

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Diagnóstico de Linfoma Grau V em Cães e Tratamento com Transplante de Medula  
Óssea**

**Autor: Mariana Olinto Dreyer da Silva**

**PORTO ALEGRE  
2013/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Diagnóstico de Linfoma Grau V em Cães e Tratamento com Transplante de Medula  
Óssea**

**Autor: Mariana Olinto Dreyer da Silva**

**Monografia apresentada à  
Faculdade de Veterinária como  
requisito parcial para obtenção  
da Graduação em Medicina  
Veterinária**

**Orientador: Stella de Faria Valle  
Co-orientador: Francisco de Oliveira Conrado**

**PORTO ALEGRE  
2013/1**

## **AGRADECIMENTOS:**

À minha família pois, apesar de tudo, estão sempre ao meu lado.

Ao Médico Veterinário Francisco de Oliveira Conrado, pela amizade, pela co-orientação e pela persistência.

À Prof. Dra. Stella de Faria Valle, pela orientação e pela oportunidade de retorno ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – LACVet que fez parte da minha formação nos últimos 5 anos de faculdade.

À Dra. Elisa Barp Newald por ser minha tutora, minha professora e minha amiga, sempre acreditando no meu potencial.

Às minha cadelinhas Teka e Molly que me fizeram e fazem persistir na profissão.

Aos meus amigos Fernanda Roos, Maurício Fishmann, Heloísa de Souza, Gabriel Larizzatti, Arthur Hemmeister, Tatiana Guerra, Christina Farias, Bruno Teixeira, Amanda Muliterno, Viviane Fernandes, Luciana Machado e tantos outros que fizeram os meus dias mais fáceis e mais alegres.

## RESUMO

O linfoma é a neoplasia hematopoiética mais comumente observada em cães, com prevalência de 7 a 24% dentre todas as neoplasias caninas. A determinação da imunofenotipagem do linfoma é realizada pela citometria de fluxo, imunocitoquímica, ou imunohistoquímica e, através dessas técnicas, tenta-se desenvolver uma ligação com o tipo celular e o prognóstico do paciente. A realização de exames laboratoriais em cães com linfoma serve tanto para a avaliação do estadiamento da neoplasia desses animais, indicando o protocolo de tratamento ideal, quanto para o acompanhamento da saúde do paciente determinando também a evolução ou a remissão do linfoma. O mielograma é essencial para o estadiamento do linfoma e, em alguns casos, possibilita a identificação de alterações na medula óssea antes de serem identificadas no hemograma. Novos protocolos de tratamento estão sendo desenvolvidos e aplicados na rotina oncológica em medicina veterinária, como o transplante de medula óssea, que tem se mostrado eficaz no auxílio a remissão da doença. Este trabalho trata de revisar das opções mais simples de diagnóstico laboratorial como hemograma e citologia, até exames mais complexos como a citometria de fluxo. Visa também, difundir as práticas de coleta de medula e explorar uma nova modalidade de tratamento (transplante de medula óssea) pouco realizada no país.

Palavras-chave: diagnóstico, grau V, imunofenotipagem

## **ABSTRACT**

*Lymphoma is the most common hematopoietic neoplasm in dogs and accounts for between 7 and 24 percent of all canine neoplasms. Lymphoma immunophenotyping is done by flow cytometry, immunocytochemistry or immunohistochemistry. With these techniques, a correlation between cellular type and prognosis of the patient can be developed. Laboratorial examination in dogs with lymphoma is important for physical evaluation and disease staging of those animals, suggesting the ideal treatment protocol, and also for patient follow-up to determine the lymphoma remission or growth. Bone marrow evaluation is essential for the staging of lymphoma and contributes to the identification of bone marrow abnormalities before they are noted on CBC. New treatment protocols are being developed and used in veterinary medicine such as bone marrow transplantation. This treatment showed efficacy in contributing to disease remission. This work aims to review the options from the simplest diagnostic laboratory tests like CBC and cytology, to more complex tests such as flow cytometry. Also aims to disclosure practices of bone marrow collection and explore a new treatment modality (bone marrow transplant) not customarily performed in Brazil.*

*Key words : diagnostic, stage V, immunophenotyping*

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2.DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Linfoma: .....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Etiologia: .....	9
2.1.2 Patologia: .....	10
<b>2.2 Sistemas de Classificação Histológica:.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Manifestações Clínicas:.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Diagnóstico e Estadiamento: .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Estadiamento .....	15
2.4.2 Exame Clínico .....	15
2.4.3 Hemograma .....	16
2.4.4 Bioquímica clínica.....	17
2.4.5 Avaliação Citológica .....	18
2.4.6 Avaliação Histológica .....	19
2.4.7 Imunohistoquímica .....	19
2.4.8 Imunofenotipagem.....	19
2.4.9 Citometria de Fluxo.....	20
<b>2.5 Coleta e Avaliação de Medula Óssea .....</b>	<b>21</b>
2.5.1 Biópsia Aspirativa .....	22
2.5.2 Biópsia de Fragmento por Agulha.....	23
2.5.3 Avaliação da Medula.....	23
<b>2.6 Tratamento.....</b>	<b>24</b>
2.6.1 Quimioterapia .....	25
2.6.2 Radioterapia.....	26
2.6.3 Transplante de Medula Óssea.....	27
2.6.4 Tipos de Transplante .....	27
2.6.5 Purificação das Células Tronco Hematopoiéticas .....	28

2.6.6 Técnica de Transplante .....	29
<b>2.7 Remissão e Prognóstico .....</b>	<b>31</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>

## 1.INTRODUÇÃO

O linfoma maligno é a neoplasia hematopoiética mais comumente observada em cães. Origina-se nas células linforeticulares, usualmente nos tecidos linfóides, como os linfonodos, baço, fígado e medula óssea sendo que, pode se originar em qualquer tecido do organismo. A doença pode apresentar cinco estádios de evolução partindo do mais brando, que acomete apenas um linfonodo, ao último estágio que atinge a medula óssea e/ou órgão não linfóide. Este último tem pior prognóstico, exigindo assim, um diagnóstico exato e precoce para escolha do tratamento mais adequado e melhora na sobrevida do paciente.

As técnicas de diagnóstico utilizadas são, desde as mais simples (anamnese, ultrassonografia, exames de sangue, urinálise e citologia de massas e líquidos cavitários anormais), até métodos mais avançados e precisos (citometria de fluxo, biologia molecular, imunohistoquímica). O estágio do linfoma é determinado pela realização do mielograma ou biópsia de órgão não linfóide afetado, como lesões cutâneas. A partir do diagnóstico e do estadiamento é possível traçar uma linha de tratamento com o protocolo adequado de quimioterapia, porém as chances de sucesso no tratamento de um animal com o estágio mais grave do linfoma são poucas.

Novas diretrizes de tratamento vem sendo pesquisadas na medicina veterinária, como o transplante de medula óssea. Esta terapia está sendo empregada há alguns anos em países desenvolvidos como os Estados Unidos, que possui o laboratório pioneiro em transplantes de medula óssea na medicina veterinária, apresentando bons resultados na remissão de linfoma já no último estágio. No Brasil há apenas um relato de caso descrito na literatura no qual o procedimento mostrou ser eficiente na remissão da patologia.

Este trabalho tem como objetivo explorar as técnicas de diagnóstico aplicadas na medicina veterinária no Brasil e discutir as novas diretrizes de tratamentos, indicando o transplante de medula óssea como uma nova possibilidade na terapia de pacientes em estádios avançados da doença, garantido-lhes uma maior sobrevida.



## **2.DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Linfoma:**

Linfoma é uma neoplasia hematopoiética que se origina nas células linforreticulares. Usualmente inicia em tecido linfóide como linfonodos, fígado, baço e medula óssea; mas pode orginar-se em qualquer tecido do corpo (VAIL & YOUNG, 2007). O linfoma representa aproximadamente de 7 a 24% de todas as neoplasias caninas e 83% de todas neoplasias hematopoiéticas malignas (MOULTON & HARVEY, 1990). Cães podem desenvolver linfoma multicêntrico altamente agressivo, sendo comparado a Linfoma Não-Hodgkin em humanos. Linfomas do tipo Hodgkin são raros em caninos (MARCONATO et al., 2013).

O linfoma atinge principalmente cães de meia idade a idosos, com idade média entre 6 e 9 anos com predisposição racial para Scottish Terrier, Boxer, Bull Mastiff, Basset Hounds, São Bernardo e Airedales e menor risco para Dachshund e Spitz Alemão (PRIESTER et al., 1980; EDWARDS et al., 2003).

Existem quatro apresentações anatômicas de linfoma em cães: a multicêntrica, caracterizada por linfadenopatia generalizada com envolvimento de fígado, baço e/ou medula óssea; a mediastinal, caracterizada por linfadenopatia mediastínica com ou sem envolvimento da medula óssea; a alimentar, caracterizada por infiltração solitária, difusa ou multifocal no trato gastrointestinal com ou sem linfadenopatia intrabdominal; e por fim, a extranodal, que afeta qualquer órgão ou tecido (COUTO, 2009).

#### **2.1.1 Etiologia:**

Em cães, a etiologia do linfoma é considerada multifatorial, pois nenhum agente etiológico foi claramente identificado até o presente momento. Contudo, existem evidências de que haja um componente genético, visto que algumas raças caninas apresentam elevada prevalência para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia (COUTO, 2009).

Segundo Thomas (2003), podem ocorrer ganhos no material genético nos cromossomos 13 e 31, assim como perdas no cromossomo 14, considerando-as as aberrações genéticas mais comuns nos 25 cães com linfoma utilizados em uma pesquisa. Adicionado a isso, diferentes prevalências de subtipos imunofenotípicos de linfoma em diferentes raças indicam a probabilidade de hereditariedade (MODIANO, 2005).

Alterações em genes supressores de tumor, mudanças epigenéticas, sinais de transdução genética alterados, e modificações de vias de apoptose, são características comumente encontradas em linfomas humanos e também podem estar presentes em cães (YUNIS et al., 1984). Além disso, fatores ambientais, como o uso de herbicidas, produtos químicos e residência próxima a áreas industriais, já foram associados ao desenvolvimento de linfoma em cães e humanos (VAIL & YOUNG, 2007). A prolongada estimulação antigênica e imunossupressão crônica (como infecção por *Leishmania infantum*) tem um papel crucial na etiopatogenia de linfomas de células T (FERRICK, 1995; MANZILLO, 2008).

### 2.1.2 Patologia:

O linfoma maligno em cães pode ser distinguido em local anatômico, morfologia histológica e características imunofenotípicas. As formas anatômicas mais comuns do linfoma canino, em ordem decrescente de prevalência, são a multicêntrica, mediastinal, gastrointestinal e misto. As formas primárias extranodais, que podem ocorrer em qualquer local fora do sistema linfático, incluem os olhos, pele, sistema nervoso central, ossos, testículos, bexiga, coração e cavidade nasal (VAIL & YOUNG, 2007). O envolvimento renal em casos de linfoma multicêntrico é comum, entretanto pode ocorrer o desenvolvimento primário da neoplasia nos rins (BRESHEARS et al., 2011).

Linfoma multicêntrico é caracterizado pela presença de linfadenopatia generalizada e é a forma anatômica mais comumente encontrada, representando 80% dos casos em cães (PONCE, 2010). O aumento do linfonodo geralmente é indolor, elástico, discreto e pode iniciar nos linfonodos mandibulares ou pré-escapulares. A maioria dos animais acometidos por linfoma não apresenta sinais clínicos. Porém, aproximadamente 20 a 40% apresentam histórico de perda de peso, letargia, anorexia e febre (VAIL, 1996).

Segundo Ponce (2010), um estudo de 608 cães indicou a presença de 17,60% de casos de manifestação extranodal, dentre estes 12,34% de envolvimento de pele e, 5,26% de outras localizações como trato digestivo (1,48%), baço (1,8%), tonsilas (1,48%) e olhos (0,33%).

A forma alimentar é pouco comum, ocorrendo em 5 a 7% de todos os pacientes com linfoma. Esta forma é mais frequentemente diagnosticada em cães machos do que em fêmeas, similar às observações em seres humanos (VAIL & YOUNG, 2007; De NARDO et al., 2008). Cães com linfoma alimentar apresentam sinais gastrointestinais não específicos como vômito,

diarréia, perda de peso e má absorção. Linfonodos mesentéricos, baço e fígado podem estar envolvidos (De NARDO et al., 2008).

A forma mediastinal do linfoma ocorre em aproximadamente 5% dos casos. Essa forma é caracterizada pelo aumento de volume dos linfonodos craniomediastinais, timo ou ambos (VAIL & YOUNG, 2007). Segundo Couto (2009), cães com linfoma mediastinal são usualmente avaliados por apresentarem dispneia, tosse ou regurgitação. Tanto os sinais respiratórios quanto digestivos são causados pelo aumento dos linfonodos craniais, apesar da formação de efusão pleural maligna contribuir para a severidade dos sinais respiratórios. Alguns cães podem apresentar edema facial devido a síndrome da veia cava.

Linfoma cutâneo é relativamente incomum. Histopatologicamente pode ser dividido nas formas não-epiteliotrófica e epiteliotrófica. O linfoma epiteliotrófico é formado por células T, e é apresentado como a forma mais comum de linfoma cutâneo (SHIMAZAKI et al., 2010). A lesão característica de cães com essa forma de linfoma é uma massa circular, em relevo, eritematosa, em forma de rosca e dermoepidermal que contém pele sem alteração no centro (COUTO, 2009).

O linfoma hepatoesplênico é marcado pela ausência de linfadenopatia periférica e acometimento do fígado, baço e medula óssea com infiltrações malignas de linfócitos T. Biologicamente este linfoma é extremamente agressivo e pouco responsivo a terapia (VAIL & YOUNG, 2007). Adicionado a isto, cães com linfoma hepático e que apresentam neutrofilia, trombocitopenia, hipoalbuminemia ou hiperbilirrubinemia tem pior prognóstico (DANK et al., 2011). Linfoma esplênico caracteriza-se pela formação neoplásica das células B localizadas na zona marginal do baço, podendo ocorrer também em linfonodos ou tecido linfóide associado à mucosa (STEFANELLO et al., 2011).

Linfoma intravascular, originalmente denominado angioendoteliomatose, é uma neoplasia rara caracterizada pela proliferação de linfócitos nos vasos capilares, mas não nos grandes vasos. As manifestações clínicas são variáveis e os achados clinicopatológicos são inespecíficos, tais como anemia, trombocitopenia e leucopenia (LANE et al., 2012).

## **2.2 Sistemas de Classificação Histológica:**

Segundo De Nicola (2009) o linfoma é caracterizado por linfócitos neoplásicos que eventualmente substituem toda a população celular normal do tecido afetado, compreendendo um grupo variado de neoplasias linfóides. Cada uma dessas neoplasias representa uma

expansão clonal de um compartimento anatômico ou de um desenvolvimento de células linfóides no linfonodo, que possuem características morfológicas e imunofenotípicas diferentes.

Linfoma maligno é a neoplasia mais comum em caninos é tratada com quimioterapia e atinge cães de todas as raças e idade. As classificações desenvolvidas para linfoma Não-Hodgkin em humanos serviram como base para os patologistas veterinários classificarem o linfoma maligno canino (VALLI et al., 2010). Dessa forma, o sistema desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para classificação de doenças neoplásicas em tecidos linfóides em humanos foi adaptada para cães onde pode-se categorizar as neoplasias linfóides de acordo com a diferenciação celular e a indicação prognóstica (VALLI et al., 2013).

A Working Formulation (WF) e o sistema Kiel também foram adaptados para classificar o linfoma canino. A WF categoriza os tumores em difuso ou folicular e tipo celular, mas não inclui informações sobre a imunofenotipagem dos tumores. O sistema Kiel inclui classificações de arquitetura padrão, morfologia (centroblástica, centrocítica ou imunoblástica) e imunofenótipos (células B ou células T) das células tumorais. Em ambos os sistemas, os tumores podem ser graduados em baixa, intermediária e alta malignidade (VAIL & YOUNG, 2007). A maior parte dos linfomas de alta malignidade origina-se nas células do tipo B (FOURNEL et al., 1997). Entretanto, existe uma prevalência de imunofenótipos de acordo com a raça do animal (MONDIANO et al., 2005); Cocker Spaniels e Doberman Pinchers tem predisposição para desenvolver linfomas do tipo B celular, Boxers tendem a desenvolver linfomas do tipo T enquanto Golden Retrievers podem desenvolver igualmente linfomas do tipo B e T (VAIL & YOUNG, 2007). Para serem clinicamente utilizáveis, estes sistemas de classificação devem fornecer informações sobre resposta terapêutica, manutenção da remissão e sobrevida. Linfomas com alta malignidade demonstram ser mais responsivos a quimioterapia do que os de baixa malignidade. Cães acometidos por linfoma de baixa malignidade apresentam maior sobrevida sem um tratamento quimioterápico agressivo, enquanto cães com linfoma de células T tem pior resposta a quimioterapia e menor sobrevida do que cães linfoma de células B (VAIL et al., 1996; RUSLANDER et al., 1997; APPELBAUM et al., 1984; TESKE et al., 1994).

Apesar do diagnóstico morfológico de linfoma Não-Hodgkin ser usualmente/frequentemente realizado através de um exame citológico, a histologia é também útil para realizar a avaliação da estrutura nodular. Através do exame histológico pode-se verificar pequenas células que caracterizam linfoma de baixa malignidade, incluindo linfoma

folicular, linfoma de células T rico em células B e linfoma marginal (MARCONATO et al., 2013).

Os subtipos histopatológicos de linfoma indolente são descritos como linfoma de zona marginal, linfoma folicular e linfoma de células de manto (todos formados por células B), e linfoma da zona T que é formado por células de linhagem T. Adicionados a esses tipos somam-se linfoma linfocítico, linfoma linfoplasmacítico e linfoma de células T rico em células B, que também possuem progressão lenta e baixa malignidade (FLOOD-KNAPIK et al., 2012).

### **2.3 Manifestações Clínicas:**

Os sinais clínicos do linfoma ocorrem de acordo com a sua forma anatômica. Animais acometidos com a forma multicêntrica apresentam manifestações clínicas não específicas como perda de peso, anorexia e letargia (COUTO, 2009). Nesta forma, os animais apresentam linfadenopatia solitária ou generalizada, a qual pode ser acompanhada por hepatoesplenomegalia, envolvimento de medula óssea ou outros órgãos. Clinicamente, ocorre aumento de volume e rigidez dos linfonodos, que usualmente são indolores à palpação. Estes pacientes podem apresentar discrasias sanguíneas secundárias a mielofiose e a síndromes paraneoplásicas como anemia, trombocitopenia e neutropenia (VAIL & YOUNG, 2007).

Linfoma alimentar é menos comum em cães do que em gatos, representando apenas 7% de todos os linfomas caninos. Esse tipo pode estar associado a síndrome do linfoma multicêntrico mas, na maioria das vezes, está confinado ao trato gastrointestinal (RASSNICK et al., 2009). Cães com linfoma alimentar usualmente apresentam sinais clínicos como vômito, diarreia, anorexia e perda de peso que ocasionalmente, pode ser confundido com obstrução intestinal ou peritonite. Na avaliação física, pode-se perceber massas intrabdominais e espessamento das alças intestinais (COUTO, 2009) com envolvimento ou não de linfonodos mesentéricos, baço e fígado (VAIL & YOUNG, 2007). A anormalidade bioquímica mais comum presente no linfoma alimentar é a hipoalbuminemia (ocorre de 61 a 80% dos pacientes) e, particularmente, a hipercalcemia é incomum (RASSNICK et al., 2009). A maior parte dos linfomas alimentares são formados por células T (FRANK et al., 2007).

A forma mediastínica é caracterizada pelo alargamento das estruturas craniomediastinais, timo ou ambos. Os sinais clínicos presentes, estão associados à extensão da doença, podendo apresentar poliúria e polidipsia devido a hipercalcemia, uma síndrome

paraneoplásica relacionada a essa forma tumoral. Esses pacientes apresentam problemas respiratórios, causados pela presença de efusão pleural e/ou compressão das estruturas internas pela massa neoplásica, intolerância ao exercício e regurgitação. A compressão da veia cava cranial pelas estruturas tumorais pode causar edema facial e na região cervical ventral (VAIL & YOUNG, 2007). Ocasionalmente, cães com linfoma são avaliados pelos sinais clínicos secundários as síndromes paraneoplásicas (COUTO, 2009). Essas síndromes são alterações estruturais ou funcionais no organismo do paciente acometido por neoplasia, são um grupo diversificado e estão associadas com as ações não invasivas do tumor. Em muitas situações, a síndrome paraneoplásica trilha paralelamente com a malignidade do tumor e, com o tratamento e remissão da neoplasia, ela desaparece (BERGMAN, 2007). O mesmo autor ainda refere que, entre os sinais da síndrome estão hipercalcemia, hipergamaglobulinemia, anemia, eritrocitose, leucocitose neutrofílica, trombocitopenia, pênfigo e hipoglicemia.

Acredita-se que cães com linfoma que apresentem hipercalcemia possuam pior resposta a quimioterapia e pior sobrevida quando comparados a pacientes normocalcêmicos. Em tais casos, o fator humoral está envolvido, onde a célula neoplásica produz uma proteína semelhante ao paratormônio causando a liberação excessiva de cálcio na circulação (ROSENBERG et al., 1991). A primeira manifestação clínica de hipercalcemia está relacionada a função renal. A inabilidade de concentrar urina é observada devido ao decréscimo da ação do hormônio antidiurético no túbulo distal, o cálcio diminui o fluxo de sangue nos rins e a taxa de filtração glomerular devido a vasoconstrição. Sais de cálcio se depositam no parênquima renal causando azotemia renal e pré-renal. O epitélio urinário pode sofrer degeneração e, em casos graves, até mesmo necrose (BERGMAN, 2007).

#### **2.4 Diagnóstico e Estadiamento:**

O objetivo do estadiamento de cães com câncer é determinar a terapia adequada, monitorar a resposta a esta terapia, comunicar ao proprietário um prognóstico mais preciso e estratificar os pacientes para ensaios clínicos (FEINSTEIN et al., 1984). A realização do estadiamento permite determinar a distribuição e a extensão do câncer (FLORY et al., 2007). Para seleção da terapia mais adequada para cada caso, é necessário um diagnóstico específico de linfoma, tanto para animais quanto para humanos. (VALLI et al., 2013).

Testes para estadiamento estão mais sensíveis e podem detectar, previamente, alterações assintomáticas consequentemente conhecidas como “viés de tempo zero” (FEINSTEIN et al., 1984). A detecção da doença nesse estágio acarreta a maior tempo de sobrevida quando comparado a pacientes em que o diagnóstico foi simultâneo a doença clínica (FLORY et al., 2007).

#### 2.4.1 Estadiamento

O sistema de estádios do linfoma que foi desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e é utilizado nas últimas duas décadas para estadiamento do linfoma em cães e gatos (TABELA 1) (COUTO, 2009). Essa classificação foi desenvolvida segundo recomendações de um grupo internacional de patologistas, baseada em aspectos únicos de cada doença neoplásica para atualizar o sistema de classificação, sem refletir origens geográficas (HARRIS et al., 1994; VALLI et al., 2013).

Tabela 1: Classificação para Neoplasias em Tecidos Linfóides:

ESTÁGIO	CARACTERÍSTICAS
I	Envolvimento de apenas um linfonodo
II	Envolvimento de múltiplos linfonodos craniais ou caudais ao diafragma
III	Linfadenopatia generalizada
VI	Estágio III mais hepatomegalia ou esplenomegalia
V	Qualquer estágio acima mais acometimento de medula óssea ou envolvimento extranodal
<i>Substágio a</i>	Assintomático
<i>Substágio b</i>	Sintomático

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS)(1984)

#### 2.4.2 Exame Clínico

Em cães, apesar da avaliação física incluir a palpação dos linfonodos superficiais, assim como aqueles palpáveis pelo toque retal, Vail & Young afirmam que uma parte significativa de pacientes com linfoma possuem pólipos retais constituídos por agregados de linfócitos

neoplásicos. As mucosas oral e ocular devem ser inspecionadas para a identificação de palidez, icterícia, petéquias e úlceras, pois esses sinais podem indicar anemia ou trombocitopenia secundária a mielofitose, doença imunomediada ou evidência de falência de órgãos (rins e fígado). A palpação abdominal pode revelar organomegalia, afinamento das paredes intestinais ou linfadenopatia mesentérica enquanto a ausculta torácica é importante para a detecção de massa mediastínica, efusão pleural ou ambos (VAIL & YOUNG, 2007). Exames de fundo de olho podem revelar anormalidades como uveítes, hemorragia de retina e infiltração ocular, que acometem pelo menos um terço dos cães com linfoma (MASSA et al., 2002).

#### 2.4.3 Hemograma

É necessário realizar um hemograma, incluindo contagem plaquetária, para a avaliação de um cão com suspeita de linfoma uma vez que podem ocorrer anormalidades hematológicas em casos de linfoma multicêntrico (VAIL, 2010).

A anemia, usualmente normocítica normocrômica, é a anormalidade hematológica mais comumente encontrada, afetando mais de 30% dos cães com linfoma. (MADWELL & FELDMAN, 1980; HARPER, 2005). Apesar disso, anemia hemolítica também pode estar presente, assim como anemias regenerativas, concomitantes com hemólise ou hemorragias. Em situações em que há envolvimento da medula óssea, a anemia pode estar acompanhada de trombocitopenia e leucopenia. Nestes casos, há a indicação da contagem de reticulócitos, contagem total de plaquetas e testes de coagulação (VAIL & YOUNG, 2007). As causas da anemia são variadas, e incluem alterações no metabolismo, armazenamento e disponibilidade do ferro, redução da meia-vida das hemácias e, ocasionalmente, diminuição da resposta medular (MADEWELL & FELDMAN, 1980). A presença da anemia no momento do diagnóstico do linfoma está associada com menor tempo de sobrevida para cães (CÁPUA et al., 2011).

Coagulopatias são comumente associadas com tumores que causam trombocitopenia (BERGMAN, 2007). A incidência e a significância de trombose e/ou tromboembolismo em cães com linfoma ainda é desconhecida embora em humanos com linfoma Não-Hodgkin, essa alteração seja comum. Um estudo constatou a presença de hipercoagulabilidade e subsequente tromboembolismo em cães com linfoma multicêntrico, tanto no momento do diagnóstico quanto no tratamento com quimioterapia (KOL et al., 2013). Já um estudo realizado por



Eberle (2010), pode-se verificar que não ocorreram disfunções plaquetárias relevantes em cães em tratamento com protocolo quimioterápico incluindo vincristina, L-asparaginase e doxorubicina. Apesar disso, houve aumentos transitórios na contagem plaquetária destes animais.

No estudo realizado por Martini (2013), pacientes acometidos com linfomas do tipo B foram submetidos a exames laboratoriais para verificar se a presença de alterações na circulação periférica era indicativa de infiltração neoplásica na medula óssea. Foi constatado, em cães com linfoma grau V (estádio mais grave do linfoma), alterações na circulação periférica como linfocitose, leucocitose e trombocitopenia. Essa investigação é relevante pois a diferenciação entre linfoma multicêntrico com envolvimento de medula óssea e a leucemia linfoblástica possuem prognósticos são inteiramente diferentes (VAIL & YOUNG, 2007).

#### 2.4.4 Bioquímica clínica

As anormalidades bioquímicas em cães com linfoma geralmente estão ligadas a apresentação anatômica (VAIL, 2010). A hipoproteïnemia é observada frequentemente em cães com linfoma alimentar enquanto que elevações nas globulinas séricas, usualmente monoclonais, estão relacionadas ao linfoma do tipo B. Se o paciente tem o valor de proteína total elevado ou evidência do aumento nas globulinas no perfil bioquímico, deve ser realizada uma avaliação através da eletroforese para confirmação da hiperglobulinemia. Gamopatias monoclonais tem sido descritas em 6% de cães com linfoma (MACEWEN et al., 1977). Elevações na atividade de enzimas hepáticas ou nas concentrações de bilirrubina pode indicar a ocorrência de infiltração neoplásica no parênquima hepático (VAIL & YOUNG, 2007).

A presença de hipercalcemia também marca a resposta do paciente à terapia, bem como a elevação dos valores de uréia e creatinina séricas também podem ocorrer de forma secundária à infiltração dos rins pela neoplasia, nefrose hipercalcêmica, ou azotemia pré-renal devido à desidratação. Aproximadamente 15% dos cães com linfoma apresentam hipercalcemia (30% a 40% desses pacientes apresentam envolvimento mediastinal e 35% são linfoma de célula T) (MADEWELL, 1986; ROSENBERG et al., 1991; FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Em casos de hipercalcemia idiopática, o linfoma deve ser colocado como um dos possíveis diagnósticos diferenciais (VAIL & YOUNG, 2007). Em cães existe a correlação entre linfomas de células T (tipicamente com envolvimento mediastínico) e hipercalcemia

(MADEWELL, 1986). Já em felinos, em um estudo Gabor et al.(2006), não verificaram a correlação entre o linfoma T celular e hipercalcemia.

#### 2.4.5 Avaliação Citológica

A avaliação morfológica do tecido e das células que abrangem o tumor é essencial para o diagnóstico do linfoma . Na maior parte dos casos, o diagnóstico de linfoma pode ser determinado através de biópsia aspirativa por agulha fina (BAAF) dos linfonodos ou de outros tecidos afetados (VAIL & YOUNG, 2007). Para a coleta de material, deve-se evitar linfonodos de áreas suscetíveis a inflamações, como os linfonodos mandibulares, e dar preferência a linfonodos pré-escapulares e poplíteos. Durante a coleta e confecção das lâminas, cuidados são necessários na aspiração e na realização dos esfregaços uma vez que as células linfóides são frágeis. Os critérios de classificação morfológicas são baseados no tamanho celular (pequeno, médio, grande), forma e distribuição do núcleo; densidade da cromatina; número, tamanho e distribuição dos nucléolos; volume e basofilia do citoplasma também são considerados (SÖZMEN et al., 2005). Na interpretação citológica, deve-se considerar que hiperplasias muito acentuadas que contenham muitas células podem ser difíceis de diferenciar de linfoma enquanto linfomas de células pequenas podem exibir poucas características citológicas que evidenciem malignidade (VAIL & YOUNG, 2007).

O linfoma maligno é caracterizado por linfócitos que eventualmente substituem toda a população celular normal (VALLI, 1989), mas nem todos os linfomas são iguais; eles são um grupo variado de neoplasias linfóides. Cada uma dessas neoplasias representa uma expansão clonal de um compartimento anatômico ou de desenvolvimento de células linfóides no linfonodo, que possuem características morfológicas e imunofenotípicas diferentes (VALLI, 2002; WILKERSON et al., 2005). Quando as células imaturas compõem mais de 50% da população celular, o diagnóstico de linfoma maligno pode ser feito com segurança, mas uma quantidade reduzida dessas células podem estar presentes no início do processo, dificultando o diagnóstico pelo exame citológico isolado (MESSICK, 2009). Sugere-se que, técnicas auxiliares, incluindo imunofenotipagem do material dos esfregaços e de cortes histológicos e imunofenotipagem quantitativa utilizando citometria de fluxo também podem ser usadas para confirmar o diagnóstico (MESSICK, 2009).

#### 2.4.6 Avaliação Histológica

Para avaliação histológica, deve-se remover um linfonodo inteiro, incluindo a cápsula, e fixá-lo em formalina 10%. Um corte deste material é examinado para determinar se há população homogênea de células neoplásicas obliterando a arquitetura normal do linfonodo. Uma mistura de elementos malignos e reativos pode limitar a acurácia, tanto do diagnóstico citológico de linfoma, como do histológico (MESSICK, 2009).

Em linfomas alimentares é indicado a biópsia intestinal através de laparotomia onde deve-se obter uma amostra adequada para o diagnóstico diferencial de enteríte linfocítica. Para linfomas cutâneos, é realizado biópsia do tipo *punch*, assim, a amostra representativa e não contaminada pode ser obtida (VAIL & YOUNG, 2007).

#### 2.4.7 Imunohistoquímica

Imunohistoquímica é um método em que o antisoro é conjugado à uma enzima cujo o substrato é adicionado na presença de um cromógeno nas cores marrom, azul ou vermelho. Este é depositado na porção que a célula alvo ocupa no tecido (DAY, 2011). A quantidade de tecido varia de acordo com o tipo da amostra, em modelos pequenos todos os campos são examinados para observação de tamanho celular e mitoses. Para amostras maiores (fatia ou todo o nódulo), o tecido inteiro é examinado para escolha das partes com melhor fixação e menor interferência de artefatos, onde será possível a melhor observação do tamanho celular e mitoses. O tecido é embebido em parafina e fixado em formalina, são confeccionadas lâminas para determinar a fenotipagem do material de interesse (FLOOD-KNAPIK et al., 2012).

#### 2.4.8 Imunofenotipagem

Imunofenotipagem é utilizada para determinar o tipo celular que constitui o linfoma, contribuindo para o diagnóstico da neoplasia. Segundo Vail e Young (2007), a literatura veterinária descreve que 60 a 80% dos casos de linfoma são do tipo celular B, 10 a 30% do tipo celular T, 22% mistos e 5% nulos (não são imunorreativas para ambos os tipos, B e T). O desenvolvimento de testes para detecção de anticorpos monoclonais específicos para

linfócitos caninos tornou a imunofenotipagem de tumores rotineira, e está disponível em muitos laboratórios comerciais.

A imunofenotipagem dos linfócitos é determinada pela expressão de moléculas específicas pelo tipo celular B e tipo celular T. Apesar das células tumorais possuírem características morfológicas que tipificam um imunofenótipo em particular, exceções podem ocorrer, e a morfologia não pode ser a única determinante do tipo de linfócito. Para a determinação precisa da imunofenotipagem, anticorpos contra marcadores de linfócitos são aplicados a tecidos seccionados, espécimes citológicos ou células em meio fluido (citometria de fluxo) (ABBAS, 2007) .

#### 2.4.9 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a avaliação de um largo número de células simultaneamente, registrando os diferentes fenótipos para cada célula que se tornou a ferramenta ideal para a determinação da imunofenotipagem de linfomas em cães (JOETZKE et al., 2012) pois oferece grande vantagem na eficiência da imunofenotipagem acoplada a um alto grau de sensibilidade. É possível avaliar uma extensa variedade de marcadores como também a expressão de vários antígenos, simultaneamente, numa mesma população de células. Este alto nível de sensibilidade permite a detecção de neoplasias raras (baseado em suas características específicas), coexistindo com uma subpopulação benigna (NGUYEN, 2007).

A citometria do sangue, linfonodos e medula óssea promovem a avaliação e o prognóstico de cães com linfoma (PAPAKONSTANTINO et al., 2013). Estudos com cães acometidos por linfoma relatam que pacientes com fenótipo celular T possuem tempo menor de recidiva e menor tempo de sobrevida do que pacientes com fenótipo celular B (RUSLAMDER et al., 1997; DOBSON et al., 2001). Porém, a correlação de imunofenotipagem e prognóstico não é perfeita, e exceções já foram relatadas (PAPAKONSTANTINO et al., 2013).

Para execução da técnica, é utilizado um aparelho para avaliação da emissão de fluorescência das células. Alguns aparelhos são capazes de separar fisicamente as células de acordo com as características citométricas (ROITT et al., 1999; NAKAGE et al., 2005). As células da amostra em suspensão são marcadas com reagentes fluorescentes específicos para detecção de moléculas de superfície e são introduzidas numa câmara de fluxo vibratória. O

fluxo de células que atravessa a câmara é envolvido por uma solução tampão, sendo que 500 a 4000 células ou partículas passam em fila simples por segundo e por meio do sensor eletrônico. O fluxo é iluminado por laser de argônio (azul), que tem uma energia de luz incidente de 488 nm. Cada célula é avaliada com relação ao tamanho (dispersor de luz anterior), granulosidade (dispersor 90°) e intensidade de fluorescência para detecção de antígenos de superfície diferente (imunofenotipagem). A vibração do fluxo celular provoca o rompimento em gotículas que podem ser carregadas eletricamente e, a partir daí, dirigidas para placas de deflexão eletromagnética para serem coletadas em diferentes populações celulares de acordo com os parâmetros medidos, sob controle de um computador (ROITT et al., 1999; NAKAGE et al., 2005).

Os anticorpos monoclonais são os reagentes de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade. O termo CD (*Cluster Designation* – denominação de agrupamento) é utilizada para denominar os anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios de todo o mundo contra antígenos leucocitários humanos. A imunofenotipagem consiste no isolamento de populações de células distintas com diferentes antígenos de superfície marcados com anticorpos fluorescentes específicos (RIOTT, 1999).

Ainda segundo Nakage (2005), a imunofenotipagem de linfócitos é uma aplicação comum da citometria de fluxo em hematologia de seres humanos, e tem sido utilizada para estudar os efeitos de doenças e modificações do sistema imune nas populações de linfócitos. Em relação aos anticorpos monoclonais que identificam os antígenos leucocitários caninos, estes foram definidos durante o CLAW (First Canine Leukocyte Antigen Workshop). Definiu-se que o CD5 como principal marcador de superfície para todos os linfócitos T de cães, o CD4 como marcador de linfócitos T auxiliares e o CD8 como marcador de linfócitos T citotóxicos. Os principais marcadores utilizados para detecção de linfócitos B são o CD21 e CD79a.

Adicionalmente, a citometria de fluxo pode ser utilizada para detectar baixos níveis de infiltração neoplásica na medula óssea, confirmando a avaliação morfológica de esfregaços medulares. O valor de 3% de infiltrado neoplásico na medula óssea é proposto como ponto de corte para identificar cães com prognóstico desfavorável, caracterizando o Grau V da doença (MARCONATO, 2013).

## **2.5 Coleta e Avaliação de Medula Óssea**

A medula óssea é o maior órgão hematopoiético do corpo. Nos animais jovens, o tecido hematopoiético é encontrado tanto em ossos chatos quanto em ossos longos e com o cessar do crescimento, a atividade no centro dos ossos longos regride. Nos adultos, a maior parte da hematopoiese ativa ocorre nos ossos chatos e nas extremidades dos ossos longos. A área central dos ossos longos contém principalmente gordura, com muito pouco tecido hematopoiético ativo (GRINDEM et al., 2009).

Infiltração na medula óssea por células neoplásicas não é um processo acidental mas sim influenciado tanto pelas próprias células neoplásicas quanto pelo microambiente do órgão. É importante a realização do mielograma para o estadiamento de cães com câncer para determinar a melhor terapia, monitorar a resposta ao tratamento, comunicar um prognóstico mais preciso aos proprietários e avaliar o tempo de sobrevida (AUBRY et al., 2012)

### 2.5.1 Biópsia Aspirativa

Segundo Harvey (2012), os sítios ideais para a colheita de material de medula óssea são: a crista íliaca, a parte proximal do úmero, a parte proximal do fêmur, e o externo. A agulha usada para aspirar a medula óssea deve ter um mandril, que permanecerá fixado na cavidade medular para evitar obstrução do lúmen com osso cortical. Uma agulha ideal deve ter entre 16 e 18 mm de calibre e de 1 a 1,5 polegadas de comprimento. A qualidade do aspirado citológico como auxílio ao diagnóstico dependerá de uma coleta satisfatória e de um esfregaço com alta qualidade. Na maioria dos casos, só é necessário anestesia local. Entretanto, a tranquilização é frequentemente utilizada em pacientes que resistem ao posicionamento pela contenção manual. Para a coleta de material, o local da punção deve ser tricotomizado e limpo com sabão antisséptico (HARVEY, 2012).

Previamente, uma pequena incisão na pele no sítio da coleta é realizada para facilitar a passagem da agulha pela epiderme. Após, realiza-se movimentos nos sentidos horário e anti-horário para a perfuração do osso até a cavidade medular. Depois que a agulha está firmemente aderida, retira-se o mandril e acopla-se uma seringa de 10 ou 20 mL, contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (EDTA – K<sub>2</sub>), e se realiza uma intensa pressão negativa com o êmbolo da seringa para a obtenção do material necessário. Após a coleta, mistura-se a amostra ao anticoagulante e coloca-se numa placa de petry. As partículas da medula óssea aparecem como pontos brancos (espículas) e estão embebidas em sangue presente no material apirado, estas espículas são coletadas da placa com o auxílio de

uma pipeta ou capilares de microhematócrito para a confecção dos esfregaços. As lâminas confeccionadas são coradas com corantes tipo Romanowsky como Wright, Giemsa ou uma combinação dos dois (HARVEY, 2012).

### 2.5.2 Biópsia de Fragmento por Agulha

As biópsias de fragmento por agulha podem ser feitas com as agulhas para biópsia de medula óssea modelo Jamshidi para neonatos (cães pequenos) ou pediátricas (cães grandes). O procedimento é o mesmo descrito para a biópsia aspirativa, exceto depois do ponto em que a agulha penetra no córtex do osso e entra na cavidade medular, quando o mandril deve ser removido, a agulha avança em movimento rotatório. Assim secciona-se e coleta-se um fragmento da medula óssea. A agulha é removida do paciente e empurra-se o fragmento em uma lâmina com o mandril pela ponta em que ele se encaixa ou pela ponta do bisel. Utilizando-se a ponta da agulha, o fragmento de medula é gentilmente rolado ao longo da lâmina. Após preparar uma ou duas lâminas desta forma, o fragmento de medula é colocado em recipiente com formalina neutra tamponada a 10% para posterior processamento e avaliação histológica (GRINDEM, 2009).

### 2.5.3 Avaliação da Medula

Esfregaços e biópsias de fragmento devem ser revisados com objetivas de baixo aumento para verificar a celularidade e determinar se o número de megacariócitos é adequado. Uma medula normal é heterogênea. Se alguma sessão do esfregaço ou da biópsia estiver homogênea é provável que esteja presente uma população anormal de células. Infiltrados neoplásicos são de mais fácil percepção (HARVEY, 2012).

As amostras de aspirado com pouca ou nenhuma espícula e pouca gordura sugerem medula fibrótica já amostras de aspirado com poucas espículas e muita gordura sugerem medula hipoplásica gordurosa. Amostras de fragmento que fornecem uma medula vermelhocinzentada sugerem medula normo ou hiper celular e uma medula branca a amarelada sugere medula hipoplásica ou fibrótica (GRINDEM et al., 2009).

A celularidade da medula óssea é estimada através da análise de proporção de células contra gordura presente em espículas. A celularidade normal varia entre 25 a 75% de células, dependendo da idade do animal onde partículas compostas de 75% de células ou mais a

medula é interpretada como hiper celular, e partículas compostas por mais de 75% de gordura é interpretada como hipocelular (HARVEY, 2012).

A neoplasia linfóide geralmente infiltra a medula óssea. Entretanto, cães e gatos podem apresentar entre 15 e 20% de linfócitos, respectivamente, embora seja incomum. O aumento de linfócitos pequenos pode ocasionalmente ocorrer em processos reativos, frequentemente associados com o aumento de plasmócitos na medula óssea (GRINDEM et al., 2009). Quando 30% ou mais das células nucleadas na medula são definitivamente reconhecidas como linfoblastos, é indicativo de neoplasia linfóide. Os corpúsculos linfoglandulares (fragmentos citoplasmáticos basofílicos) são associados com linfoma na medula óssea. No início, a infiltração é focal ou multifocal e a identificação da população neoplásica de linfócitos dispersa pode passar despercebida (GRINDEM et al., 2009).

Infiltrações focais devem ser diferenciadas de folículos linfóides benignos. Estes possuem borda bem definida e são formados de linfócitos pequenos e maduros. Agregados neoplásicos geralmente são grandes, pobres na definição das bordas e apresentam células grandes e imaturas (HARVEY, 2012).

Em um estudo realizado por Aubry (2012), foi comparada a presença de células neoplásicas na circulação com o envolvimento da medula óssea no linfoma. Apesar de alguns pacientes não apresentarem células anormais na circulação periférica, foi indicado o envolvimento da medula óssea, ratificando a importância do exame e que são necessários mais estudos em torno da avaliação de cães com linfoma.

Metástases da medula óssea para o tecido linfóide e, do tecido linfóide para a medula, são comuns. Consequentemente, é difícil a diferenciação entre uma leucemia verdadeira (neoplasia linfóide com origem na medula óssea) e animais com linfoma no grau V (HARVEY, 2012). Linfócitos neoplásicos e/ou linfoblastos podem ser confundidos com outros blastos na medula óssea e talvez sejam necessárias técnicas especiais para a identificação definitiva (citometria de fluxo ou coloração imunohistoquímica) (GRINDEM, 2009).

## **2.6 Tratamento**

O principal tratamento para linfoma é quimioterapia antineoplásica. Dos diferentes protocolos disponíveis, as respostas variam de 65 a 96% e a duração da primeira remissão é de 6 a 9 meses. A segunda remissão é geralmente mais curta que a primeira para a maioria dos



cães que foram submetidos a protocolos quimioterápicos, e a taxa de sobrevivência varia de 10 a 12 meses (CÁPUA et al., 2009).

### 2.6.1 Quimioterapia

Existem quase o mesmo número de protocolos quimioterápicos quanto existem oncologistas veterinários, isso reflete muitas vezes na inabilidade de atingir a cura na maioria dos casos (VAIL, 2010). A combinação mais completa é a modificação do protocolo CHOP de humanos pra cães. O protocolo CHOP representa as combinações de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona (TABELA 2). A resposta ao tratamento varia, dependendo do estadiamento e, conseqüentemente, de um prognóstico mais favorável (VAIL, 2010).

Tabela 2: Protocolo CHOP para tratamento de cães com linfoma.

<b>SEMANA</b>	<b>FÁRMACODOSE/VIA</b>
1	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV Prednisona 2 mg/kg VO SID
2	Ciclofosfamida 250 mg/m <sup>2</sup> IV Prednisona 1,5 mg/kg VO SID
3	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV Prednisona 1 mg/kg VO SID
4	Doxorrubicina 30 mg/m <sup>2</sup> IV Prednisona 0,5 mg/kg VO SID
6	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
7	Ciclofosfamida 250 mg/m <sup>2</sup> IV
8	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
9	Doxorrubicina 30 mg/m <sup>2</sup> IV
11	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
12	Ciclofosfamida 250 mg/m <sup>2</sup> IV
13	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
14	Doxorrubicina 30 mg/m <sup>2</sup> IV
16	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
17	Ciclofosfamida 250 mg/m <sup>2</sup> IV

18	Vincristina 0,7 mg/m <sup>2</sup> IV
19	Doxorrubicina 30 mg/m <sup>2</sup> IV

---

VAIL & YOUNG (2007)

O tratamento quimioterápico dos cães com linfoma, de uma maneira geral, é dividido em diversas fases ou estratégias: indução da remissão, manutenção, e reindução da remissão ou resgate. Imediatamente após o diagnóstico, um protocolo quimioterápico de muitos agentes, relativamente agressivos, é usado para induzir a remissão. Durante esta fase, que dura de 6 a 8 semanas, os animais são avaliados semanalmente pelo veterinário e são submetidos a exames físico e laboratorial de rotina (COUTO, 2009). Os cães que respondem a quimioterapia e atingem a remissão completa (desaparecimento das massas neoplásicas) se tornam livres de sinais clínicos e adquirem uma boa qualidade de vida (VAIL & YOUNG, 2007).

Protocolos quimioterápicos baseados em doxorrubicina contendo ciclofosfamida, vincristina e predinisona (CHOP), com ou sem L-asparginase são os mais recomendados como primeira linha de terapia para cães com linfoma Não-Hodgkin, independente da imunofenotipagem da neoplasia. O imunofenótipo B é mais comum nos casos de linfoma do que o imunofenótipo T, que representa de 10 a 38% dos casos. O fenótipo T está associado a piores prognósticos quando comparado ao fenótipo B (REBHUN et al., 2010).

No estudo realizado por Rebhun (2010), foram selecionados 24 cães com diagnóstico confirmado de linfoma com imunofenótipo T, sem tratamento anterior, para serem submetidos ao protocolo CHOP. Os cães responderam rapidamente ao tratamento, mas obtiveram recidiva em um curto espaço de tempo (104 dias).

### 2.6.2 Radioterapia

O papel da radioterapia no tratamento do linfoma em cães ainda está sob investigação. O uso de irradiação de corpo inteiro, sem transplante de medula óssea, mostrou-se pobre nos resultados (MACEWEN, 1977; VAIL, 1990; GRIMDEM, 1994; MADEWEL, 1986). No entanto, a terapia de radiação pode ser indicada em alguns casos: neoplasia no grau I ou II; diminuição da neoplasia local (linfadenopatia mandibular, linfoma retal) e irradiação de corpo inteiro combinado com transplante de medula óssea (MADEWEL, 1986; GRIMDEM, 1994). Os resultados sugerem que a radioterapia aplicada, quer seja depois do tratamento

quimioterápico ou inserido entre as sessões, quando os cães estão em remissão parcial ou total, é seguro e deve ser extensivamente investigado para determinar se o ganho terapêutico é significativo (VAIL & YOUNG, 2007).

### 2.6.3 Transplante de Medula Óssea

Para desenvolver o transplante de células tronco para humanos, o cão foi um valioso modelo. Estes estudos em animais foram essenciais para o desenvolvimento de novos tratamentos e novas técnicas para doenças análogas em humanos. Estudos pré-clínicos em cães investigaram regimes de condicionamento para quimioterapia e irradiação total contribuíram para o sucesso de transplante de células tronco em pacientes humanos. Só nos anos 80 foram relatados em medicina veterinária os primeiros transplantes de medula óssea como intervenção terapêutica em doenças malignas, e a maioria deles limitados a experimentos alogênicos (CÁPUA et al., 2009).

O transplante de medula óssea é feito através de células tronco pluripotentes, mais comumente obtidas pelo inóculo de células da medula óssea coletadas por aspiração. Depois do transplante, as células tronco hematopoiéticas repopulam a medula óssea e se diferenciam em linhagens hematopoiéticas (ABBAS, 2007).

### 2.6.4 Tipos de Transplante

O transplante de células tronco hematopoiéticas pode ser autólogo ou alogênico. Os doadores devem ter relação genética e antigênica com os receptores. Transplantes autólogos são derivados de irmãos gêmeos monozigóticos, animais do mesmo genótipo ou de células tronco hematopoiéticas autólogo. Em transplantes alogênicos as células tronco são intraespecíficas e o genótipo é diferente do receptor (WALTON, 2010).

#### 2.6.4.1 Transplante Alogênico

Transplantes alogênicos são subcategorizados de acordo com a histocompatibilidade e com a relação com o receptor. A terapia imunossupressora requerida para o transplante alogênico objetiva suprimir a resposta imune tanto do doador quanto do receptor, para

prevenir a doença “enxerto versus hospedeiro” (DEVH). A DEVH é um dos impedimentos mais significantes para a realização desse procedimento e resulta em um ataque imune das células T do doador contra as células do hospedeiro. Por muitos anos a DEVH é associada ao transplante alogênico impedindo sua aplicação clínica, mas os avanços na modulação imunológica, e seleção dos doadores tem diminuído substancialmente muitos dos efeitos adversos. No entanto, mais estudos devem ser realizados sobre a DEVH, visando eliminar células leucêmicas. o transplante alogênico é o mais eficaz que o autólogo na eliminação do tumor. Este fenômeno é referido como “enxerto versus leucemia” (WALTON, 2010).

#### 2.6.4.2 Transplante Autólogo

Com o transplante autólogo não há incompatibilidade, descartando a necessidade de supressão imune pós-transplante e, portanto, não havendo risco de DEVH e de falha no enxerto. Por outro lado, o transplante autólogo não oferece a vantagem do “enxerto versus leucemia”. O transplante autólogo é utilizado principalmente como auxílio na terapia de doenças hematopoiéticas malignas. O mecanismo de ação é como uma redefinição do sistema imune após a ablação do sistema hematolinfóide (WALTON, 2010). O transplante autólogo envolve a remoção temporária das células tronco hematopoiéticas do paciente, seguido por mielossupressão induzida por quimioterapia e radioterapia e a reinfusão das células tronco (GASPER & THRALL, 2000) .

Segundo Escobar (2011), cães com linfoma submetidos a transplante autólogo de medula óssea após radioterapia, obtiveram uma queda na contagem de células na circulação periférica nos primeiros dias seguidos do procedimento. O acompanhamento dos pacientes comprovou a recuperação da medula e o aumento dos parâmetros celulares na circulação sanguínea periférica em poucos dias, atestando o sucesso do transplante.

#### 2.6.5 Purificação das Células Tronco Hematopoiéticas

Historicamente, medula é usada pra reconstituir medula. Em adição as células tronco, a medula contem células que podem afetar o enxerto e a imunidade de tumores, como por exemplo linfócitos T, células do estroma mesenquimal e células progenitoras mielóides. Enxertos de medula podem ser modificados diminuindo as proporções dos componentes deletérios e aumentando as células do estroma mesenquimal, as células progenitoras

mielóides e as células CD34+ , que podem melhorar o potencial do enxerto e da reconstituição medular (REYSNER, 2000).

Apesar disso, o uso de populações puras de células CD34+ podem apresentar duas desvantagens: uma demorada reconstituição imunológica (como resultado da baixa porcentagem de células T do doador e da condição de depleção de células T induzida ao receptor) e uma alta probabilidade de recidiva leucêmica (devido a ausência de “enxerto versus leucemia”). Esta demora na reestruturação do sistema imune expõe o receptor a um sério risco de infecções. A modulação de células T para o transplante é um desafio constante, considerando que existem poucas células T na medula, a rejeição do enxerto é muito alta devido ao papel destas células do doador na conformação do enxerto (WALTON,2010).

Ainda segundo Walton (2010), a justificativa para uso de purificação de populações de células tronco é o enriquecimento do enxerto e a prevenção da rejeição. O enxerto pobre em células T pode prevenir a DEVH, podendo ser invertido pelo aumento na dose de células CD34+.

A coleta de medula óssea é usualmente obtida via aspiração. Entretanto, as células da medula óssea podem ser contaminadas por células da circulação periférica durante o método de aspiração. Estudos envolvendo macacos relataram a contaminação da amostra em mais de 20% de células T periféricas (KUSHIDA et al., 2000). A presença destas células contaminantes pode aumentar os riscos de DEVH, resultando na necessidade de um tratamento imunossupressivo (BLAZAR et al., 1996; KATAOKA et al., 2001; ICHIKI et al., 2006).

#### 2.6.6 Técnica de Transplante

Segundo o trabalho de Cápua (2009), que apresenta o primeiro relato de transplante de medula óssea no Brasil, o animal deve ser submetido a um protocolo quimioterápico (no caso, 9 sessões do protocolo CHOP), estar em remissão clínico-hematológica completa e sua medula deve estar livre de infiltração neoplásica. Nesse relato, após as sessões de quimioterapia, foram realizadas as coletas de medula, de diferentes locais, através da técnica de biópsia aspirativa. Foram coletados, simultaneamente, 10 mL em cada crista ilíaca e colocados em um frasco de vidro contendo heparina sódica, sendo homogeneizado seguidamente e filtrado ao final para retirar qualquer coágulo ou fragmento ósseo. Em

seguida, o conteúdo foi transferido para uma bolsa de transfusão sem anticoagulante e a bolsa mantida em criopreservação.

Após a colheita iniciou-se, em três fases, o processamento da bolsa contendo o aspirado de medula. Em primeiro lugar, realizou-se o esgotamento dos eritrócitos, obtido pela adição de amido hidroxietil, acelerando o processo de sedimentação das células vermelhas. O segundo passo consistiu de depleção de plasma, onde a bolsa de medula óssea foi centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm e 20 °C, seguido da transferência do plasma para a outra bolsa de sangue. A terceira fase foi realizada em uma câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, onde todo o conteúdo da bolsa de sangue foi aspirado com uma seringa de 60 mL e transferido para uma bolsa adequada para congelamento. Uma mistura foi feita na bolsa vazia consistindo de 40% de plasma autólogo, 40% RPMI (RPMI 1640 meio - Sigma), e 20% de DMSO (dimetilsulfóxido). Este procedimento foi realizado em uma cuba com gelo para evitar a reação exotérmica causada pelo DMSO o qual poderia danificar as células. A bolsa com a mistura foi homogeneizada e o conteúdo dela aspirado com uma seringa de 60 mL seguido da transferência para uma bolsa de congelamento (CÁPUA et al., 2009).

O mesmo autor refere que a bolsa deve ser descongelada em banho maria a 37°C para ser reinfundida no paciente. O animal receptor, recebe suporte fluido de 0,9% NaCl 30 minutos antes da infusão e recebe mais duas horas de fluido após o transplante. Os sinais vitais devem ser monitorados durante o procedimento. O animal submetido ao tratamento foi observado até o 360º dia após o transplante e apresentou remissão total do linfoma.

Segundo Sato (2011), um estudo comparativo entre coleta de medula por aspiração e coleta de medula realizada através do método de perfusão demonstrou, que este último é satisfatório para o sucesso de um transplante. Este método baseia-se em perfundir solução salina (0,9% NaCl) por um orifício na parte proximal do osso de eleição (úmero ou fêmur), e retirar o material com outra seringa (contendo o anticoagulante heparina) fixada na porção distal do osso. O estudo indica que a técnica permite a obtenção de maior quantidade de células progenitoras no material coletado. Esta técnica permite a menor contaminação da amostra com células T da circulação periférica, diminuindo a possibilidade de rejeição após o transplante.

Um problema severo associado com o transplante de medula óssea é a falha na qualidade do enxerto. A morte de animais, seguidos de complicações do transplante e dificuldades na recuperação das células da medula óssea, pode variar de 15 a 45% dos pacientes (APPELBAUM et al., 1984). O método de perfusão pode prevenir este tipo de

complicação, pois possui quantidade de células progenitoras maior do que em amostras coletadas por aspiração (SATO et al., 2011).

## 2.7 Remissão e Prognóstico

Eventualmente, muitos cães que atingem a remissão apresentam recidivas do linfoma. Isso geralmente representa a emergência de clones tumorais que são mais resistentes à quimioterapia que o tumor original. Outras causas para recidivas depois da quimioterapia incluem dosagem e frequência inadequadas da administração do quimioterápico e falhas em atingir a concentração do fármaco em certos sítios, como no sistema nervoso central. No primeiro período de recorrência, a reindução pode ser realizada com o mesmo protocolo quimioterápico utilizado com sucesso na primeira indução. Uma taxa de reindução de aproximadamente 90% pode ser esperada nos cães que completaram protocolos baseados no CHOP. Se a reindução falhar ou o animal não responder bem ao primeiro protocolo, podem-se usar agentes de resgate. Estas drogas não são utilizadas rotineiramente nos protocolos padrões, sendo reservadas nos casos de resistência. Os protocolos de resgate mais comuns incluem actinomicina D, mitoxantrona, doxorubicina (se não fizer parte do protocolo inicial), dacarbazina, lomustina, e L-asparginase. De maneira geral, as taxas de resposta ao protocolo de resgate variam de 40 a 50%, mas estas respostas normalmente não são duráveis (VAIL & YOUNG, 2007).

O prognóstico para cães com linfoma varia e depende de vários fatores, como a localização da doença; a extensão da doença (o estadiamento clínico); a presença ou ausência de sinais clínicos (subestágio); o grau histológico; a imunofenotipagem (células B ou T, ou ambos, ou nulo); exposição à quimioterapia prévia ou corticosteróides; processos de morte celular alterados (apoptose); a taxa de proliferação do tumor; a presença de problemas médicos concomitantes ou síndromes paraneoplásicas (hipercalcemia, perda de peso e insuficiência hepática); e possivelmente o gênero do animal acometido. Embora o linfoma canino seja raramente curável (menos de 10% dos casos), uma boa resposta e qualidade de vida durante os períodos de remissão são atingidos (VAIL & YOUNG, 2007).

O grau histológico de malignidade parece ser o indicador prognóstico mais confiável, com tumores de alto grau obtendo consistentemente respostas mais pobres. Tumores de alto grau, pela classificação de Kiel, têm capacidade reduzida de resposta completa e intervalos livres de doença mais curtos; tumores de alto grau pela classificação da Working Formulation

obtiveram tempo de sobrevida mais curto. O fenótipo de célula T também é importante e demonstra prognóstico pobre, apesar do grau histológico (MORRIS & DOBSON, 2007). Os animais com grau I ou II respondem melhor à terapia e, conseqüentemente, apresentam um prognóstico mais favorável que os com doença mais avançada (VAIL & YOUNG, 2007).



## 4 CONCLUSÃO

Ao longo do trabalho foram abordados a fisiopatologia do linfoma, meios de diagnóstico e os métodos de tratamento, inclusive discutindo sobre metodologias avançadas de tratamento na medicina veterinária. O linfoma é uma das neoplasias mais comuns vistas na clínica veterinária e por esse motivo, destaca-se a importância da imunofenotipagem e o estadiamento do linfoma para apartir destas informações, construir o tratamento correto e mais efetivo.

A coleta de medula óssea mostra-se como ferramenta fundamental no estadiamento e no reconhecimento da neoplasia em pacientes afetados sendo de extrema importância que a técnica de coleta seja precisa e acarretando em menos desconforto ao paciente. A citologia e a histologia são passos muito importantes para a realização do diagnóstico e instituição do prognóstico. Elas servem como testes de triagem para a aplicação da imunohistoquímica e da citometria de fluxo que determinam o fenótipo e o grau de malignidade do linfoma.

O transplante de medula óssea é um grande avanço no tratamento dessa neoplasia. Apesar de já ser conhecido na medicina veterinária desde a década de 80, ele tem muito a ser desenvolvido e explorado, pois é pouco realizado no Brasil. para que possa ser difundida no país é necessária a capacitação através e cursos e integrações profissionais que aplicam o método de transplante rotineiramente, para que haja aperfeiçoamento e treinamento. Apesar do alto custo do procedimento, pode-se encontrar proprietários que estejam dispostos a custear esse tipo de tratamento com objetivo de propiciar melhor qualidade de vida ao seu animal de estimação.

Apesar da grande quantidade de informações que existe sobre o assunto, muitos estudos ainda devem ser realizados em torno da etiologia e da fenotipagem do linfoma no país. Quanto mais conhecimento o médico veterinário agregar, melhor será o diagnóstico e o tratamento aplicado aos pacientes resultando em maior sobrevida destes animais.

## 5 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Celular and molecular immunology**.

Editora Elsevier. 6 ed. 2007. p 375

APPELBAUM, F.R.; DEEG, H.J.; STORB, R. et al. **Marrow transplant studies in dogs with malignant lymphoma**. *Transplantation* 1985;39:499–504.

APPELBAUM, F.R.; SALE, G.E.; STORB, R. et al. **Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy**. *Hematol Oncol* 2:151-168, 1984.

ARESU, L. et al. **Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic**. *Veterinary and Comparative Oncology*. published online 2013

AUBRY, O.A.; SPANGLER, E.A.; SCHLEIS, E.S.; SMITH, A.N. **Evaluation of bone marrow aspirates from multiple sites for staging of canine lymphoma and mast cell tumours**. *Veterinary and Comparative Oncology*. published online 2012.

BERGMAN, P.J. **Paraneoplastic syndromes**. In: WITHROW, MACEWEN'S. *Small Animal Clinical Oncology*. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap 5, p.77-90.

BLAZAR, B.R.; TAYLOR, P.A.; SNOVER, D.C. et al. **Nonmitogenic anti-CD3F(ab')<sub>2</sub> fragments inhibit lethal murine graft-versus-host disease induced across the major histocompatibility barrier**. *J Immunol* 1993;150:265–277.

BRESHEARS, M.A.; MEINKOTH, J.H.; STERN, A.W.; BUONCOMPAGNI, S.; THOMASON, J.D. **Pathology in practice. (RENAL LYMPHOMA)** *JAVMA*, v. 238, n.2, 2011.

CÁPUA, M.L.B. et al. **Autologous bone marrow transplantation in a dog with lymphoma: a clinical study**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.2, p.580-584. 2009.

DANK, G. et al. **Clinical characteristics, treatment, and outcome of dogs with presumed primary hepatic lymphoma: 18 cases (1992–2008)** J Am Vet Med Assoc. 2011.n239.p966–971.

DAY, M.J. **Veterinary immunology, principles and practices**. Manson publishing. 2 ed. 2012. p 141.

DE NARDO, C.D.D.; CEZARINO, P.F.; QUEIROZ, C.L.N.; SEGUNDO, J.P.; DAGNONE, A.S.; SUEIRO, F.A.R.; CASTRO, K.F.; MARCONDES, M. **Linfoma alimentar em cão – relato de caso**. Veterinária e Zootecnia, v.15, n.3, p.42-44, 2008.

DOBSON, J.; BLACKWOOD, L.B; MCINNES, E.F; BOSTOCK, D.E; NICHOLLS, P.; HOARTHER, T.M; TOM, B.D.**Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma**. J Small Anim Pract 2001, n 42 p 377–384.

EBERLE, N., MISCHKE, R. **Influence of a cyclic combination chemotherapeutic protocol on primary haemostasis in dogs suffering from malignant lymphoma**. The Veterinary Journal 183 (2010) 298–304.

EDWARDS, D.S. et al. **Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs**, Vet Comp Oncol 1p.200-206, 2003.

ESCOBAR, C., GRINDEM, C., NEEL, J.A., SUTER,E. **Hematologic Changes After Total Body Irradiation and Autologous Transplantation of Hematopoietic Peripheral Blood Progenitor Cells in Dogs With Lymphoma**. Vet Pathol published online 13 June 2011.

FEINSTEIN, A.R.; SOSIN, D.M., WELLS, C.K. **The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer**. N Engl J Med 1985;312:1604–1608.

FERRICK, D.A.; SCHRENZEL, M.D.; MULVANIA,T.; HSIEH, B.; FERLIN, W.G.; LEPPER, H. **Differential production of interferon-g and interleukin-4 in response to Th1 and Th2-stimulating pathogens by gd T-cells in vivo**. Nature.1995; n373. p 255–257.

FLOOD-KNAPIK, K.E., et al. **Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent.** Veterinary and Comparative Oncology, published online 2012.

FLORY, A.B., et al. **Stage migration in dogs with lymphoma.** Journal of Veterinary Internal Medicine 21, 1041–1047. 2007.

FONTAINE, J.; HEIMANN, M.; DAY, M.J. **Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases.** Veterinary Dermatology, v. 21, p. 267-275, 2010

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; BRICAIRE, P. et al. **Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas,** J Comp Pathol 117:35-59, 1997.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P. et al. **Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological and clinical study of 46 new cases.** Vet Pathol 39:92-109,2002.

FRANK, J.D.; REIMER, S.B.; KASS, P.H. et al. **Clinical outcomes of 30 cases of canine gastrointestinal lymphoma.** J Am Anim Hosp Assoc, 2007. n 43 p313–21.

GABOR,L.J., CANFIELD, P.J., MALIK, R. **Haematological and biochemical findings in cats in Australia with lymphosarcoma.** Aust Vet J Vol 78, No 7, July 2000.

GASPER, P.W.; THRALL, M.A. **Hematopoietic stem cell transplantation.** In: FELDMAN, B.F et al. (Eds.). , Schalm's veterinary hematology. Blackwell Publishing Ltd 2000. p.97-101.

GRINDEM, B.B., TYLER, R.D., COWELL, R.L. **A Medula Óssea.** In: COWELL, R.L., TYLER, R.D., MEINKOTH, J.H., DENICOLA, D.B. (Ed). **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos.** 3 ed. São Paulo: MedVet, 2009, cap. 27, p. 423-451.

GRINDEM, C.B. et al. **Thrombocytopenia associated with neoplasia in dogs.** J Vet Intern Med 8:400-405, 1994.

GRINDEM, C.B.; TYLER, R.D.; COWELL, R.L.. **A medula óssea.** In: Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. Editora MedVet. 3ed. 2009. p 423 -450.

HARPER, P.; LITTLEWOOD, T. **Anaemia of cancer: impact on patient fatigue and long-term outcome.** *Oncology* 2005;69(suppl 2):2–7.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H. et al. **A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.** *Blood*.n 84. p1361-1392,1994.

HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas.** 1. Ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2012, 360 p.

ICHIKI, Y.; BOWLUS, C.L.; SHIMODA, S., et al. **T cell immunity and graft versus-host disease (GVHD).** *Autoimmun Rev* 2006;5:1–9.

JOETZKE, A.E. et al. **Flow cytometric evaluation of peripheral blood and bone marrow and fine-needle aspirate samples from multiple sites in dogs with multicentric lymphoma.** *Am J Vet Res* 2012; n73. p 884–893.

KATAKOA, Y.; IWASAKI, T.; KUROIWA, T. et al. **The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease.** *Immunology* 2001;103:310–318.

KOL, A. et al. **Serial haemostatic monitoring of dogs with multicentric lymphoma.** *Veterinary and Comparative Oncology.* published online 2013.

KUSHIDA, T.; INABA, M.; IKEBUKURO, K. et al. **A new method for bone marrow cell harvesting.** *Stem Cells*, 2000. n18 p 453–456.

LANE, L.V. et al. **Canine intravascular lymphoma with overt leukemia.** *Vet Clin Pathol* 41/1. 2012. p 84–91.

MACEWEN, E.G.; PATNAIK, A.K.; WILKINS, R.J. **Diagnosis and treatment of canine hematopoietic neoplasms.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract* n 7 p105-118, 1977.

MADEWELL, B.R. **Hematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma.** J Am Anim Hosp Assoc. n 22. p 235-240, 1986.

MADEWELL, B.R.; FELDMAN, B.F. **Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals.** J Am Vet Med Assoc 176. p 419-425, 1980.

MANZILLO, F.V.; PAGANO, A.; GUGLIELMINO, R.; GRADONI, L.; RESTUCCI, B.; OLIVA, G. **Extranodal cd-T-cell lymphoma in a dog with leishmaniasis.** Vet Clin Pathol 37/3. 2008. p 298–301.

MARCONATO, L. et al. **Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: Prognostic significance and proposal of a cut-off value.** The Veterinary Journal (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.003>

MARTINI, V., MELZI, E., COMAZZI, S., GELAIN, M.E. **Peripheral blood abnormalities and bone marrow infiltration in canine large B-cell lymphoma: is there a link?** Veterinary and Comparative Oncology, 2013.

MASSA, K.L.; GILGER, B.C.; MILLER, T.L. et al **Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000),** *Vet Ophthalmol* 5:9-98, 2002.

MESSICK, J.B.; **Linfonodos.** In: Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. Editora MedVet. 3ed. 2009. p 179 -192.

MONDIANO, J.F. et al. **Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk.** Cancer Research .2005.n65. p5654–5661.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Oncologia de pequenos animais.** São Paulo, SP: Roca; 2007, p 300.

MOULTON, J. E; HARVEY, J.W: **Tumors of lymphoid and hematopoietic tissue.** In Moulton JE, Editor: Tumors of domestic animals, ed 3, Berkeley, Calif, 1990, University of California Press.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CÁPUA, M.L.B.; COELHO, P.S. **Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária.** Ciência Rural, Santa Maria, v35, n.4, p.966-973, jul-ago, 2005

COUTO, C. G. **Oncologia.** In: \_\_\_\_ Manual de medicina interna de pequenos animais. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2009. Cap. 77-84, p. 1059-1117.

NGUYEN, D.; LAWRENCE, D.W.; BRAYLAN, R.C. **Flow Cytometry in Hematopathology: A Visual Approach to Data Analysis and Interpretation.** 2 ed. Humana Press Inc 2007.

PAPAKONSTANTINO, S. et al. **Rapid, effective and user-friendly immunophenotyping of canine lymphoma using a personal flow cytometer.** Irish Veterinary Journal 2013, n 66. p 6.

PONCE, F.; MAGNOL, J.P.; LEDIEU, D. et al. **Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy.** Vet J 167:158-166, 2004.

PONCE, F.; MARCHAL, T.; MAGNOL J.P.; TURINELLI, V.; LEDIEU, D.; BONNEFONT, C.; PASTOR, M.; DELIGNETTE, M.L.; FOURNEL-FLEURY, C. **A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology.** Veterinary Pathology 2010. n 47 p 414–433.

PRIESTER, W.A.; MCKAY, F.W. **The occurrence of tumors in domestic animals,** Natl Cancer Inst Monogr 54:1-210, 1980.

RASKIN, R.E.; KRENBIEL, J.D. **Prevalence of leukaemia blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma.** Journal of American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v.194, n.10, p.1427-1429, 1989.

RASSNIK, K.M.; MOORE, A.S; COLLISTER, K.E. et al. **Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs.** J Vet Intern Med

REBHUM, R.B. et al. **CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma.** Vet Comp Oncol. 2010.n.9(1). p38–44.

REYSNER, Y.; MARTELLI, M.F. **Tolerance induction by “ megadose ” transplants of CD34+ stem cells: a new option for leukemia patients without an HLA-matched donor .** Curr Opin Immunol 2000 ; 12 : 536 – 541 .

ROITT, I. et al. **Imunologia.** São Paulo: Manole, 1999. 424p.

ROSENBERG, M.P.; MATUS, R.E.; PATNAIK, A.K. **Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia,** J Vet Intern Med 5:268-271, 1991.

RUSLANDER, D.A; GEBHARD, D.H.; TOMPKINS, M.G. et al. **Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders,** In Vivo 11:169-172, 1997.

SATO, M. et al. **Perfusion method for harvesting bone marrow cells from dogs.** Am J Vet Res 2011; n.72. p1344– 1348.

SHIMAZAKI, T. et al. **A Case of Canine Lymphomatoid Granulomatosis with Cutaneous Lesions.** J. Vet. Med. Sci. 72(8): 1067–1069, 2010

SÖZMEN, M., TASCA, S., CARLI, S., DELORENZI, D., FURLANELLO, T., CALDIN, . **Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification and Immunophenotyping of canine lymphomas.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 17, n. 4., p. 323-330, 2005.

STEFANELLO, D.; VALENTI, P.; COMAZZI, S.; GELAIN, M.E.; ROCCABIANCA, P.; AVALLONE, G.; CANIATTI, M.; MARCONATO, L. **Splenic Marginal Zone Lymphoma in 5 Dogs (2001 –2008),** J Vet Intern Med 2011;25:90–93.

TESKE, E.; VAN HEERDE, P.; RUTTEMAN, G.R. et al. **Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs.** J Am Vet Med Assoc 205:1722-1728, 1994.



THOMAS, R.; SMITH, K.C.; OSTRANDER, E.A. et al. **Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes.** Br J Cancer. n 89. p1530-1537, 2003.

VAIL, D.M.; YOUNG, K.M. **Hematopoietic Tumors.** In: WITHROW, S.J., VAIL, D.M. (Ed). Small Animal Clinical Oncology. 4 ed. Missouri: Saunders, 2007, cap. 31, p. 699-784.

VAIL, D.M; KISSEBERTH, W.C; OBRADOVICH, J.E. et al: **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 24:807-815, 1996.

VAIL, M.D.; **Cancer – hematopoietic tumors.** In: \_\_\_\_\_ Veterinary Internal Medicine. Editora Elsevier. 6 ed. 2010. p 732-741.

VALLI, V.E. et al. **Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria.** Vet Pathol published online 22 September 2010

VALLI, V.E.; KASS, P.H.; SAN MYINT, M.; SCOTT, F. **Canine Lymphomas : Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate and Treatment With Survival.** Vet Pathol. published online 26 February 2013.

VALLI, V.E.O., et al. **Anatomic and histological classification of feline lymphoma using the National Cancer Institute Working Formulation.** 9<sup>th</sup> Annul Conf Vet Cancer Soc. 1989.

VALLI, V.E.R.M., et al: **Tumors of lymphoid system.** In: \_\_\_\_\_ Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals, 2<sup>nd</sup> series, v.8. 2002.

WALTON, R.M.. **Hematopoietic Stem Cell Transplantation** In: \_\_\_\_\_ Schalm's veterinary hematology. Blackwell Publishing Ltd. 6 ed, 2010. p.783-788.

WILKERSON, M.J., et al. **Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 106, 179–196.

YUNIS, J.J.; OKEN, M.M.; THEOLOGIDES, A. et al. **Recurrent chromosomal defects found in most patients with non-Hodgkin's lymphoma.** *Cancer Genet Cytogenet* n 13.p17-28, 1984.