$ anos. Relativamente à distribuição geográfica dos animais, verificou-se que 4 eram do distrito de Lisboa, 2 de Setúbal e 1 de Santarém.

Tabela 13. Caracterização da amostra em estudo com resultado positivo para leishmaniose.

Indivíduo	Idade (anos)	Raça	Sexo	Localização anatómica	Imunofenótipo
1	13	SRD	M	Multicêntrico	T
2	9	Golden Retriever	M	Multicêntrico	-
3	10	Pastor Alemão	F	Multicêntrico	-
4	9	SRD	F	Multicêntrico	-
5	4	SRD	M	Multicêntrico	B
6	11	Pastor Alemão	F	Multicêntrico	-
7	9	SRD	F	Multicêntrico	-

Legenda: F- fêmea; M- macho; SRD- sem raça definida.

Discussão

1.1 Caracterização da amostra em estudo

A população incluída no presente estudo foi composta por 139 canídeos, cujos exames citológicos e/ou histológicos revelaram diagnóstico de linfoma. Sendo que 12 foram obtidos através de citologia e 127 por histologia.

Verificou-se que mais de metade da população em estudo era constituída por canídeos do género masculino, demonstrando-se assim maior prevalência em machos do que em fêmeas. A influência do género no desenvolvimento de linfoma é um assunto ainda algo controverso. Em medicina humana estudos realizados demonstraram evidência de uma maior prevalência de linfoma não-Hodgkin's em homens do que em mulheres. Em medicina veterinária foi também colocada esta hipótese, todavia um estudo realizado por Dorn *et al.* (1970) não suportou a mesma. Mais tarde, o trabalho de Villamil *et al.* (2009), demonstrou uma maior prevalência de linfoma em machos do que em fêmeas, e maior prevalência em fêmeas esterilizadas quando comparadas com fêmeas inteiras.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com o estudo realizado por Villamil *et al.* (2009). Contudo, não foram obtidas informações relativas ao estado fértil dos animais que compuseram a amostra nem relativa à população total de machos e fêmeas dos CAMVs utilizados.

Relativamente à idade no momento do diagnóstico, verificou-se uma média de idade de $8,7 \pm 3,2$ anos e mediana de 9 anos, sendo que grande parte da amostra se encontrava entre os 5 e os 11 anos. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos realizados por outros autores. Valli *et al.* (2013) indicam maior prevalência de linfoma em canídeos entre os 6 e os 9 anos de idade e um estudo realizado por Mortier *et al.* (2012) demonstrou que 80% dos canídeos com linfoma tinham idades entre os 5 e 11 anos.

Assim, os dados obtidos revelam uma população adulta a sénior, demonstrando a relação entre o aumento da idade e o aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de neoplasias. Esta afirmação está relacionada com a longa exposição no tempo a agentes carcinogénicos, facultada pelo envelhecimento. Também a diminuição das defesas anti-tumorais ao longo da vida do animal, nomeadamente, diminuição da reparação de DNA e alteração dos genes supressores de tumor, contribuem para este evento (Villalobos & Kaplan, 2018).

Após análise da amostra em estudo, verificou-se que a mesma era maioritariamente constituída por cães sem raça definida (SRD), não sendo assim possível estabelecer uma associação entre a raça e o desenvolvimento de linfoma. A seguir aos canídeos SRD, encontram-se por ordem decrescente, os da raça labrador, golden retriever e pastor alemão. Na literatura, encontram-se descritas como raças com maior prevalência de linfoma o boxer, bull mastiff, São Bernardo e bulldogs (Priester & McKay, 1980; Edward *et al.*, 2003). A prevalência de linfoma de acordo com a raça poderá variar com a localização geográfica do animal, uma vez que a frequência da raça e a exposição da mesma a determinados fatores poderá variar conforme a sua localização (Pastor *et al.*, 2009). Por exemplo, um estudo realizado por Pinello *et al.* (2019) na região do Porto, Portugal, verificou maior prevalência de linfoma em canídeos SRD, seguidos da raça labrador, boxer e rottweiler. Assim, a diferença nos resultados obtidos no presente estudo e por outros autores poderá estar relacionada com a exposição a diferentes fatores ambientais e/ou pela preferência de raças caninas de diferentes populações.

Com o intuito de averiguar se a distribuição geográfica poderia ter influência no desenvolvimento de linfoma, analisou-se a população em estudo de acordo com o distrito. A análise deste parâmetro demonstrou maior prevalência de linfoma no distrito de Lisboa, representando estes canídeos mais de metade da amostra. Todavia, o resultado obtido poderá ter sido influenciado pela localização das instituições utilizadas para a obtenção dos dados, uma vez que ambas se localizam no distrito de Lisboa. Verificou-se que o segundo distrito com maior prevalência foi o distrito de Setúbal (13%), seguido do distrito de Faro (10%). No entanto, não foi possível comparar estes dados uma vez que não foram encontrados estudos relativos à prevalência de linfoma canino em Portugal. Existe apenas um estudo confinado à região do Porto onde se verificou maior prevalência na área metropolitana do Porto (Pinello *et al.*, 2019).

1.2 Caracterização do linfoma da amostra em estudo

Relativamente à classificação segundo a localização anatómica, verificou-se maior prevalência da forma multicêntrica. Este resultado está de acordo com o obtido por outros autores, nomeadamente, Madewell & Thesen (1987) que demonstraram que a forma multicêntrica representa cerca de 84% dos linfomas caninos. A seguir à forma multicêntrica e por ordem decrescente, verificou-se a forma nodal, cutânea, alimentar, extra-nodal e, por fim, mediastínica. Estes resultados não estão de acordo com a bibliografia analisada, a qual indica, por ordem decrescente e a seguir à forma multicêntrica, a forma alimentar, cutânea, mediastínica e extra-nodal (Vail *et al.*, 2013).

No presente estudo, dos 9 animais que apresentavam linfoma alimentar, verificou-se maior prevalência em machos. Não existe evidência em medicina veterinária de que esta localização de linfoma esteja associada a um determinado género. No entanto, um estudo realizado por Jemal *et al.* (2004) em medicina humana, demonstrou que as neoplasias intestinais são mais frequentes em pacientes do género masculino.

Relativamente à imunofenotipagem, uma grande percentagem da amostra em estudo não possuía informações relativas ao imunofenótipo, fator importante na determinação do prognóstico e resposta ao tratamento. Deste modo, para a caracterização da amostra relativamente a este parâmetro, apenas foram incluídos os canídeos que haviam realizado exames complementares de diagnóstico para a determinação do imunofenótipo. Tal como esperado, verificou-se maior prevalência de linfoma de células B, representando grande parte da amostra. Os resultados obtidos estão de acordo com os adquiridos por Ponce *et al.* (2010), que demonstraram uma maior prevalência de linfoma de células B, representando 64% da amostra avaliada pelos autores.

O reduzido número de animais com informações relativas ao imunofenótipo poderá demonstrar a indisponibilidade financeira dos tutores com que o médico veterinário tem por vezes de lidar, limitando a realização de exames complementares de diagnóstico.

Pretendeu-se também com o presente estudo, estabelecer uma relação entre a localização anatómica do tumor e o imunofenótipo. Para tal analisaram-se apenas os animais que tinham informação relativa a este parâmetro. Dos 35 canídeos que apresentavam linfoma multicêntrico, 32 eram de células B e apenas 3 de células T. Os resultados obtidos estão de acordo com a bibliografia analisada, a qual indica que o imunofenótipo B é o mais comum, representando aproximadamente 60 a 70% dos linfomas caninos (Ponce *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2013). Verificou-se também que 75% dos linfomas nodais eram do tipo B.

O linfoma cutâneo está fortemente associado ao imunofenótipo T, podendo ser classificado com epiteliotrópico ou não epiteliotrópico (Moore *et al.*, 2009; Vail, 2011;). Dos 12 canídeos com linfoma cutâneo, 4 foram classificados como epiteliotrópicos, não tendo sido os restantes classificados como epiteliotrópicos ou não epiteliotrópicos. Destes, apenas 2 apresentavam informação relativa ao imunofenótipo, sendo ambos de células T.

Dos canídeos com linfoma alimentar e informação relativa ao imunofenótipo, verificou-se que 2 tinham linfoma do tipo B e 1 do tipo T. Inicialmente acreditava-se que este linfoma tinha origem nas células B, contudo estudos realizados por vários autores vieram demonstrar que a maioria dos linfomas alimentares caninos têm origem nos linfócitos T (Coyle

& Steinberg, 2004; Ozaki *et al.*, 2006; Vail *et al.*, 2013). Os resultados obtidos não vão encontro à bibliografia analisada. Todavia, estes poderiam ser diferentes caso todos os canídeos com linfoma alimentar apresentassem informação relativa ao imunofenótipo.

A maioria dos linfomas mediastínicos têm origem nas células T (Fournel-Fleury *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013). No entanto, não foi possível no presente estudo obter informações relativamente ao imunofenótipo desta forma de linfoma.

Pretendeu-se também estabelecer uma relação entre o género do animal e imunofenótipo. No entanto, não se verificou uma relação estatisticamente associativa no presente estudo entre estas duas variáveis ($p=0,236$).

1.3 Tratamento implementado

Relativamente ao esquema terapêutico selecionado, apenas foram considerados os animais observados no HVR que realizaram algum tipo de tratamento. Verificou-se que o protocolo CHOP foi o mais utilizado tendo sido administrado à maioria dos cães em estudo. Os resultados obtidos estão de acordo com a bibliografia analisada, a qual classifica o protocolo CHOP como o *gold standard* no tratamento de linfoma multicêntrico, sendo assim o mais utilizado (Carter *et al.*, 1987).

O segundo tratamento mais utilizado foi o protocolo com quimioterapia oral, tendo sido administrado a 2 canídeos que apresentavam linfoma folicular de baixo grau. Os resultados obtidos vão de encontro à bibliografia analisada, a qual sugere a eleição de protocolos de quimioterapia oral nos casos de linfoma indolente (Mailankody *et al.*, 2018).

1.4 Tempo médio de sobrevivência

Pretendeu-se com o presente estudo analisar o período de tempo compreendido entre o diagnóstico e a morte do animal, e o início do tratamento e morte do animal. Para tal, foram analisados os animais observados no HVR.

Comparou-se o tempo médio de sobrevida entre os animais observados no HVR com linfoma de células B e de células T. Dos canídeos em estudo, verificou-se que os cães com linfoma de células B viveram mais tempo do que os cães com linfoma de células T. Assim, demonstrou-se um menor período médio de sobrevida nos canídeos com linfoma de células T. Os resultados obtidos estão de acordo com a bibliografia analisada, a qual indica o imunofenótipo T como um fator de pior prognóstico, estando o mesmo associado a menor tempo de sobrevivência (Vail, 2017). No entanto, é importante salientar que, para a realização da presente análise, não foram considerados determinados fatores que poderão influenciar a

sobrevivência, nomeadamente, tipo de linfoma, localização anatômica e o tratamento implementado.

Pretendeu-se também averiguar a resposta ao tratamento dos canídeos em estudo. Para tal, foram analisados os animais observados no HVR que realizaram algum tipo de tratamento. Considerou-se o período de tempo compreendido entre o início do tratamento e a morte do animal. Tal como referido anteriormente, o protocolo CHOP foi o mais utilizado tendo os animais que receberam o mesmo atingido um período médio de sobrevivência de $6,2 \pm 4,9$ meses. Os valores obtidos são inferiores aos analisados pela literatura, a qual indica que os animais que recebem este tratamento podem atingir tempos médios de sobrevivência de 10 a 12 meses (Carter *et al.*, 1987; Harding *et al.*, 2018).

O canídeo que realizou o protocolo com apenas doxorrubicina, o qual havia sido iniciado noutro CAMV tendo sido posteriormente iniciado o protocolo CHOP, sobreviveu 19 meses. O mesmo não foi incluído na amostra anterior por ter realizado previamente o protocolo com doxorrubicina. O resultado obtido é superior à média atingida pelos animais que recebem apenas doxorrubicina, sendo a mesma entre 6 e 8 meses, e pelos que recebem o protocolo CHOP.

Dos canídeos que receberam quimioterapia oral, por apresentarem linfoma folicular de baixo grau, verificou-se um tempo médio de sobrevida de $5 \pm 4,2$ meses. Espera-se que os animais diagnosticados com linfoma indolente apresentem tempos médios de sobrevivência superiores comparativamente aos linfomas de grau intermédio/alto (Valli *et al.*, 2006). No entanto, o mesmo não se verificou no mesmo estudo, tendo estes animais apresentado valores inferiores comparativamente aos canídeos em estudo com linfoma de grau intermédio/alto.

Relativamente aos animais que receberam tratamento paliativo com prednisona, os mesmos atingiram um tempo médio de sobrevida de $4,5 \pm 6,4$ meses. Os resultados obtidos são superiores à média referida na bibliografia analisada, a qual indica que os animais que recebem este tipo de tratamento apenas vivem 1 a 2 meses (Vail *et al.*, 2013). Assim, salienta-se a vantagem da realização de prednisona quando os tutores não concordam com a realização de quimioterapia uma vez que sem a realização de nenhum tipo de tratamento, a esperança média de vida de um canídeo com linfoma será de 4 a 6 semanas (Vail, 2017).

É importante evidenciar que, para a análise de sobrevivência segundo o tratamento, não se considerou o tipo de linfoma, a localização anatômica nem o imunofenótipo, circunstância que poderá ter influenciado os resultados.

1.4 Interação com leishmaniose

Um dos objetivos da presente dissertação foi averiguar a interação entre leishmaniose e linfoma. Da população em estudo, verificou-se que apenas 48 animais (35%) haviam sido testados para esta enfermidade. Dos animais que haviam sido testados para leishmaniose, 7 eram positivos, obtendo-se assim uma prevalência de 15%. Da amostra em estudo, verificou-se que 4 animais eram do distrito de Lisboa, 2 de Setúbal e 1 de Santarém.

Num rastreio serológico realizado por Cortes *et al.* (2012), no qual foram avaliados 3974 canídeos provenientes de 18 distritos de Portugal continental, verificou-se uma prevalência de 6,31% de leishmaniose. Verificou-se que a prevalência obtida da comorbilidade em estudo é superior à prevalência nacional leishmaniose canina. Os resultados obtidos poderão sugerir uma possível interação entre linfoma e leishmaniose. No entanto, sendo os distritos mais afetados por ordem decrescente, segundo Cortes *et al.* (2012), Santarém, Coimbra e Setúbal, e uma vez que o presente estudo inclui animais destes distritos, a seroprevalência poderá ser superior por esta razão.

A pequena percentagem de animais testados poderá dever-se à semelhança dos sinais clínicos entre a leishmaniose e o linfoma, sendo a linfadenomegália o principal sinal clínico de ambas. Também o longo período de incubação da leishmaniose, o qual pode ir de meses a anos, poderá influenciar a pequena percentagem de animais testados. (Fisa *et al.*, 1999; Cardoso *et al.*, 2007). Além disso, caso o animal desenvolva linfoma durante o período de incubação e uma vez feito o diagnóstico de linfoma, é raro averiguarem-se outros diagnósticos diferenciais.

Dos canídeos que apresentavam esta comorbilidade, verificou-se maior prevalência em fêmeas que em machos e maior prevalência em canídeos sem raça definida. Os resultados obtidos podem estar relacionados com o facto de a população total em estudo ser maioritariamente composta por canídeos sem raça definida. Não foram encontrados estudos que demonstrassem evidência de maior prevalência de leishmaniose em fêmeas do que em machos. Verificou-se também que todos os canídeos desta amostra apresentavam linfoma na sua forma multicêntrica. Os resultados obtidos poderão estar relacionados com o facto de a forma multicêntrica ser a forma mais comum de linfoma, representando 84% de todos os linfomas caninos (Madewell & Thesen, 1987).

1.5 Limitações do estudo

As limitações do presente estudo deverão ser consideradas e devem-se principalmente à sua natureza retrospectiva. Ao longo da realização do presente estudo, as limitações que se verificaram foram, principalmente, a falta de determinadas informações clínicas, tais como o imunofenótipo, estadio, sub-estadio, entre outras. Com o intuito de estabelecer coerência entre os dados obtidos, os linfomas foram apenas categorizados relativamente ao seu imunofenótipo, sem ter em consideração o grau, uma vez que se trata de um dado por vezes subjetivo e porque laboratórios diferentes poderão utilizar diferentes sistemas.

A falta de dados relativamente ao estatuto positivo ou negativo do animal para leishmaniose foi também um fator limitante, uma vez que apenas uma pequena percentagem da amostra apresentava informações deste parâmetro. A falta desta informação poderá dever-se ao facto de muitos animais observados pelos médicos da área de oncologia do HVR serem referenciados por outros CAMVs, não existindo assim acesso a todo o historial clínico do animal.

Os casos obtidos através dos dados do DNAtch foram também limitantes uma vez que nas fichas de requisição de análises apenas constam informações como idade, raça e género, desconhecendo-se o estadio e sub-estadio do linfoma do animal. Relativamente ao estatuto para leishmaniose destes animais, apenas foi possível obter informações dos que realizaram diagnóstico através deste laboratório. Será importante salientar que muitas vezes o diagnóstico é realizado no próprio CAMV, através da utilização de testes rápidos, ou que o CAMV poderá recorrer a outros laboratórios para a realização do diagnóstico. Assim, a amostra pode não ser representativa da prevalência real de canídeos com linfoma e leishmaniose pela falta de acesso ao historial clínico completo do animal.

O presente estudo pretendeu contribuir para o estudo e caracterização do linfoma canino em Portugal. Do ponto de vista epidemiológico, o registo dos casos de linfoma canino e o seu estudo são importantes com o intuito de identificar possíveis fatores de risco ao seu desenvolvimento. Do conhecimento da autora, o presente estudo foi o primeiro realizado em Portugal com o intuito de averiguar a relação entre linfoma e leishmaniose.

Conclusão

A presente dissertação foi realizada com o intuito de caracterizar o linfoma canino e tentar estabelecer uma relação entre o mesmo e leishmaniose.

Relativamente aos objetivos impostos no presente estudo, foi possível analisar as variáveis em estudo, obtendo assim resultados semelhantes aos obtidos por outros autores. Analisando o presente trabalho, verificou-se que grande parte da amostra era constituída por animais SRD e que 68% da amostra em estudo se encontrava entre os 5 e os 11 anos no momento do diagnóstico. Tal como esperado, 71% da amostra apresentava linfoma multicêntrico, sendo o imunofenótipo mais comum de células B.

Verificou-se uma prevalência de 15% de leishmaniose na amostra que apresentava informação relativa a este parâmetro. O resultado obtido poderá sugerir uma interação entre leishmaniose e linfoma, uma vez que a prevalência obtida é superior à prevalência de leishmaniose a nível nacional. No entanto, pela falta de dados disponíveis, não foi possível estabelecer uma relação direta entre linfoma e leishmaniose.

A falta de dados comparativos relativamente à prevalência de linfoma canino em Portugal continental foi também um fator limitante para a realização de um estudo mais completo. Considera-se assim importante a realização de estudos geograficamente mais abrangentes ou a criação de uma base de dados universal, que permitam fornecer conhecimento relativamente ao estatuto do linfoma canino em Portugal. A criação de uma base de dados seria interessante na medida em que poderia auxiliar o estudo e identificação de agentes com potencial carcinogénico para o desenvolvimento de linfoma em cães. Devido às semelhanças entre linfoma canino e linfoma humano não-Hodgkins, estas informações poderiam ter um valor relevante na identificação de agentes carcinogénicos em humanos.

Seria interessante a realização futura de um estudo com uma amostra maior para averiguar a interação entre leishmaniose e linfoma, com o intuito de avaliar se esta poderá ser um fator de risco de desenvolvimento desta neoplasia. Seria também importante salientar a importância do despiste de leishmaniose em todos os cães com linfoma. Tal como referido anteriormente, na prática clínica diária, uma vez feito o diagnóstico de linfoma não é recorrente averiguarem-se outros diagnósticos diferenciais. No entanto, um animal que seja positivo para leishmaniose continuará a ser um foco de infeção para outros animais e pessoas imunodeprimidas. Seria também interessante realizar PAAF dos linfonodos dos canídeos com leishmaniose para averiguar possíveis alterações a nível dos linfócitos.

Dada a ausência de felídeos no presente estudo e uma vez que se têm relatado casos de leishmaniose nos mesmos, seria também interessante a inclusão desta espécie em estudos futuros.

Bibliografia

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016). Innate and adaptive immunity. In A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai, *Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system*. (5^a Ed., pp. 1-25). St Louis, Missouri: Elsevier, Inc.
- Albanese, F., Poli, A., Millanta, F. & Abramo, F. (2002). Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin?. *Vet Dermatol*. 13(5), 243-246.
- Alvarez, F. J., Kisseberth, W. C., Gallant, S. L. & Couto, C. G. (2006). Dexamethasone, melphalan, actinomycin D, cytosine arbinoside (DMAC) Protocol for dogs with relapsed lymphoma. *J Vet Intern Med*. 20(5), 1178-1183.
- Avery, A., Olver, C., Khanna, C. & Paoloni, M. C. (2013). Molecular Diagnostics. In: S. J. Withrow, D. M. Vail & R. L. Page, *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5^a Ed., pp. 131-142). St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc.
- Back, A. R., Schleis, S. E., Smrkovski, O. A., Lee, J., Smith, A. N. & Phillips, J. C. (2015). Mechlorethamine, vincristine, melphalan and prednisone (MOMP) for the treatment of relapsed lymphoma in dogs. *Vet Comp Oncol*. 13(4), 398-408.
- Backer, L. C., Grindem, C. B., Corbett, W. T., Cullins, L. & Hunter, J. L. (2001). Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci Total Environ*. 274(1-3), 161-169.
- Baskin, C. R., Couto, C. G. & Wittum, T. E. (2000). Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc*. 36(5), 404-409.
- Beaver, L. M., Strottnier, G. & Klein, M. K. (2010). Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008). *J Am Vet Med Assoc*. 237(9), 1052-1055.
- Bezerra, J. M. T., de Araújo, V. E. M., Barbosa, D. S., Martins-melo, F. R., Werneck, G. L. & Carneiro, M. (2018). Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(9).
- 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.
- Brodsky, E. M., Maudlin, G. N., Lachowicz, J. L. & Post, G. S. (2009). Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*. 23 (3), 578- 584.

- Browder, T., Butterfield, C. E., Kraling, B. M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M. S. *et al.* (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 60(7). 1878-1886.
- Brown, P. M., Tzannes, S., Nguyen, S., White, J. & Langova, V. (2017). LOPP chemotherapy as a first-line treatment for dogs with T-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 16 (1), 108-113.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta medica portuguesa* 23, 859-864.
- Cardoso, L., Schallig, H.D., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J.M., Rodrigues, M. (2007). Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117(1-2), 35–41.
- Carter, R. F., Harris, C. K., Withrow, S. J., Valli, V. E. O. & Susaneck, S. J. (1987). Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. *J Am Anim Hosp Assoc* 23, 587-596.
- Comazzi, S. & Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometry immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J.* 188 (2), 149-155.
- Corral-Caridad, M. J. & Alunda, J. M. (2013). Chemotherapy of leishmaniasis: A veterinary perspective. In: T. Jager, O. Koch & L. Flohé, *Trypanosomatid diseases: Molecular routes to drug discovery* (1ª Ed., pp. 17-35). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol.* 189(2-4), 189-196.
- 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.
- Coyle, K. A. & Steinberg, H. Characterization of Lymphocytes in Canine Gastrointestinal Lymphoma. *Vet Pathol* 41(2), 141-146.
- De Clercq, E. (2018). Tanovea® for the treatment of lymphoma in dogs. *Biochem Pharmacol.* 154, 265-269.
- De Swarte, M., Alexander, K., Rannou, B., D'Anjou, M., Blond, L. & Beauchamp, G. (2011). Comparison of sonographic features of benign and neoplastic deep lymph nodes in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 52 (4), 451-456.

- Demurtas, A., Accinelli, G., Pacchioni, D., Godio, L., Novero, D., Bussolati, G. et al. (2010). Utility of flow cytometry immunophenotyping in fine-needle aspirate cytologic diagnosis of non-Hodgkin lymphoma: A series of 252 cases and review of the literature. *Appl Immunohistochem Mol. Morphol.* 18(4), 311-322.
- Dorn, C. R., Taylor, D. O. & Schneider, R. (1970). The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibl Haematol.* (36), 403-415.
- Doroshov, J. H. (2011). Topoisomerase II inhibitors: anthracyclines. In: B. A. Chabner & D. L. Longo, *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice* (5^a Ed., pp. 356-391). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Edwards, D. S., Henley, W. E., Harding, E. F., Dobson, J. M. & Wood, J. L. (2003). Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol* 1(4), 200-206.
- Elliott, J. & Baines, S. (2019). Retrospective Study of Multi-agent Chemotherapy including either Cyclophosphamide or Lomustine as Initial Therapy for Canine High-grade T-cell Lymphoma (2011-2017). *Aust Vet J.* 97(9), 308-315.
- Farinha, P. & Gascoyne, R. D. (2005). Helicobacter pylory and MALT lymphoma. *Gastroenterology* 128(6), 1579-1605.
- Ferrick, D. A., Schrenzel, M. D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W. G. & Lepper, H. (1995). Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1 and Th2-stimulating pathogens by gd T-cells in vivo. *Nature* 373(6511), 255–257.
- Ferro, S., Palmieri, C., Cavichioli, L., De Zan, G., Aresu, L. & Benalo, S. L. (2013). *Leishmania* Amastigotes in Neoplastic Cells of 3 Nonhistiocytic Canine Tumours. *Vet Pathol.* 50(5), 749-752.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C. et al. (1999). Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the exemple of the Priorat focus. *Parasitol.* 83(2), 87-97
- 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* 11(4), 272-286.
- Flory, A. B., Rassnick, K. M., Stokol, T., Scrivani, P. V. & Erb, H. N. (2007). Stage migration in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 21 (5), 1041-1047.

- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L. et al. (2002). Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol.* 39(1), 92-109.
- Furner, R. L., Brown, R. K. & Duncan, G. (1977). Pharmacokinetics of the absorption, distribution, and elimination of melphalan in the dog. *Cancer Treat Rep* 61(9), 1637-1646.
- 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.
- Geigy, C., Riond, B., Bley, C. R., Grest, P., Kircher, P. & Lutz, H. (2013). Multiple myeloma in a dog with multiple concurrent diseases and persistent polyclonal gammopathy. *Vet Clin Pathol.* 42(1), 47-54.
- Gieger, T. (2011) Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vete Clin North Am Small Anim Pract.* 41 (2), 419-432.
- Goodman, I. H., Moore, A. S. & Frimberger, A. E. (2016). Treatment of canine non-indolent T-cell lymphoma using the VELCAP-TSC protocol: A retrospective evaluation of 70 dogs (2003-2013). *Vet J.* 211, 39-44.
- Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N. L. & Rosen, S. T. (2002). Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res.* 8(6), 1681-1694
- Griensven, J. Carrillo, E., López-Vélez, R. Lynen, L. & Moreno, J. (2014). Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect.* 20(4), 286-299.
- Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J. & Affolter, V. K. (2005). Lymphocytic tumors. In: N. Henrich, M. Eisenschenk, R. Harvey & T. Nuttall, *Skin diseases of the dog and cat* (2^a Ed., pp.866-888). Oxford, Blackwell.
- Hallman, B. E., Hauck, M. L., Williams, L. E., Hess, P. R., Suter, S. E. (2019). Incidence and risk factors associated with development of clinical cardiotoxicity in dogs receiving doxorubicin. *J Vet Intern Med* 33 (2), 783-791.
- Harding, K., Bergman, N., Smith, A., Lindley, S., Szivek, A., Milner, R. et al. (2018). Response rate to a single dose of vinblastine administered to dogs with treatment-naïve multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 16 (4), 636-641.
- Ito, D., Frantz, A. M. & Modiano, J. F. (2014). Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol.* 159 (3-4), 192-201.

- Jaffe, E., Arber, D. A., Campo, E., Harris, N. L. (2016). Hematopathology. (2ª Ed.). Elsevier.
- Jeffreys, A. B., Knapp, D. W., Thomas, R. M., Bonney, P. L., Degortari, A. & Lucroy, M. D. (2005). Influence of asparaginase on a combination chemotherapy protocol for canine multicentric lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 41 (4), 221-226.
- Jemal, A., Tiwari, R. C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E. *et al.* (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 54(1), 8-29.
- Keller, E. T. (1992). Immune-mediated disease as a risk for canine lymphoma. *Cancer* 70(9), 2334-2337.
- Khanna, C., Lund, E. M., Redic, K. A., Hayden, D. W., Bell, F. W., Goulland, E. L. *et al.* (1998). Randomized controlled trial of doxorubicin versus dactinomycin a multiagent protocol for treatment of dogs with malignant lymphoma. *J Am Vet Med Assoc.* 213 (7), 985-990.
- Kinns, J. & Mai, W. (2007). Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes. *Vet Radiol Ultrasound* 48 (6), 565-569.
- Kopterides, P., Mourtzoukou, E. G., Skopelitis, E., Tsavaris, N. & Falagas, M. E. (2007). Aspects of the association between leishmaniasis and malignant disorders. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101, 1181-1189.
- Kuppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5(4), 252-262.
- Lautscham, E. M., Kessler, M., Ernst, T., Willimzig, L. & Neiger, R. (2017). Comparison of a CHOP-LAsp-based protocol with and without maintenance for canine multicentric lymphoma. *Vet Rec.* 180(12), 303.
- Lawrence, J., Vanderhoek, M., Barbee, D., Jeraj, R., Tumas, D. B. & Vail, D. M. (2009). Use of 3'-deoxy-3'-[18F] fluorothymidine PET/CT for evaluating response to cytotoxic chemotherapy in dogs with non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Radiol Ultrasound* 50 (6), 660-668.
- Lax, A. J. & Thomas, W. (2002). How bacteria could cause cancer: one step at a time. *Trends Microbiol.* 10(6), 293-299.
- LeBlanc, A. K., Jakoby, B. W., Townsend, D. W. & Daniel, G. B. (2009). 18DG-PET imaging in canine lymphoma and cutaneous mast cell tumor. *Vet Radiol Ultrasound* 50 (2), 215-223.

- Lennert, K., Mohri, N., Stein, H., Kaiserling, E. & Muller-Hermelink, H. K. (1978). Histopathology and diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas. In: K. Lennert, *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease* (1^a Ed., pp.111-469). Berlin: Springer-Verlag.
- Lobetti, R. G. (2009). Lymphoma in 3 related Rottweilers from a single household. *J S Afr Vet Assoc.* 80(2), 103-105.
- Lukes, R. J. & Collins, R. D. (1974). Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 34 (8), 1488-1503.
- MacDonald, V. S., Thamm, D. H., Kurzman, I. D., Turek, M. M. & Vail, D. M. (2005). Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *J Vet Intern Med.* 19 (5), 732-736.
- Madewell, B. R. & Feldman, B. F. (1980). Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals. *J Am Vet Med Assoc.* 176 (5), 419-425.
- Mailankody, S., Ganesan, P., Joshi, A., Ganesan, T. S., Radhakrishnan, V., Dhanushkodi, M. *et al.* (2018). Outcomes of oral metronomic therapy in patients with lymphomas. *Indian J Hematol Blood Transfus* 35(1), 50-56.
- Male, D. (2006). Mechanisms of innate immunity. In: D. Male, J. Brostoff, D. B. Roth & I. Roitt, *Immunology* (7^a Ed., pp.127-144). London: Mosby Elsevier
- Manzillo, V. F., Pagano, A., Guglielmino, R., Gradoni, L. & Restucci, B. (2008). Extranodal $\gamma\delta$ -T.cell lymphoma in a dog with leishmaniasis. *Vet Clin Pathol.* 37 (3), 298-301.
- Marconato, L., Gelain, M. E. & Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol.* 31 (1), 1- 9.
- Marconato, L., Stefanello, D., Valenti, P., Bonfanti, U., Comazzi, S., Roccabianca, P. *et al.* (2011). Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *J Am Vet Med Assoc,* 238 (4), 480-485.
- Marquardt, T. M., Lindley, S. E. S., Smith, A. N., Cannon, C. M., Rodriguez Jr, C. O., Thamm, D. H. *et al.* (2019). Substitution of mitoxantrone for doxorubicin in a multidrug chemotherapeutic protocol for first-line treatment of dogs with multicentric intermediate- to large -cell lymphoma. *J Am Vet Med Assoc.* 254 (2), 236-242.
- Mastromauro, M. L., Suter, S. E., Hauck, M. L. & Hess, P. R. (2017). Oral melphalan for the treatment of relapsed canine lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 16(1), 123-129.

- Mauldin, G. E., Fox, P. R., Patnaik, A. K., Bond, B. R., Mooney, S. C. & Matus, R. E. (1992). Doxorubicin-induced cardiotoxicosis. Clinical features in 32 dogs. *J Vet Intern Med* 6 (2), 82-88.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., Ryam, M. T., Kilroy, D. & Lonergan, P. (2017). Cardiovascular system. In T. A. McGeady, P. J. Quinn, E. S. FitzPatrick, M. T. Ryam, D. Kilroy, P. Lonergan, *Veterinary embryology*. (2ªEd., pp. 119-147). West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Meleo, K. A. (1997). The role of radiotherapy in the treatment of lymphoma and thymoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27, 115-129.
- Mescher, A. L. (2016). The immune system & lymphoid organs. In A. L. Mescher, *Junqueira's basic histology* (14ª Ed., pp. 267-294). McGraw-Hill education.
- Modiano, J. F., Breen, M., Burnett, R. C., Parker, R. C., 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.
- Modlin, R. L., Pirmez, C., Hofman, F. M., Torigian, V., Uyemura, K., Rea, T. H. *et al.* (1989). Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptor accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 339(6225), 544-548.
- Moore, P. F., Affolter, V. K., Graham, P. S. & Hirt, B. (2009). Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: an investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. *Vet Dermatol* 20(5-6), 569-576.
- Mortier, F., Daminet, S., Vandenabeele, S. & Van de Maele, I. (2012). Canine lymphoma: a retrospective study (2009-2010). *Vlaams Diergen Tigids* 81(6), 341-351.
- Myers, N. C., Moore, A. S., Rand, W. M., Gliatto, J. & Cotter, S. M. (1997). Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 11(6), 333-339.
- National Cancer Institute (1982). National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 49(10), 2112-2135.
- Nerschbach, V., Eule, J. C., Eberle, N., Hoinghaus, R. & Betz, D. (2013). Ocular manifestation of lymphoma in newly diagnosed cats. *Vet Comp Oncol.* 10 (1111), 58-66.

- Nyman, H. T., Kristensen, A. T., Skovgaard, I. M. & McEvoy, F. J. (2005). Characterization of normal and abnormal canine superficial lymph nodes using gray-scale B-mode, color flow mapping, power, and spectral Doppler ultrasonography: a multivariate study. *Vet Radiol Ultrasound* 46 (5), 404-410.
- O'Brien, D., Moore, P. F., Vernau, W., Peauroi, J. R., Rebhun, R. B., Rodriguez, C. O. *et al.* (2013). Clinical characteristics and outcome in dogs with splenic marginal zone lymphoma. *J Vet Intern Med* 27(4), 949-954.
- Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K. & Narama, I. (2006). T-cell Lymphoma with Eosinophilic Infiltration Involving the Intestinal Tract in 11 dogs. *Vet Pathol* 43(3), 339-344.
- Paoloni, M. C. & Khanna, C. (2007). Comparative oncology today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 37 (6), 1023-1032
- Parodi, A. L. (2001). Classification of malignant lymphoma in domestic animals: history and conceptual evolution. *European Journal of Veterinary Pathology* 7 (2), 43-50.
- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J. P. *et al.* (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed association and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med* 23(2), 301-310.
- Piek, C. J., Rutteman, G. R. & Teske, E. (1999). Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *Vet Q.* 21 (2), 44-49.
- Pinello, K. C., Niza-Ribeiro, J., Fonseca, L. & de Matos, A. J. (2019). Incidence, characteristics and geographical distributions of canine and human non-Hodgkin's lymphoma in the Porto region (North West Portugal). *Vet J.* 245, 70-76.
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bennefont, C. *et al.* (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol.* 47 (3), 414-433.
- Postorino, N. C., Sasaneck, S. J. & Whitrow, S. J. (1989). Single agent therapy with Adriamycin for canine lymphosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 25 (32), 221-225.
- Priester, W. A. & McKay, F. W. (1980). The occurrence of tumors in domestic animals. *Natl Cancer Inst Monogr.* (54), 1-210.

- Rappaport, H. (1966). Tumors of the hematopoietic system. In: H. Rappaport, *Atlas of tumor pathology* (2ª Ed.). Washington: AFIP
- Rassnick, K. M., Mauldin, G. E., Al-Sarraf, R., Mauldin, G. N., Moore, A. S. & Mooney, S. C. (2002). MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000). *J Vet Intern Med.* 16(5), 576-580.
- Rossi, G., Ross, 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.
- Ruple, A., Avery, A. C. & Morley, P. S. (2016). Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. *Vet Comp Oncol.* 15(4), 1590-1597.
- Ruslander, D. A., Gebhard, D. H., Tompkins, M. B., Grindem, C. B. & Page, R. L. (1997). Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo.* 11(2), 169-172.
- Russo, D. M., Armitage, R. J., Barral-Netto, M., Barrakk, A. Grabstein, K. H. & Reed, S. G. (1993). Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis. *J Immunol* 151(7), 3712-3718.
- Saba, C. F., Vickery, K. R., Clifford, C. A., Burgess, K. E. Phillips, B., Vail, D. M. *et al.* (2018). Rabacfosadine for relapsed canine B-cell lymphoma: Efficacy and adverse event profiles of 2 different doses. *Vet Comp Oncol.* 16(1), 76-82.
- Santoro, D., Marsella, R. & Hernandez, J. (2007). Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. *Vet Dermatol* 18(2), 101–106.
- Seelig, D. M., Avery, A. C., Ehrhart, E. J. & Linden, M. A. (2016). The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Veterinary sciences* 3(2). Acedido em 10 de Setembro de 2019 em <https://www.mdpi.com/2306-7381/3/2/11>
- Seelig, D. M., Avery, P., Webb, T., Yoshimoto, J., Bromberek, J., Ehrhart, E. J. *et al.* (2014). Canine T-zone lymphoma: unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. *J Vet Intern Med.* 28 (3), 878-886.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L. *et al.* (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 4(86). Acedido em 6 de Setembro de 2019 em <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-86>

- Starrak, G. S., Berry, C. R., Page, R. L., Johnson, J. L. & Thrall, D. E. (1997). Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound* 38 (6), 411-418.
- Stefanello, D., Valenti, P., Zini, E., Comazzi, S., Gelain, M. E. Roccabianca, P. *et al.* (2011). Splenic marginal zone lymphoma in 5 dogs (2001-2008). *J Vet Intern Med.* 25 (1), 90-93.
- Steinberg, H., Dubielzig, R. R., Thomson, J. & Dzata, G. (1995). Primary gastrointestinal lymphosarcoma with epitheliotropism in three Shar-pei dog. *Vet Pathol.* 32(4), 423-426.
- Stone, M. S., Goldstein, M. A. & Cotter, S. M. (1991). Comparison of two protocols for induction of remission in dogs with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 27, 315-321.
- Suami, H., Yamashita, S., Soto-Miranda, A. & Chang, D. W. (2013). Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: An animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. *Plos one journal* 8 (7), 1-9.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H. *et al.* (2017). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (4^a Ed). Lyon, France. International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Thalheim, L., Williams, L. E., Borst, L. B., Fogle, J. E & Suter, S. E. (2013). Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *J Vet Intern Med.* 27(6), 1509-1516.
- Thamm, D. H., Vail, D. M., Kurzman, I. D., Babusis, D., Ray, A. S., Sousa-Powers, N. *et al.* (2014). GS-9219/VDC-1101--a prodrug of the acyclic nucleotide PMEG has antitumor activity in spontaneous canine multiple myeloma. *BMC Vet Res.* 10(30), 1-7.
- Tizard, I. (2013). Lymphocytes. In: I. Tizard, *Veterinary Immunology* (7^a Ed., pp. 127-136). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Vail, D. M. (2011). Tumours of the haemopoietic system. In: J. M. Dobson, & B. D. X. Lascelles, *BSAVA Manual of canine and feline oncology* (3^a Ed., pp. 285-291). British Small Animal Veterinary Association
- Vail, D. M. (2017). Hematopoietic tumors. In: S. J. Ettinger, E. C. Fellawdman & E. Côte, *Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and the cat* (8^a Ed., pp. 5000-5015). St Louis, Missouri: Elsevier, Inc.

- Vail, D. M., Kisseberth, W. C., Obradovich, J. E., Moore, F. M., London, C. A., MacEwen, E. G. et al. (1996). Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol.* 24(7), 807-815.
- Vail, D. M., Pinkerton, M. E. & Young, K. M. (2013). Hematopoietic tumors: Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: S. J. Withrow, D. M. Vail & R. L. Page, *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5ª Ed., pp. 608-638). St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc.
- Vail, D. M., Thamm, D. H., Reiser, H., Ray, A. S., Wolfgang, G. H., Watkins, W. J. et al. (2009). Assessment of GS-9219 in a pet dog model of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 15(10), 3503-3510.
- Valerius, K. D., Ogilvie, G. K., Mallinckrodt, C. H. & Getzy, D. M. (1997). Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). *J Am Vet Med Assoc.* 210 (4), 512-516.
- Valli, V. E., Bienzle, D. & Meuten, D. J. (2017). Tumors of the Hemolymphatic System. In: D. J. Meuten, *Tumors in Domestic Animals* (5ªEd., pp. 203-260) John Willey & Sons, Inc.
- Valli, V. E., Jacobs, R. M., Norris, A., Couto, C. G., Morrison, W. B., McCaw, D. et al. (2000). The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest* 12(4), 295-306.
- Valli, V. E., Kass, P. H., San Myint, M. & Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol.* 50 (5), 738-748.
- Valli, V. E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, L., Colbatzky, F. et al. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health criteria. *Vet Pathol.* 48 (1), 198-211.
- 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.
- Van der Schalie, W. H., Gardner, H. S. Jr., Bantle, J. A., De Rosa, C. T., Finch. R. A., Reif, J. S. et al. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ Health Perspect.* 107(4), 309-315.

- Veterinary cooperative oncology group [VCOG] (2011). Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG- CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Vet Comp Oncol.* 14(4), 417-446.
- Vezzali, E., Parodi, A. L., Marcato, P. S. & Bettini, G. (2010). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin's lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol.* 8 (1), 38-49.
- Villalobos, A. & Kaplan, L. (2018). Molecular Biology of Cancer and Aging. In: A. Villalobos & L. Kaplan, *Canine and Feline Geriatric Oncology* (2^a Ed., pp. 3-6). River Street, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Villamil, J. A., Henry, C. J., Hahn, A. W., Bryan, J. N., Tyler, J. W. & Caldwell, W. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol.* 2009(8).
- Wang, H.W. & Raffeld, M. (2019). Molecular assessment of clonality in lymphoid neoplasms. *Semin in Hematol.* 56, 37-45.
- Waugh, E. M., Gallagher, A., Haining, H., Johnston, P. E., Marchesi, F., Jarret, R. F. *et al.* (2016). Optimization and validation of a PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) assay to detect clonality in canine lymphoid malignancies. *Vet Immunol Immunopathol.* 182 (115-124).
- Wilkerson, M. J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garret, L. *et al.* (2005). Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol.* 106 (3-4), 179-196.
- Yamazaki, J., Baba, K., Goto-Koshino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Fujino, Y., Ohno, K. *et al.* (2008). Quantitative assessment of minimal residual disease (MRS) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.* 126(3-4), 321-331.
- Yau, P. P. Y., Dhand, N. K. & Thomson & Taylor, R. M. (2017). Restrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2011-2009). *Aust Vet J.* 95(5), 149-155.
- Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Vet Q.* 36(2), 76-104.