



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

LINFOMA MALIGNO MULTICÊNTRICO CANINO

ANA RITA DOS SANTOS GONÇALVES PROENÇA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutor José Henrique Duarte Correia

Vogais:

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Dra. Sofia Maltez Ribeiro Baptista Mouro

ORIENTADORA

Dra. Sofia Maltez Ribeiro Baptista

Mouro

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

LINFOMA MALIGNO MULTICÊNTRICO CANINO

ANA RITA DOS SANTOS GONÇALVES PROENÇA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutor José Henrique Duarte Correia

Vogais:

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Dra. Sofia Maltez Ribeiro Baptista Mouro

ORIENTADORA

Dra. Sofia Maltez Ribeiro Baptista

Mouro

2009

LISBOA

Agradecimentos

À minha Orientadora, Dra. Sofia Maltez Ribeiro Baptista Mouro, Médica Veterinária a exercer medicina interna no Hospital Escolar da FMV, por toda a disponibilidade, orientação, apoio ao desenvolvimento deste tema e pelos conhecimentos proporcionados na área de Clínica de Animais de Companhia.

Ao Professor Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia, por toda a disponibilidade demonstrada e pela transmissão de conhecimentos que permitiram a realização desta dissertação.

À Professora Doutora Maria da Conceição Peleteiro e ao Dr. Hugo Pissarra pela disponibilidade demonstrada desde o início da realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor António José Almeida Ferreira, director do Hospital Escolar da FMV, pela oportunidade de estágio concedida.

A toda a equipa do Hospital Escolar da FMV pela aprendizagem, pela disponibilidade e pelo ambiente de camaradagem e profissionalismo vivido. Um agradecimento especial ao Dr. Gonçalo Vicente pelo apoio que me ofereceu.

Aos meus colegas de Estágio no Hospital da FMV, por todas as experiências partilhadas e pelos bons momentos vividos em conjunto.

Aos meus amigos, em especial ao Rui, à Susana e à Sofia pelo apoio e compreensão demonstrados durante todo o período de execução desta dissertação.

À minha família, em especial aos meus pais e irmãos, pela paciência sempre demonstrada.

LINFOMA MALIGNO MULTICÊNTRICO CANINO

Resumo

O linfoma maligno canino é um grupo heterogéneo de neoplasias com origem nas células linfóides, podendo atingir praticamente todas as regiões do organismo.

A presente dissertação refere-se ao período de Setembro de 2008 a Junho de 2009, durante o qual foi desenvolvida a componente prática do Estágio Curricular de Mestrado Integrado, no Hospital Escolar da FMV, de Setembro 2008 a Fevereiro de 2009. Durante este período procedeu-se ao estudo de linfoma maligno multicêntrico em 8 canídeos que evidenciaram linfadenomegália ao exame físico e/ou exames citológicos ou histológicos positivos para linfoma maligno. O diagnóstico da doença foi realizado por análise citológica de linfonodo (n=7), baço (n=2) e medula óssea (n=1) e por exame histológico hepático (n=1). Adicionalmente realizaram-se exames complementares, nomeadamente a radiografia (n=6) e a ultrasonografia (n=6). Os 8 canídeos foram distribuídos pelos estadios clínicos da OMS sendo que 4 se enquadravam no estadio III, 3 no estadio IV e 1 no estadio V.

Os sinais e sintomas clínicos mais consistentes com doença foram a linfadenomegália (n=7), perda de peso acentuada (n=5) e anorexia (n=4). Relativamente às alterações hematológicas, 4 canídeos apresentavam anemia.

O tratamento quimioterápico baseado no protocolo CHOP de 19 semanas foi realizado em 4 canídeos. Dos restantes 4 animais, 3 foram submetidos a prednisolona e 1 não recebeu qualquer tipo de terapêutica. A mortalidade e morbilidade foram bastante elevadas nos 4 últimos casos. As alterações hematológicas foram a causa mais prevalente para o adiamento de algumas sessões de quimioterapia.

Contudo, apesar da presença de efeitos secundários para o animal e dos possíveis riscos para a saúde pública, os efeitos benéficos do uso de quimioterápicos parece sobrepor-se aos potenciais riscos envolvidos.

Duma maneira geral, os canídeos responderam bem à terapêutica quimioterápica mais complexa e os proprietários demonstraram-se satisfeitos com os resultados obtidos. Assim, tendo em conta que o linfoma maligno canino é dos tumores mais gratificantes de abordar com quimioterapia deve ser estabelecida uma correcta relação com os proprietários, de forma a aumentar a adesão ao tratamento.

Palavras-chave: Linfoma maligno multicêntrico, canídeo, citologia, quimioterapia

MALIGNANT MULTICENTRIC LYMPHOMA IN DOG

Abstract

The canine malignant lymphoma is a heterogeneous group of neoplasias whose origin is in lymphoreticular cells and can virtually reach every region of the organism.

This thesis covers the period September 2008 to June 2009, during which took place the curricular training of the Integrated Master degree in Veterinary Medicine, at the FMV Teaching Hospital, September 2008 to February 2009.

During this period there has been a study of malignant multicentric lymphoma in 8 dogs, these showed lymphadenomegaly at the physical exam and/or were positive to cytologic or histologic examination for malignant lymphoma. The diagnosis of the disease was made by cytological examination of lymph nodes (n = 7), spleen (n = 2), bone marrow (n = 1) and liver histology (n = 1).

They were made some additional tests, including radiography (n = 6) and ultrasound (n = 6). The 8 dogs were distributed by the WHO clinical stage, 4 of which were in stage III and the other in stage IV.

The clinical signs and symptoms more consistent with the disease were lymphadenomegaly (n = 7), severe weight loss (n = 5) and anorexia (n = 4). Anemia was found in 4 dogs at CBC count.

The CHOP chemotherapy protocol of 19 weeks was conducted in 4 dogs. In the remaining 4 animals, 3 were submitted to prednisolone and 1 did not receive any therapy. The rate of mortality and morbidity was high in the last two cases. The hematologic toxicity was the most prevalent cause for the postponement of some chemotherapy sessions.

However, despite the presence of side effects to the animal and possible risks to public health, the beneficial effects of the use of chemotherapy seems to overlap the potential risks involved. In general, dogs had a good response to chemotherapy and owners seemed to be satisfied with the results. The canine malignant lymphoma is one of the most rewarding tumors to treat with chemotherapy. Therefore, a proper relationship with the owners is very important in order to increase adherence to treatment.

Keywords: malignant multicentric lymphoma, dogs, cytology, chemotherapy

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice de tabelas	ix
Índice de gráficos	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de abreviaturas e de símbolos	xi
I. Introdução	1
II. Revisão bibliográfica sobre linfoma maligno multicêntrico canino	2
1. Anatomia e fisiologia do sistema linfóide	2
2. Etiologia.....	6
3. Epidemiologia	7
4. Classificação	8
4.1 Classificação Anatômica.....	8
4.2 Classificação citológica, histológica e imunofenotípica.....	10
4.2.1 Caracterização dos LMC estudados	13
5. Manifestações clínicas e síndromes paraneoplásicas	15
5.1 Sinais e sintomatologia clínica.....	15
5.2 Alterações Laboratoriais	17
5.3 Síndromes paraneoplásicas	19
6. Diagnóstico	21
6.1 Exame físico.....	21
6.2 Perfil hematológico, bioquímico e urianálise	21
6.3 Imagiologia	22
6.4 Diagnóstico citológico, histopatológico e imunofenotípico	24
6.4.1 Exame citológico	24
6.4.1.1 Técnica citológica.....	26
6.4.2 Exame Histológico	28
6.4.3 Imunofenotipagem.....	29
6.4.3.1 Citometria de fluxo	29
6.4.3.2 Imunohistoquímica e imunocitoquímica.....	30
6.5 Técnicas de diagnóstico molecular.....	30
6.5.1 AgNORs.....	30
6.5.2 Marcadores tumorais	31
6.6 Outras técnicas	32
6.6.1 Actividade da telomerase.....	32
6.6.2 PCR (Polymerase chain reaction).....	33
6.7 Sistema de estadios clínicos da OMS	34
7. Tratamento do linfoma maligno multicêntrico	35

7.1 Quimioterapia.....	36
7.1.1 Protocolos quimioterápicos de agente único.....	38
7.1.2 Protocolos quimioterápicos de múltiplos agentes	40
7.1.2.1 Protocolos baseados no COP.....	40
7.1.2.2 Protocolos baseados no CHOP.....	42
7.1.3 Protocolos quimioterápicos de reindução ou emergência.....	45
7.2 Efeitos adversos da quimioterapia.....	46
7.2.1 Toxicidade hematológica	47
7.2.2 Toxicidade Gastrointestinal	48
7.2.3 Reacções anafiláticas	48
7.2.4 Toxicidade dermatológica.....	48
7.2.5 Cardiotoxicidade	49
7.2.6 Urotoxicidade	49
7.2.7 Outras toxicidades	49
7.3 Radioterapia	49
7.4 Outros tratamentos	50
8. Prognóstico	51
III. Estudo de linfoma maligno multicêntrico em canídeos, observados no Hospital Escolar da FMV-UTL	54
1. Materiais e métodos	54
2. Resultados.....	56
2.1 Caracterização da população em estudo.....	56
2.2 Sinais e sintomatologia clínica.....	57
2.3 Alterações laboratoriais	58
2.4 Exames complementares.....	59
2.5 Estadiamento clínico	60
2.6 Diagnóstico	61
2.6 Doenças concomitantes	62
2.7 Terapêutica.....	63
2.8 Efeitos adversos da quimioterapia.....	64
3. Discussão	65
3.1 Caracterização da população em estudo.....	65
3.2 Estudo clínico.....	66
IV. Conclusões	75
V. Bibliografia	77
VI. Anexos	92
1. Métodos de diagnóstico, exames complementares, doenças concomitantes e terapêutica instituída na população total do estudo.	92
2. Valores de referência das analíticas sanguíneas (Feldman, Zinkl & Jain, 2000).	96
3. Protocolos quimioterápicos CHOP, completos e parciais, dos 4 canídeos com os dias correspondentes a cada sessão e com as respectivas alterações hematológicas.	97

Índice de tabelas

Tabela 1 - Centros linfáticos do cão e respectivas regiões anatómicas .	5
Tabela 2 - Classificação histológica dos tumores hematopoiéticos nos animais domésticos da OMS .	13
Tabela 3 - Critérios de malignidade citológica	25
Tabela 4 - Sistema de estadios clínicos para o LM em animais domésticos da OMS	35
Tabela 5 - Diferentes tipos de resposta à indução da remissão da doença	37
Tabela 6 - Protocolos quimioterápicos aplicados ao linfoma maligno no cão	42
Tabela 7 - Protocolo quimioterápico da University of Wisconsin Madison	43
Tabela 8 - Protocolo quimioterápico baseado no CHOP (UW25)	44
Tabela 9 - Protocolo quimioterápico baseado no CHOP	45
Tabela 10 - Toxicidades associadas aos agentes quimioterápicos	47
Tabela 11 - Factores de prognóstico para o linfoma canino	51
Tabela 12 - Identificação, raça, sexo, idade e data do diagnóstico na população estudada.	55
Tabela 13 – Caracterização da população estudada de acordo com a raça.	56
Tabela 14 - Sinais e sintomatologia clínica e respectiva duração presentes na primeira consulta dos canídeos com linfoma maligno multicêntrico.	57
Tabela 15 - Alterações registadas no hemograma	58
Tabela 16 - Alterações registadas nas bioquímicas sanguíneas.	59
Tabela 17 - Estadiamento clínico segundo a OMS dos 8 canídeos estudados.	61
Tabela 18 - Caracterização do exame citológico das PAAF's de linfonodos	62
Tabela 19 - Caracterização do exame histológico hepático	62
Tabela 20 - Protocolo CHOP de 19 semanas aplicado aos canídeos com LM multicêntrico.	63

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Frequência relativa (%) da idade dos canídeos diagnosticados com linfoma maligno multicêntrico.	56
Gráfico 2 - Frequência absoluta e frequência relativa dos sinais e sintomatologia clínica observados na primeira consulta nos 8 canídeos estudados.	57

Índice de figuras

Figura 1 - Origem e diferenciação dos linfócitos	3
Figura 2 - Anatomia microscópica de um linfonodo típico de canídeo	4
Figura 3 - Distribuição anatômica dos linfonodos clinicamente relevantes no cão	5
Figura 4 – Linfoma de alto grau de malignidade tipo imunoblástico	14
Figura 5 - Linfoma centroblastico monomórfico	14
Figura 6 - Linfoma centroblastico polimórfico	15
Figura 7 - Linfoma linfoblástico	15
Figura 8 - Linfadenomegália superficial generalizada em canídeo com LM	16
Figura 9 - Perda de peso acentuada em canídeo com LM	16
Figura 10 - Radiografia torácica em canídeo com LM.	23
Figura 11 - PAAF de linfonodo em canídeo com aumento do linfonodo pré-escapular	27

Índice de abreviaturas e de símbolos

\geq – Maior ou igual

\leq – Menor ou igual

↓ – Parâmetro diminuído

↑ – Parâmetro aumentado

% – Percentagem

μl – Microlitro

Ac – Anticorpos

AC – Doxorubicina e ciclofosfamida

ACT – Actinomicina D

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ALT – Alanina Aminotransferase

arac – citosina arabinósido

ARN – Ácido Ribonucleico

BID – A cada doze horas

CCNU - Lomustina

COAP – Ciclofosfamida, Vincristina, Citosina arabinósido e Prednisona

COP – Ciclofosfamida, Vincristina e Prednisona

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CHOP – Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisona

CTX – Ciclofosfamida

dl – decilitro

DOX – Doxorubicina

DTIC – Dacarbazina

D-MAC – Dexametasona, Actinomicina D, Citosina arabinósido, Melfalan

Eos - Eosinófilos

Erit - Eritrócitos

EV – Via Endovenosa

F- Fêmea

FAS – Fosfatase Alcalina Sérica

fl – fentolitro

G – Gauge

g – Grama

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HE – Hematoxilina-Eosina
Hem - Hemoglobina
HT – Hematócrito
IFI – Imunofluorescência Indirecta
IM – Intramuscular
kg – Quilograma
L – Litro
L-CHOP – L-asparaginase, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisona
Leu – Leucócitos
Leuk – Clorambucil
Linf - Linfócitos
LM – Linfoma Maligno
LMC – Linfoma Maligno Canino
LMP – Clorambucil, Metotrexato e Prednisona
M - Macho
MIT – Mitoxantrona
mg – Miligrama
MMPs – Metaloproteinases da matriz
Mon - Monócitos
MOPP – Mecloretamina, Vincristina, Procarbazina e Prednisona
MTX – Metotrexato
m² – metro quadrado
Neut - Neutrófilos
NK- Células Natural Killer
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCR – Polymerase chain reaction
pCr – Proteína C-reativa
pg – picograma
Plaq - Plaquetas
PO – *Per Os*
PTHrP – Péptido relacionado com a hormona da paratiróide
q2 semanas – cada duas semanas
q24h – cada 24 horas
q48h – cada 48 horas

RC – Remissão Completa
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RP – Remissão Parcial
SC – Subcutânea
SID – A cada vinte e quatro horas
SNC – Sistema Nervoso Central
UW – University of Wisconsin
TAC – Tomografia Axial Computorizada
TK – Timina quinase
UI – Unidades Internacionais
UW25 – Protocolo quimioterápico da University of Wisconsin de 25 semanas
VCM – Volume Corpuscular Médio
VCR – Vincristina

I. Introdução

O desenvolvimento tumoral caracteriza-se por uma alteração celular com formação de uma população de células que têm a capacidade de crescer e de se dividir de uma forma anômala, ultrapassando os limites de regulação celular normais (Waters, 2006). Os tumores malignos são aqueles que apresentam capacidade tanto de invasão local como de metastização (Argyle, 2003). O aumento da prevalência de neoplasias em canídeos torna-se um problema cada vez mais presente no dia a dia de uma clínica ou hospital veterinário. Esta situação pode dever-se em parte ao aumento da esperança média de vida dos canídeos (Gobar, Case & Kass, 1998) .

Os linfomas são um grupo diverso de neoplasias malignas sólidas que têm em comum a sua origem em células linfóides (Vail, 2003). O termo linfoma é aplicado geralmente às neoplasias primárias dos tecidos extramedulares (Correia, 2006). Caracterizam-se por uma proliferação anormal de células linfóides malignas em praticamente todos os órgãos ou tecidos, sendo os órgãos sólidos hematopoiéticos (linfonodos, baço) os mais afectados. Existe a possibilidade do aparecimento de lesões na medula óssea e do desenvolvimento de leucemia a acompanhar esta doença. Neste estadio avançado de linfoma maligno (LM) o diagnóstico pode revelar-se inconclusivo quanto à origem, medular ou extramedular, da neoplasia (Vail & Young, 2007).

Existem dois tipos de linfomas, a doença de Hodgkin's, cujo tecido tumoral contém células específicas, as células Reed-Sternberg, e o linfoma não-Hodgkin's. O linfoma maligno canino (LMC) pode ser mencionado como linfoma não-Hodgkin's, de acordo com a terminologia humana. A doença de Hodgkin's não foi ainda reconhecida nesta espécie (Fournel-Fleury et al., 2002).

A presente dissertação traduz o culminar do Estágio Curricular de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, cuja componente prática assumiu a forma de estágio na área da Clínica de Animais de Companhia. Assim, será feita uma revisão bibliográfica do tema proposto seguindo-se, na segunda secção, o estudo de um conjunto de casos observados no decurso do estágio, em que se verificou a presença de linfoma maligno multicêntrico. Por fim, serão salientadas as conclusões obtidas.

II. Revisão bibliográfica sobre linfoma maligno multicêntrico canino

1. Anatomia e fisiologia do sistema linfóide

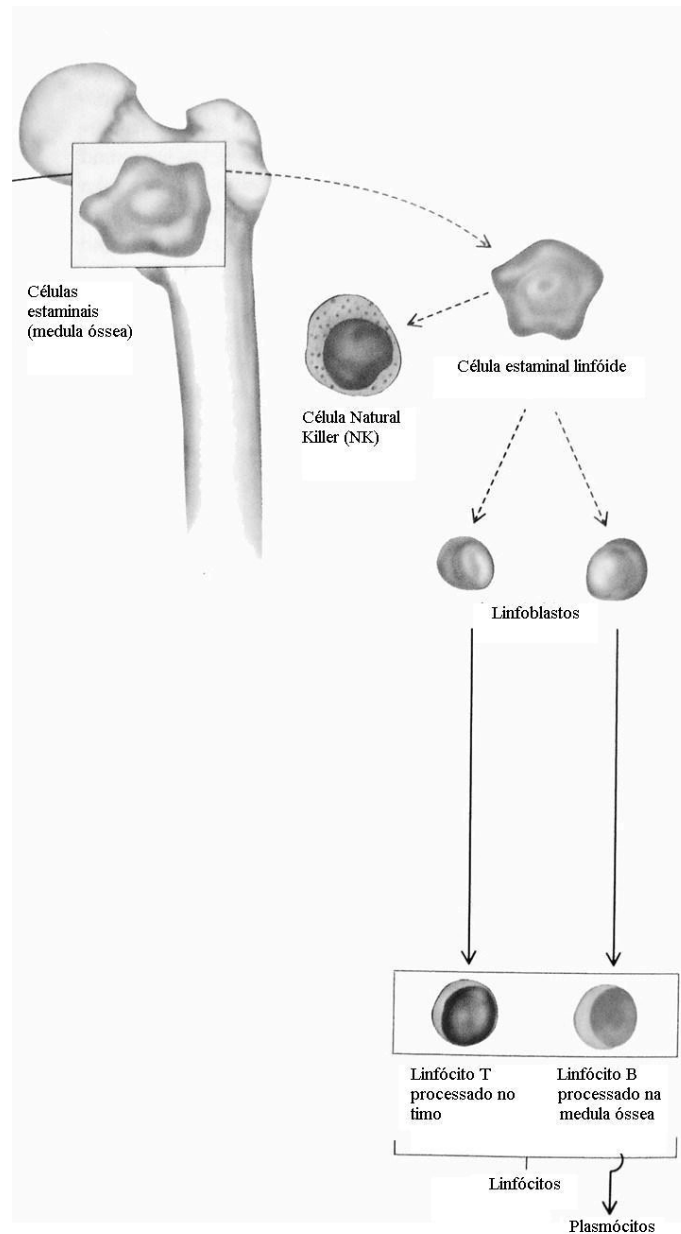
O sistema linfóide, principal alvo dos linfomas malignos (LMs) (Vail & Young, 2007), é constituído pelos órgãos linfóides centrais, medula óssea e timo; pelos órgãos periféricos, baço, linfonodos e nódulos linfáticos; e por uma vasta rede de vasos que se distribuem por todo o corpo, estando envolvidos na condução da linfa (Junqueira & Carneiro, 2004a).

As células do sangue estão em constante renovação, graças à proliferação mitótica das células localizadas nos órgãos hematopoiéticos. Inicialmente, os principais órgãos envolvidos são o baço e o fígado sendo que, com o desenvolvimento do organismo, a medula óssea toma um papel cada vez mais primordial nesta função. Antes de atingirem o sangue, as células sanguíneas passam por diversas fases de maturação e diferenciação (Junqueira & Carneiro, 2004b).

Os neutrófilos são o tipo de leucócitos mais comuns no sangue (40 a 75%), correspondendo os linfócitos ao segundo tipo mais prevalente (20 a 50%). Estes últimos originam-se nos órgãos linfóides, a partir de células trazidas da medula óssea (Figura 1). O linfoblasto, de dimensão média (2 eritrócitos) e forma esférica, com dois ou três nucléolos quase imperceptíveis, é a célula mais jovem da série linfocitária. A sua cromatina, já com algum grau de condensação, lembra a de um linfócito maduro. Por sua vez, o pró-linfócito, formado a partir do linfoblasto, apresenta menores dimensões, sendo o seu citoplasma igualmente basófilo. Os nucléolos tornam-se pouco visíveis devido ao aumento da condensação da cromatina. Pode apresentar ou não granulações azurófilas ao contrário do primeiro, onde estas ainda não estão presentes. O linfócito origina-se directamente do pró-linfócito e é a menor célula da série leucocitária. Estas células possuem um núcleo corado, sem nucléolos visíveis, sendo o citoplasma reduzido, basófilo e sem grânulos. A quantidade de citoplasma varia consoante o seu estado de activação sendo que, em circulação, predominam pequenos linfócitos inactivos (6 a 9µm de diâmetro). Os linfócitos maiores, com um diâmetro entre os 9 a 15µm, constituem apenas 3% dos linfócitos no sangue periférico (Junqueira & Carneiro, 2004b).

Os linfócitos classificam-se em dois tipos principais (B e T), e em vários subtipos consoante os receptores das suas membranas e o local onde se diferenciam (Junqueira & Carneiro, 2004a), sendo morfologicamente indistinguíveis (Fournel-Fleury et al., 1994).

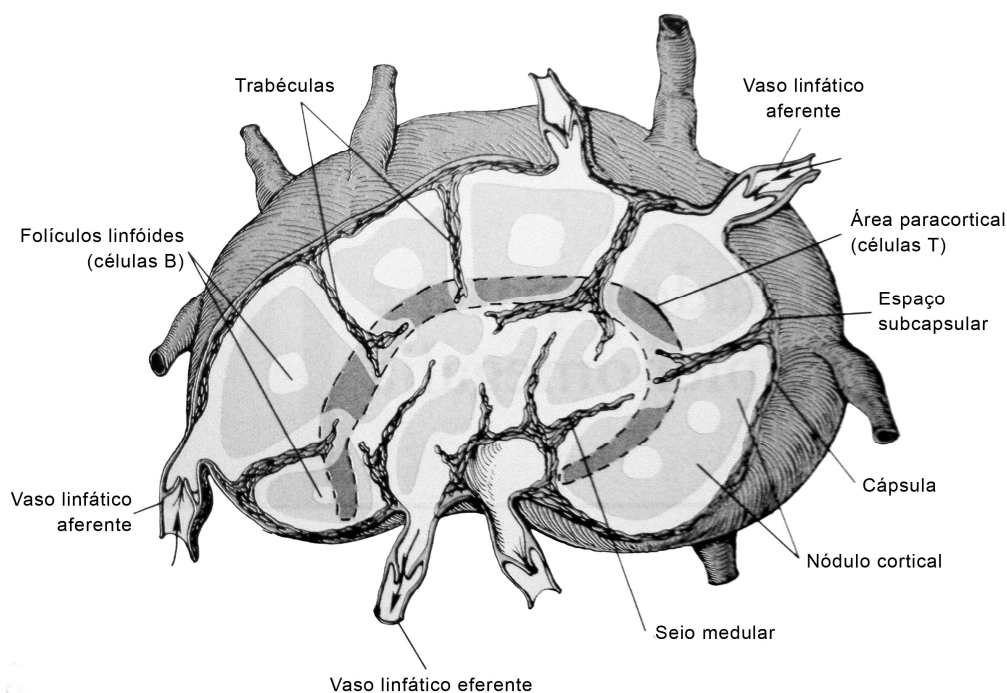
Figura 1 - Origem e diferenciação dos linfócitos (adaptado de Prescott, Harley & Klein, 2005).



Devido às suas funções de defesa, os linfócitos são naturalmente encontrados ao longo de todo o corpo, em praticamente todos os sistemas de órgãos e tecidos (Newman, Kitchell, Wallig & Paria, 2008).

Os linfonodos são estruturas integrantes do sistema circulatório e imunológico, apresentando estrutura e tamanho variável, desde 1mm de comprimento até 1 a 2 cm (Junqueira & Carneiro, 2004a) (Figura 2).

Figura 2 - Anatomia microscópica de um linfonodo típico de canídeo (Couto, 2009).



Na área superficial do córtex do linfonodo, mais precisamente no centro germinativo dos folículos secundários, ocorre a proliferação e diferenciação das células B. No caso de um estímulo antigénico, este local torna-se rico em centroblastos (tamanho superior a 2 eritrócitos) que originam os centrócitos (ligeiramente maiores que os linfócitos) e estes, por sua vez, os linfócitos B de memória (Fournel-Fleury et al., 1994).

Os imunoblastos do tipo B são células de grandes dimensões (maiores que 2 eritrócitos), precursoras dos plasmócitos, que se encontram nos centros germinativos, na área perifolicular e na medula. Os plasmócitos, células terminais na resposta humoral, localizam-se apenas na área medular.

A área profunda da cortical ou paracórtex é constituída essencialmente por pequenos linfócitos T, células interdigitais e, caso haja estímulo antigénico nesta zona, por imunoblastos do tipo T (Fournel-Fleury et al., 1994).

As células B representam 5 a 10% dos linfócitos circulantes no sangue, enquanto as células T representam 65 a 75%, correspondendo os restantes 10 a 15% aos linfócitos Natural Killer (NK) responsáveis pela destruição de células cancerígenas e infectadas por vírus, sem necessidade de estímulo prévio (Junqueira & Carneiro, 2004a).

Os linfócitos T e B não se apresentam distribuídos uniformemente pelos órgãos linfóides. No entanto, com a exceção do timo, onde apenas se encontram células T, todos os restantes contêm ambos os tipos celulares (Junqueira & Carneiro, 2004a).

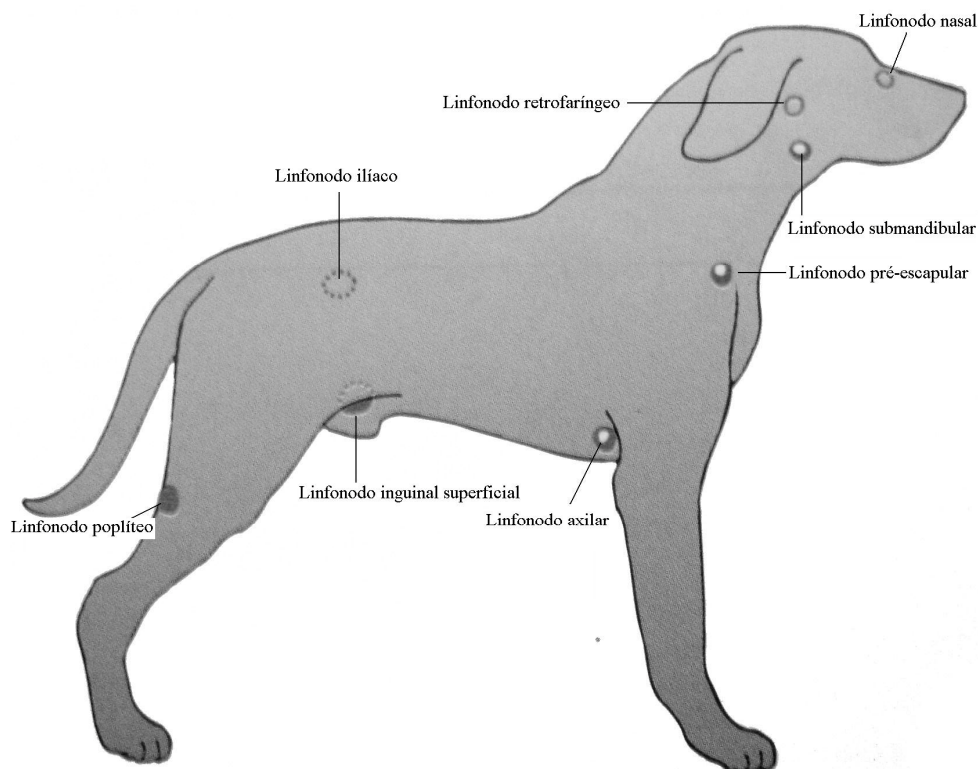
Um centro linfático corresponde a um ou a vários linfonodos agrupados que surgem sempre na mesma região anatómica e que recebem vasos aferentes de regiões semelhantes em todas as espécies (Saar & Getty, 1986).

Os linfonodos no cão agrupam-se segundo o elucidado na Tabela 1 e Figura 3 (Saar & Getty, 1986).

Tabela 1 - Centros linfáticos do cão e respectivas regiões anatómicas (adaptado de Saar e Getty, 1986).

Centro linfático	Região anatómica
Submandibular, parotídeo e retrofaríngeo	Cabeça
Cervical superficial e profundo	Pescoço
Axilar	Membro anterior
Torácico dorsal e ventral, mediastínico e brônquico	Cavidade torácica
Lombar, iliossacral, inguinofemoral e isquiático	Parede pélvica e abdominal
Ilieofemoral e poplíteo	Membro posterior
Celíaco, mesentérico cranial e caudal	Cavidade abdominal

Figura 3 - Distribuição anatómica dos linfonodos clinicamente relevantes no cão (Couto, 2009).



O baço situa-se no abdómen esquerdo, é um órgão altamente vascularizado, não essencial à vida. A sua função consiste em filtrar sangue, remover a hemoglobina, produzir anticorpos e

linfócitos que entram directamente na corrente sanguínea, bem como armazenar e libertar sangue com uma grande concentração de glóbulos vermelhos (Ellenport, 1986).

Assim, os linfonodos e o baço apresentam-se como a principal sede de células imunes e fagocítico-mononucleares do organismo. Duma forma geral, apesar de o baço responder primariamente aos antigénios que circulam no sangue, e os linfonodos aos que chegam através dos linfáticos aferentes, a resposta de ambas as estruturas ao estímulo antigénico acaba por ser muito semelhante (Couto, 2009).

O timo é um órgão bem desenvolvido e muito activo na fase inicial da vida acabando por sofrer uma grande involução, infiltração de gordura e degeneração amilóide após a maturidade sexual. Histologicamente é composto por uma cápsula e septo de tecido conjuntivo e pelo parênquima que se divide em córtex, que contém timócitos (células semelhantes aos linfócitos), e em medula (Venzke, 1986).

2. Etiologia

A etiologia do LMC é considerada multifactorial, uma vez que não se consegue isolar um agente etiológico único que justifique o desenvolvimento da doença (Vail & Young, 2007). No entanto, parecem estar presentes determinados componentes genéticos e uma predisposição racial (Couto, 2009). A ideia da existência de um factor de hereditabilidade é apoiada por um estudo de Mondiano et al. (2005), onde diferentes prevalências dos tipos imunofenotípicos estão associadas a diferentes raças de canídeos.

A hipótese de o LMC poder, à semelhança do que se passa no ser humano, estar associado a aberrações cromossomais recorrentes, começou a ser colocada quando se demonstraram as semelhanças genéticas entre ambas as espécies (Thomas, Smith, Ostrander, Galibert & Breen, 2003a). Com os avanços na área da citogenética molecular tem sido possível investigar as aberrações cromossomais presentes nos canídeos com linfoma (Thomas et al., 2001; Thomas et al., 2003a; Thomas, Fiegler, Ostrander, Galibert, Carter & Breen 2003b). Assim, Thomas et al. (2003a) verificaram que existia um ganho no cromossoma canino 13 (48%), e no cromossoma 31 (32%) em animais com LM. A perda no cromossoma 14 foi também observada em cinco dos vinte e cinco casos estudados (20%). A trissomia do cromossoma 13 tinha já sido observada num estudo de Hahn, Richardson, Hahn e Chrisman (1994), tendo sido relacionada com o aumento da duração da primeira remissão e com o tempo de sobrevivência. No entanto, apesar destas e de outras aberrações por erros na segregação dos cromossomas já terem sido descritas em células de cães com linfoma, não foram ainda

identificadas translocações específicas, correspondendo apenas a anomalias numéricas (Momoi, Okai, Watari, Goitsuka, Tsujimoto & Hasegawa, 1997).

O LMC apresenta inúmeras semelhanças histológicas, moleculares e clínicas com o linfoma não-Hodkin's que surge no ser humano (Khanna et al., 2006, citado por Kisseberth et al., 2007). Assim, o gene MYC surge no cão com a mesma organização estrutural do gene equivalente humano, tal como acontece com os genes IGH, TCRB e BCL2. No Homem, a activação dos genes MYC e BCL2 por translocações cromossomais tem-se vindo a demonstrar como um dos principais precursores no desenvolvimento do linfoma não-Hodkin's. Um mecanismo similar poderá estar na origem do LMC (Morrison, 2007).

Apesar de raras, foram descritas também mutações no gene supressor tumoral p53 e no gene N-ras em cães com LM (Edwards, Pazzi, Gumerlock & Madewell, 1993; Veldhoen, Stewart, Brown & Milner, 1998; Mayr, Holzheu, Schaffner & Reifinger, 2003).

Alguns autores (Tomley, Armstrong, Mahy & Owen, 1983) referem a presença de partículas retrovirais em tecidos de LM canino. Apesar disso, não existe nenhum caso confirmado de LMC de etiologia viral (Vail & Young, 2007).

Têm sido também associados ao aparecimento de LMC factores ambientais semelhantes aos descritos no desenvolvimento tumoral em seres humanos. Entre os vários estudos, hoje em dia considerados pouco relevantes, encontra-se a exposição ao herbicida 2,4-D, utilizado nos relvados a que os animais têm acesso (Hayes, Tarone, Cantor, Jessen, McCurnin & Richardson, 1991), e a exposição a campos magnéticos de baixa frequência (Reif, Lower & Ogilvie, 1995) como possíveis etiologias da doença. Num estudo de Gavazza, Presciuttini, Barale, Lubas e Gugliucci (2001) foi estudada também a relação entre cães com LM que residiam em áreas industriais e o uso de pesticidas. No entanto não foi encontrada nenhuma ligação entre ambos.

Recentemente têm sido feitas associações entre o desenvolvimento de LMC e alterações no sistema imunitário (Foster, Sturgess, Gould, Iwasaki & Day, 2000; Blackwood, German, Stell & O'Neill, 2004).

3. Epidemiologia

O LM é a neoplasia hematopoética mais comum e uma das cinco neoplasias mais frequentes no cão (Dobson et al., 2002), correspondendo a aproximadamente de 7 a 24% (Kaiser, 1981; Moulton & Harvey, 1990, citados por Vail & Young, 2007; Correia, 2006) de todas as neoplasias caninas e a 83% dos tumores hematopoéticos (Kaiser, 1981; Moulton & Harvey, 1990, citados por Vail & Young, 2007).

A incidência anual estimada varia entre 33 por 100000 canídeos (Teske, 1994 citado por Fournel-Fleury et al., 2002) e 114 por 100000 canídeos (Dobson et al., 2002), consoante os autores.

A prevalência da doença é superior à média em algumas raças puras, como por exemplo Airedale Terrier, Basset Hound, Cocker Spaniel, Golden Retriever, São Bernardo, Scottish Terrier, Rottweiler (Couto, 2009), Boxer, Buldog e Bull Mastiff (Edwards, Henley, Harding, Dobson & Wood, 2003). Segundo Correia (2006) as raças portuguesas com maior incidência de LMC são, por ordem decrescente, Cão de Água, Cão da Serra da Estrela e Rafeiro Alentejano. Estas raças apresentaram uma menor incidência do que as estrangeiras Caniche, Cocker e Dobermann (Correia, 2006).

No estudo de Mondiano et al. (2005) indica que existem não só raças com uma maior tendência para o desenvolvimento da doença, como também as diferentes raças apresentam susceptibilidades variáveis e únicas para os fenótipos B e T.

O linfoma atinge animais de todas as faixas etárias com uma maior incidência entre os 6 e os 12 anos (Couto, 2009).

A influência do factor sexo no desenvolvimento deste tipo tumoral apresenta-se bastante controverso, existindo estudos que relatam uma maior incidência em machos (Moreno, Frederico & Loureiro, 2007; Tasca, Carli, Caldin, Menegazzo, Furlanello & Gallego, 2009) e outros em fêmeas (Teske et al., 1994a). Apesar das divergências, a maior parte dos autores defende que o género não é um factor de risco relevante (Vail & Young, 2007).

4. Classificação

A classificação do LM apresenta-se como um tema controverso, tendo surgido múltiplos tipos de classificações ao longo dos tempos. Estes podem ter por base a localização anatómica, os critérios citológicos, histológicos ou as características imunofenotípicas (Vail & Young, 2007).

4.1 Classificação Anatómica

Esta classificação divide os linfomas em multicêntrico, mediastínico, digestivo e extranodal, consoante a localização anatómica dos órgãos afectados.

A forma anatómica mais frequente em canídeo é a multicêntrica, correspondendo a mais de 80% (Couto, 2009) de todos os linfomas, seguida da digestiva, mediastínica e cutânea. A forma extranodal primária é a menos prevalente e pode ocorrer em qualquer localização fora

do sistema linfóide, incluindo, a pele, o olho, o sistema nervoso central, o osso, o testículo, a bexiga, o coração e a cavidade nasal (Vail & Young, 2007).

A forma multicêntrica, caracterizada por uma linfadenomegália superficial (simétrica na maioria dos casos) (Jacobs, Messick & Valli, 2002) com envolvimento de múltiplos linfonodos em várias regiões do organismo, é geralmente não dolorosa. A maior parte dos animais apresenta-se com linfadenomegália e sem sintomatologia clínica, apesar de alguns surgirem com sintomas pouco específicos como anorexia, perda de peso, letargia e episódios de febre. Por vezes podem ocorrer infiltrações pulmonares difusas e hepatoesplenomegália (Vail & Young, 2007).

A forma digestiva representa cerca de 5 a 7% de todos os linfomas que atingem o cão (Madewell & Thesen, 1987, citado por Vail & Young, 2007). O linfoma digestivo primário atinge a submucosa e a lâmina própria do intestino delgado, sendo frequente a presença de úlceras superficiais, e podendo ocorrer ocasionalmente infiltração transmural da serosa (Vail & Young, 2007). Os principais sintomas que acompanham esta doença são pouco específicos (Couto, Rutgers, Sherding & Rojko, 1989) e caracterizam-se por perda de peso, anorexia, hipoproteinémia, má absorção (Leib & Bradley, 1987; Couto et al., 1989, citado por Vail & Young, 2007), vômito e diarreia (Leifert & Matus, 1986, citado por Vonderhaar & Morrison, 1998). O comprometimento dos linfonodos mesentéricos, fígado e/ou baço pode ou não estar presente (Madewell & Theilen, 1987, citado por Vonderhaar & Morrison, 1998) assim como zonas de inflamação linfoplasmocitária adjacentes ao tumor primário (Couto et al., 1989). Alguns estudos sobre a imunofenotipagem deste tipo de linfoma relatam que a maior parte é consistente com tipo B, apesar de estarem também descritos alguns casos do tipo T (Coyle & Steinberg, 2004).

A forma mediastínica caracteriza-se essencialmente por um aumento da dimensão dos linfonodos mediastínicos e/ou do timo (Vail & Young, 2007), correspondendo a cerca de 5% de todos os casos de linfoma (Madewell & Thesen, 1987, citado por Vail & Young, 2007). Os derrames pleurais são comuns, levando muitas vezes a dispneia, tosse, regurgitação, intolerância ao exercício e disfagia. Nos casos com compressão da veia cava anterior pode ocorrer edema cervical e da face (Leifert & Matus, 1986, citado por Vonderhaar & Morrison, 1998). A hipercalecémia surge com uma maior frequência neste tipo de apresentação associada muitas vezes a poliúria, polidipsia, anorexia, vômito, diarreia ou obstipação, depressão e arritmias cardíacas (Leifert & Matus, 1986 e Teske, 1994 citados por Vonderhaar & Morrison, 1998). A maioria das formas mediastínicas relatadas no cão são do tipo T (Ruslander, Gebhard, Tompkins, Grindem & Page, 1997, citado por Vail & Young, 2007).

O linfoma cutâneo é uma neoplasia pouco frequente (5%) no cão e com uma maior incidência em animais de idade avançada (Lower, 2001). É classificado em epiteliotrópico ou não epiteliotrópico. Este tipo tumoral é considerado uma variedade de linfoma extranodal (Jacobs, Messick & Valli, 2002). As lesões mais frequentes, geralmente pruriginosas, são os nódulos, placas, úlceras e eritema (Lower, 2001). A forma cutânea pode atingir também a mucosa oral, sob a forma de nódulos ou placas eritematosas (Lower, 2001), e provocar metástases noutros órgãos tais como os linfonodos, baço, fígado e medula óssea (Vail & Young, 2007).

O linfoma extranodal (<3% dos casos) inclui todas as outras formas e os sinais clínicos que o acompanham são geralmente inespecíficos ou estão directamente relacionados com o órgão envolvido (Vail & Young, 2007).

4.2 Classificação citológica, histológica e imunofenotípica

Ao longo dos tempos têm sido feitas várias tentativas com o objectivo de classificar o linfoma multicêntrico com base em critérios citológicos, histológicos e imunofenotípicos (Dobson et al., 2001). Desta forma foram feitas modificações à classificação humana com o intuito de a aplicar à espécie canina (Dobson et al., 2001).

Assim, não existindo ainda um consenso universal para um modelo único de classificação de tumores linfóides, surgem actualmente descritas a classificação de Rappaport, de Lukes-Collins, do “National Cancer Institutes of Health Working Formulation” (NCI-WF), de Kiel-Lennert, da “Revised European American Lymphoma” (REAL) e da Organização Mundial de Saúde (OMS).

A classificação de Rappaport tem por base a avaliação do padrão histológico de crescimento (folicular ou difuso) e as características citológicas do tumor (bem diferenciado, pouco diferenciado ou histiocítico) (Rappaport, Winter & Hicks, 1956, citado por Vail & Young, 2007). Uma vez que os LMCs com um padrão folicular são pouco frequentes, este sistema de classificação acaba por não ter uma boa aplicabilidade na espécie canina (Greenlee et al., 1990). Além disso, não providencia um valor de prognóstico significativo em relação à resposta à terapêutica, à duração da remissão e ao tempo de sobrevivência (Weller, Holmberg, Theilen, Madewell, 1980a), em parte devido ao facto de no subgrupo de linfomas histiocíticos estarem incluídos tumores com diferentes características morfológicas e imunofenotípicas (Vail & Young, 2007).

A classificação de Lukes e Collins associa as características morfológicas de um LM a um determinado fenótipo, acabando também por se tornar pouco aplicável à espécie canina uma

vez que os grupos citológicos são heterogêneos em termos imunológicos (Greenlee et al., 1990).

O sistema de classificação do NCI-WF e uma atualização do Kiel-Lennert têm vindo a ser adaptados com sucesso aos tumores caninos (Teske et al., 1994a), uma vez que ambos se baseiam em técnicas histológicas facilmente aplicáveis a esta espécie (Jacobs et al., 2002). O sistema NCI-WF, amplamente utilizado nos Estados Unidos da América na classificação do linfoma humano (Jacobs et al., 2002), foi desenvolvido para permitir uma melhor compreensão entre as várias classificações existentes (Vail & Young, 2007). Este sistema categoriza o tumor exclusivamente através dos critérios morfológicos (Vail & Young, 2007) e classifica a malignidade em três graus (baixo, intermédio e alto) (Valli, Jacobs, Parodi, Vernau & Moore, 2002), estando estes relacionados com a biologia tumoral e com a sobrevivência do paciente (Vail & Young, 2007). No entanto, não inclui qualquer informação acerca da imunofenotipagem do tumor (Vail & Young, 2007).

O Sistema Kiel-Lennert, largamente usado na Europa (Jacobs et al., 2002), baseia-se na morfologia e composição celular (centroblástica, centrocítica, imunoblástica, linfoblástica, plasmocítica, linfocítica), no padrão de crescimento histológico (folicular ou difuso) e na imunofenotipagem das células tumorais, B e T (Lennert & Feller, 1992). Nesta classificação o linfoma é dividido em dois grupos, os de baixo grau, constituídos principalmente por células pequenas (citos), e os de alto grau, constituídos predominantemente por células médias ou grandes (blastos) (Lennert & Feller, 1992). Este sistema divide também o linfoma em dois subgrupos, tendo por base a imunofenotipagem (B e T) (Valli et al., 2002).

Tanto na classificação de Keil como na NCI-WF os linfomas de baixo grau, compostos por células pequenas e com índice mitótico baixo, progridem lentamente e estão associados a tempos de sobrevivência mais longos. Por outro lado, os de alto grau, com um índice mitótico elevado, progridem rapidamente mas respondem melhor à abordagem terapêutica com quimioterapia (Vail & Young, 2007). Apenas uma pequena percentagem de linfomas no cão é considerada de baixo grau, cerca de 12% a 40% (Teske, Van Heerde, Rutteman, Kurzman, Moore & MacEwen, 1994a; Teske, Wisman, Moore & Van Heerde, 1994b; Fournel-Fleury et al., 1997; Correia, 2006), sendo que a maior parte deles tem origem nas células T (Fournel-Fleury et al., 1997). Por outro lado, os de alto grau, surgem associados mais frequentemente ao fenótipo B (Fournel-Fleury et al., 1997). A incidência do LMC com origem nas células T é cerca de 22 a 37,9%, correspondendo os das células B a cerca de 71% a 79% (Teske et al., 1994b; Fournel-Fleury et al., 1997a; Ruslander et al., 1997; Fournel-Fleury et al., 2002b; Correia, 2006). Apenas 2% a 5% dos animais apresentam linfoma nulo (sem reacção com os anticorpos para células B ou T) (Teske et al., 1994b; Ruslander et al., 1997). A maior

prevalência de uma proliferação de células B nas neoplasias linfóides pode ser explicada, em parte, pelo facto de durante a diferenciação as células B sofrerem um maior número de rearranjos genómicos devido à produção das imunoglobulinas. Desta forma, estas células tornam-se mais susceptíveis a alterações neoplásicas (Tasca, Carli, Caldin, Menegazzo, Furlanello & Gallego, 2009). No entanto, num estudo de Moreno, Frederico e Bracarense (2007) a ocorrência de linfomas das células T em cães foi de 53,5%, sendo esta alta incidência devida, segundo os autores, a uma provável existência na região do Brasil de factores ambientais que contribuam para o aparecimento deste tipo tumoral.

O sistema REAL baseia-se no princípio de que uma classificação é uma lista de entidades oncológicas, sendo estas definidas pela combinação das características morfológicas, imunofenotípicas, alterações genéticas e quadro clínico. A importância de cada um destes parâmetros varia entre as diferentes doenças, não havendo um mais importante que todos os outros (Harris et al., 2000).

A OMS Veterinária (2002) publicou também uma classificação de LM, tendo por base a Classificação REAL, para a definição de categorias histológicas para os tumores hematopoiéticos nos animais de companhia (Valli et al., 2002). Este sistema seguiu a classificação humana, com o objectivo de facilitar o intercâmbio de conhecimentos e realização de estudos comparativos entre medicina humana e veterinária (Correia, 2006). Esta classificação incorpora tanto os critérios morfológicos como imunológicos, dividindo os tumores hematopoiéticos em dois grupos, o linfóide e o mielóide (Valli et al., 2002). A classificação dos tumores do sistema linfóide encontra-se descrito na Tabela 2.

Esta classificação da OMS representa um passo bastante importante em oncologia veterinária, uma vez que permite a identificação de várias entidades oncológicas, revistas com base em conhecimentos científicos recentes. Apesar disso, são necessárias mais investigações e estudos nesta área (Vail & Young, 2007).

Tabela 2 - Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos nos Animais Domésticos da OMS (adaptado de Valli et al., 2002).

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

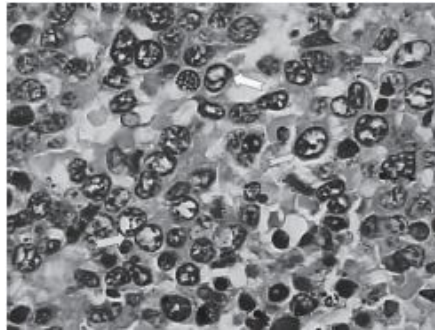
4.2.1 Caracterização dos LMC estudados

Em seguida são descritos os LMC que surgiram ao longo do período em que decorreu este estudo.

O LM imunoblástico (Figura 4) é constituído principalmente por imunoblastos, podendo estar ainda presentes outras células, entre elas os centroblastos. Os imunoblastos são células grandes, com um núcleo central e geralmente único, citoplasma abundante e intensamente

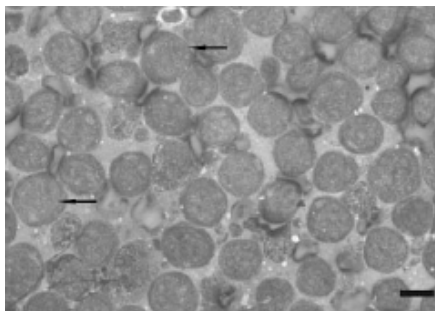
basófilo. O linfoma imunoblástico pode apresentar células com ou sem diferenciação em plasmócitos ou plasmoblastos, podendo nestes casos o tumor ser identificado morfológicamente como do tipo B (Lennert & Feller, 1992). Os LM imunoblásticos são raros nos cães (Fournel-Fleury et al., 1992).

Figura 4 – Linfoma de alto grau de malignidade tipo imunoblástico. Presença de células pleomórficas (setas). HE 40x (Moreno, Frederico & Bracarense, 2007).



O LM centroblastico, constituído por centroblastos e imunoblastos, pode ter origem primária ou surgir secundariamente a outro linfoma. Os centroblastos são células com tamanho grande, núcleo redondo com cromatina fina, 2 a 4 nucléolos e citoplasma escasso e basófilo.

Figura 5 - Linfoma centroblastico monomórfico. População celular densa e homogênea de células grandes e núcleos redondos, com nucléolos pequenos e proeminentes (setas). Citoplasma basófilo. Corado com May-Grunwald-Giemsa (Sözmen, Tasca, Carli, De Lorenzi, Furlanello & Caldin, 2005).

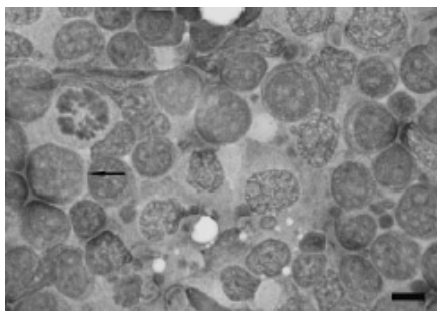


Barra no canto inferior direito = 5 μ m

Os linfomas centroblasticos são definidos como monomórficos (Figura 5), quando mais de 60% das células tumorais são centroblastos, e polimórficos (Figura 6), quando mais de 10% das células são imunoblastos. Segundo Lennert e Feller, (1992) este tipo de linfoma pode ainda ser dividido em mais 2 subtipos. O multilobado, onde mais de 10 a 20% das células apresentam núcleo lobado, e o centrocitóide constituído por células relativamente pequenas

com características morfológicas intermédias entre o centroblasto e o centrócito. (Lennert & Feller, 1992). Num estudo de Correia (2006) através da classificação citológica identificaram-se 33% de LMC centroblástico. Desta forma este tipo de linfomas corresponde aos mais frequentes nos canídeos (Correia, 2006; Gelain, Mazzilli, Riondato, Marconto & Comazzi, 2008).

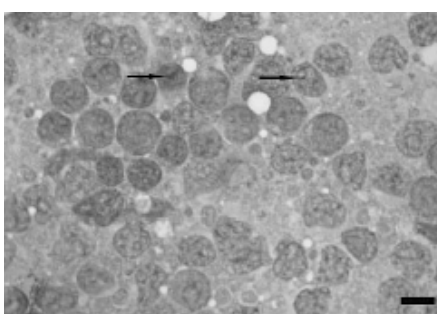
Figura 6 - Linfoma centroblástico polimórfico. Mistura de células pequenas com múltiplos nucléolos e centroblastos (seta). Corado com May-Grunwald-Giemsa. (Sözmen et al., 2005).



Barra no canto inferior direito = 5 μ m

Os LM linfoblásticos (Figura 7) possuem células de tamanho médio com núcleo geralmente redondo, cromatina fina e 1 a 3 nucléolos discretos, citoplasma escasso e fracamente basófilo. O índice mitótico é geralmente elevado (Lennert & Feller, 1992).

Figura 7 - Linfoma linfoblástico. Células pequenas com cromatina aglomerada, múltiplos nucléolos e espessamento perinuclear (setas) e um fino halo basofílico no citoplasma. Corado com May-Gruwald-Giemsa (Sözmen et al., 2005).



Barra no canto inferior direito = 5 μ m

5. Manifestações clínicas e síndromes paraneoplásicas

5.1 Sinais e sintomatologia clínica

Os sinais e sintomas clínicos que surgem associados ao LMC são variados e dependem da extensão e da localização do tumor. O LM multicêntrico é caracterizado por uma linfadenomegália superficial generalizada e não dolorosa, sendo este o sinal mais consistente

da doença (Figura 8). Inicialmente a linfadenomegália pode estar restrita aos linfonodos submandibular e pré-escapular (Vail & Young, 2007). Os linfonodos afectados podem-se encontrar muito aumentados, com cerca de 5 a 15 vezes a dimensão normal (Couto, 2009).

Figura 8 - Linfadenomegália superficial generalizada em canídeo com LM:

a- linfadenomegália dos submandibulares; b- linfadenomegália inguinal; c- linfadenomegália dos poplíteos (fotografias originais).



a)

b)

c)

Os sinais clínicos são, duma forma geral, pouco específicos e apenas cerca de 10 a 40% dos canídeos estão clinicamente doentes (sub-estadio b) (Chun, Garrett & Vail, 2000; Moore et al., 2001; Garrett, Thamm, Chuan, Dudley & Vail, 2002; Williams et al., 2004; Hosoya et al., 2007).

Os sinais clínicos mais comuns incluem perda de peso acentuada (Figura 9), letargia, anorexia, poliúria/polidipsia (Vail & Thamm, 2005), episódios de febre, vômito, diarreia, melena e dispneia (Vail & Young, 2007).

Figura 9 - Perda de peso acentuada em canídeo com LM (fotografia original).



Podem surgir edema subcutâneo e tosse associados a alterações na drenagem linfática ou compressão das vias respiratórias devido à linfadenomegália (Couto, 2009). As alterações oculares (uveíte anterior, hipopion, hifema, infiltrados) podem estar presentes em aproximadamente 20 a 25% dos canídeos (Ogilvie, 2004). Podem também surgir alterações ao nível da medula óssea, pele, rins e sistema nervoso central (Couto, 2009).

Segundo um estudo de Blackwood et al. (1997), aproximadamente 76% dos cães com LM multicêntrico apresentam alterações torácicas detectadas radiograficamente. A alteração mais comum é a linfadenomegália supraesternal, correspondendo a cerca de 40% dos casos, seguida da linfadenomegália traqueobrônquica (33%), mediastínica cranial (26%) e o aumento do timo (7%). A infiltração pulmonar surge em 37% dos animais e as alterações pleurais em 23% dos casos, sendo que 8% apresentam derrame pleural (Blackwood et al., 1997).

As principais manifestações do comprometimento abdominal, observadas em aproximadamente 82% dos casos (Blackwood et al., 1997), correspondem, na maior parte das vezes, a estados mais avançados da doença multicêntrica (Vail & Young, 2007), consistem em linfadenomegália sublombar (75%) e hepatomegália (53%). A esplenomegália surge em cerca de 46% dos casos, frequentemente associada à hepatomegália. A tríade linfadenomegália sublombar e hepatoesplenomegália surge em aproximadamente 28% dos casos (Blackwood et al., 1997). Apesar de menos frequentes, podem também ocorrer linfadenomegália mesentérica, ascite e alterações peritoneais (Blackwood et al., 1997).

5.2 Alterações Laboratoriais

A anemia é uma das alterações laboratoriais mais frequentes e significativas (Bergman, 2001), surgindo em cerca de 38% dos casos de LMC (Madewell, 1986, citado por Bergman, 2001). Quando está presente é geralmente não regenerativa, normocítica e normocrômica, e está associada a doença crónica. Pode também ocorrer anemia regenerativa, por perda de sangue ou hemólise. A anemia pode surgir associada à trombocitopénia e a leucopénia (Vail & Thamm, 2005).

A trombocitopénia é uma alteração frequente em canídeos com linfoma, sendo mais prevalente e acentuada nos do tipo T. Além do potencial efeito da inflamação crónica, causada pelo envolvimento neoplásico de vários órgãos, a trombocitopénia pode resultar do consumo das plaquetas devido a coagulação intravascular disseminada, ou de mecanismos auto-ímmunes. Parece existir uma associação entre o LMC e a trombocitopénia imunomediada. Isto pode dever-se ao facto de durante a proliferação neoplásica as células perderem as suas

capacidades de supressão contra as doenças auto-imunes, contribuindo para a destruição imunomediada das células e levando ao desenvolvimento de citopénias (Tasca et al., 2009).

A presença de leucopénia ou leucocitose ocorre também em canídeos com este tumor, sendo a sua frequência de 19% e 32%, respectivamente. Com uma frequência idêntica surgem também as variações na contagem total dos linfócitos, correspondendo a linfocitose a 20% e a linfopénia a 25% (Teske, 1994, citado por Vonderhaar & Morrison, 1998). As causas da linfopénia no LMC incluem lise geral dos linfócitos, destruição dos linfócitos neoplásicos, supressão da maturação dos linfócitos ou alterações nos padrões circulatórios (Gauthier, Aubert, Abrams-Ogg, Woods & Bienzle, 2005). A linfocitose pode surgir associada a doenças linfoproliferativas, como é o caso do linfoma. No entanto, é por vezes pouco claro se se trata de um linfoma com linfocitose, ou de uma leucemia primária com posterior envolvimento dos linfonodos. Uma linfocitose persistente composta por linfócitos pequenos, maduros ou reactivos surge na maioria das vezes associada a linfoma ou a leucemia linfocítica crónica (Avery & Avery, 2007).

A existência de células neoplásicas em circulação no LMC indica a presença de leucemia, sendo esta relativamente frequente (Raskin & Krehbiel, 1989).

A hipercalcémia é uma síndrome paraneoplásica relativamente comum, atingindo 20 a 40% dos canídeos com LM. Os animais com a forma multicêntrica apresentam esta alteração em 10 a 20% dos casos (Couto, 2009).

As gamopatias monoclonais surgem tanto como manifestações hematológicas de linfoma, como síndromes paraneoplásicas. A hipergamoglobulinémia deve-se à produção excessiva de imunoglobulinas monoclonais produzidas pelas células plasmocitárias. Quando estas se tornam excessivas surgem os sinais clínicos de hiperviscosidade (Bergman, 2001).

O perfil lipoproteico pode estar alterado em cães que desenvolvem linfoma, nomeadamente colesterol total, VLDL colesterol e VLDL triglicéridos (lipoproteínas de muito baixo peso molecular), LDL triglicéridos (lipoproteína de baixo peso molecular) e as HDL colesterol e HDL triglicéridos (alto peso molecular). Estes parâmetros encontram-se, geralmente, acima dos valores obtidos nos animais normais (Ogilvie et al., 1994).

O metabolismo dos carboidratos é uma das alterações metabólicas mais sérias registada nos animais que desenvolvem neoplasias (Ogilvie, 2001). Vail, Ogilvie, Wheeler, Fettman, Johnston e Hegstad (1990) verificaram que os animais com LM têm uma curva de tolerância à glucose normal, mas concentrações de lactato e de insulina basais elevadas. Estas alterações metabólicas acontecem em parte devido ao facto do tumor metabolizar a glucose para obtenção de energia através da glicólise anaeróbia, formando o lactato como produto final (Ogilvie, 2001).

Embora estejam publicados vários estudos sobre as alterações metabólicas que acompanham os casos de LMC, poucos relatam a actividade enzimática das células tumorais. Num estudo de Washizu, Azakami, Bonkobara, Washizu e Arai (2005) realizado em 10 canídeos com LM não tratados e 5 saudáveis, analisou-se a actividade enzimática relacionada com o metabolismo energético. Os resultados deste estudo demonstraram haver uma produção energética elevada nas células tumorais, comparativamente ao observado em animais saudáveis (Washizu et al., 2005)

Em cães com linfoma multicêntrico verifica-se também um aumento nos valores séricos de ácido úrico e fósforo e diminuição da depuração da creatinina endógena em 24 horas (Page, Leifer & Matus, 1986).

As doenças infiltrativas, como é o caso do linfoma, podem causar alterações renais graves, quer duma forma iatrogénica (quimioterapia, antibióticos) quer devido às consequências da hipercalcémia por precipitação tubular e /ou alterações hidroelectrolíticas (Bergman, 2001). Contudo, a incidência de disfunção renal em cães com linfoma não complicado é baixa (Page et al., 1986).

5.3 Síndromes paraneoplásicas

Embora sejam reconhecidas mais frequentemente no ser humano, as síndromes paraneoplásicas ocorrem também em medicina veterinária. Podem surgir assim como um dos primeiros sinais de malignidade e correspondem a efeitos metabólicos, endocrinológicos e hematológicos de diversos tipos. As síndromes paraneoplásicas podem apresentar características próprias de certos tumores e estão frequentemente associadas a acções não invasivas. No entanto, podem apresentar consequências graves sendo necessária uma abordagem terapêutica destas complicações antes da instituição da quimioterapia (Bergman, 2001).

Algumas das alterações sistémicas mais frequentes secundárias a tumores são uma profunda debilidade e má nutrição, associada ou não a uma diminuição da ingestão de alimentos, respectivamente anorexia e caquexia. Estas são consideradas as principais síndromes paraneoplásicas em canídeos (Bergman, 2001).

Ogilvie, Walters, Fettman, Hand, Salman e Wheeler (1993) realizaram um estudo em canídeos com LM, com o objectivo de verificarem se a caquexia, associada a este tumor, poderia estar relacionada com o aumento do gasto energético e com a utilização de uma dieta rica em gordura. No entanto, concluíram que o gasto energético nos animais com LM diminuía transitoriamente em resposta à quimioterapia e à remissão, e não variava

significativamente com a dieta rica em gordura ou rica em carboidratos (Ogilvie et al., 1993).

Outra síndrome paraneoplásica muito importante e frequente no LMC é a anemia. Existem várias possibilidades para a causa de anemia em oncologia veterinária, nomeadamente anemia de doença crónica, anemia hemolítica imunomediada, anemia por perda de sangue ou microangiopatia hemolítica. No caso do LM a anemia ocorre predominantemente sobre a forma de anemia da doença crónica ou anemia hemolítica imunomediada (Bergman, 2001). A anemia da doença crónica é extremamente comum em tumores disseminados e/ou metastizados. Esta deve-se essencialmente a uma inflamação crónica associada à doença, a uma diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, a uma alteração do metabolismo do ferro ou a uma resposta deficiente da medula óssea à eritropoietina. O uso continuado da quimioterapia pode ser um factor bastante relevante na perpetuação deste estado não regenerativo (Bergman, 2001). Quanto à anemia hemolítica imunomediada adquirida, associada ou não a trombocitopenia, caracteriza-se por uma destruição prematura dos eritrócitos. Estas células são identificadas como um componente estranho ao organismo e são revestidas por auto-anticorpos, produzidos por vezes nas doenças linfoproliferativas sendo posteriormente destruídas pelos macrófagos e pelo sistema do complemento (Bergman, 2001). A trombocitopenia é também uma síndrome paraneoplásica comum no cão. Esta pode dever-se à diminuição da produção de plaquetas secundária ao envolvimento da medula óssea pelo tumor, ao decréscimo da capacidade da medula óssea em produzir megacariócitos e ao aumento do consumo, sequestro e/ou destruição imunomediada de plaquetas (Bergman, 2001).

A febre pode acompanhar uma variedade de tumores nos animais e surge como uma síndrome paraneoplásica que deve ser sempre tida em conta (Bergman, 2001). A patogénese da febre associada às neoplasias está associada ao excesso de produção de citocinas que estimulam a produção de prostaglandinas promotoras de febre (John, Patchell & Foon, 1997, citado por Bergman, 2001).

A hipercalcémia no LMC, como referido anteriormente, surge como uma síndrome paraneoplásica e está associada à produção secundária e ectópica de um péptido relacionado com a hormona da paratiróide (PTHrP) que estimula os osteoclastos na reabsorção óssea (Bergman, 2001).

A hipoglicémia paraneoplásica, as gamopatias monoclonais, a leucocitose neutrofilica e a eritrocitose, apesar de menos frequentes, podem surgir em cães associadas ao LM. A eritrocitose é pouco frequente como síndrome paraneoplásica. No entanto, pode surgir associada ao LM e pode estar directamente relacionada com um aumento da produção de

eritropoietina e/ou indirectamente com o excesso de eritropoietina provocada pela hipóxia renal (Bergman, 2001).

6. Diagnóstico

O LM pode ter origem em qualquer órgão ou tecido e é, na maioria das vezes, uma doença sistémica. Desta forma, torna-se importante a determinação da sua extensão, do envolvimento dos vários órgãos e das condições secundárias que ocorrem (McCaw et al., 2007).

Assim sendo, uma lista variada de procedimentos de rotina deve ser tida em conta para a elaboração de um diagnóstico definitivo e para o estadiamento do LMC (Vonderhaar & Morrison, 1998)

6.1 Exame físico

A abordagem clínica de qualquer doença deve ser sempre iniciada com um exame físico do paciente. Este, no caso de suspeita de linfoma multicêntrico, deve incluir a palpação atenta de todos os linfonodos acessíveis, por exame rectal inclusive (Vail & Young, 2007).

As mucosas devem ser inspeccionadas quanto à cor e presença ou ausência de sinais indicativos de alterações da coagulação, de forma a descartar suspeitas de anemia ou trombocitopénia (Vail & Thamm, 2005).

A palpação abdominal, procedimento presente em qualquer exame clínico, surge aqui com uma enorme importância, na medida em que nos pode revelar a presença e o grau de organomegália (fígado e baço), o espessamento da parede do intestino e/ou o envolvimento dos linfonodos mesentéricos (Vail & Thamm, 2005).

Através da auscultação podemos suspeitar do envolvimento torácico, seja pela presença de massas no mediastino e/ou de derrame pleural (Vail & Thamm, 2005).

O exame oftalmológico, incluindo a observação do fundo do olho, deve também ser realizado, podendo revelar algumas alterações, tais como uveítes (Massa, Gilger, Miller & Davidson, 2002), hemorragias da retina ou infiltrações oculares (Vail & Thamm, 2005).

6.2 Perfil hematológico, bioquímico e urianálise

Em animais suspeitos de LM, o perfil hematológico e bioquímico completo deve ser sempre realizado, já que as alterações hematológicas surgem frequentemente na forma multicêntrica (Vail & Thamm, 2005).

Além das alterações laboratoriais supracitadas, o hemograma permite-nos ainda observar linfócitos atípicos em circulação, que podem ser um indicativo do envolvimento medular ou da presença de leucemia (Vail & Young, 2007). No caso do perfil hematológico, as alterações devem-se essencialmente a infiltrações medulares, mau funcionamento do baço, doença crónica, síndrome paraneoplásica ou anomalias imunomediadas. A leucocitose pode dever-se a libertação de citocinas pelas células tumorais (Ettinger, 2003). Nos pacientes com anemia ou hemorragia deve ser incluída uma contagem de reticulócitos bem como estudos de alterações na coagulação (Vail & Young, 2007).

Quanto às manifestações bioquímicas são causadas pela libertação de citocinas ou por alterações nos vários órgãos devido à infiltração tumoral (Martineau, 2002), reflectindo geralmente o local anatómico envolvido na doença (Vail & Young, 2007). No caso de haver hiperproteinémia deve ser feita uma electoforese de proteínas para avaliar a presença de gamopatas monoclonais (Ettinger, 2003).

Deve ser realizada uma análise detalhada à urina, quando possível, para descartar alterações da função renal e do tracto urinário (Vail & Young, 2007). A densidade urinária é importante não só para avaliar a capacidade de concentração, mas também para a classificação da azotémia. Podem ocorrer proteinúria e glomerulonefrite, estando geralmente associadas à estimulação imune tumoral (Ettinger, 2003).

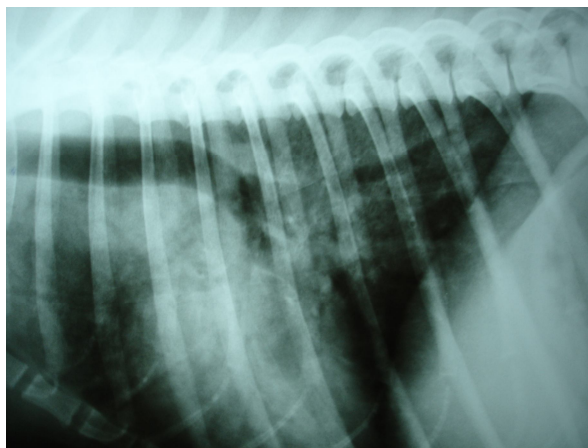
É de realçar que as alterações verificadas nos perfis bioquímicos e hematológicos não são específicos da doença e raramente servem para o diagnóstico definitivo de LM (Vail & Young, 2007).

No entanto, segundo um estudo de Tasca et al. (2009), existem diferenças significativas nos perfis hematológicos (presença de anemia, neutropénia e trombocitopenia) dos diferentes tipos de neoplasias hematopoiéticas.

6.3 Imagiologia

As imagens radiográficas (Figura 10), ecográficas e as obtidas por tomografia axial computadorizada (TAC) ou ressonância magnética nuclear (RMN) surgem como métodos auxiliares de diagnóstico importantes, principalmente nos casos em que a linfadenomegália periférica não está presente. São também necessárias no estadiamento clínico, de forma a determinar a extensão da doença e permitir o estabelecimento do prognóstico e da terapêutica (Ettinger & Feldam, 2005).

Figura 10 – Radiografia torácica em canídeo com LM



Padrão bronco-intersticial, deslocação da traqueia na zona perto da carina (devido a um possível aumento dos linfonodos traqueobrônquicos) e zona de radiopacidade de tecido mole perto das esternebras (possível aumento do linfonodo supra-esternal).

Segundo Vail e Thamm (2005) em caso de LM multicêntrico, apenas a radiografia torácica se demonstra relevante em termos de prognóstico, uma vez que não existe uma diferença significativa no prognóstico de animais com linfadenomegália generalizada (estadio III) ou com envolvimento hepático e esplênico com ou sem linfadenomegália generalizada (estadio IV). O facto de haver linfadenomegália mediastínica craneal demonstra-se um importante factor de mau prognóstico (Starrak, Berry, Page, Johnson & Thrall , 1997).

As técnicas de imagiologia aplicadas à zona abdominal permitem a avaliação da organomegália, linfadenomegália e ascite. Cerca de metade dos cães com linfoma multicêntrico apresentam alterações abdominais detectáveis radiograficamente (Blackwood et al., 1997; Starrak et al., 1997).

A ecografia abdominal é preferível principalmente em caso de sinais suspeitos de obstruções gastrointestinais, pancreatite e/ou alterações não detectáveis à radiografia (Ettinger, 2003).

A ecocardiografia deve ser sempre realizada antes da administração de quimioterápicos cardiotoxicos (doxorubicina) principalmente quando haja história de doença cardíaca já conhecida ou em canídeos de raças com pré disposição para cardiomiopatia (Ettinger, 2003).

Apesar dos seus preços elevados e de nem sempre estarem disponíveis, as técnicas de imagiologia mais complexas como TAC e a RMN, têm-se vindo a tornar cada vez mais frequentes na prática veterinária como métodos de diagnóstico complementar (Vail & Young, 2007). A TAC permite detectar com exactidão a presença, localização, tamanho e relações anatómicas de várias neoplasias, principalmente as que atingem a região cerebral (LeCouter, 2001). Por outro lado, a RMN, usada inicialmente para investigação da cavidade intracraniana, é actualmente aplicada numa forma cada vez mais frequente a outras partes do

organismo, sendo especialmente útil para tumores da medula, cabeça e pescoço, dorso e pélvis (Dennis, 2003). A aplicação da RMN aos pequenos animais é o método mais sensível, permitindo melhores decisões no tratamento e nas intervenções cirúrgicas através dum meio não invasivo que não utiliza radiação (Yasuda et al., 2004). No entanto, a TAC permite a obtenção de um diagnóstico mais rápido comparativamente à RMN (Dennis, 2003). Ambas as técnicas são excelentes na visualização de linfadenomegália, quando esta é demasiado discreta para ser detectada à radiografia, e na detecção de metástases (pulmonares, hepáticas, esplénicas, renais) (Dennis, 2003).

6.4 Diagnóstico citológico, histopatológico e imunofenotípico

O diagnóstico de LMC é feito através da avaliação citológica por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) do órgão afectado e/ou por uma avaliação histológica de amostras biopsiadas. No entanto, em certas ocasiões o uso de outros métodos, tais como a imunofenotipagem e as técnicas de diagnóstico molecular, podem melhorar a exactidão do diagnóstico e a compreensão do comportamento tumoral (Dickinson, 2008).

6.4.1 Exame citológico

A citologia, realizada através de PAAF, corresponde ao exame morfológico e individual das células obtidas duma amostra (Meyer, 2001), e tem vindo a ser considerada uma técnica de diagnóstico credível para o LMC (Dickinson, 2008). Segundo Couto (2009) 90% dos casos de LMC podem ser diagnosticados com sucesso por citologia.

Este método é utilizado duma forma generalizada no diagnóstico da doença por se apresentar como uma técnica simples, pouco dispendiosa, pouco invasiva e compensatória (Fournel-Fleury et al., 2002; Sözmen et al., 2005). Além disso permite, comparativamente aos exames realizados em cortes, uma melhor avaliação da morfologia celular, um diagnóstico rápido e múltiplas colheitas (Correia, 2006).

A linfadenomegália isolada ou generalizada constitui uma das indicações principais para a realização deste exame (Young, 2007), embora seja possível o estudo citológico de quase todas as áreas corporais através do avanço das técnicas de imagiologia (Meyer, 2001).

Uma importante aplicação da citologia é a capacidade de diferenciar lesões reactivas e hiperplásicas de processos tumorais (Meyer, 2001), e de distinguir neoplasias não linfóides de linfóides (Caniatti et al., 1996).

Quando se realiza um exame citológico deve fazer-se, em primeiro lugar, a diferenciação entre células normais e neoplásicas e de seguida proceder-se à classificação geral do tipo celular predominante (Meyer, 2001) (Tabela 3).

Tabela 3 - Critérios de malignidade citológica (adaptado de Rebar & Raskin, 2006).

Critérios de malignidade	Características citológicas
Geral	População celular uniforme
Núcleo	Mitoses frequentes e/ou anormais Dimensão do núcleo Racio núcleo/citoplasma variável Nucléolos múltiplos Nucléolos grandes e irregulares Padrões densos de cromatina Margem do núcleo irregular
Citoplasma	Acentuada basofilia Vacuolização
Estrutura	Carcinoma - células redondas ou ovais dispostas em grupo ou numa camada Sarcoma - células individuais fusiformes e alongadas <i>Discrete cell</i> - células individuais redondas ou ovais: com grânulos; com vacúolos; ou sem grânulos ou vacúolos

No caso das neoplasias de “*discrete cells*” (Tabela 3), estas incluem um grupo alargado de tumores com importância em medicina veterinária, entre eles o LM (Rebar & Raskin, 2006; Couto, 2009). As células neoplásicas presentes num LM são geralmente reconhecidas pela sua morfologia típica e são tradicionalmente classificadas como células redondas, não possuem aderências nem arranjos ordenados entre elas, sendo o termo “*discrete cells*” escolhido para enfatizar a individualidade celular (Meyer, 2001).

Duma forma geral, na aspiração dos linfonodos de um canídeo com LM, verifica-se que a maioria das células da amostra são de grandes dimensões com um nucléolo proeminente e um citoplasma basófilo, ou com uma cromatina fina sem nucléolos visíveis. Contudo, uma vez que na citologia a arquitectura dos tecidos não se mantém, a presença de uma hiperplasia reactiva, caracterizada por um aumento do número de células linfóides de grandes dimensões, pode ser difícil de diferenciar de LM (Vail & Young, 2007). Por outro lado, no caso de LM compostos por células de tamanho médio e pequeno, o diagnóstico, através da citologia, torna-se mais complicado pelo facto de estes possuírem apenas pequenos indícios citológicos de malignidade (Vail & Young, 2007; Couto, 2009).

Desta forma, e apesar de as características citológicas variarem consoante o tipo de LM, existem alguns aspectos a ter em conta. Duma maneira geral, uma densidade celular elevada (Correia, 2006) e uma população celular homogénea é uma característica marcante que surge

no LMC (Peleteiro, Correia, Carvalho, Pissarra & Fernades, 2006). Por outro lado, a fragilidade das células e o elevado índice mitótico surgem frequentemente associados a casos de alto grau de malignidade, apresentando-se as células “nuas” e com material nuclear livre. A variabilidade dos nucléolos no que diz respeito ao número, dimensão e localização, deve ser sempre observada (Correia, 2006).

A análise citológica da medula óssea está indicada para proceder ao estadiamento clínico completo, e nos casos em que há anemia, linfocitose, neutropénia ou trombocitopénia para verificar se há ou não envolvimento medular (Vail & Young, 2007). A presença de alguns pró-linfócitos e linfoblastos em circulação pode indicar envolvimento medular. No entanto há que ter em conta que estas células são vistas também em casos de parasitismo gastrointestinal, anemia hemolítica imunomediada e em outras doenças imunomediadas.

A citologia de fluídos torácicos, fluídos cerebrospinais e de massas intracavitárias surgem como testes auxiliares (Ettinger, 2003) que estão indicados nos casos de derrame pleural, alterações do sistema nervoso central ou massas intratorácicas, respectivamente (Vail & Young, 2007).

Uma boa caracterização celular do LMC permite assim obter numerosas informações, quer no estabelecimento do tratamento, quer na elaboração do prognóstico (Jacobs et al., 2002). Desta forma, a presença de células pouco diferenciadas (linfoma de alto grau de malignidade) com um elevado índice mitótico constitui um melhor prognóstico, uma vez que apresenta respostas mais positivas à quimioterapia. Da mesma maneira, se as células forem pequenas (baixo grau) respondem pior ao tratamento (Jacobs et al., 2002).

Apesar das limitações que o exame citológico apresenta, nomeadamente a incapacidade de uma correcta avaliação das alterações estruturais dos tecidos, este tipo de exame possibilita uma vasta informação útil para o diagnóstico (Peleteiro et al., 2006).

6.4.1.1 Técnica citológica

As colheitas das amostras obtidas por punção aspirativa por agulha fina dos linfonodos (figura 11) ou massas são realizadas com a utilização de um punho de aspiração, seringas de 10 c.c. e agulhas finas, de 22G. A entrada do material para o corpo da seringa deve ser evitada, uma vez que deixa de ser recuperável (Peleteiro et al., 2006).

Figura 11 - PAAF de linfonodo em canídeo com aumento do linfonodo pré-escapular (fotografia original).



A amostra deve ser colhida, no mínimo, de 2 linfonodos (Correia, 2006) ou massas, de forma cuidadosa e evitando o vácuo excessivo. Os linfonodos mandibulares que drenam a região da orofarínge, e os mesentéricos, que drenam o tracto gastrointestinal, apresentam-se frequentemente reactivos, devendo por isso ser evitados para este tipo de diagnóstico, a menos que sejam a única amostra possível. Também os casos em que a linfadenomegália é demasiado evidente, ou em que existe necrose do centro do linfonodo não são a melhor opção (Young, 2007).

Para a colocação na lâmina do material recolhido na agulha, esta deve ser separada da seringa na qual se introduz ar. Após se fixar novamente a agulha expulsa-se o seu conteúdo sobre uma ou mais lâminas. A quantidade aplicada em cada lâmina para o esfregaço deve ser reduzida de forma a obter-se uma camada fina em que as células se dispõem numa camada única (Peleteiro et al., 2006).

Uma preparação cuidada da amostra torna-se essencial não só para facilitar os diagnósticos diferenciais atrás descritos, mas também para evitar a lise celular, uma vez que as células são extremamente frágeis (Young, 2007).

Os problemas que podem surgir numa PAAF dos linfonodos e que se podem opor ao diagnóstico definitivo de LM incluem a recolha de um número insuficiente de células intactas ou uma pobre preservação das células linfóides, devida por exemplo a uma pressão negativa exercida pela seringa (Dickinson, 2008).

A fim de otimizar a proporção de células intactas obtidas, existem já clínicos a optar por este método sem a utilização da seringa, fazendo-se uma punção sem aspiração (Dickinson, 2008). Nesta técnica a agulha (idêntica à utilizada na PAAF) é introduzida no órgão até atingir a profundidade desejada, podendo-se aplicar movimentos suaves de modo a libertar o máximo de células para a amostra. De seguida, a agulha é retirada da lesão e é-lhe acoplada uma

seringa cheia de ar que permitirá empurrar o conteúdo da agulha para a lâmina (Peleteiro et al., 2006).

No caso da aspiração feita à medula óssea as agulhas utilizadas são de 20 G e as seringas de 5 c.c.. O material pode ser obtido facilmente da medula óssea das costelas (acima da transição costocontral na 10^a ou 11^a costela) em animais com mais de 5kg de peso, ou da fossa trocântérica do fémur, crista do íliaco e extremidade proximal do úmero, em animais com menos de 5 kg. A inserção da agulha deve ser feita com firmeza até se sentir que penetrou no osso inserindo-se nessa altura a seringa sem punho (Peleteiro et al., 2006).

A coloração dos esfregaços é habitualmente feita com o método de Giemsa (Peleteiro et al., 2006).

6.4.2 Exame Histológico

Apesar da citologia, por si só, poder em muitos casos dar ao clínico um diagnóstico definitivo de LM, a biópsia dos tecidos afectados deve ser, sempre que possível, incluída na lista de métodos a utilizar. Além de permitir o diagnóstico da doença, a análise histológica possibilita a determinação do comportamento biológico do tumor, ajudando na compreensão da extensão e tipo de tratamento a aplicar (Withrow, 2001).

O principal objectivo desta técnica é a obtenção de uma amostra de tecido neoplásico suficiente para o estabelecimento de um diagnóstico. Os métodos mais utilizados são a biópsia por agulha (agulhas “Tru-Cut” ou “Vet-Core”), biópsia por “punch”, biópsia incisional e a biópsia excisional (Withrow, 2001).

O método aconselhado depende do tecido alvo. No caso dos linfonodos a extirpação cirúrgica e a avaliação de todo o linfonodo surge como a técnica mais indicada, já que torna possível a observação de toda a arquitectura e envolvimento neoplásico do órgão (Dickinson, 2008). Os linfonodos mais acessíveis e mais facilmente removíveis para este tipo de exames são o poplíteo (Moore, 2005) e o pré-escapular (Vail & Young, 2007). Para o caso dos órgãos internos, a biópsia cirúrgica é a melhor opção. Se o paciente apresentar riscos anestésicos acrescidos, deve recorrer-se a uma biópsia incisional ou com agulha “tru-cut” ecoguiada (Ettinger, 2003; Dickinson, 2008).

O exame histopatológico deve iniciar-se por uma observação simples ao microscópio usando colorações de rotina de Hematoxilina-Eosina (HE). Deve-se começar por pequenas ampliações para a visualização de todo o tecido e avaliação do padrão histológico de crescimento (Powers, 2001): tipo folicular ou difuso (Harris et al., 1994). De uma maneira

geral, é possível através destas ampliações diferenciar um tecido tumoral de um reactivo e, por vezes, reconhecer o tipo tumoral (Powers, 2001).

Aproximadamente 85 a 90% dos casos que surgem em oncologia humana e veterinária podem ser diagnosticados através destes exames de visualização ao microscópio óptico com colorações simples e de rotina (Pfeifer & Wick, 1991, citado por Powers, 2001). Contudo, o resultado da análise da morfologia celular pode ser ambíguo em diversos tipos de proliferações linfocitárias não neoplásicas, tais como nas inflamações por estímulo antigénico devido a infecções ou doenças auto-imunes, levando a uma sobreposição com a morfologia das células linfóides neoplásicas (Dickinson, 2008). Desta forma pode ser necessário recorrer a colorações especiais ou procedimentos mais especializados, tal como a imunocitoquímica ou imunohistoquímica, técnicas de diagnóstico molecular e PCR, para o diagnóstico de LM (Couto, 2009).

6.4.3 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem é usada para a identificação de marcadores dos linfócitos através de uma vasta gama de anticorpos, permitindo o reconhecimento dos diferentes tipos celulares (B e T) (Dickinson, 2008).

Por vezes, a sensibilidade para detectar precocemente células tumorais entre uma população de células não neoplásicas torna-se limitada através dos métodos citológicos e histológicos (Dickinson, 2008). Nestes casos, o diagnóstico de LM pode ser feito através da imunofenotipagem, onde se observa a presença duma população homogénea de células com o mesmo fenótipo (Vail & Young, 2007).

6.4.3.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite uma análise rápida e individual de uma grande quantidade de células (dezenas a milhares de células) e que tem por base a utilização de substâncias fluorescentes ligadas a anticorpos que coram especificamente determinados constituintes celulares (Cullen et al., 2002).

Esta técnica permite obter quer a imunofenotipagem das células tumorais e uma análise do DNA, permitindo a avaliação da ploidia, quer a determinação da actividade proliferativa celular (Gibson et al., 2004).

6.4.3.2 Imunohistoquímica e imunocitoquímica

A imunofenotipagem pode ser aplicada a amostras citológicas (imunocitoquímica) ou a cortes de tecidos (imunohistoquímica) para a identificação do tipo celular (Vail & Young, 2007).

Painéis de diferentes anticorpos (Ac) são aplicados às amostras para serem examinadas, e os padrões resultantes da sua expressão permitem a diferenciação e classificação das diferentes células (Morrison, 2007).

Os Ac disponíveis no mercado são, na maioria dos casos, os utilizados no ser humano, podendo ou não apresentar reactividade cruzada quando utilizados na espécie canina. Além disso, poucos são os desenvolvidos para permitir a detecção de antígenos celulares em tecidos fixados com formalina (Morrison, 2007).

Apesar de bastante valiosas na identificação de determinados tumores, a imunocitoquímica e a imunohistoquímica apresentam algumas desvantagens. No caso de se estar na presença de um tumor com células pouco diferenciadas, ou perante algumas dificuldades técnicas, podem obter-se falsos negativos nesta técnica. Ou seja, a ausência de coloração não descarta a possibilidade da existência de determinado tipo celular. Uma das principais causas para este problema é a sobrefixação, que deve ser evitada para garantir a conservação da estrutura antigénica (Powers, 2001).

A imunohistoquímica pode também ser útil na avaliação da actividade proliferativa dos LMCs, através da medição da percentagem de células marcadas positivamente com o anticorpo Ki-67 (Powers, 2001). Esta proteína reconhece um antígeno nuclear que está presente durante todas as fases activas do ciclo celular (G_1 , S, G_2 , e mitose), apresentando-se como um excelente marcador na determinação da fracção de crescimento duma determinada população celular (Gerdes et al., 1991).

6.5 Técnicas de diagnóstico molecular

6.5.1 AgNORs

A quantificação de regiões de organizadores nucleolares corados pela prata (AgNORs) apresenta-se como uma técnica disponível, com valor prognóstico no LMC. Os organizadores nucleolares (NORs) são regiões das ansas de ADN no nucléolo, que contêm os genes que codificam para o ARN ribossomal (Valdovich, Psáder, Tóth & Perge, 2004). Em virtude da argirofilia das proteínas associadas a estas regiões, a maioria das técnicas correntes usadas na sua visualização baseiam-se na coloração pela prata (Correia, 2006).

A possibilidade de diagnóstico inerente à contagem de AgNORs surgiu há cerca de 15 anos. Desde aí foram várias as experiências realizadas em medicina humana, que demonstram que o número de AgNOR's está significativamente mais elevado nos tumores malignos do que nos processos reactivos, fisiológicos e benignos (Valdovich et al., 2004).

Em medicina veterinária a técnica AgNOR's, a partir de amostras citológicas e histológicas, tem-se demonstrado capaz de distinguir os casos de LM consoante o prognóstico, bom ou mau (Teske et al., 1994a; Kiupel et al., 1999).

O aumento do número de AgNOR's nos casos de LM pode dever-se à proliferação celular e a um elevado grau de síntese de ARNr que caracteriza as células tumorais quando comparadas com as células normais.

Os principais problemas associados a esta técnica são, por um lado, a diversidade de parâmetros e interpretações, e por outro a dificuldade no estabelecimento de um protocolo padrão, devido à dependência dos factores externos do protocolo de coloração, como a fixação, a temperatura e o tempo de coloração. Surge assim a necessidade de programas informáticos de análise de imagens que permitam avaliar os AgNORs, de forma a evitar erros que lhe possam estar inerentes (Kiupel et al., 1999).

6.5.2 Marcadores tumorais

Várias tentativas têm sido feitas para a utilização de marcadores tumorais na detecção e monitorização do LMC (Burnett, Vernau, Mondiano, Olver, Moore & Avery, 2003).

A medição da actividade sérica da timidina quinase (TK) pode ser usada como um valioso marcador tumoral para o prognóstico e para prever a recidiva da doença, após a quimioterapia e antes de ser possível a detecção clínica (Von Euler, Einarsson, Olsson, Lagerstedt & Eriksson, 2004). Os resultados obtidos por Von Euler et al. (2004) apresentam-se como promissores na medição da actividade sérica da TK e para o uso deste marcador em oncologia veterinária, apesar do método utilizado limitar a sua medição na prática clínica. Por isso, Von Euler, Rivera, Aronsson, Bengtsson, Hansson e Eriksson (2008) desenvolveram um novo método não radioactivo para a medição desta enzima, tendo demonstrado a sua viabilidade na determinação da actividade da TK em cães com LM e a possibilidade de uma maior utilização por parte dos clínicos.

Num estudo de Nielsen, Toft, Eckersall, Mellor e Morris (2007) verificou-se a importância da determinação da concentração sérica da proteína C reactiva (pCr) na identificação da remissão completa da doença após o tratamento com fármacos citotóxicos. Contudo, surgem algumas

limitações, entre elas a existência de variações individuais entre os canídeos (Nielsen et al., 2007).

A medição dos níveis séricos da α -1-ácido glicoproteína (Hahn, Freeman, Barnhill & Stephen, 1999) e das metaloproteinases da matriz (MMPs) (Newman et al., 2008), têm vindo a ser sugeridas como método de diagnóstico e de prognóstico na determinação da recidiva da doença. Contrariamente a outros estudos desenvolvidos, Newman et al. (2008) não encontram diferenças significativas na expressão da MMP-2 ao nível do ARN em amostras de linfonodos de cão com LM e normais. Também não foi encontrada uma associação entre os níveis da MMP-2 ou 9 com o estadio, resposta ao tratamento ou tempo de sobrevivência.

A detecção imunohistoquímica da proteína Pax 5 demonstrou-se, num estudo de Willmann, Müllauer, Guija de Arespacochaga, Reifinger, Mosberger e Thalhammer (2009), como um possível marcador na caracterização da linhagem do linfoma não-Hodgkin's canino. No entanto, são necessários estudos adicionais para justificar e alargar o seu uso a outras neoplasias linfóides caninas.

A amostra para a análise citogenética de um tumor deve ser preferencialmente obtida do tecido afectado. Quando a análise tumoral é impraticável ou impossível, o sangue periférico é uma alternativa viável, pois as aberrações cromossomais podem ser detectadas a partir do sangue periférico em cães com LM não tratados (Devitt, Maranon, Ehrhart & Lana 2009). No entanto, a correspondência entre as aberrações presentes no sangue e no tumor necessitam ainda de ser determinadas, podendo este método surgir como uma boa alternativa na monitorização de cães com LM durante o curso do tratamento (Devitt et al., 2009).

Assim, estes e outros marcadores poderão tornar-se potenciais meios de diagnóstico, usados futuramente em medições de rotina em medicina veterinária (McCaw et al., 2007).

6.6 Outras técnicas

6.6.1 Actividade da telomerase

Uma outra técnica utilizada na identificação de uma neoplasia, é a avaliação da actividade da telomerase. Os telómeros são estruturas especializadas que correspondem a sequências repetidas de ADN, localizando-se na extremidade dos cromossomas. Devido à natureza da replicação do ADN, estas sequências vão encurtando ao longo de cada divisão celular, funcionando como um relógio mitótico, que governa a senescência natural nas células normais. Uma actividade anormal da telomerase registada em células neoplásicas de cães, tem sido investigada como um alvo para a quimioterapia e como um meio de diagnóstico de

neoplasias (Vonderhaar & Morrison, 1998). Também nos casos de LM esta alteração na actividade enzimática tem servido como método de diferenciação entre células normais e alteradas (Vonderhaar & Morrison, 1998). Contudo, segundo Carioto, Kruth, Betts e King, (2001) a actividade da telomerase não difere significativamente entre os linfonodos neoplásicos e normais.

6.6.2 PCR (Polymerase chain reaction)

Apesar do diagnóstico de LM em estado avançado ser, na maior parte dos casos, fácil de realizar citológica ou histologicamente, existem apresentações da doença que tornam o diagnóstico um desafio (Burnett et al., 2003). Entre eles encontram-se os estados iniciais do tumor, muitas vezes confundidos com hiperplasias linfóides; os fluidos de cavidades contendo um elevado número de pequenos linfócitos com aparência de células maduras; os casos de linfocitose ligeira ou crónica; as amostras não representativas da lesão e a presença de um pequeno número de linfócitos atípicos no aspirado por agulha fina. Desta forma foi necessário encontrar métodos mais objectivos e sensíveis no diagnóstico de LMC (Burnett et al., 2003).

A partir de uma mistura complexa de ADN é possível, por PCR, sintetizar uma grande quantidade de cópias de um único fragmento específico (Prescott, Harley & Klein, 2005) e obter não só a distinção de populações de linfócitos reactivos e neoplásicos, mas também a detecção de resíduos mínimos de doença (Yamazaki et al., 2008).

A clonalidade é uma característica que está presente nos tumores malignos. Teoricamente uma população de células malignas deriva da expansão de um único clone caracterizado por uma região única de ADN. Assim, nos cães com linfoma das células T, todas as células tumorais devem ter a mesma sequência de ADN que codifica para a região variável do receptor das células T. Do mesmo modo, no linfoma das células B, todas as células tumorais devem ter sequências de ADN idênticas que codifiquem para a região variável dos receptores de imunoglobulinas (Vail & Young, 2007).

O uso desta técnica tem sido já descrito em cães e apresenta uma alta sensibilidade e especificidade na distinção entre linfadenopatia reactiva e linfoma (Couto, 2009).

Ao utilizar-se o PCR, há que ter em conta o facto de já terem sido registados linfomas malignos biclonais (Lennert & Feller, 1992), o que atribui à técnica um ponto negativo. Por outro lado, os limites de detecção de neoplasia pelo PCR dependem do tecido de onde é colhida a amostra. Nos tecidos não linfóides, esta técnica apresenta-se muito sensível permitindo a detecção de uma célula neoplásica em 1000, enquanto nos tecidos linfóides este grau de sensibilidade já não se verifica (Burnett et al. 2003).

A presença de células que não possuam receptores antigénicos para anticorpos de células B ou T, como é o caso das células NK, ou a presença de quantidade insuficiente de ADN na amostra, pode levar a resultados falsos negativos. Por outro lado, os falsos positivos surgem por exemplo em infecções crónicas por *rickettsia spp*, onde uma diversidade mínima de estímulos antigénicos pode levar à oligo ou monoclonalidade. Da mesma forma podem surgir bandas monoclonais se o ADN da amostra pertencer a apenas algumas células linfóides normais, ou se a qualidade do ADN for baixa (Dickinson, 2008).

Como referido anteriormente, outra utilização do PCR consiste na quantificação dos resíduos mínimos da doença. Estes correspondem a uma pequena quantidade de células malignas residuais, que se mantêm após terapêutica quimioterápica. A sua quantificação, através do PCR em tempo real, permitiu melhorar a compreensão da dinâmica do crescimento e regressão das células tumorais, mesmo em animais em remissão (Yamazaki et al., 2008).

6.7 Sistema de estadios clínicos da OMS para o linfoma maligno em animais domésticos

Depois de estabelecido um diagnóstico definitivo, é necessário proceder ao estadiamento clínico, isto é, determinar a distribuição e extensão da doença. Desta forma será possível monitorizar as condições de saúde e a resposta aos tratamentos, bem como determinar que protocolos de quimioterapia aplicar a cada caso (Flory, Rassnick, Stokol, Scrivani & Erb, 2007).

Nos últimos anos foram vários os métodos utilizados para determinar os estadios da OMS a que os animais com linfoma multicêntrico correspondem. No entanto, a existência de técnicas mais sensíveis como a radiografia, a ultrasonografia e a citologia de medula óssea têm vindo a modificar a forma de realizar o estadiamento clínico em canídeos (Flory et al., 2007). A utilização destes métodos torna possível a identificação precoce de lesões silenciosas ou assintomáticas até aí não detectáveis. Além disso, se a detecção da doença preceder o aparecimento dos sinais clínicos, o tempo de vida previsto para estes pacientes é maior, comparativamente àqueles em que sinais e doença surgem simultaneamente (Flory et al., 2007).

Tal como em humanos, o linfoma canino encontra-se incluído na classificação da OMS, que se baseia em critérios clínicos e clinicopatológicos, permitindo a determinação da extensão da doença e a sua relação com o prognóstico (Couto, 2009).

Neste tipo de classificação encontramos uma divisão do linfoma nos animais de companhia em cinco estadios e em dois sub-estadios cada um com as suas características (Tabela 4).

Tabela 4 - Sistema de estadios clínicos para o LM em animais domésticos da OMS (adaptado de Dobson & Lascelles, 2003).

Estadio	Características
I	Envolvimento limitado a um só linfonodo ou tecido linfóide de um só órgão, excluindo medula óssea
II	Envolvimento dos linfonodos de uma determinada região, com ou sem envolvimento das tonsilas
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos
IV	Envolvimento do fígado e baço, +/- estadio III
V	Manifestações no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou de outros órgãos, +/- estadios I ao IV
Sub-estadio	
a	Sem sinais sistémicos
b	Com sinais sistémicos

Os 80 a 85% dos casos de LM que correspondem à forma multicêntrica surgem duma maneira geral enquadrados no grau III ou IV desta classificação (Garrett et al., 2002).

7. Tratamento do linfoma maligno multicêntrico

Após o estabelecimento do diagnóstico de LM multicêntrico, é necessário decidir se se efectua ou não terapêutica.

Tendo em conta que o LMC é normalmente uma doença sistémica, a quimioterapia surge como a modalidade terapêutica mais adequada. Apesar disso, infelizmente, a taxa de cura é baixa em cães com LM (Ettinger, 2003) e o tempo médio de vida esperado para cães tratados é de 12 a 16 meses para a maioria dos casos, sendo que apenas 20 a 30% dos cães sobrevive 2 anos após o diagnóstico. Mesmo que um animal se apresente no estadio I da doença, a disseminação sistémica ocorre geralmente dentro de semanas a meses (Couto, 2009).

No início do tratamento as células tumorais são mais sensíveis à quimioterapia, sendo parcialmente eliminadas. No entanto, com o avançar do tempo, as células neoplásicas que se mantêm vão-se tornando gradualmente mais resistentes aos agentes quimioterápicos (Ettinger, 2003). Segundo alguns estudos, as células tumorais estão mais susceptíveis para expressar o gene que codifica para a P-glicoproteína (Vail & Young, 2007). Esta proteína transmembranar é responsável pelo transporte dos fármacos através da membrana. Desta forma, as células

tumorais com P-glicoproteínas podem ser responsáveis pelo transporte dos agentes quimioterápicos para fora das células, causando resistências à terapêutica (Papich, 2005).

Quando tratados, a maioria dos animais consegue manter uma boa qualidade de vida e o tratamento acaba por ser bastante gratificante, resolvendo muitos dos sinais clínicos e alterações que surgem com a doença (Ettinger, 2003) e permitindo obter uma remissão completa em cerca de 80 a 90% dos casos (Couto, 2009).

7.1 Quimioterapia

A quimioterapia é uma modalidade terapêutica cada vez mais frequente em oncologia veterinária e que tem por base o uso de fármacos citostáticos (Lana, 2003).

Quando se opta pela abordagem quimioterápica há que ter em conta alguma da terminologia que lhe está subjacente.

A primeira fase da terapêutica corresponde à indução da remissão e deve ser feita com um protocolo (semanal) mais intensivo que o utilizado na fase seguinte. A fase de manutenção tem por objectivo prolongar e manter a remissão e os tratamentos são feitos em média com intervalos de 2 a 3 semanas (Ettinger, 2003). Os protocolos de emergência incluem novos fármacos com o objectivo de induzir nova remissão (Ettinger, 2003).

Desta forma, os objectivos fundamentais da quimioterapia são a indução de uma primeira remissão do LM que dure mais que 6 meses, a reindução da remissão após uma ou mais recidivas (Ettinger, 2003) e finalmente a indução da remissão quando a resposta à terapêutica falha, sendo para isso necessária a introdução de novos fármacos não utilizados no protocolo inicial (Vail & Young, 2007).

Por remissão entende-se a resolução dos sinais clínicos, laboratoriais e das alterações observadas ao exame físico (Ettinger, 2003). A sua avaliação é feita usualmente com base na palpação ou medição dos linfonodos com dimensão normal, e no desaparecimento dos sinais paraneoplásicos e clinicopatológicos. Assim sendo, e como o descrito num estudo de Gauthier et al. (2005), os cães são considerados em remissão se todos os linfonodos palpáveis estiverem normais, se não houver organomegália detectada ao exame físico e se os proprietários descreverem o comportamento do cão como normal. Contudo, este tipo de diagnóstico é extremamente subjectivo e pode ser influenciado por alterações secundárias no linfonodo, tais como a fibrose ou a deposição de gordura. (Gauthier et al., 2005).

A remissão da doença pode ser definida como remissão completa (RC), remissão parcial (RP), doença estável (DE) ou doença progressiva (DP) (Tabela 5) (Ettinger, 2003).

Tabela 5 - Diferentes tipos de resposta à indução da remissão da doença (adaptado de Ettinger, 2003).

Resposta à terapêutica	Definição
Remissão completa (RC)	100% de redução das alterações detectadas inicialmente
Remissão parcial (RP)	>50% e < 100% de redução das alterações detectadas inicialmente
Doença estável (DE)	<50% de redução ou sem alterações ou sem novas lesões neoplásicas
Doença progressiva (DP)	>25% de aumento das alterações ou de novas lesões neoplásicas

Os termos recidiva e recaída estão associados ao reaparecimento dos sinais clínicos ou das alterações detectadas inicialmente ao exame físico.

Antes de cada sessão do tratamento deve ser realizado um hemograma. Só se deve realizar quimioterapia se os neutrófilos forem superiores a 2000/ μ l e as plaquetas superiores a 50,000/ μ l. Caso isto não se verifique deve-se esperar 5 a 7 dias e depois repetir-se a análise. Se o animal apresentar valores inferiores de neutrófilos e plaquetas antes do início do tratamento, devido a um possível envolvimento tumoral da medula óssea, é instituída uma quimioterapia mielossupressiva com o objectivo de combater estas citopénias (Vail & Young, 2007).

Existem actualmente vários protocolos de quimioterapia, com agentes únicos ou múltiplos, que são eficazes no tratamento do LMC. Os protocolos mais complexos e que incorporam um maior número de agentes quimioterápicos são os que oferecem aos pacientes caninos um tempo de remissão e de vida mais alargado. No entanto, estes exigem mais tempo e são mais onerosos. Por outro lado, os protocolos mais simples, apesar de menos tóxicos, proporcionam um tempo de remissão e de sobrevivência inferior ao obtido pelos tratamentos mais complexos (Ettinger, 2003).

Muitos dos veterinários oncologistas estão de acordo em dizer que, mais do que a obtenção da cura da doença, a abordagem paliativa surge como um dos principais papéis da terapêutica quimioterápica (Moore, 2005).

A escolha do protocolo adequado depende não só do paciente e das circunstâncias que o envolvem (estadio e sub-estadio da doença, presença/ausência de síndrome paraneoplásica,

estado geral do paciente), como também do proprietário e do médico veterinário responsável (Ettinger, 2003).

7.1.1 Protocolos quimioterápicos de agente único

A prednisona, prednisolona, ciclofosfamida, clorambucil, vincristina, doxorubicina, epirubicina, mitoxantrona e lomustina são exemplos de agentes quimioterápicos que podem ser administrados separadamente, em protocolos terapêuticos mais simples, na abordagem do LMC.

A prednisona e prednisolona têm sido associadas a uma remissão completa ou parcial em cerca de 50% dos canídeos (Ogilvie & Moore, 1995 citado por Vonderhaar & Morrison, 1998), apresentando tempos de remissão e de vida entre 1 a 4 meses (Vail & Young, 2007; Argyle, 2008). Isto significa que não existe um aumento no tempo de sobrevivência quando comparado com o esperado em animais não tratados. No entanto, apesar da resposta não ser prolongada, os canídeos apresentam melhorias clínicas significativas após a administração deste fármaco (Vonderhaar & Morrison, 1998). Um dos problemas decorrentes do uso isolado de glucocorticóides é o facto de estes poderem influenciar negativamente a resposta e a durabilidade da remissão se mais tarde se decidir pela aplicação de um protocolo quimioterápico mais agressivo (Vonderhaar & Morrison, 1998; Argyle, 2008). Por outro lado, uma vantagem do uso da prednisona ou prednisolona é não haver necessidade de uma monitorização do hemograma. Além disso os efeitos da administração crónica dos glucocorticóides (hiperadrenocorticism iatrogénico, poliúria, polidipsia, ulceração gastrointestinal, hepatomegália) (Lana, 2003) não têm tempo de se manifestar antes da morte do animal (Vonderhaar & Morrison, 1998).

A dose usual de prednisona e prednisolona é de 2 mg/kg PO, uma vez por dia durante 7 dias, seguida de 1 mg/kg PO uma vez por dia indefinidamente (Argyle, 2008).

A ciclofosfamida apresenta uma resposta semelhante ou ligeiramente superior à conseguida pela prednisona e prednisolona. A dose recomendada em canídeos varia consoante o protocolo, entre 50 mg/m², PO, um vez por dia durante 4 dias (McKnight, 2003), e 50 mg/m² em dias alternados, até 8 semanas (Kitchell, 2005). Alternativamente pode ser administrada na dose de 150 a 300 mg/m² EV cada 3 semanas (Kitchell, 2005), simultaneamente com furosemida (1 mg/kg) de forma a diminuir a incidência de cistite hemorrágica estéril (McKnight, 2003).

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

8mg/m²) (Lana, 2003), como um substituto da ciclofosfamida quando ocorre cistite hemorrágica estéril (Vonderhaar & Morrison, 1998).

A vincristina é um alcalóide eficaz contra o LMC que quando usado isoladamente permite obter tempos de remissão entre 3 a 6 meses (Vonderhaar & Morrison, 1998). Este é um fármaco importante no uso de protocolos mais complexos. O uso de vincristina como agente único na quimioterapia é realizado na dose de 0,5 mg/m² EV uma vez por semana. Esta dose pode ser aumentada gradualmente até um máximo de 0,75 mg/m², em cães de grande porte (Kitchell, 2005).

A doxorubicina é o fármaco mais eficaz, quando usado isoladamente, no tratamento do LMC (Vonderhaar & Morrison, 1998; Argyle, 2008), sendo administrado por via endovenosa lenta cada 21 dias num total de 5 doses ao longo de 15 semanas (Argyle, 2008). A dose é de 30mg/m² EV, sendo que em canídeos com peso inferior a 10 kg a dose é de 1mg/kg. Esta redução na dose deve-se ao aumento da toxicidade quando a dosagem é feita com base na superfície corporal (Lana, 2003). Além disso, as doses deverão estar de acordo com os resultados do electrocardiograma (Kitchell, 2005), pois este fármaco possui toxicidade cardíaca aguda e crónica (Mauldin, Fox, Patnaik, Bond, Mooney & Matus, 1992; McKnight, 2003). A dose máxima cumulativa que deverá ser administrada é de 180 a 240 mg/m², sendo que doses acima deste limite aumentam a probabilidade de falência cardíaca (Kisseberth, 2003).

A epirubicina é um análogo da doxorubicina que apresenta uma cardiotoxicidade inferior e um tempo de remissão e sobrevivência semelhante apresentando-se como uma alternativa viável (Vonderhaar & Morrison, 1998).

A mitoxantrona, usada como agente único no tratamento de cães previamente tratados ou não, não apresenta uma eficácia tão elevada como a doxorubicina (Ogilvie et al., 1991). No entanto, pode ser usada em sua substituição em canídeos com doença cardíaca concomitante (Vonderhaar & Morrison, 1998). A dose é de 5,5 mg/m² EV cada 3 semanas (Lana, 2003).

A lomustina (CCNU) pode ser considerada numa primeira abordagem terapêutica de agente único se o proprietário do animal pretender um tratamento mais simples e conveniente, já que as visitas à clínica são reduzidas devido à possibilidade da administração oral ser feita pelo proprietário do animal. No entanto estes devem estar cientes do curto período de tempo de sobrevivência esperado, em média 3 meses (Moore et al., 1999). Este fármaco é usado mais frequentemente nas recidivas do LM multicêntrico, na dose de 60 a 90mg/m² PO cada 3 semanas (Argyle, 2008).

7.1.2 Protocolos quimioterápicos de múltiplos agentes

A teoria subjacente à utilização de protocolos mais complexos é de que os fármacos, usados simultaneamente no mesmo plano terapêutico, devem ter diferentes mecanismos de acção, e eficácia em diferentes fases do ciclo celular. Desta forma é possível destruir um maior número de células tumorais, sem aumentar as resistências aos fármacos (Vonderhaar & Morrison, 1998).

O LMC é tipicamente tratado com protocolos cíclicos que englobam a combinação de alguns ou todos os seguintes agentes: ciclofosfamida, vincristina, prednisona, L-asparaginase e doxorrubicina (Garrett et al., 2002; Simon, Nolte, Eberle, Abbrederis, Killich & Hirschberger, 2006), pois estes são os fármacos mais eficazes na abordagem desta doença (Hosoya et al., 2007).

Existem duas abordagens quimioterápicas principais para canídeos com LM, uma utilizando um protocolo baseado no COP (ciclofosfamida, vincristina e prednisona) e outra um protocolo CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona) (Hosoya et al., 2007).

Uma das principais vantagens da abordagem feita com os protocolos derivados do CHOP é o facto de os cães poderem ser tratados durante um período de tempo limitado, sem passarem necessariamente por uma fase adicional de manutenção. Esta contrapartida é bastante relevante em medicina humana, onde os efeitos adversos da quimioterapia são bastante altos, o que não se verifica em medicina veterinária onde apenas uma minoria dos canídeos desenvolve toxicidade significativa (Vail & Young, 2007). No entanto existe, regra geral, uma maior probabilidade deste tipo de protocolo causar toxicidades mais severas (mielossupressão e efeitos gastrointestinais) do que os protocolos COP (Couto, 2009).

Hosoya et al. (2007) verificaram, num estudo em 101 cães com LM multicêntrico tratados com versões dos dois tipos de protocolo (COP e CHOP), que a probabilidade da obtenção da RC ou RP e o tempo médio de vida eram semelhantes em ambos os protocolos. Apenas a duração média da primeira remissão foi superior no protocolo CHOP (174 *versus* 94 dias).

Uma vez que os custos acabam também por ser aproximados em ambos os tipos de terapêutica, parece não existir nenhuma vantagem evidente num ou noutro tipo de abordagem, dependendo a escolha de uma variedade de factores relacionados com o proprietário, o paciente e o médico veterinário (Couto, 2009).

7.1.2.1 Protocolos baseados no COP

Os protocolos de tratamento mais antigos usados em medicina veterinária resultam da combinação da ciclofosfamida, vincristina e prednisona, sendo relativamente simples, bem

tolerados e bem sucedidos em pacientes caninos (Vail & Young, 2007). Os resultados obtidos por estas primeiras abordagens terapêuticas correspondiam a 60 a 70% de RC e tempo médio de vida de 6 a 7 meses (Cotter & Goldstein, 1983 citado por Vail & Young, 2007).

Existem vários protocolos derivados do COP, como por exemplo o protocolo COAP (ciclofosfamida, vincristina, citosina arabinósido e prednisona) que é relativamente pouco agressivo e surge como uma opção para induzir a remissão da doença (Couto, 2009) (Tabela 6).

Quando se opta por uma terapêutica com base no COP deve ter-se em conta que este se encontra dividido em várias fases: indução da remissão, intensificação, manutenção e reindução da remissão ou “emergência”.

A primeira fase de indução dura cerca de 6 a 8 semanas e deve ser acompanhada por visitas semanais ao médico veterinário. Se no fim desta etapa o paciente não se encontrar em RC é indicada a fase de intensificação (Tabela 6). Em caso de RC é iniciada a fase de manutenção, que pode ser feita entre 1 a 4 vezes. Neste caso, a monitorização necessária é menos intensiva e dispendiosa e a toxicidade é mínima, estando apenas associada a problemas gastrointestinais causados pelo metotrexato (Couto, 2009). Apesar do efeito do uso ou não uso da fase de manutenção neste tipo de protocolo ainda não ter sido correctamente avaliado, a experiência sugere que sem a terapêutica de manutenção, os cães tratados com este protocolo recidivam pouco tempo depois da indução (Hosoya et al., 2007).

Em caso de recidiva pode-se optar pela adição de um quarto fármaco ao protocolo de manutenção LMP (clorambucil, metotrexato e prednisona), usualmente a vincristina (0,5-0,75 mg/m², EV, q1-2 semanas) (Tabela 6). Duma maneira geral esta é suficiente para reinduzir a remissão e mantê-la por semanas ou meses (Couto, 2009).

A fase de manutenção continua até o tumor recidivar, altura em que se inicia a fase de reindução, semelhante em tudo à primeira indução e a que se segue novamente a fase de manutenção.

O tratamento com este protocolo resulta numa RC em 1 a 14 dias a partir do início da terapia, que se prolonga por 3 a 6 meses, em mais de 85% nos cães (Couto, 2009).

Entre outros protocolos com capacidade de reindução da remissão, está o protocolo de “emergência” D-MAC (dexametasona, actinomicina D, citosina arabinósido e melfalan) (Tabela 6), que resulta numa remissão de aproximadamente 61 dias em 70% dos cães com linfoma recidivante e possui menor toxicidade quando comparado com protocolos que contêm doxorubicina. Se for obtida uma RP ou RC, depois da administração de 4 a 6 ciclos deste protocolo, o paciente pode começar a fase de manutenção novamente. Caso a resposta ao D-MAC seja reduzida, é recomendado recorrer ao protocolo CHOP (Couto, 2009).

Tabela 6 - Protocolos quimioterápicos aplicados ao linfoma maligno no cão (adaptado de Couto, 2009).

Protocolos	Dosagens
Indução:	
COAP	Ciclofosfamida 50 mg/m ² , PO q 48h Vincristina 0,5 mg/m ² EV semanalmente Citosina arabinósido 100 mg/m ² diariamente EV/SC durante 4 dias Prednisona 50 mg/m ² PO q24h durante 1 semana, seguido de 20mg/m ² PO q48h
Intensificação	L-Asparaginase 10,000-20,000 IU/m ² IM em 1 ou 2 doses ou Vincristina 0,5-0,75 mg/m ² EV q1-2 semanas
Manutenção:	
LMP	Clorambucil 20 mg/m ² PO q2 semanas Metotrexato 2,5 mg/m ² PO 2 ou 3 vezes por semana Prednisona 20 mg/m ² PO q48h
Emergência:	
D-MAC	Dexametasona 0,23 mg/Kg PO ou SC nos dias 1 e 8 Actinomicina D 0,75 mg/m ² EV no dia 1 Citosina arabinósido 200-300 mg/m ² EV em 4 horas ou SC no dia 1 Melfalan 20 mg/m ² PO no dia 8
AC	Doxorrubicina 30 mg/m ² ou 1mg/kg para cães com menos de 10kg EV no dia 1 Ciclofosfamida 100-150 mg/m ² PO no dia 15 e 16
CHOP	Ciclofosfamida 200-300 mg/m ² PO no dia 10 Doxorrubicina 30 mg/m ² ou 1 mg/kg para cães com menos de 10kg EV no dia 1 Vincristina 0,75 mg/m ² EV no dia 8 e 15 Prednisona 20-25 mg/m ² PO q48h

7.1.2.2 Protocolos baseados no CHOP

Os protocolos de doxorrubicina combinada com ciclofosfamida, vincristina e prednisona são de uma maneira geral conhecidos por protocolos CHOP (Garrett, Thamm, Chun, Dudley & Vail, 2002) e foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento do linfoma humano (Vail & Young, 2007).

A maioria destes protocolos incluem, além dos fármacos já referidos, também uma dose da enzima L-asparaginase (L-CHOP) no início da indução. Alguns autores defendem que esta

resulta numa resposta inicial elevada e numa primeira remissão mais longa (Vail & Young, 2007). Estes protocolos que englobam os 5 fármacos estão associados a RC de 65 a 97% (Rassnick et al., 2007). Outros autores verificaram no entanto, não haver diferenças significativas na duração da primeira remissão (217 sem L-ASP *versus* 206 com L-ASP), no tempo de sobrevivência (308 sem L-ASP *versus* 310 com L-ASP) e na prevalência/ tipo/ grau de toxicidade em cães tratados com ou sem L-asparaginase. Desta forma, parece ser mais apropriado não utilizar esta enzima no protocolo de indução, não só devido aos seus custos elevados, baixa disponibilidade e elevada toxicidade (Northrup et al., 2002), mas também pela vantagem de a reservar para casos de recidiva ou como protocolo de “emergência” (MacDonald, Thamm, Kurzman, Turek & Vail, 2005)

Um exemplo de protocolo baseado no CHOP é o da University of Wisconsin Madison (UW-Madison) (Tabela 7).

No protocolo da University of Wisconsin Madison após as 25 semanas repetem-se as administrações da semana 11 à 25 com intervalos de 3 semanas durante um ciclo e depois novamente com intervalos de 4 semanas. Uma vez que, conforme referido, a dose cumulativa de doxorubicina que é administrada não deve exceder os 180-240 mg/m², esta deve ser substituída nestes ciclos pelo metotrexato. Se o animal se encontrar livre da doença ao fim das 104 semanas que dura o protocolo toda a terapia deve ser parada (Garrett et al., 2002).

Tabela 7 - Protocolo quimioterápico da University of Wisconsin Madison (adaptado de Garrett et al., 2002).

Protocolo	Semanas															
	1	2	3	4	6	7	8	9	11	13	15	17	19	21	23	25
L-asparaginase (400 IU/kg SC)	x															
Vincristina (0,7 mg/m ² EV)	x		x		x		x		x		x		x		x	
Ciclofosfamida ^a (200 mg/m ² EV)		x				x										
Clorambucil (1,4 mg/kg PO)										x					x	
Doxorrubicina (30 mg/m ² EV)				x				x								x
Metotrexato (0,8 mg/kg EV)													x			
Prednisona	2mg/kg PO q24h durante 7 dias; 1,5mg/kg PO q24h nos 7 dias seguintes; seguido de 1mg/kg PO q24h por 7 dias; por fim 0,5mg/kg PO por 7 dias															

^aSubstituir pelo Clorambucil se o animal entrar em RC

Um aspecto ainda pouco esclarecido nestes protocolos CHOP usados no LMC é a dúvida sobre a necessidade da terapêutica de manutenção como um componente da abordagem do LM (Garrett et al., 2002). Por esta razão têm sido sugeridos protocolos menos prolongados e sem esta fase do tratamento (Chun et al., 2000; Moore et al., 2001; Garrett et al., 2002; Simon et al., 2006).

Num estudo de Chun et al. (2000), foi avaliada a eficácia e a toxicidade de um protocolo de 25 semanas derivado do UW-Madison com doses mais elevadas (ciclofosfamida: 250mg/m²; doxorrubicina: 37,5mg/m² sem substituição pelo clorambucil ou metotrexato) e sem a fase de manutenção. Verificou-se que a duração da remissão e o tempo de sobrevivência não diferia significativamente entre os animais tratados com o protocolo convencional (UW-Madison) ou com o mais intensivo. No entanto, a toxicidade deste tipo de protocolo exige precauções na sua utilização, sendo necessárias mais investigações que incidam na utilização de terapêuticas menos prolongadas com as doses usuais (Chun et al., 2000).

Assim, Garrett et al. (2002) verificaram que uma versão modificada do UW-Madison sem fase de manutenção (UW-25 de 6 meses) (Tabela 8), apresentava uma RC e resultados no tempo de sobrevivência semelhantes a um protocolo idêntico, mas com uma fase de manutenção prolongada.

Tabela 8 - Protocolo quimioterápico baseado no CHOP (UW25) (adaptado de Garrett et al., 2002).

Protocolo	Semanas															
	1	2	3	4	6	7	8	9	11	13	15	17	19	21	23	25
L-asparaginase (400 IU/kg SC)	x															
Vincristina (0,7 mg/m ² EV)	x		x		x		x		x		x		x		x	
Ciclofosfamida (200 mg/ m ² EV)		x				x				x				x		
Doxorrubicina (30 mg/m ² EV)				x				x				x				x
Prednisona	2mg/kg PO q24h durante 7 dias, 1,5mg/kg PO q24h nos 7 dias seguintes, seguido de 1mg/kg PO q24h por 7 dias, por fim 0,5mg/kg PO por 7 dias															

Esta abordagem terapêutica foi bem tolerada pelos animais, encontrando-se 92% em RC ao fim dos 6 meses de tratamento. Após a recidiva, a administração do mesmo protocolo para a reindução permitiu que os cães entrassem na segunda RC. Deste modo, e ainda segundo os

mesmos autores, no uso de quimioterapias agressivas com agentes múltiplos incluindo a doxorrubicina, a fase de manutenção não tem vantagens significativas na sobrevivência dos pacientes.

Mais recentemente foi estudado um outro protocolo CHOP de 12 semanas, sem fase de manutenção, numa tentativa não só de avaliar a sua eficácia e toxicidade, como também de limitar os custos e o tempo usado na terapêutica. A RC obtida foi em cerca de 76% dos cães e a duração média da primeira remissão foi de 243 dias. Apesar dos outros protocolos apresentarem tempos de remissão superiores, os resultados deste estudo suportam, mais uma vez, a conclusão de que a terapia de manutenção não se demonstra necessária para se obter resultados satisfatórios no tratamento do LMC (Simon et al., 2006).

Um outro protocolo CHOP bem tolerado pelos pacientes caninos, sem fase de manutenção, e de apenas 19 semanas de tratamento tem sido também usado com êxito por alguns clínicos (Vail & Young, 2007) (Tabela 9).

Tabela 9 - Protocolo quimioterápico baseado no CHOP (adaptado de Vail & Young, 2007).

Protocolo	Semanas															
	1	2	3	4	6	7	8	9	11	12	13	14	16	17	18	19
Vincristina (0,7 mg/m ² EV)	x		x		x		x		x		x		x		x	
Ciclofosfamida (250mg/m ² EV)		x				x				x				x		
Doxorrubicina (30mg/m ² EV)				x				x				x				x
Prednisona	2mg/kg PO q24h durante 7 dias, 1,5mg/Kg PO q24h nos 7 dias seguintes, seguido de 1mg/kg PO q24h por 7 dias, por fim 0,5mg/kg PO por 7 dias															

7.1.3 Protocolos quimioterápicos de reindução ou emergência

Foram estudadas várias estratégias terapêuticas com o objectivo de eliminar os sinais mínimos da doença que pudessem levar à recidiva, nos animais que se encontram em RC após a fase de indução quimioterápica. Entre elas incluem-se as altas doses de quimioterapia com (Frimberger, Moore, Rassnick, Cotter, O'Sullivan & Quesenberry, 2006) ou sem (Chun et al., 2000) transplante de medula óssea, as doses convencionais de manutenção (Garrett et al., 2002), a radioterapia (Williams et al., 2004; Axiak et al., 2006) e a introdução de novos fármacos no protocolo (Morrison-Collister et al., 2003). Contudo, as doses óptimas, a frequência e o número de ciclos de manutenção a aplicar para os cães que entram em RC

encontram-se ainda por estabelecer. Segundo Rassnick et al. (2007), quer o protocolo combinado CCNU (lomustina) /MOPP (mecloretamina, vincristina, procarbazona e prednisona) quer a radioterapia de corpo inteiro, ambos usados no tratamento dos cães com LM após a indução da remissão, não apresentam vantagens sobre o uso do protocolo CHOP convencional, relativamente ao tempo de remissão e de sobrevivência.

Na primeira recidiva do LM é recomendado que a reindução seja feita com o protocolo que teve sucesso na indução inicial (com a excepção dos cães que receberam doses máximas cumulativas de doxorubicina) (Vail, 2003). Duma maneira geral, a durabilidade da resposta é cerca de metade da encontrada no tratamento inicial, embora uma boa parte dos animais usufrua de uma reindução longa, especialmente se tiverem completado o tratamento de indução e não se encontrarem a fazer quimioterapia no momento da recaída (Vail & Young 2007).

Em caso de falha da reindução, ou se os canídeos são refractários à fase de indução inicial, pode-se recorrer ao uso de protocolos de “emergência”. Existem fármacos ou combinações deles, alguns não incluídos nos protocolos CHOP, que se encontram reservadas para os casos em que surgem resistências. Alguns exemplos destes fármacos com eficácia no LMC são a actinomicina D (Bannink, Sauerbrey, Mullins, Hauptman & Obradovich, 2008), mitoxantrona (Lucroy, Phillips, Kraegel, Simonson & Madewell, 1998), doxorubicina (caso não tenha feito parte do protocolo de indução) (Vail, 2003), doxorubicina/decarbazona (Van Vechten, Helfand & Jeglum, 1990), lomustina (Moore et al., 1999) e o MOPP (Rassnick, Mauldin, Al-Sarraf, Mauldin, Moore & Mooney, 2002). Contudo, apenas 40 a 50% dos animais respondem a esta abordagem terapêutica, sendo a duração da remissão de aproximadamente 1,5 a 2 meses (Vail & Young, 2007).

Concluindo, devido ao facto do efeito paliativo, mais do que a cura, se apresentar como o principal papel em oncologia veterinária (Eberle & Mischke, 2009), surge a necessidade do desenvolvimento de protocolos que reduzam o número de visitas do paciente à clínica, assim como os custos e a toxicidade do tratamento (Moore et al., 2001).

7.2 Efeitos adversos da quimioterapia

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

A toxicidade está geralmente associada a órgãos onde a divisão celular é mais rápida, como a medula óssea e as células das vilosidades intestinais. Assim, os sinais de toxicidade mais

frequentes são a mielossupressão e os efeitos gastrointestinais. Outros efeitos adversos que podem estar presentes incluem as reacções anafiláticas, toxicidades dermatológicas e pulmonares, pancreatite, toxicidade cardíaca, neurotoxicidade, urotoxicidade e hepatopatias.

Além destes efeitos directos dos fármacos nos diferentes sistemas de órgãos, a morte rápida das células tumorais pode causar alterações metabólicas súbitas (hiperuricémia, hiperfosfatémia e hipercalémia) que podem implicar sinais clínicos agudos (prostração, vômito, diarreia), mimetizando a toxicidade do fármaco. Esta síndrome é conhecida como síndrome da lise tumoral aguda (Couto, 2009).

Seguidamente são descritas as toxicidades mais frequentes associadas aos vários quimioterápicos (Tabela 10).

Tabela 10 - Toxicidades associadas aos agentes quimioterápicos (adaptado de Couto, 2009).

Toxicidade	DOX	ACT	CTX	LEUK	MIT	MTX	araC	L-asp	VCR	DTIC	CCNU
Mielossupressão	x		x	x	x	x	x		x		x
Gastrointestinal	x		x	x	x	x	x		x		
Cardíaca	x										
Dermatológica	x		x			x	x		x		
Urotoxicidade						x					
Hepatotoxicidade			x			x		x			x
Pancreatite	x	x	x				x	x		x	
Neurotoxicidade									x		
Anafilaxia	x							x			

DOX, doxorubicina; ACT, actinomicina D; CTX, ciclofosfamida; LEUK, clorambucil; MIT, mitoxantrona; MTX, metotrexato; araC, citosina arabinósido; L-asp, l-asparaginase; VCR, vincristina; DTIC, dacarbazina; CCNU, lomustina

7.2.1 Toxicidade hematológica

A toxicidade hematológica é a complicação mais comum decorrente do uso da quimioterapia. As citopénias que ocorrem podem ser graves e implicar a suspensão temporária ou definitiva dos agentes quimioterápicos, sendo a neutropénia e a trombocitopénia as mais frequentes (Couto, 2009). A anemia induzida pela quimioterapia é rara (McKnight, 2003).

Casos graves de mielossupressão podem levar ao desenvolvimento de sépsis exigindo antibióticos de largo espectro e tratamento de suporte (fluidoterapia, antieméticos, etc.) (McKnight, 2003).

A doxorrubicina, ciclofosfamida, clorambucil, metotrexato, citosina arabinósido, vincristina e lomustina são alguns dos fármacos mais frequentemente associados a este tipo de toxicidade (Tabela 10).

7.2.2 Toxicidade gastrointestinal

A toxicidade gastrointestinal mais frequente é a combinação de anorexia, vômito e náusea e a gastroenterocolite que provoca diarreia hemorrágica (Couto, 2009).

A doxorrubicina, ciclofosfamida, clorambucil, metotrexato, citosina arabinósido e vincristina surgem por vezes associados ao vômito, náusea e diarreia (Couto, 2009).

7.2.3 Reacções anafiláticas

Os sinais clínicos associados a reacções de hipersensibilidade aos agentes quimioterápicos podem surgir durante ou imediatamente após a sessão de quimioterapia. Incluem agitação, eritema, vômito, diarreia e, por vezes, colapso devido a hipotensão.

A L-asparaginase e a doxorrubicina são os fármacos mais frequentemente associados a estas reacções adversas (McKnight, 2003).

7.2.4 Toxicidade dermatológica

A toxicidade dermatológica associada à quimioterapia é rara em canídeos. Pode implicar necrose local dos tecidos (por aplicação perivascular), alopecia, atraso no crescimento dos pêlos e hiperpigmentação cutânea da face, abdómen e flancos (Couto, 2009).

A vincristina e a doxorrubicina são exemplos de fármacos vesicantes que devem ser sempre administrados de forma endovenosa de maneira a evitar a necrose local dos tecidos (McKnight, 2003). Quando existe infiltração subcutânea destes agentes os sinais ocorrem 1 a 7 dias após a administração de vincristina e 7 a 10 dias após a de doxorrubicina. As lesões ligeiras a moderadas devem ser controladas com os tratamentos básicos, tais como os pensos e meios de controlo da dor. Nestes casos está indicada também a aplicação de toalhas frias na zona da lesão. Nos casos em que as reacções são graves estão aconselhados o desbridamento cirúrgico da zona afectada e os enxertos de pele (Lana, 2003).

Apesar de não causar problemas clínicos graves e de ser pouco frequente comparativamente ao que acontece ao ser humano, a queda do pêlo dos pacientes canídeos é muitas vezes uma preocupação para os proprietários. Nestes casos é aconselhado terminar ou descontinuar a terapêutica de forma a permitir o crescimento do novo pêlo. No entanto este pode surgir com textura e cor ligeiramente diferente (McKnight, 2003). Os fármacos mais frequentemente

associados a este problema são ciclofosfamida, clorambucil, metotrexato e citosina arabinósido.

7.2.5 Cardiotoxicidade

A cardiotoxicidade, aguda ou crónica, é relativamente frequente em canídeos sujeitos a quimioterapia, principalmente nos tratamentos com doxorubicina. As reacções agudas ocorrem durante ou logo após a sessão de quimioterapia, sendo caracterizadas essencialmente por arritmias cardíacas. A toxicidade crónica está associada ao desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada (Couto, 2009).

7.2.6 Urotoxicidade

A urotoxicidade associada à quimioterapia é pouco frequente em canídeos. Apesar disso, a nefrotoxicidade e a cistite hemorrágica estéril podem surgir associadas a alguns fármacos.

A nefrotoxicidade surge associada a substâncias nefrotóxicas como a doxorubicina e metotrexato. A cistite hemorrágica estéril é frequente no tratamento crónico com ciclofosfamida e manifesta-se por poliúria, hematúria e disúria (Couto, 2009). Nestes casos a terapêutica deve ser interrompida e substituída pelo clorambucil (1,4mg/kg PO). Como forma de prevenção pode-se recorrer ao uso concomitante de furosemida (1mg/kg EV), como referido anteriormente (Vail & Young, 2007), pelas suas acções diuréticas.

7.2.7 Outras toxicidades

A hepatotoxicidade, a neurotoxicidade e a toxicidade pulmonar, associadas à administração quimioterápica, são extremamente raras em canídeos (Couto, 2009).

7.3 Radioterapia

A radioterapia é uma terapêutica local, sendo o seu uso limitado nos casos de LM multicêntrico. No entanto, uma vez que os linfoblastos são células radiosensíveis, a terapia por radiação acaba por exercer um papel relevante em alguns casos de alterações localizadas. É o caso por exemplo do papel paliativo nos casos em que os linfonodos submandibulares não respondem à quimioterapia, provocando dispneia inspiratória (Ettinger, 2003).

Contudo, se por um lado a radiação de corpo inteiro é apenas eficaz quando acompanhada de um transplante de medula óssea, por outro a radioterapia de meio corpo, aplicada ao LMC, não resulta numa remissão longa e possui complicações significativas (Ettinger, 2003).

A radiação de meio corpo tem vindo a ser avaliada para uso na manutenção e consolidação da terapêutica combinada com quimioterapia (Williams et al., 2004; Axiak et al., 2006). Segundo Williams et al. (2004), este tipo de abordagem, usada após a indução quimioterápica, é bem tolerada pelos animais e poderá aumentar a duração da remissão relativamente ao uso isolado de protocolos convencionais. No entanto este aumento não é suficiente para ser considerado clinicamente relevante e para justificar os custos que lhe são inerentes (Williams et al., 2004).

7.4 Outros tratamentos

Além dos quimioterápicos convencionais estão também descritos tratamentos alternativos. Os tratamentos com agentes biológicos possuem benefícios discutíveis no uso no LMC (Vail & Young, 2007). A utilização de vacinas autólogas, com extractos de células tumorais mortas (Weller, Theilen, Madewell, Crow, Benjamini & Villalobos, 1980b; Young, Barnsley & Whereat; 1988) e a aplicação de imunomoduladores, como o Levamisol (MacEwen, Hayes, Mooney, Patnaik, Kurzman & Hardy, 1985), combinados com protocolos de quimioterapia, são alguns exemplos de terapêuticas já testadas em canídeos com LM que necessitam de mais estudos que determinem a sua eficácia (Vail & Young, 2007).

Por outro lado, o uso de agentes antiangiogénicos, associados a quimioterapia convencional, demonstra-se eficaz no uso do LMC (Wolfesberger et al., 2008).

Quanto à terapia nutricional, esta é um componente na abordagem da caquexia provocada pelo tumor, e uma forma de controlo de algumas alterações metabólicas que surgem no avanço da doença (Ogilvie, 2003). Assim, a dieta dada aos pacientes caninos que desenvolvem uma neoplasia deve ser relativamente baixa em carboidratos simples, conter uma quantidade moderada de proteínas de alto valor biológico e facilmente digeríveis, uma quantidade moderada de ácidos gordos poliinsaturados e fibra solúvel e insolúvel (Ogilvie, 2003). Existem também estudos que demonstram que a utilização de antioxidantes (por exemplo, β -carotenos, retinóides, vitaminas C e E) (Wakshlag & Kallfelz, 2008) permite reduzir o risco de desenvolvimento tumoral e aparecimento de metástases (Ogilvie, 2001). A suplementação com estes nutrientes deve ser evitada durante os períodos de quimioterapia ou radiação, uma vez que parecem contrariar os efeitos destes fármacos ao favorecer a sobrevivência das células tumorais durante estes períodos (Wakshlag & Kallfelz, 2008).

8. Prognóstico

Apesar de serem raros os casos de cura de LMC (<10%), é frequente conseguir-se uma boa resposta à terapêutica e uma boa qualidade de vida durante o tempo de remissão (Vail & Young, 2007). Como referido anteriormente, um animal ao qual não seja administrada qualquer tipo de terapêutica apresenta um pior prognóstico, sendo o tempo de vida esperado de aproximadamente 4 a 8 semanas. Por outro lado, uma terapêutica quimioterápica com agentes múltiplos está associada a um melhor prognóstico comparativamente a tratamentos com um único fármaco.

Existem numerosos factores, muitos deles controversos, que influenciam a evolução da doença tornando o prognóstico bastante variável e difícil de estabelecer (Vail & Young, 2007). Alguns factores que foram descritos como tendo influência na sobrevivência dos animais, e o seu grau de associação ao prognóstico encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Factores de prognóstico para o linfoma canino (adaptado Vail & Young, 2007).

Factor	Grau de associação com o prognóstico
Imunofenótipo	Forte
Linfadenomegália mediastínica cranial	Forte
Localização anatómica	Forte
Sub-estadio clínico da OMS	Forte
Tratamento prévio com esteróides	Forte
Estadio clínico da OMS	Moderado*
Expressão da P-glicoproteína	Moderado*
Hipercalcémia	Moderado*
Histopatologia	Moderado*
Índices proliferativos	Moderado*
Género	Fraco

* Requer mais investigações

Apesar de Dobson et al. (2001) não terem encontrado uma relação significativa entre o sub-estadio da OMS e a sobrevivência dos canídeos, os dois factores que, numa forma mais unânime, apresentam um valor de prognóstico mais consistente no LMC são o fenótipo celular e o sub-estadio da OMS (Vail & Young, 2007). Assim numa maneira geral, canídeos com linfoma de origem nas células T (Teske et al., 1994a; Kiupel et al., 1999; Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2004) e/ou pertencentes ao sub-estadio b (Keller, MacEwen, Rosenthal, Helfand & Fox, 1993; Chun et al., 2000; Garrett et al., 2002) estão associados a tempos de remissão e de sobrevivência menores.

Por outro lado, o estadió clínico da OMS surge também envolto em controvérsia com autores a defenderem o seu valor de prognóstico (Jagielski, Lechowski, Hoffmann-Jagielska & Winiarczyk, 2002; Lana, Tracey, Jackson, Burnett, Morley & Avery, 2006; Kaiser et al., 2007) e outros a não encontrarem uma relação significativa entre esta classificação e o tempo de vida e remissão (Garrett et al., 2002; Flory et al., 2007; Couto, 2009).

O tumor pode ser classificado em alto, intermédio ou baixo grau de malignidade (Cullen, Page & Misdorp, 2002). Esta característica tumoral tem sido descrita em alguns estudos como tendo também relevância na avaliação do paciente, estando os de alto grau associados a índices de RC maiores e a espaços de tempo até à recidiva menores (Teske et al., 1994a; Ponce et al., 2004). Contudo, a capacidade de prever a resposta aos tratamentos com base nestes subtipos histopatológicos continua a ser ainda bastante limitada (Vali & Young, 2007). A localização anatómica tem também uma importância considerável no prognóstico da doença, na medida em que as formas digestiva, cutânea, hepatoesplénica e do sistema nervoso central (Vail & Young, 2007), assim como a presença concomitante de linfadenomegália mediastínica (Starrak et al., 1997) estão associados a um prognóstico mais grave.

O género a que pertencem os pacientes caninos, apesar de controverso, poderá influenciar a evolução da doença, sugerindo alguns estudos que o prognóstico é mais favorável nas fêmeas do que nos machos (Page et al., 1992; Keller et al., 1993; Sauerbrey, Mullins, Bannink, Van Dorp, Kaneene & Obradovich, 2007).

Também os níveis séricos de TK (Von Euler et al., 2004) e do factor de crescimento do endotélio vascular (Gentilini et al., 2005) assim como, a expressão da P-glicoproteína, têm sido descritos como potenciais factores de mau prognóstico do LMC (Bergman, Ogilvie & Powers, 1996; Ettinger, 2003).

A hipercalcémia apresenta-se como um factor negativo principalmente quando relacionada com o fenótipo T ou com a diminuição da função renal (Kaiser, Fidel, Roos & Kaser-Hotz, 2007). Por outro lado, conforme referido, também a medicação com glucocorticóides antes da instituição de protocolos quimioterápicos mais complexos, está associado a tempos de remissão mais curtos (Price, Page, Fischer, Levine & Gerig, 1991).

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

A medição da actividade proliferativa das células tumorais, através por exemplo do anticorpo Ki-67 e do índice de AgNOR, tem-se demonstrado como um factor de prognóstico

significativo em cães tratados com protocolos combinados de quimioterapia (Kiupel et al., 1999; Phillips et al., 2000; Valdovich et al., 2004) (Ver capítulo do Diagnóstico e estadiamento). No entanto os resultados obtidos em diferentes estudos são ainda contraditórios (Dobson et al., 2001).

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

III. Estudo de linfoma maligno multicêntrico em canídeos, observados no Hospital Escolar da FMV-UTL

1. Materiais e métodos

Durante o estágio curricular, realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV), no período de 15 de Setembro de 2008 a 15 de Fevereiro de 2009, foram observados 6 canídeos com linfoma maligno multicêntrico. Terminado este período, a observação e seguimento de mais 2 casos prolongou o estudo até ao dia 3 de Junho de 2009 (Tabela 12).

A componente prática da presente dissertação incide assim na análise de uma amostra de 8 canídeos com manifestações clínicas de linfoma maligno multicêntrico e com diagnósticos citológicos e/ou histológicos de linfoma maligno.

O diagnóstico de linfoma maligno canino foi realizado por análise citológica de linfonodo (n=7) (a1, a2, a4, a5, a6, a7, a8), baço (n=2) (a3, a4) e medula óssea (n=1) (a4) (Anexo 1). Destes casos, todos foram observados no laboratório de Anatomia Patológica da FMV, com excepção de uma citologia de linfonodo (a7) realizada no laboratório “DNAtech”. Num dos casos (a3), além da citologia esplénica, foram realizados também exames histológicos, hepático e testicular, no laboratório de Anatomia Patológica da FMV.

O diagnóstico de linfoma maligno multicêntrico foi realizado antes do início do estágio em 3 (37,5%) animais, durante o estágio em 3 (37,5%) animais e após a conclusão do estágio em 2 (25%) casos.

Sempre que possível foram realizadas análises complementares no laboratório Professor Braço Forte da FMV, nomeadamente hemograma, análises bioquímicas e urianálise. Os exames complementares imagiológicos (ultrasonografia e radiografia) foram realizados no Hospital Escolar da FMV. Para exclusão de diagnósticos diferenciais foram realizadas análises por IFI no laboratório do “DNAtech” para despiste de hemoparasitas (n=4) e *Leishmania spp.* (n=3).

Com base nos métodos de diagnóstico anteriormente descritos, todos os animais foram incluídos no estadiamento clínico da OMS para canídeos com linfoma, e classificados como pertencentes ao sub-estadio a (sem sintomatologia sistémica) ou b (com sintomatologia sistémica).

Quanto à terapêutica instituída, 4 animais (a1, a2, a6, a8) foram tratados com um protocolo quimioterápico baseado no CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona) de 19 semanas e 3 (a4, a5, a7) foram sujeitos a um protocolo de agente único com

prednisolona. Um dos canídeos foi eutanasiado antes de instituído qualquer tratamento. Antes de cada sessão do protocolo CHOP foi sempre realizado um hemograma com o intuito de verificar a reacção e evolução ao tratamento e de avaliar a possibilidade do animal ser submetido a nova sessão.

A resposta à terapêutica foi avaliada com base na remissão dos sinais clínicos e/ou diminuição dos linfonodos hipertrofiados. Foram considerados em remissão completa (RC) aqueles que apresentaram evidências de resolução total da doença e em remissão parcial (RP) aqueles que demonstraram uma diminuição da linfadenomegália superior a 50% e inferior a 100%. A duração da remissão teve que ser de pelo menos 3 semanas para ser considerada como completa ou parcial. Os animais que apresentaram menos de 50% de redução ou aumento de 25% dos linfonodos foram considerados estáveis (DE). Finalmente, foram considerados em doença progressiva (DP) aqueles que demonstraram evidências de aumento dos linfonodos superiores a 25% ou desenvolvimento de novas lesões extranodais.

A duração da remissão foi definida como o tempo, em dias, desde o início do tratamento até ao reaparecimento da doença. O tempo de sobrevivência foi definido como o período desde o início da sintomatologia até à morte do animal.

Tabela 12 - Identificação, raça, sexo, idade e data do diagnóstico na população estudada.

Animal (a)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Data do diagnóstico
1	Pitt Bull	M	2	Maio 2008
2	Shar Pei	F	9	Agosto 2008
3	Pastor Alemão	M	13	Agosto 2008
4	Indeterminada	F	13	Dezembro 2008
5	Rottweiler	F	6	Novembro 2008
6	Rottweiler	F	6	Fevereiro 2009
7	Boxer	M	6	Fevereiro 2009
8	Indeterminada	F	8	Abril 2009

As alterações hematológicas foram obtidas com base nos resultados dos hemogramas realizados antes de cada sessão de quimioterapia (Anexo 3), e a gastrointestinal pelas descrições dos sinais clínicos feitas pelos proprietários.

De modo a caracterizar esta população foram recolhidas informações nas consultas de diagnóstico e seguimento, em conjunto com os dados obtidos dos registos clínicos (Anexo 1).

A análise destes dados foi realizada com métodos de estatística descritiva (média, moda, frequência absoluta e frequência relativa), utilizando o programa Microsoft® Excel.

2. Resultados

2.1 Caracterização da população em estudo

A população em estudo, constituída por 8 canídeos com diagnóstico de LM multicêntrico, incluiu 62,5% (5/8) dos animais do sexo feminino e 37,5% (3/8) do sexo masculino. Dos 8 animais, apenas 2 das fêmeas (25%) tinham sido submetidas a ovariectomia sendo os restantes 6 canídeos inteiros (75%).

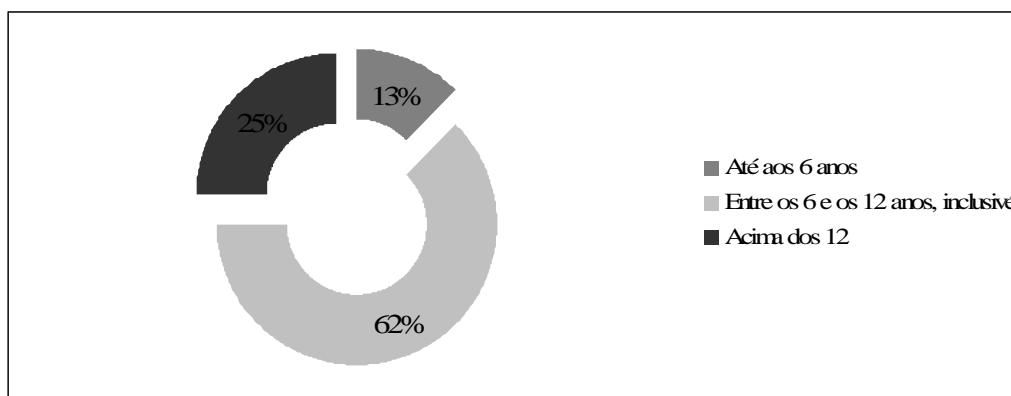
Os animais eram de raça pura em 75% (n=6) dos casos. As raças mais representadas foram Rottweiler (n=2), Boxer, Pastor Alemão, Pitt Bull e Sharpei (n=1 cada) (Tabela 13).

Tabela 13 – Caracterização da população estudada de acordo com a raça.

Discriminação das raças	n (%)
Indeterminada	2 (25)
Rottweiler	2 (25)
Boxer	1 (12,5)
Pastor Alemão	1 (12,5)
Pitt Bull	1 (12,5)
Sharpei	1 (12,5)

Em relação às idades dos animais incluídos neste estudo, verificou-se que estavam compreendidas entre os 2 e os 13 anos, com média de 8 anos e moda de 6 anos. Um animal (13%) tinha idade inferior a 6 anos, enquanto que em 62% (5/8) se verificaram idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos e em 25% (2/8) idades superiores a 12 anos (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Frequência relativa (%) da idade dos canídeos diagnosticados com linfoma maligno multicêntrico.



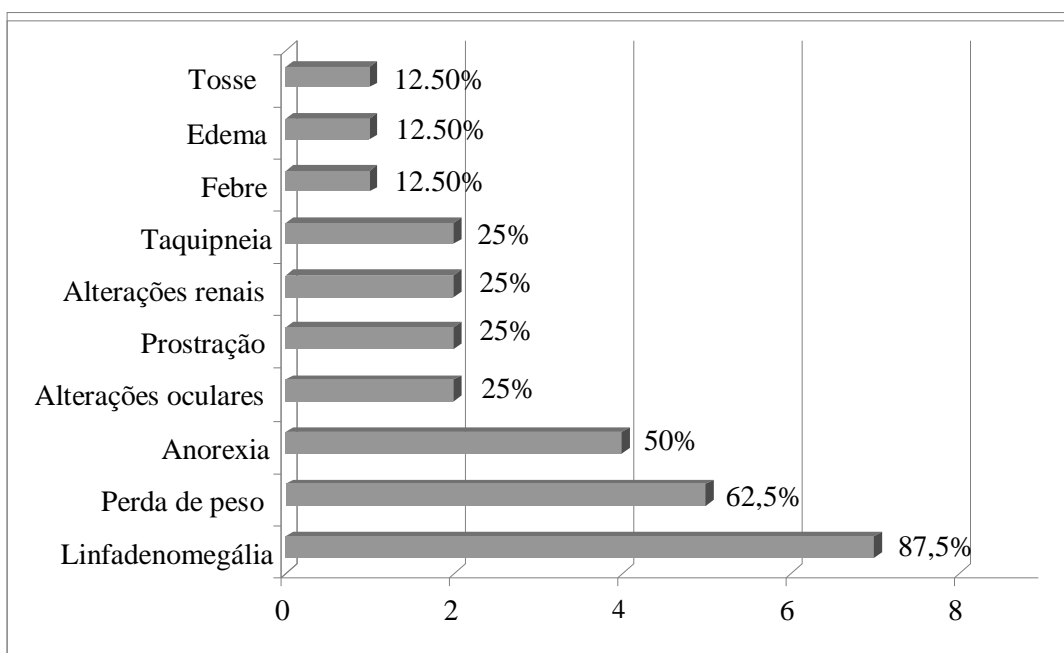
2.2 Sinais e sintomatologia clínica

Os sinais e sintomas clínicos associados ao LM multicêntrico canino registrados na primeira consulta encontram-se resumidos na Tabela 14 e Gráfico 2.

Tabela 14 - Sinais e sintomatologia clínica e respectiva duração presentes na primeira consulta dos cães com linfoma maligno multicêntrico.

Animal	Sinais e sintomatologia clínica	Duração
1	Linfadenomegália generalizada, episódios de febre, perda de peso, taquipneia	1 semana
2	Linfadenomegália generalizada, alterações oculares	1 mês
3	Assintomático	Início 2 meses após o diagnóstico
4	Linfadenomegália retrofaríngea, prostração, perda de peso, anorexia, alterações renais, taquipneia	2 meses
5	Linfadenomegália retrofaríngea e dos poplíteos, prostração, febre, perda de peso, anorexia, alterações oculares	15 dias
6	Linfadenomegália generalizada, edema da face e entrada do peito	1 mês
7	Linfadenomegália generalizada, prostração, perda de peso, anorexia, alterações renais	1 mês
8	Linfadenomegália generalizada, perda de peso, anorexia, tosse	1 mês

Gráfico 2 - Frequência absoluta e frequência relativa dos sinais e sintomatologia clínica observados na primeira consulta nos 8 cães estudados.



Verificou-se que 7 (87,5%) canídeos apresentavam na primeira consulta linfadenomegália. Destes 7 animais, 5 (62,5%) apresentavam linfadenomegália generalizada. Dos restantes canídeos, 1 apresentava linfadenomegália restrita aos retrofaríngeos e outro linfadenomegália dos retrofaríngeos e poplíteos.

Verificou-se também que 5 dos 8 animais (62,5%) surgiram à consulta com perda de peso acentuada e que 4 dos 8 canídeos (50%) se apresentaram anoréticos.

As alterações renais consistiram em poliúria e polidipsia nos 2 (25%) casos.

As alterações oculares incluíram 1 caso de opacidade da córnea, hifema e hipópion e outro de hifema bilateral e uveíte hipertensiva.

A duração da sintomatologia, desde o seu início até à altura do diagnóstico, variou entre 1 semana e 2 meses nos 8 canídeos. A média foi de aproximadamente 3 semanas sendo que metade dos animais (50%) surgiu à consulta 1 mês após o início das alterações.

2.3 Alterações laboratoriais

Dos 8 canídeos estudados, 7 foram inicialmente sujeitos a análises laboratoriais, nomeadamente hemograma e bioquímicas sanguíneas. No caso do canídeo (a7) que chegou ao Hospital já com diagnóstico de LM e para consulta de seguimento, apenas foi realizado um hemograma.

As alterações obtidas nos hemogramas dos 8 canídeos, bem como a percentagem de animais com parâmetros acima ou abaixo dos valores normais de referência (no Anexo 2 são apresentados os valores de referência utilizados), estão resumidas na Tabela 15.

Tabela 15 - Alterações registadas no hemograma

Alterações registadas no hemograma	n/t (FR%)	Animal (a)
Anemia	4/8 (50,0)	a3, a4, a5, a8
Leucocitose	3/8 (37,5)	a2, a6, a8
Trombocitopénia	3/8 (37,5)	a1, a7, a8
Monocitose	3/8 (37,5)	a2, a6, a7
Linfocitose	3/8 (37,5)	a2, a6, a8
Linfopénia	2/8 (25,0)	a1, a3
Neutrofilia	2/8 (25,0)	a6, a8
Neutropénia	1/8 (12,5)	a4
Eosinopénia	1/8 (12,5)	a1

Constatou-se que 4 dos 8 cães (50%) surgiram à consulta com alterações do hemograma indicativas de anemia. A leucocitose, trombocitopenia, linfocitose e monocitose surgiram em 3 dos 8 animais (37,5%). Dos 3 cães que apresentavam trombocitopenia, 2 (a7 e a8) apresentavam agregação plaquetária.

A neutrofilia e a neutropenia surgiram em 2 (25%) e 1 (12,5%) animais, respectivamente.

Relativamente às alterações da morfologia hematológica, verificou-se a presença de eritrócitos nucleados, anisocitose eritrocitária e policromasia em 25% dos cães (a5 e a8), “target cells” em 12,5% (a8) e linfócitos reativos em 12,5% (a2).

As análises bioquímicas sanguíneas foram realizadas em 7 dos 8 cães, tendo-se verificado uma elevação dos valores de FAS, creatinina e ureia em 3/6 (50%), 2/5 (40%) e 2/5 (40%) da população total, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16 - Alterações registadas nas bioquímicas sanguíneas.

Alterações registadas nas bioquímicas sanguíneas	n/t (FR%)	Animal (a)
Elevação da FAS	3/6 (50)	a2, a5, a8
Elevação da creatinina	2/5 (40)	a4, a7
Elevação da ureia	2/5 (40)	a4, a7

As análises de urina tipo II foram realizadas nos 2 cães (a4, a7) com elevação da ureia e creatinina. Foi registada hematúria no exame químico de urina do animal 4 com valores próximos de 200 células/ μ l, enquanto no cão 7 foi observada piúria no exame microscópico do sedimento, 6 a 8 leucócitos/campo 400x.

Adicionalmente e como exclusão de diagnósticos diferenciais, foram realizadas análises para despiste de hemoparasitas (n=4) (a2, a4, a5, a7) e *Leishmania spp.* (n=3) (a1, a6, a7). Todos os testes realizados por IFI para *Leishmania spp.* foram negativos. Um teste (a7), feito por IFI, apresentou resultado positivo fraco para *Babesia canis*, outro (a4) resultado positivo para *Rickettsia conorii* e outro resultado positivo (a2) para *Rickettsia conorii* e *Ehrlichia canis*.

2.4 Exames complementares

Os exames radiológicos ao tórax foram realizados em 6 dos 8 animais (75%) (Anexo 1). As indicações para a realização deste exame incluíram, linfadenomegália (n=3, 50%) (a2, a4, a7), auscultação pulmonar alterada com murmúrio broncovesicular (n=1, 17%) (a1), sopro sistólico de grau IV/IV (n=1, 17%) (a8) e pesquisa de metástases de um tumor testicular das células de Leydig (n=1, 17%) (a3).

As alterações radiográficas registadas (Anexo 1) foram suspeita de linfadenomegália mediastínica (n=3, 50%), suspeita de linfadenomegália traqueobrônquica (n=2, 33%), deslocação dorsal da traqueia (n=2, 33%), padrão broncointersticial (n=1, 17%) e padrão alveolar nos lobos diafragmáticos (n=1, 17%). Dois animais apresentavam o exame ao tórax normal.

A radiografia abdominal foi realizada no canídeo 5 que apresentava anorexia e caquexia, tendo revelado aumento da dimensão dos linfonodos mesentéricos.

Quanto à ultrasonografia, 6 dos 8 canídeos (75%) foram submetidos a ecografia abdominal, 2 (25%) realizaram ecocardiografia e um (12,5%) foi sujeito a uma ecografia testicular devido a assimetria acentuada (Anexo 1).

A ultrasonografia abdominal foi realizada com o objectivo de avaliar o comprometimento dos linfonodos desta região e o envolvimento dos restantes órgãos. Constatou-se que 3 canídeos (50%) apresentavam linfadenomegália sublombar/subaórtica, 2 (33%) demonstravam aumento dos linfonodos mesentéricos, 2 (33%) dos linfonodos hepáticos e 1 (16,7%) do linfonodo esplénico. A esplenomegália e a presença de imagens hipocogénicas de contornos irregulares no baço estavam presentes em 50% dos casos. Três (50%) apresentavam heterogeneidade ecográfica do parênquima hepático. Dois canídeos (33%) apresentavam aumento da espessura craneo-dorsal da parede da bexiga e outro um espessamento da parede intestinal. Verificou-se também que um animal apresentava hiperplasia prostática e outro um aumento da ecogeneidade deste órgão. Uma alteração da ecogeneidade do ovário, sugestiva de metastização, foi encontrada num animal (Anexo1).

A ecocardiografia foi realizada no canídeo 8 com sopro cardíaco de grau IV/VI para ponderar a realização da quimioterapia com citostático cardiotóxico, sendo o exame normal. A ecocardiografia foi também realizada num canídeo de 13 anos (a3) com o intuito de avaliar os riscos associados à castração, nenhuma alteração digna de registo foi observada neste caso.

2.5 Estadiamento clínico

De acordo com os dados obtidos os 8 canídeos foram distribuídos pelos diferentes estádios, segundo o observado na Tabela 17.

Verificou-se que 50% (4/8) dos animais pertenciam ao estadio III (envolvimento generalizado dos linfonodos), 37,5% (3/4) ao estadio IV (envolvimento do fígado e baço com ou sem envolvimento generalizado dos linfonodos) e 12,5% (1/4) ao estadio V (manifestações no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou de outros órgãos, +/- estádios I ao IV) Observou-se também que 87,5% (7/8) da população apresentava sintomatologia sistémica (sub-estadio b) na primeira consulta.

Tabela 17 - Estadiamento clínico segundo a OMS dos 8 canídeos estudados.

Estadio clínico	n/t (FR%)	Animal (a)
I	0	
II	0	
III	4/8 (50)	a1, a2 a6, a7
IV	3/8 (37,5)	a4, a5, a8
V	1/8 (12,5)	a3
Sub-estadio	n/t (FR%)	Animal (a)
a	1/8 (12,5)	a3
b	7/8 (87,5)	a1, a2, a4, a5, a6, a7, a8

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da doença foi realizado através da citologia obtida por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) nos 8 canídeos. Destes 8 animais, 6 foram sujeitos a PAAF dos linfonodos, 1 a PAAF do baço e 1 a PAAF de linfonodos, baço e medula óssea. Num dos casos o diagnóstico foi feito igualmente por exame histológico hepático (Anexo 1).

Os linfonodos examinados foram os poplíteos em 4 canídeos, os pré-escapulares em 2, os submandibulares em 2 e os retrofaríngeos num animal (Anexo 1).

Na Tabela 18 e 19 podem-se observar as classificações citológicas, obtidas por PAAF dos linfonodos (n=7), e histológica, obtida por biópsia hepática (n=1), dos linfomas dos 8 animais estudados. O tipo centrolástico foi o mais prevalente surgindo em 4/8 (50%) canídeos, enquanto que o tipo linfoblástico e imunoblástico surgiu em 3 e 1 dos animais, respectivamente. Todos os linfomas presentes neste estudo eram de alto grau de malignidade. Quanto ao índice mitótico, 6 (75%) apresentavam um índice elevado e 2 (25%) um índice baixo.

É de realçar a presença de um linfoma leucémico diagnosticado na biópsia hepática pela presença de células neoplásicas no sangue circulante.

As punções ao baço e respectivos exames citológicos realizados a 2 canídeos, apresentaram, num caso, resultados sugestivos de estar em curso um processo de linfoma, e no outro um diagnóstico possível de hiperplasia benigna do tecido linfóide não excluindo por completo a possibilidade de linfoma.

Tabela 18 - Caracterização do exame citológico das PAAFs de linfonodos

Animal	Classificação citológica	Detalhes
		Índice mitótico
1	Linfoma maligno de alto grau de malignidade, de tipo centroblastico, monomórfico.	Elevado
2	Linfoma maligno de alto grau de malignidade, de tipo linfoblástico	Elevado
4	Linfoma maligno de alto grau de malignidade, de tipo centroblastico monomórfico	Elevado
5	Linfoma maligno de alto grau de malignidade, de tipo imunoblástico.	Elevado
6	Linfoma maligno de alto grau de malignidade, de tipo centroblastico, monomórfico	Baixo
7	Linfoma maligno de alto grau de malignidade, de tipo linfoblástico. Presença de corpos linfoglandulares	Elevado
8	Linfoma maligno de alto grau de malignidade, de tipo centroblastico, monomórfico.	Baixo

Tabela 19 - Caracterização do exame histológico hepático

Animal	Classificação histológica	Detalhes
		Índice mitótico
3	Linfoma maligno leucémico de alto grau de malignidade, de tipo linfoblástico	Elevado

A citologia medular foi realizada no animal 4 tendo sido feitas duas punções medulares, ambas com resultados inconclusivos devido à qualidade da amostra.

A biópsia testicular foi feita no animal 3 que foi submetido a cirurgia. As alterações testiculares eram indicativas de neoplasia das células Leydig.

2.6 Doenças concomitantes

Em relação às doenças concomitantes verificou-se que 5 dos 8 canídeos apresentavam outras doenças.

Um canídeo (a3) apresentava uma neoplasia testicular maligna das células de Leydig, 1 (a3) otite bilateral, 2 (a3, a8) apresentavam sopro cardíaco, 2 (a4, a7) insuficiência renal e 2 (a2, a4) cistite.

2.7 Terapêutica

O tratamento quimioterápico com protocolo de múltiplos agentes, para LMC multicêntrico, foi realizado em 50% dos animais (4/8) (a1, a2, a6 e a8) (Anexo 3). Dos restantes quatro, três (a4, a5 e a7) nunca apresentaram um estado geral capaz de suportar um protocolo quimioterápico complexo, sendo sujeitos a um protocolo de um único agente. O animal 3 acabou por não ser submetido a qualquer tipo de terapêutica por opção dos proprietários, sendo submetido a eutanásia.

Relativamente à terapêutica quimioterápica de múltiplos agentes instituída, consistiu no protocolo CHOP de 19 semanas nos quatro animais (Tabela 20).

Tabela 20 - Protocolo CHOP de 19 semanas aplicado aos canídeos com LM multicêntrico.

Protocolo	Semanas															
	1	2	3	4	6	7	8	9	11	12	13	14	16	17	18	19
Vincristina	x		x		x		x		x		x		x		x	
Ciclofosfamida		x				x				x				x		
Doxorrubicina				x				x				x				x
Prednisolona	2mg/kg PO q24h durante 7 dias, 1,5mg/kg PO q24h nos 7 dias seguintes, seguido de 1mg/kg PO q24h por 7 dias, por fim 0,5mg/kg PO por 7 dias															

As doses dos agentes quimioterápicos foram de 0,7 mg/m² EV de vincristina para os quatro animais. A dose de ciclofosfamida foi de 200 mg/m² EV em dois animais (a1, a6), 50 mg/m² PO num caso (a2) e 250 mg/m² EV noutro (a8). A doxorrubicina foi administrada na dose de 30 mg/m² EV em três animais (a1, a2 e a6) e num (a8), com menos de 15 Kg, foi aplicada uma dose de 1mg/Kg EV. Quanto à prednisolona foi prescrita uma dose inicial de 2mg/Kg PO durante sete dias, seguida de 1,5mg/Kg PO em sete dias, reduzindo-se depois para 1mg/Kg PO em sete dias e finalmente, também durante sete dias, uma dose de 0,5mg/Kg PO.

Aos três canídeos que fizeram tratamento quimioterápico com agente único foi administrada prednisolona na dose de 2 mg/kg PO SID.

Adicionalmente, foi realizada terapia de suporte nos casos em que se considerou necessário, incluindo fluidoterapia, antibioterapia, protectores gástricos, tratamento tópico das afecções oculares, bem como terapêutica dirigida às doenças concomitantes.

A resposta ao tratamento quimioterápico foi positiva nos quatro animais (100%) que foram submetidos ao protocolo CHOP. Destes, 2 (a6 e a8) encontravam-se ainda a realizar o protocolo quando foi terminado este estudo. No entanto, a evolução apresentava-se favorável e os animais estavam a entrar em remissão dos sinais clínicos e em diminuição da dimensão dos linfonodos.

Em relação aos outros 2 canídeos (a1 e a2), após terminado o protocolo quimioterápico, o animal 1 foi sujeito a observação e reavaliação após 1 mês e o animal 2 após 3 meses. O primeiro animal, ao fim de um mês voltou a apresentar uma linfadenomegália generalizada ligeira, tendo sido realizada nova PAAF que confirmou o diagnóstico inicial de linfoma maligno. O segundo animal após os 3 meses continuava em bom estado geral, sem sinais clínicos ou aumento dos linfonodos, tendo sido reavaliado após 2 meses. Nessa altura apresentava já um ligeiro aumento do linfonodo poplíteo esquerdo e do linfonodo submandibular esquerdo tendo sido observado novamente em quinze dias e sujeito de novo ao protocolo quimioterápico inicial.

Até à data do fim deste estudo os 4 canídeos encontravam-se vivos.

Os três canídeos submetidos a prednisolona não chegaram a apresentar melhoras significativas da sintomatologia clínica, acabando dois (a5 e a7) por serem eutanasiados por opção dos proprietários, e um (a4) por morrer naturalmente devido à progressão da doença. Relativamente aos tempos de sobrevivência estes variam entre 1 mês (a5), 1 mês e ½ (a7) e 5 meses (a4).

2.8 Efeitos adversos da quimioterapia

Os 3 canídeos sujeitos a prednisolona apresentaram sintomatologia típica da progressão da doença. Os efeitos adversos dos glucocorticóides não foram registados em nenhum destes casos.

Como referido anteriormente, o protocolo de agentes múltiplos utilizado no tratamento de 4 animais foi o CHOP de 19 semanas e 16 sessões.

Num caso (a2) foram necessários sete adiamentos ao protocolo devido a trombocitopenia, neutropenia e anemia. O canídeo 1 não manifestou ao longo do tratamento nenhuma alteração do hemograma que justificasse o adiamento das sessões. A linfopenia e trombocitopenia ligeira foram as únicas manifestações observadas neste animal. É de realçar o facto de durante o tratamento o animal ter apresentado blastos em circulação indicativas do desenvolvimento de leucemia.

O animal 1 apresentou náusea e vômito após a 3ª sessão de quimioterapia, tendo sido estes os únicos sinais de toxicidade gastrointestinal observados.

A infiltração subcutânea com doxorubicina foi registada num caso (a2), tendo provocado inflamação e necrose tecidual, resolvido em 2 meses, sem sequelas.

Dos dois animais (a6 e a8) que se encontravam em tratamento no final deste estudo, um (a6) apresentou alterações hematológicas que justificaram o adiamento da terapêutica. Após a 3ª sessão da quimioterapia o canídeo desenvolveu uma trombocitopenia acentuada e anemia, e

após a 5ª sessão, além de anemia, desenvolveu também neutropénia justificando o adiamento da quimioterapia.

Até ao momento nenhum deles manifestara sinais de outro tipo de toxicidade.

No anexo 3 encontram-se os protocolos completos e parciais dos 4 canídeos, com os dias correspondentes a cada sessão e com as alterações hematológicas que justificaram as modificações e adiamentos feitos ao protocolo aplicado.

3. Discussão

A amostra incluída neste estudo foi constituída por 8 canídeos que revelaram ao exame físico suspeita de LM multicêntrico devido à linfadenomegália, e/ou que posteriormente aos exames citológicos e/ou histológicos revelaram desenvolvimento de linfoma maligno. Este estudo foi efectuado numa amostra reduzida, observada durante um curto espaço de tempo, pelo que os resultados não apresentam significado estatístico. Este estudo teve como fontes de recolha de dados as fichas clínicas do Hospital Escolar e a informação recolhida por parte da autora no decorrer das consultas.

3.1 Caracterização da população em estudo

Neste estudo foi verificada uma maior frequência de linfoma maligno multicêntrico no sexo feminino (62%). Como referido anteriormente, a influência do sexo no desenvolvimento de linfoma maligno é controversa, e apesar das divergências este factor não parece relevante para o desenvolvimento deste tipo tumoral (Vail & Young, 2007). No entanto, alguns estudos surgem com prevalências superiores em machos (Moreno et al., 2007; Tasca et al., 2009) e outros em fêmeas (Teske et al., 1994a).

Na nossa amostra 75% dos indivíduos eram inteiros. Num estudo de Valli (1993) citado por Moreno et al. (2007) observou-se igualmente a existência de uma menor ocorrência da doença em fêmeas e machos castrados.

A média de idade de 8 anos, havendo 62% dos animais com idade entre os 6 e os 12 anos, revela uma população adulta a sénior, tal como observado por outros autores (Couto, 2009). Este facto está de acordo com a associação existente entre a susceptibilidade para o desenvolvimento tumoral e o aumento da idade (Waters, 2006). Esta relação pode dever-se em parte ao aumento de lesões no ADN celular, que leva a uma transformação maligna das células e ao desenvolvimento tumoral (Waters, 2006). Apesar disso, verificou-se a possibilidade do desenvolvimento de linfoma maligno em canídeos com uma grande variedade de idades, dos 2 aos 13 anos (Couto, 2009). Esta amplitude de idades é muito semelhante à obtida por Teske et al. (1994a).

Relativamente às raças da amostra em estudo, verificou-se que os canídeos pertencentes a raças puras apresentaram maior prevalência, correspondendo a 75% dos casos, e sendo a raça Rottweiler a mais frequente (25%). Noutros estudos, foi igualmente observada a tendência de animais de raça pura para o desenvolvimento da doença (Edwards et al., 2003; Mondiano et al., 2005; Moreno et al., 2007; Couto, 2009). Embora segundo alguns autores, possa existir uma maior predisposição para o desenvolvimento de linfoma no Boxer (Lurie et al., 2008), no nosso estudo apenas 1 dos 8 animais pertencia a esta raça. As raças representadas nesta amostra podem reflectir as preferências da população portuguesa e, tendo em conta o número reduzido de canídeos observados, não foi possível constatar uma predisposição rácica na população estudada.

3.2 Estudo clínico

Tendo em conta que o linfoma maligno é uma doença sistémica (Couto, 2009), que se caracteriza por uma proliferação anormal de células linfóides malignas em qualquer órgão ou tecido (Vail & Young, 2007), a sintomatologia clínica que apresenta pode ser bastante variável. Os sinais clínicos verificados com maior frequência na amostra estudada, consistiram em linfadenomegália (87,5%) e sinais inespecíficos de perda de peso (62,5%) e anorexia (50%).

A linfadenomegália foi constatada, como referido anteriormente, em 7 animais que surgiram à consulta com suspeita de linfoma multicêntrico. Tal como o descrito por Vail e Young (2007) verificou-se que, inicialmente, a linfadenomegália pode estar restrita a apenas alguns linfonodos. Nestes casos os linfonodos mais afectados pela doença foram os poplíteos e os retro-faríngeos. No entanto, em cerca de 62,5% dos animais que apresentavam aumento da dimensão dos linfonodos, este era generalizado. Para muitos autores, a linfadenomegália generalizada constitui o sinal clínico mais frequentemente observado (Vail & Young, 2007). É de salientar que apesar da frequência e da dimensão dos linfonodos observados, em nenhum caso este foi o estímulo iatrogénico registado.

Relativamente aos outros sinais clínicos verificados nos animais incluídos neste estudo, são de salientar as manifestações oculares, registadas em 25% dos casos. Esta percentagem encontra-se entre os valores de 20-25% referidos por Ogilvie (2004). Este facto vem enfatizar a necessidade da inclusão do exame oftálmico em casos suspeitos de linfoma maligno. A alteração mais frequente foi o hifema que surgiu em 2 dos 3 canídeos, tal como o documentado previamente (Ogilvie, 2004).

A taquipneia e a tosse, o edema da face e da entrada do peito são, respectivamente, um provável reflexo da compressão das vias respiratórias e da veia cava anterior devido ao aumento dos linfonodos.

A ausência de sinais específicos da doença dificulta o diagnóstico, tornando-o muitas vezes tardio, principalmente quando são reduzidos e/ou discretos. O facto de os proprietários não se aperceberem do grave aumento dos linfonodos dos seus animais e de só se dirigirem à consulta quando o canídeo começa já a demonstrar sintomatologia geral e de afecção de outros órgãos, apresenta-se também como um factor importante para o diagnóstico tardio desta doença.

A dificuldade de diagnóstico é acrescida quando o Médico Veterinário se depara apenas com o resultado da citologia que pode, em alguns casos, não apresentar um diagnóstico definitivo e totalmente conclusivo da doença. Nos 8 animais estudados as citologias indicavam desenvolvimento de linfoma maligno que, enquadrado na sintomatologia clínica observada, eram conclusivos para linfoma maligno multicêntrico.

No entanto, devido há existência de algumas limitações do exame citológico, a biópsia excisional e os exames histopatológicos tornam-se importantes (Fournel-Fleury, 1992). Como referido anteriormente, apenas foi realizado um exame histológico hepático. Nenhuma biópsia dos linfonodos foi realizada para confirmação da doença em parte devido à existência de alguma relutância por parte dos proprietários dos animais quer em termos económicos quer em sujeitar o animal, já por si fragilizado, a um método de diagnóstico invasivo.

Pelos exames citológicos realizados pôde constatar-se ainda a predominância de linfomas do tipo centroblástico. Estes dados encontram-se de acordo com a maior frequência deste tipo citológico descrito por outros autores (Correia, 2006; Gelain et al. 2008). Todos os linfomas estudados (100%) eram de alto grau de malignidade o que revela a agressividade destas neoplasias na espécie canina. Estes resultados estão também de acordo com estudos anteriores, em que apenas 12 a 29,5% dos linfomas no cão são considerados de baixo grau (Teske et al., 1994a; Teske et al., 1994b; Fournel-Fleury et al., 1997). Destes 100%, em 6/8 canídeos o índice mitótico foi elevado (75%) e em 2/8 (25%) foi baixo.

A presença de corpos linfoglandulares, foi registada apenas num caso de linfoma maligno linfoblástico. Estes, quando observados nas amostras citológicas obtidas por PAAF, correspondem a fragmentos citoplasmáticos de linfócitos (Murakami et al., 2008) e surgem como diagnóstico da presença de tecido linfóide, aparecendo associados a tumores malignos (Flanders, Kornstein, Wakely, Kardos & Frable, 1993). O seu reconhecimento é por vezes útil na distinção de linfoma maligno de outros tumores (Murakami et al., 2008).

A indisponibilidade financeira dos proprietários, que limita obviamente a quantidade e o tipo de exames complementares a realizar, contribuiu para o entrave a uma desejada compreensão dos tipos de linfoma em causa.

A dificuldade de interpretação ocorre igualmente quando, em concomitância com o linfoma, estão presentes outras doenças. As parasitoses transmitidas por ixodídeos, inicialmente colocadas na lista de diagnósticos diferenciais em 4 animais neste estudo, apresentam-se como um exemplo de doença concomitante que pode atrasar o diagnóstico.

Por outro lado, o facto da linfadenomegália ser o sinal clínico mais consistente da doença (Vail & Young, 2007) e estar também associado a outras afecções, tais como a Leishmaniose, dificultam por vezes o diagnóstico do clínico. Neste estudo, nenhum dos animais testados com IFI estava infectado por *Leishmania spp.*

Desta forma, torna-se importante a realização de exames complementares de diagnóstico que ajudem a suportar um possível caso de linfoma maligno.

A realização de exames hematológicos na primeira consulta, revelou como alterações mais frequentes a anemia, em 50% dos casos, seguida de trombocitopenia, leucocitose, linfocitose e monocitose, todas elas presentes em 37,5% dos canídeos. A anemia surgiu como a anomalia hematológica mais consistente, facto verificado já anteriormente por outros autores (Bergman, 2001).

A presença de eritrócitos nucleados (25%), anisocitose e policromasia eritrocitária (25%), sugere uma componente regenerativa da anemia em alguns animais. Segundo alguns autores a anemia quando está presente no linfoma, surge frequentemente como não regenerativa, associada a doença crónica, normocítica e normocrómica. No entanto, anemias regenerativas, apesar de menos prevalentes, encontram-se também descritas e surgem associadas a hemólise (Vail & Thamm, 2005). É de salientar que a ocorrência de valores ligeiramente aumentados no índice eritrocitário HCM em dois animais (a3, a8), pode dever-se a artefacto por hemólise *in vitro*, mas também pode resultar de hemólise intravascular. Ambos os canídeos apresentavam anemia sendo que um (a8) deles apresentava alterações morfológicas indicativas de regeneração, sendo por isso a hipótese de artefacto a menos provável.

Os resultados dos restantes exames complementares são mais difíceis de avaliar na população estudada, pois as determinações não foram realizadas uniformemente em todos os animais.

As alterações bioquímicas séricas verificadas com maior frequência incluíram aumento da FAS (50%) e aumento da ureia e creatinina (40%). Estes valores podem ser sugestivos de infiltração tumoral (Martineau, 2002) hepática e renal, ou corresponderem a manifestações de doenças concomitantes. O facto de não se terem realizado exames de necropsia impossibilitou a obtenção de conclusões definitivas.

Os exames radiológicos ao tórax foram realizados em 6 dos 8 canídeos que compareceram à consulta com fortes suspeitas de estarem a desenvolver linfoma multicêntrico. Aproximadamente 67% dos animais demonstrava alterações à radiografia torácica sendo a mais prevalente a linfadenomegália mediastínica (50%), valor superior aos 26% referidos por Blackwood (1997). Segundo vários autores, a presença desta alteração está associada, na maioria das vezes, a um pior prognóstico da doença.

Dos seis canídeos sujeitos ao exame ecográfico constatou-se que todos apresentavam alterações dos órgãos abdominais e que destes, 83% apresentava alterações sugestivas de linfoma. Estes resultados são idênticos aos obtidos por Blackwood et al. (1997) em que cerca de 82% dos casos apresentavam comprometimento abdominal. As principais alterações observadas no nosso estudo consistiram em linfadenomegália sublombar (50%) e esplenomegália (33%). Segundo o autor supracitado, a principal alteração abdominal observada correspondia igualmente a linfadenomegália sublombar (75%), ocorrendo a esplenomegália em 46% dos casos.

As alterações abdominais correspondem na maioria das vezes a estados mais avançados da doença multicêntrica (Vail & Young, 2007), reforçando mais uma vez o facto de o diagnóstico precoce da doença ser pouco frequente, uma vez que à primeira consulta 5 dos 6 canídeos sujeitos ao exame apresentavam já comprometimento abdominal.

Os resultados verificados na urianálise, conjuntamente com as imagens da ultrasonografia, são sugestivos de cistite num animal (a4) e de prostatite (a7) no outro. Assim sendo, a hematúria microscópica, observada num animal, resultou provavelmente da cistite diagnosticada na ultrasonografia abdominal, enquanto que a piúria detectada na urianálise do outro canídeo é provavelmente compatível com uma prostatite.

As lesões focais e multifocais observadas no baço (n=3) e fígado (n=1), durante o exame ultrasonográfico, podem ter várias interpretações, uma vez que em apenas um caso foi efectuada citologia e biópsia deste órgãos tendo-se obtido um diagnóstico de linfoma maligno. Os diagnósticos diferenciais de lesões esplénicas e hepáticas incluem: hematomas, hiperplasia nodular, infiltrados neoplásicos, necrose e abscessos (D'Anjou, 2008; Hecht, 2008). Tendo em conta o facto destes animais estarem a desenvolver linfoma multicêntrico o diagnóstico mais provável para estas alterações será o de infiltração tumoral.

É de registar o diagnóstico de um caso (a3) de linfoma maligno subclínico, manifestando-se apenas por linfadenomegália dos linfonodos mesentéricos, esplenomegália e presença de focos multifocais observados no baço e fígado. Estas alterações foram identificadas durante a ecografia para análise testicular. Durante a cirurgia para a extirpação do tumor testicular diagnosticado, foi realizada uma PAAF esplénica e uma biópsia hepática. Ambos os

resultados foram sugestivos de linfoma. Este animal revelou mais tarde sintomatologia típica desta doença, com linfadenomegália generalizada, esplenomegália acentuada, anorexia com perda de peso e prostração. Cinco meses depois do diagnóstico, e após terem sido colocadas as várias possibilidades de seguimento e tratamento desta doença, os proprietários acabaram por optar pela eutanásia. Nenhum tipo de terapêutica dirigida para linfoma foi instituída neste animal.

Em relação ao estadiamento clínico da OMS a maior ocorrência foi observada nos estadios III (n=4) e IV (n=3), o que demonstra a grande capacidade de disseminação deste tipo tumoral a diferentes órgãos. Apesar destes resultados estarem de acordo com o descrito na literatura (Garrett et al., 2002) surge a necessidade de frisar, mais uma vez, a falta de uniformidade nos meios de diagnóstico usados, o que inviabilizou um correcto conhecimento acerca da disseminação do tumor aos vários órgãos. Por outro lado, é de salientar a maior facilidade existente por parte dos proprietários em reconhecer a presença de alterações no seu animal apenas nos estadios mais avançados da doença, dirigindo-se à consulta apenas quando este apresenta um comprometimento generalizado, com sintomatologia clínica. Em relação ao estadio mais avançado da classificação (estadio V) surgem alguns factores que podem influenciar a baixa percentagem registada (12,5%). Salienta-se que para a inclusão no estadio V é muitas vezes necessária a realização de punção de medula óssea. No nosso estudo, apenas um animal foi submetido a este exame e, apesar das 3 punções realizadas, nenhuma foi conclusiva devido à má qualidade da amostra. Desta forma, neste e noutros estudos, o estadio V pode estar sub-representado, não havendo uma maior prevalência pela ausência de análise à medula óssea ou por resultados inconclusivos (Moreno et al., 2007).

O sub-estadio b (presença de sinais sistémicos) surge em 87,5% (n=7) dos animais estudados realçando mais uma vez o diagnóstico tardio que é feito na maioria dos casos.

No que respeita ao esquema terapêutico utilizado, verificou-se que a 4 animais foi administrado um protocolo quimioterápico CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona) de 19 semanas e a outros 3 um protocolo de agente único com prednisolona. Ao outro canídeo não foi instituída qualquer terapêutica dirigida ao linfoma. Na bibliografia existente, verifica-se uma grande variação nos esquemas terapêuticos aplicados e nas durações recomendadas (Chun et al., 2000; Moore et al., 2001; Garrett et al., 2002; Simon et al., 2006; Vail & Young, 2007). Apesar do protocolo instituído durar apenas 19 semanas (aproximadamente 5 meses, se realizado de forma contínua) os dois animais que terminaram a terapêutica foram submetidos a 8 e 6 meses de tratamento. A descontinuidade do tratamento deveu-se num caso (a2) à toxicidade hematológica e no outro (a1) ao não cumprimento por parte dos proprietários das datas das sessões.

Os dois animais que terminaram o esquema terapêutico apresentaram, como esperado, uma RC dos sintomas que os levaram à primeira consulta. O animal 2 apresentou uma RC com apenas 1 mês de duração e canídeo 1 apresentou 5 meses de RC.

Duma maneira geral, os animais tratados com protocolos CHOP têm em média um tempo de sobrevivência de 12 meses após o início da terapêutica (Argyle, 2008). Devido ao período de tempo limitado deste estudo não foi possível determinar o tempo de sobrevivência dos canídeos envolvidos. Apesar disso, desde do diagnóstico e início da terapêutica até à recidiva da doença, decorreram aproximadamente 12 meses num caso (a1) e 9 meses no outro (a2). Os outros dois canídeos (a6, a8) que se encontravam a realizar a terapêutica demonstravam já um início da remissão dos sintomas. É de realçar a melhoria marcada do estado geral dos animais e na redução da dimensão dos linfonodos notada pelos proprietários logo após as primeiras sessões quimioterápicas.

Os hemogramas realizados semanalmente antes de cada sessão do tratamento (Anexo 3) permitiram obter informações sobre as toxicidades hematológicas causadas pelos agentes quimioterápicos.

Tendo em conta o alto índice mitótico e a elevada fracção de crescimento das células da medula óssea, é de esperar a predisposição deste órgão para uma maior toxicidade por parte dos fármacos quimioterápicos. Desta forma a toxicidade hematológica constituiu o efeito adverso mais frequente durante este tipo de terapia. As citopénias que ocorrem obrigam, por vezes, à suspensão temporária ou total das sessões (Couto, 2009). Neste estudo a toxicidade hematológica foi sem dúvida a mais prevalente, surgindo nos 4 canídeos sujeitos à terapêutica. A gravidade das citopénias observadas nos canídeos que terminaram o protocolo foi variável, sendo que o animal 2 necessitou de 7 interrupções da terapêutica, enquanto o animal 1, apesar de apresentar alterações no hemograma, não necessitou de qualquer tempo de suspensão. No entanto, é de referir que neste último caso as datas correctas das sessões raramente foram cumpridas pelos proprietários, o que inviabiliza uma conclusão correcta acerca da toxicidade hematológica a que o animal pudesse estar sujeito.

Tendo em conta os tempos de transporte na medula óssea e da semi-vida em circulação dos elementos constituintes do sangue, será de esperar que as citopénias mais frequentes sejam a neutropénia, seguida da trombocitopénia e da anemia (Couto, 2009). De facto todas estas alterações estiveram presentes e foram as responsáveis pela necessidade de adiamento das sessões num animal. No entanto, apesar de a anemia induzida pela quimioterapia ser considerada menos frequente e crónica (Couto, 2009), neste estudo ocorreu logo após o tratamento e foi uma das alterações hematológicas mais frequentes. Por outro lado o canídeo 1

desenvolveu apenas trombocitopénia ligeira. A neutropénia ocorreu apenas após uma sessão, nunca tendo o animal desenvolvido anemia.

Apesar de serem feitos todos os esforços por parte do médico veterinário para evitar o desenvolvimento de efeitos secundários, surgem por vezes alguns associados ao uso destes fármacos citostáticos. No entanto, é de salientar que estes são bastante inferiores aos registados no ser humano quer em quantidade quer em durabilidade, limitando-se na maioria dos casos a citopénias associadas ao aumento do risco de infecções, vômito e diarreia (European College of Veterinary Internal Medicine of Companion Animals [ECVIMCA], 2007) .

Segundo Vaughan, Johnson e Williams (2007), a presença de neutropénias clinicamente relevantes, associadas a febre ou sépsis, são raras nos pacientes caninos, sendo que apenas 10% destes episódios resultam em hospitalizações. Num outro estudo concluiu-se que a presença de toxicidades graves (citopenias e sintomatologia gastrointestinal) associadas à quimioterapia são pouco frequentes, ocorrendo apenas em 16% dos casos (Rassnick et al., 2007). No nosso estudo todos os efeitos adversos registados não obrigaram à hospitalização dos animais e melhoraram significativamente com suspensões temporárias das sessões.

Um outro aspecto associado à utilização de fármacos citostáticos em oncologia são os perigos para a saúde pública devido aos seus efeitos carcinogénicos.

De forma a evitar a contaminação das pessoas que possam estar envolvidas existem algumas precauções que devem ser tidas em conta. Os médicos/trabalhadores envolvidos nesta área devem estar informados dos riscos associados ao trabalho com agentes citotóxicos, das formas e dos locais seguros e apropriados para os manusearem, dos métodos de prevenção da formação de aerossóis e das instruções e medidas a seguir caso haja uma emergência e/ou contaminação. O médico envolvido no manuseamento dos fármacos deve estar protegido com equipamentos que minimizem a exposição aos citostáticos e o material utilizado deve, no fim de todo o procedimento, ser eliminado de forma adequada e segura em recipientes próprios e especiais (ECVIMCA, 2007)

Quanto aos próprios proprietários surgem também algumas precauções essenciais. De uma maneira geral, mulheres grávidas e crianças são especialmente sensíveis aos efeitos carcinogénicos associados a estes fármacos. Desta forma, devem evitar estar envolvidas nos processos de administração e preparação da terapêutica. Por outro lado, cabe ao médico veterinário a tarefa de informar correctamente os proprietários acerca de todos estes riscos envolvidos. O médico veterinário deve informar os proprietários acerca do manuseamento correcto de citostáticos orais assim como evitar o contacto com as excreções do animal,

nomeadamente, saliva, vômito, urina e fezes nos dias seguintes à administração quimioterápica (ECVIMCA, 2007).

Alguns factores contribuíram para a impossibilidade de efectuar uma terapêutica quimioterápica mais adequada em 50% dos casos observados. Entre eles encontram-se o diagnóstico tardio da doença permitindo o desenvolvimento de alterações de pior prognóstico, a progressão da doença incapacitando a realização da quimioterapia, os custos dispendiosos do tratamento, a relutância de alguns proprietários em utilizar a quimioterapia e a opção de realizar a eutanásia por parte dos proprietários.

Assim, o canídeo 3 assintomático, no qual se obteve inesperadamente um diagnóstico sugestivo de linfoma maligno multicêntrico, demorou aproximadamente 5 meses até desenvolver sintomatologia grave. A este animal nenhuma terapia dirigida à neoplasia foi realizada, acabando por se optar pela eutanásia. O canídeo 5 viveu apenas mais um mês após o diagnóstico de linfoma. Por decisão dos proprietários nenhuma terapêutica, além da corticoterapia, foi instituída, tendo-se optado igualmente pela eutanásia. Num dos outros casos, o canídeo 7 surgiu à consulta já em estado avançado da doença e nunca se apresentou capaz de ser sujeito a quimioterapia complexa. Este animal foi medicado unicamente com prednisolona e em cerca de mês e meio, devido ao evoluir da doença, os proprietários optaram pela eutanásia. O animal 3 sobreviveu aproximadamente 5 meses desde que surgiu à primeira consulta. Neste caso o diagnóstico foi feito tardiamente e nenhum tratamento quimioterápico complexo foi realizado. O animal foi sujeito a prednisolona e fluidoterapia regular, no entanto a doença progrediu de forma irreversível, acabando o animal por morrer naturalmente.

Estes resultados são semelhantes aos descritos por outros autores (Vail & Young, 2007; Couto, 2009). Caso os animais não sejam submetidos a qualquer tratamento ou, realizem apenas corticoterapia, o tempo de sobrevivência será semelhante e corresponderá a aproximadamente 1-2 meses (Couto, 2009) e 1-4 meses (Vail & Young, 2007), respectivamente. No entanto, numa forma geral a corticoterapia melhora significativamente a sintomatologia, dando ao animal uma melhor qualidade de vida.

Estes casos alertam para a importância de uma suspeita clínica de linfoma precoce, em casos com manifestações pouco específicas ou mesmo reduzidas. A intensificação progressiva dos sintomas leva os proprietários a dirigirem-se à consulta apenas numa fase tardia e em que, por vezes, já não é possível estabilizar o animal. Estes casos realçam a necessidade para uma sensibilização dos proprietários para a realização de exames de rotina e para a palpação regular dos linfonodos dos seus animais.

Uma vez que o tratamento precoce parece ser fundamental para um melhor prognóstico no linfoma maligno canino, o Médico Veterinário deve incluir o linfoma na lista de diagnósticos diferenciados dos principais sintomas e manifestações desta doença.

Ao proprietário do animal deverão ser dadas todas as informações necessárias em relação à doença e às várias opções que se colocam. Desta forma, devem tomar conhecimento das diferentes opções de protocolo quimioterápicos, a sua toxicidade, a sua duração, o seu preço, assim como os objectivos que se esperam atingir com cada uma das alternativas (Vail & Thamm, 2005). É essencial que os proprietários possam decidir de forma informada o futuro do seu animal, e que estejam cientes de que caso não seja submetido a terapêutica a esperança média de vida é de 4 a 8 semanas após o diagnóstico (Couto, 2009). No entanto, deve ser focada a gravidade deste tipo tumoral, e o facto de a probabilidade de obter a cura nos canídeos com linfoma maligno ser remota, passando o tratamento por um papel essencialmente paliativo (Moore, 2005). Contudo, a quimioterapia pode resolver, durante meses, a maioria ou até mesmo todos os sinais clínicos e alterações laboratoriais presentes na altura do diagnóstico, sem comprometer a qualidade de vida do paciente canino. Os proprietários devem ser sensibilizados para a importância de realizar o tratamento completo e na frequência correcta, realçando-se a necessidade da realização de análises periódicas que monitorizem o animal.

Assim sendo, o facto da realização da terapêutica quimioterápica poder ser, em alguns casos, dispendiosa e obrigar a visitas regulares à clínica, desagrada muitas vezes os proprietários, que ao verem-se perante a curta esperança de vida dos seus animais sem tratamento acabam por optar pela eutanásia.

Por fim, tendo em conta que a prevalência do desenvolvimento tumoral nos animais está a aumentar, em parte devido ao aumento da esperança média de vida (Withrow, 2001), e tendo em conta que o linfoma maligno canino é dos tumores mais gratificantes de abordar com quimioterapia (Vail & Thamm, 2005), deve ser estabelecida uma correcta relação com os proprietários, de forma a aumentar a adesão ao tratamento. Os proprietários que optam pela terapêutica dos seus animais são na sua maioria dedicados e compassivos. Este aspecto revela-se como um factor positivo e gratificante na abordagem, por vezes um pouco frustrante, destas doenças (Withrow, 2001).

IV. Conclusões

A componente prática do estágio curricular, realizado no Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária, permitiu a aquisição de conhecimentos essenciais para o desenvolvimento futuro da actividade profissional na área de clínica de pequenos animais. Foi através da aprendizagem realizada, e do confronto com a realidade de um hospital veterinário que foi possível a aquisição de confiança para o desempenho do papel de Médica Veterinária a que a autora se propôs no início do curso. É de salientar a necessidade de formação e actualização contínuas, assim como a cooperação e comunicação entre os colegas e os proprietários dos animais, para a obtenção de sucesso profissional. O contacto com os proprietários e com as diferentes condições sócio-económicas foi fulcral para a compreensão da necessidade de selecção dos métodos de diagnóstico e terapêutica que melhor se adaptem a cada caso. Actualmente, as condições sócio-económicas dos proprietários dos animais surgem como uma das principais problemáticas na prática da Medicina Veterinária. No linfoma maligno canino, este assunto é importante na medida em que muitas vezes é necessária a realização de vários métodos de diagnóstico e exames complementares, para a confirmação da doença e da sua extensão. Adicionalmente, este aspecto é bastante relevante nos casos em que existe impossibilidade por parte dos proprietários em suportar a totalidade dos custos e do tempo despendido associados ao tratamento necessário para a doença. Além deste factor, e relativamente ao tema escolhido para a presente dissertação, várias outras limitações surgiram ao longo do estudo. O facto de o período de estágio apenas ter permitido a recolha de um número reduzido de casos e de ter impossibilitado o seguimento completo dos canídeos, a falta de uniformidade dos meios de diagnóstico realizados, e a falta de dedicação registada por vezes no cumprimento da terapia, apresentam-se como as mais relevantes. No entanto, o estudo e a caracterização geral desta população de 8 canídeos permitiram a discussão de vários aspectos.

É importante reter que a prevalência de tumores tem vindo a aumentar, representando estes uma das maiores causas de morte nos animais de companhia (Gobar, Case & Kass, 1998). Além disso, o linfoma maligno corresponde a uma das cinco neoplasias mais frequentes no cão e à neoplasia hematopoiética mais prevalente (Dobson et al., 2002). Desta forma e devido à crescente mortalidade e morbidade dos animais com neoplasia, os médicos veterinários devem informar os seus clientes, de forma contínua e perceptível, acerca dos potenciais riscos e opções de tratamento associados à doença. O proprietário deve ser sensibilizado para as consequências da doença e para as prováveis recidivas, mesmo após a instituição da

terapêutica quimioterápica, surgindo a necessidade de monitorizações de modo a controlar a progressão da doença e uma rápida intervenção aquando da recaída.

Através do estudo realizado e da bibliografia recolhida acerca de linfoma maligno multicêntrico canino, concluiu-se que, no que respeita ao tratamento, não existe um esquema terapêutico único e uniformizado. A escolha do protocolo depende não só da condição do animal, como das opções do proprietário e da experiência do Médico Veterinário. Contudo, tendo em conta as diversas possibilidades actuais de tratamento, é necessário esclarecer o proprietário do facto de nenhum deles poder garantir a cura da doença, apenas permitindo, na maioria dos casos, a remissão da sintomatologia.

O uso em medicina veterinária de fármacos citotóxicos como agentes antineoplásicos tem vindo a aumentar ao longo dos anos. No entanto, este tipo de tratamento apresenta alguns riscos não só para o próprio animal mas também para as pessoas envolvidas, nomeadamente o médico veterinário, técnicos e assistentes, farmacêuticos, auxiliares de limpeza e os próprios proprietários. Estes agentes terapêuticos, apesar de utilizados no tratamento de tumores, são, na sua maioria, carcinogénicos. Este é um aspecto fundamental a ter em conta durante qualquer tratamento oncológico.

Contudo, apesar da presença de efeitos secundários para o animal e dos possíveis riscos para a saúde pública, quando usados de uma forma correcta e segura, os efeitos benéficos do uso destes fármacos sobrepõe-se, na maioria dos casos, aos potenciais riscos envolvidos. Os proprietários demonstram-se, duma maneira geral, satisfeitos com os resultados obtidos com a quimioterapia, uma vez que são registados poucos sinais de toxicidade e o animal apresenta remissão dos sintomas logo após as primeiras sessões.

Muitos dos proprietários tiveram, têm ou terão uma experiência relacionada com neoplasias. Este facto, associado à dedicação demonstrada aos seus animais e à vontade de lhes proporcionar uma melhor qualidade de vida, exige um empenho por parte do Médico Veterinário que corresponda às esperanças depositadas.

V. Bibliografia

- Abbo, A.H. & Lucroy, M.D. (2007). Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006) [abstract]. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 231 (12), 1836-1842. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18081522>
- Aptekmann, K.P., Okamoto, C.E., Campos, K.C.H. & Takahira, R.K. (2005). Multicentric lymphoma with metastasis in the central nervous system in a dog. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57 (3), 307-311. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57n3/25489.pdf>
- Argyle, D.J. (2008). What is new in canine and feline lymphoma [versão electrónica]. In *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress, Dublin, Ireland, 2008*. pp. 518-520. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2008/lecture19/165.pdf?LA=1>
- Avery, A.C. & Avery, P.R. (2007). Determining the significance of persistent lymphocytosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37 (2), 267-282.
- Axiak, S.M., Carreras, J.K., Hahn, K.A., Endicott, M.M., Parshley, D.E. & King, G.K. (2006). Hematologic changes associated with half-body irradiation in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (6), 1398-1401.
- Bannink, E.O., Sauerbrey, M.L., Mullins, M.N., Hauptman, J.G & Obradovich, J.E. (2008). Actinomycin D as rescue therapy in dogs with relapsed or resistant lymphoma: 49 cases (1999-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233 (3), 446-451.
- Bergman, P.J., Ogilvie, G.K. & Powers, B.E. (1996). Monoclonal antibody c219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10 (6), 354-359. Acedido em Jun. 11, 2009, disponível em:
<http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=19972210686>
- Bergman, P.J. (2001). Paraneoplastic Syndromes. In S.J., Withrow & E.G., MacEwen. *Small Animal Clinical Oncology*. (3rd ed.). (pp. 35-53). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Blackwood, L., Sullivan, M. & Lawson, H. (1997). Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: A review of 84 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 38 (2), 62-69.
- Blackwood, L., German, A.J., Stell, A.J. & O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *Journal of Small Animal Practice*, 45 (5), 259-262.
- Burnett, R.C., Vernau, W., Modiano, J.F., Olver, C.S., Moore, P.F. & Avery, A.C. (2003). Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology*, 40 (1), 32-41. Acedido em Jun. 15, 2009, disponível em:
<http://www.vetpathology.org/cgi/reprint/40/1/32>

- Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S. & Moore, P.F. (1996). Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Veterinary Pathology*, 33 (2), 204-212.
- Carioto, L.M., Kruth, S.A., Betts, D.H. & King, W.A. (2001). Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma [abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 62 (9), 1442-1446. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2001.62.1442>
- Chretin, J.D., Rassnick, K.M., Shaw, N.A., Hahn, K.A., Ogilvie, G.K., Kristal, O., Northrup, N.C. & Moore, A. S. (2007). Prophylactic Trimethoprim-Sulfadiazine during Chemotherapy in Dogs with Lymphoma and Osteosarcoma: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (1), 141-148.
- Chun, R., Garrett, L. & Vail, D.M. (2000). Evaluation of High-Dose Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14 (2), 120-124.
- Correia, J.. (2006). *Contribuição para o estudo do linfoma maligno no cão*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Couto, C.G., Rutgers, H.C., Sherding, R.G. & Rojko, J. (1989). Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3 (2), 73-78. Acedido em Jun. 15, 2009, disponível em: <http://www.labmeeting.com/paper/18812399/couto-1989-gastrointestinal-lymphoma-in-20-dogs-a-retrospective-study>
- Couto, C.G. (2009). Oncology. In R.W. Nelson & C.G. Couto. *Small Animal Internal Medicine*. (4th ed.). (1143-1195). St. Louis: Mosby Elsevier.
- Coyle, K.A. & Steinberg, H. (2004). Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Pathology*, 41, 141-146. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://www.vetpathology.org/cgi/reprint/41/2/141>
- Cullen, J.M. Page, R. & Misdorp, W. (2002). An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In J.D. Meuten, *Tumors in domestic animals*. (4th ed.). (pp. 3-44). Iowa: Blackwell Publishing.
- D'Anjou, M.A. (2008). Liver. In D. Pennink & M.A. D'Anjou. *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. (pp.217-261). Iowa: Blackwell Publishing.
- Devitt, J.J., Maranon, D.G., Ehrhart, E.J., Bachand, A.M. & Lana, S.E. (2009). Correlations between numerical chromosomal aberrations in the tumor and peripheral blood in canine lymphoma. *Cytogenetic and Genoma Research*, 124 (1), 12-18. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=ShowPDF&ArtikelNr=000200083&Ausgabe=245135&ProduktNr=224037&filename=000200083.pdf>
- Dickinson, R.M. (2008). Canine lymphosarcoma: Overcoming diagnostic obstacles and introduction to the latest diagnostic techniques. *The Canadian Veterinary Journal*, 49 (3), 305-308. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=2249731&blobtype=pdf>

- Dobson, J.M., Blackwood, L.B., McInnes, E.F., Bostock, D.E., Nicholls, P., Hoather, T.M. & Tom, B.D.M. (2001). Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, 42 (8), 377-384.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43 (6), 240-246.
- Document of the European College of Veterinary Internal Medicine of Companion Animals (2007). *Preventing occupational and environmental exposure to cytotoxic drugs in veterinary medicine*. (2nd ed.). Acedido em Jun. 22, 2009, disponível em: <http://www.ecvim-ca.org/Documents/oncol2007/Guidelines%20ECVIM%20Hazards%20Cytotoxic%20drugs%202nd%20version%20July%202007.pdf>
- Edwards, M.D., Pazzi, K.A., Gumerlock, P.H. & Madewell, B.R. (1993). c-N-ras is activated infrequently in canine malignant lymphoma [abstract]. *Toxicologic Pathology*, 21 (3), 288-291. Acedido em Jun.10, 2009, disponível em: <http://tpx.sagepub.com/cgi/content/abstract/21/3/288>
- Edwards, D.S., Henley, W.E., Harding, E.F., Dobson, J.M. & Wood, J.L. (2003). Breed incidence of lymphoma in UK population of insured dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 1 (4), 200-206. Acedido em Jun. 23, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379181>
- Eberle, N. & Mischke, R. (2009). Influence of a cyclic combination chemotherapeutic protocol on primary haemostasis in dogs suffering from malignant lymphoma. *The Veterinary Journal*. Acedido em, Jun. 21, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185520>
- Ellenport, C.R. (1986). Baço. In R. Guetty. *Anatomia dos animais de companhia*. (5^aed). (pp.166-167). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Ettinger, S.N. (2003). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (2), 92-97. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B75BB-4FPWX3S-7-1&_cdi=12978&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=05%2F31%2F2003&_sk=999819997&view=c&wchp=dGLbVzW-zSkzV&md5=7cd4c06936d47f4f4fe75357518db49e&ie=/sdarticle.pdf
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (2000). Schalm's Veterinary Hematology. (5th ed.). (pp.1058). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Flanders, E., Kornstein, M.J., Wakely, P.E.J., Kardos, T.F. & Frable, W.J. (1993). Lymphoglandular bodies in fine-needle aspiration cytology smears. *American Journal of Clinical Pathology*, 99 (5), 566-569. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4800915>
- Flory, A.B., Rassnick, K.M., Stokol, T., Scrivani, P.V. & Erb, H.N. (2007). Stage Migration in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (5), 1041-1047.

- Flory, A.B., Rassnick, K.M., Al-Sarraf, R., Bailey, D.B., Balkman, C.E., Kiselow, M.A. & Autio, K. (2008). Combination of CCNU and DTIC Chemotherapy for Treatment of Resistant Lymphoma in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22 (1), 164-171.
- Foster, A.P., Sturgess, C.P., Gould, D.J., Iwasaki, T & Day, M.J. (2000). Pemphigus foliaceus in association with systemic lupus erythematosus, and subsequent lymphoma in a cocker spaniel. *Journal of Small Animal Practice*, 41, (6), 266-270.
- Fournel-Fleury, C., Magnol, J.P. & Guelfi, J.-F. (1994). The lymph node. In *Color Atlas of Cancer Cytology of Dog and Cat* (pp. 243-267). Paris: CNVSPA
- Fournel-Fleury, C., Magnol, J.P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P.A. & Felman, P. (1997). Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas [abstract]. *Journal of Comparative Pathology*, 117 (1), 35-59. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9263843>
- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J.L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I. & Magnol, J.P. (2002). Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. *Veterinary Pathology*, 39 (1), 92-109.
- Frimberger, A.E., Moore, A.S., Rassnick, K.M., Cotter, S.M. O'Sullivan, J.L. & Quesenberry, P.J. (2006). A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (2), 355-364.
- Garrett, L.D., Thamm, D.H., Chun, R., Dudley, R. & Vail, D.M. (2002). Evaluation of a 6-Month Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (6), 704-709.
- Gauthier, M.J., Aubert, I., Abrams-Ogg, A., Woods, J.P. & Bienzle, D. (2005). The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dogs with lymphoma in remission. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19 (2), 193-199.
- 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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15 (3), 190-195.
- Gelain, M.E., Mazzilli, M., Riondato, F., Marconato, L. & Comazzi, S. (2008). Aberrant phenotypes and quantitative antigen expressions in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121 (3-4), 179-188. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6TD5-4PT7WW0-7-5&_cdi=5189&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=02%2F15%2F2008&_sk=998789996&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkzV&md5=457d4e8492882b2af442236a2223ee49&ie=/sdarticle.pdf

- Gentilini, F., Calzolari, C., Turba, M.E., Agnoli, C., Fava, D., Forni, M. & Bergamini, P.F. (2005). Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs [abstract]. *Leukemia Research*, 29 (11), 1263-1269. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: [http://www.lrjournal.com/article/S0145-2126\(05\)00167-0/abstract](http://www.lrjournal.com/article/S0145-2126(05)00167-0/abstract)
- Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E. & Flad, H.D. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *American Journal of Pathology*, 138 (4), 867-873. Acedido em Jun., 22, 2009, disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1886092&blobtype=pdf>
- Gibson, D., Aubert, I. Woods, J. P., Abrams-Ogg, A, Kruth, S., Wood, R.D. & Bienzle, D. (1994). Flow cytometric immunofenotype of canine lymph node aspirates. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18 (5), 710-717.
- Gobar, G.M., Case, J.T. & Kass, P.H. (1998). Program for surveillance of causes of death of dogs , using the Internet to survey small animal veterinarians. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213 (2), 251-256.
- Greenlee, P.G, Filippa D.A, Quimby F.W., Patnaik A.K., Calvano S.E., Matus R.E., Kimmel M., Hurvitz A.I. & Lieberman P.H. (1990). Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer*, 66 (3), 480-490.
- Hahn, K.A., Richardson, R.C., Hahn, E.A. & Chrisman, C.L. (1994). Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma [abstract]. *Veterinary Pathology*, 31 (5), 528-540. Acedido em Jun.10, 2009, disponível em: <http://www.vetpathology.org/cgi/content/abstract/31/5/528>
- Hahn, K.A., Freeman, K.P., Barnhill, M.A. & Stephen, E.L. (1999). Serum α_1 -acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treated with doxorubicin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214 (7), 1023-1025.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M, Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. Grogan, T.M, Isaacson, P.G., Knowles, D.M., Mason, D.Y., Muller-Hermelink, H.K., Pileri, S.A., Piris, M.A., Ralfkiaer, E. & Warnke, R.A. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84 (5), 1361-1392. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/reprint/84/5/1361>
- Hayes, H.M., Tarone, R.E., Cantor, K.P., Jessen, C.R., McCurnin, D.M. & Richardson, R.C. (1991) Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides [abstract]. *Journal of the National Cancer Institute*, 83 (17), 1226-1231. Acedido em Jun.21, 2009, disponível em: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/83/17/1226>
- Hecht, S. (2008). Spleen. In D. Pennink & M.A. D'Anjou. *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. (pp.263-280). Iowa: Blackwell Publishing.

- Hosoya, K., Kisseberth, W.C., Lord, L.K., Alvarez, F.J., Lara-Garcia, A., Kosarek, C.E., London, C.A. & Couto, C.G. (2007). Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (6), 1355-1363.
- Jagielski, D., Lechowski, R., Hoffmann-Jagielska, M. & Winiarczyk, S. (2002). A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000) [abstract]. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 49 (8), 419-424. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450190>
- Jacobs, R.M., Messick, J.B. & Valli, V.E. (2002). Tumors of the hemolymphatic system. In D.J. Meuten, *Tumors in domestic animals*, (4^aed). (pp. 119-198). Iowa State Press: Blackwell Publishing.
- Junqueira, L.C. & Carneiro J. (2004a). Sistema imunitário e órgãos linfáticos. In *Histologia Básica*. (10^aed). (pp. 254-283). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Junqueira, L.C. & Carneiro J. (2004b). Hemocitopoese. In *Histologia Básica*. (10^aed). (pp. 238-253). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kaiser, C.I., Fidel, J.L., Roos, M. & Kaser-Hotz, B. (2007). Reevaluation of the University of Wisconsin 2-year protocol for treating canine lymphosarcoma [abstract]. *Journal of American Hospital Association*, 43 (2), 85-92. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.jaaha.org/cgi/content/abstract/43/2/85>
- Keller, E.T., MacEwen, E.G., Rosenthal, R.C., Helfand, S.C. & Fox, L.E. (1993). Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7 (5), 289-295. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/120714959/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>
- Kiseberth W. C., Nadella, M.V.P., Breen, M., Thomas, R., Duke, S.E., Murahari, S., Kosarek, C.E., Vernau, W., Avery, A.C., Burkhard, M.J. & Rosol T.J. (2007). A novel canine lymphoma cell line: A translational and comparative model for lymphoma research. *Leukemia Research*, 31 (12), 1709-1720.
- Kitchell, B.E. (2005). Pratical chemotherapy-An overview [versão electrónica]. In *Proceedings of the 30th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Mexico City, Mexico, 11-14, May, 2005*. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?&CID=WSAVA2005&PID=pr10914&O=Generic>
- Kiupel, M., Teske, E. & Bostock, D. (1999). Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 36 (4), 292-300.
- Lana, S.E., Jackson, T.L., Burnett, R-C., Morley, P.S. & Avery, A.C. (2006). Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (2), 329-334.
- LeCouter, R.A. (2001). Tumors of the nervous system. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen. *Small Animal Clinical Oncology*. (3rd ed.). (pp.500-531). Philadelphia: W.B. Saunders Company.

- Lennert, K. & Feller, A.C. (1992). *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas (Based on the Updated Kiel Classification)*. 2ª edição, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lower, K. (2001). Neoplastic and Nonneoplastic Tumors. In L. Medleau & K.A. Hnilica. *Small Animal Dermatology: A color atlas and therapeutic guide*. (pp.285-325). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Lucroy, M.D., Phillips, B.S., Kraegel, S.A., Simonson, E.R. & Madewell, B.R. (1998). Evaluation of single-agent mitoxantrona as chemotherapy for relapsing canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12 (5), 325-329.
- Lurie, D.M., Milner, R.J., Suter, S.E. & Vernau, W. (2008). Immunophenotypic and cytomorphic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125, 102-110. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD5-4SJP78V-1-7&_cdi=5189&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=09%2F15%2F2008&_sk=998749998&view=c&wchp=dGLbVzz-zSkzS&md5=addabf655e0cd6d5997e918c469f3f45&ie=/sdarticle.pdf
- MacDonald, V.S., Thamm, D.H., Kurzam, 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? *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19 (5), 732-736.
- McCaw, D.L., Chan, A.S., Stenger, A.L., Mooney, B., Bryan, J.N., Turnquist, S.E., Henry, C.J., Alexander, H. & Alexander, S. (2007). *Clinical Cancer Research*, 13 (8), 2496-2503. Acedido em Jun. 22, 2009, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/13/8/2496>
- Martineau, M.M.C. (2002). Multicentric canine lymphoma in a 12-year-old keeshond: chemotherapy options. *Cancer Veterinary Journal*, 43,709-711. Acedido em Jun. 23, 2009, disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=339556&blobtype=pdf>
- Massa K.L., Gilber, B.C., Miller, T.L. & Davidson, M.G. (2002). Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Veterinary Ophthalmology*, 5 (2), 93-98. Acedido em Jun. 22, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12071865>
- 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 [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6 (2), 82-88. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588546>
- Mayr, B., Holzheu, M., Schaffner, G. & Reifinger, M. (2003). N-ras mutation in canine lymphoma: short communication [abstract]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 51 (1), 91-94. Acedido em Jun.10, 2009, disponível em: <http://www.akademiai.com/content/w51m46610v103m32/>
- McCaw, D.K., Chan, A.S., Stegner, A.L., Mooney, B., Bryan, J.N., Turnquist, S.E., Henry, C.J., Alexander, H. & Alexander, S. (2007). Proteomics of canine lymphoma identifies potential cancer-specific protein markers. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2496-2503. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/13/8/2496>

- McKnight, J.A. (2003). Principles of Chemotherapy. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (2), 67-72. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B75BB-4FPWX3S-2-1&_cdi=12978&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=05%2F31%2F2003&_sk=999819997&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWz&md5=dc84815041220f754db577d33110d4ee&ie=/sdarticle.pdf
- Meyer, D.J. (2001). The essentials of diagnostic cytology in clinical oncology. In S.J., Withrow & E.G., MacEwen. *Small Animal Clinical Oncology*. (3^aed.). (pp. 54-62). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Miller, A.G., Morley, P.S., Rao, S., Avery, A.C., Lana, S.E. & Olver, C.S. (2009). Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 116-122.
- Modiano, J.F., Breen, M., Burnett, R. C., Parker, H. G., Inusah, I., Thomas, R., Avery, P. R., Lindblad-Toh, K., Ostrander, E. A., Cutter, G. C. & Avery, A. C. (2005). Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. *Cancer Research*, 65 (13), 5654-5661.
- Momoi, Y., Okai, Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1997). Establishment and characterization of canine T-lymphoblastoid cell line derived from malignant lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59 (1-2), 11-20. Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD5-4123W12-2-1&_cdi=5189&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=10%2F06%2F1997&_sk=999409998&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkzS&md5=5d4195d30d7b094c3cee46872a7bbf9b&ie=/sdarticle.pdf
- Moore, A.S., London, C.A., Wood, C.A., Williams, L.E., Cotter, S.M., L'Heureux, D.A. & Frimberger, A.E. (1999). Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13 (5), 395-398.
- Moore, A. S., Cotter, S.M., Rand, W.M., Wood, C.A., Williams, L.E., London, C.A., Frimberger, A.E. & L'Heureux, D.A. (2001). Evaluation of a Discontinuous Treatment Protocol (VELCAP-S) for Canine Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15 (4), 348-354.
- Moore, A.S. (2005). Lymphoma in dogs [versão electrónica]. In *Proceedings of the 30th World Congress of World Small Animal Veterinary Association, Mexico city, Mexico, 11-14, May*. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?&CID=WSAVA2005&PID=pr10916&O=Generic>
- Moore, A.S. (2007). What is the best protocol for canine lymphoma? [versão electrónica]. In *Proceedings of the 32th WSAVA Congress, Sydney, Australia, 2007*. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2007/pdf/28_20070329144733_abs.pdf

- Moreno, K., Frederico, A. P., Loureiro, R. (2007). Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44, 46-52. Acedido em Mai. 15, 2009, disponível em <http://www.fumvet.com.br/novo/revista/44/suplemento/46-52.pdf>
- Morrison-Collister, K.E., Rassnick, K.M., Northrup, N.C, Kristal, O., Chretin, J.D., Williams, L.E., Cotter, S.M. & Moore, A.S. (2003). A combination chemotherapy protocol with MOPP and CCNU consolidation (Tufts VELCAP-SC) for the treatment of canine lymphoma [abstract]. *Veterinary and Comparative Oncology*, 1 (4), 180-190. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=20043066365>
- Morrison, W.B. (2007). A fresh look at lymphoma in dogs and cats [versão electrónica]. In *Proceedings of the North American Veterinary Conference Congress, Orlando, Florida, 13-27 January, 2007*. Acedido em Jun. 20, disponível em: <http://www.ivis.org/docarchive/proceedings/NAVC/2007/SAE/279.pdf>
- Murakami, T., Kayano, H., Itoh, T., Shimizu, Y., Ban, S., Ogawa, F., Sannohe, S., Kondo, S. & Shimizu, M. (2008). Lymphoglandular bodies in malignant tumors: with special reference to histologic specimens. *Annals of Diagnostic Pathology*, 12 (4), 249-251. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620990>
- Newman, R.G., Kitchell, B.E., Wallig, M.A. & Paria, B. (2008). The cloning and expression of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 in normal canine lymph nodes and in canine lymphoma. *Research in Veterinary Science*, 84 (2), 206-214. Acedido em Jun 21, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WWR-4P3023R-2-9&_cdi=7137&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=04%2F30%2F2008&_sk=999159997&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkWA&md5=2a56639a0b5068c7bf0adccb7e2b6dfe&ie=/sdarticle.pdf
- Nielsen, L., Toft, N., Eckersall, P.D., Mellor, D.J. & Morris, J.S. (2007). Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (6), 1231-1236.
- Northrup, N.C., Rassnick, K.M., Snyder, L.A., Stone, M.S., Kristal, O., Cotter, S.M. & Moore, A.S. (2002). Neutropenia associated with vincristina and L-asparaginase induction chemotherapy for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (5), 570-575.
- Ogilvie, G.K., Obradovich, J.E., Elmslie, R.E., Vail, D.M., Moore, A.S., Straw, R.C., Dickinson, K., Cooper, M.F. & Withrow, S.J. (1991). Efficacy of mitoxantrone against various neoplasms in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198 (8), 1618-1621.
- Ogilvie, G.K., Walters, L.M., Fettman, M.J., Hand, M.S., Salman, M.D. & Wheeler, S.L. (1993). Energy expenditure in dogs with lymphoma fed two specialized diets [abstract]. *Cancer*, 71 (10), 3146-3152. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4749115>

- Ogilvie, G.K., Ford, R.B., Vail, D.M., Walters, L.M., Salman, M.D., Babineau, C. & Fettman, M.J. (1994). Alterations in lipoprotein profiles in dogs with lymphoma [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8 (1), 62-66. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/8176666/Alterations_in_lipoprotein_profiles_in_dogs_with_lymphoma
- Ogilvie, G.K. (2001). Metabolic alterations and nutritional therapy. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen. *Small Animal Clinical Oncology*. (3rd ed.) (pp. 169-182). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Ogilvie, G.K. (2003). The care of animals with cancer. In J.M. Dobson & B.D.X. Lascelles. *BSAVA Manual of canine and feline oncology*. (2nd ed.) (pp.68-72). Gloucester: Blackwell Publishing.
- Ogilvie, G.K. (2004). Canine lymphoma [versão electrónica]. In *Proceedings of 29th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Rhodes, Greece, 6-9, October, 2004*. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.vetpathology.org/cgi/reprint/41/2/141>
- Page, R.L., Leifer, C.E. & Matus, R.E. (1986). Uric acid phosphorus excretion in dogs with lymphosarcoma [abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 47 (4), 910-912. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3754406>
- Page, R.L., Macy, D.W., Ogilvie, D.K., Rosner, G.L., Dewhirst, M.W., Thrall, D.E., Withrow, S.J., McEntee, M.C., Cline, J.M., Heidner, G.L., Novotney, C.A. & Gillette, E.L. (1992). Phase III evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma [abstract]. *International Journal of Hyperthermia*, 8 (2), 187-197. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4372241>
- Papich, M.G. (2005). Mixing and matching drugs [versão electrónica]. In *Proceedings of The North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, 8-12 January, 2005*. pp. 867-868. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.ivas.org/proceedings/navc/2005/SAE/360.pdf?LA=1>
- Peleteiro, M.C., Correia, J.J., Carvalho, T., Pissarra, H. E Fernandes, I. (2006). Diagnóstico citológico em medicina veterinária. In *VI Curso de citologia para clínicos veterinários*, 11 e 18 Novembro, Faculdade de Medicina Veterinária de Universidade Técnica de Lisboa.
- Philips, B.S., Kass, P.H., Naydan, D.K., Winthrop, M.D., Griffey, S.M. & Madewell, B.R. (2000). Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12 (2), 111-117. Acedido em Jun. 21, disponível em: <http://www.jvdi.org/cgi/reprint/12/2/111>
- Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K. & Fournel-Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *The Veterinary Journal*, 167 (2), 158-166. Acedido em Jun. 15, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WXN-4B8B9W9-5-8&_cdi=7163&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=03%2F31%2F2004&_sk=998329997&view=c&wchp=dGLzVtb-zSkzk&md5=f01ff71a778af820b4b50d802801c039&ie=/sdarticle.pdf

- Powers, B.E. (2001). The Pathology of Neoplasia. In S.J., Withrow & E.G., MacEwen. *Small Animal Clinical Oncology*. (3^aed.). (pp. 4-17). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Prescott, L.M., Harley J.P. & Klein, D.A. (2005). Cells, tissues, and organs of the immune system. In *Microbiology* (6th edition) (pp. 681-685). New York: McGraw-Hill.
- Price, G.S., Page, R.L., Fischer, B.M., Levine, J.F. & Gerig, T.M. (1991). Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5 (5), 259-262. Acedido em Jun.22, 2009, disponível em: <http://www.labmeeting.com/paper/19786629/price-1991-efficacy-and-toxicity-of-doxorubicin-cyclophosphamide-maintenance-therapy-in-dogs-with-multicentric-lymphosarcoma>
- Raskin, R.E. & Krehbiel, J.D. (1989). Prevalence of leukemic blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma [abstract]. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 194 (10), 1427-1429. Acedido em Jun, 20, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2470709>
- 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). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (5), 576-580.
- Rassnick, K. M., McEntee, M.C., Erb, H.N., Burke, B.P., Balkman, C.E., Flory, A. B., Kiselow, M. A., Autio, K. & Gieger, T. L. (2007). Comparison of 3 Protocols for Treatment after Induction of Remission in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (6), 1364-1373.
- Rebar, A.H. & Raskin, R.E. (2006). Cytology of neoplasia. In *Proceedings of 31st World Small Animal Veterinary Congress, Prague, Czech Republic, 11-14, October, 2006*. Acedido em Jun., 22, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2006&Category=2666&PID=15906&O=Generic>
- Reif, J.S., Lower, K.S. & Ogilvie, G.K. (1995). Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma [abstract]. *American Journal of Epidemiology*, 141 (4), 352-359. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em <http://aje.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/141/4/352>.
- Ruslander, D.A., Gebhard, D.H., Tompkins, M.B., Grindem, C.B. & Page, R.L. (1997). Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders [abstract]. *In Vivo*, 11 (2), 169-172. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/9179611/Immunophenotypic_characterization_of_canine_lymphoproliferative_disorders
- Saar, L.I. & Getty, R. (1986). Sistema linfático em geral. In R. Guetty. *Anatomia dos animais de companhia*. (5^aed). (pp.163-166). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Saba, C.F., Thamm, D.H. & Vail, D.M. (2007). Combination chemotherapy with L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed or refractory canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (1), 127-132.

- Sauerbrey, M.L., Mullins, M.N., Bannink, E.O., Van Dorp, T.E., Kaneene, J.B. & Obradovich, J.E. (2007). Lomustine and prednisone as first-line treatment for dogs with multicentric lymphoma: 17 cases (2004-2005) [abstract]. *American Veterinary Medical Association*, 230 (12), 1866-1869. Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571992>
- Sharkey, L.C., Dial, S.M. & Matz, M.E. (2007). Maximizing the Diagnostic Value of Cytology in Small Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 37 (2), 351-372.
- Simon, D., Nolte, I., Eberle, N., Abbrederis, N., Killich, M. & Hirschberger, J. (2006). Treatment of Dogs with Lymphoma Using a 12-Week, Maintenance-Free Combination Chemotherapy Protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (4), 948-954.
- Sokolowska, J., Cywinska, A. & Malicka, E. (2005). p53 expression in canine lymphoma [abstract]. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medic*, 52 (4), 172-175. Acedido em Jun.10, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118658992/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>
- Sözmen, M., Tasca, S., Carli, E., De Lorenzi, D., Furlanello, T. & Caldin, M. (2005). Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 323-329. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://www.jvdi.org/cgi/reprint/17/4/323>
- 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 [abstract]. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 38 (6), 411-418. Acedido em Jun. 22, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119162162/abstract>
- Tasca, S., Carli, E., Caldin, M., Menegazzo, L., Furlanello, T. & Gallego, L.S. (2009). Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 201 cases (2002-2006). *Veterinary Clinical Pathology*, 38 (1), 2-12.
- Teske, E., Van Heerde, P., Rutteman, G., Kurzman, I.D., Moore, P. F. & MacEwen, E. G. (1994a). Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205 (12), 1722-1728.
- Teske, E., Wisman, P., Moore, P.F. & Van Heerde, P. (1994b). Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology [abstract]. *Experimental Hematology*, 22 (12), 1179-1187. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925781>
- Thomas, R., Smith, K.C., Gould, R., Gower, S.M., Binns, M.M. & Breen, M. (2001). Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers [abstract]. *Chromosome Research*, 9 (8), 649-657. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/111t9044000g5k50/>

- Thomas, R., Smith, K. C., Ostrander, E. A., Galibert, F. & Breen, M. (2003a). Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *British Journal of Cancer*, 89, 1530-1537. Acedido em Mai. 20, 2009, disponível em <http://www.nature.com/bjc/journal/v89/n8/full/6601275a.html>.
- Thomas, R., Fiegler, H., Ostrander, E.A., Galibert, F., Carter, N.P. & Breen, M. (2003b). A canine cancer-gene microarray for CGH analysis of tumors [abstract]. *Cytogenetic and Genome Research*, 102 (1-4), 254-260. Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?typ=fulltext&file=CGR20031021_4254
- Tomley, F.M., Armstrong, S.J., Mahy, B.W. & Owen, L.N. (1983). Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants [abstract]. *British Journal of Cancer*, 47 (2), 227-284. Acedido em Jun. 5, disponível em: <http://www.curehunter.com/public/pubmed6186265.do>
- Vail, D.M., Ogilvie, G.K., Wheller, S.L., Fettman, M.J., Johnston, S.D. & Hegstad, R.L. (1990). Alterations in carbohydrate metabolism in canine lymphoma [abstract]. *Journal of Veterinary Medicine*, 4 (1), 8-11. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/2407842/Alterations_in_carbohydrate_metabolism_in_canine_lymphoma
- Vail, D. (2003). Lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. In J.M. Dobson & B.D.X. Lascelles. *BSAVA Manual of canine and feline oncology*. (2nd ed.). (pp. 276-292). Gloucester: Blackwell Publishing.
- Vail, D.M. & Thamm, D.H. (2005). Hematopoietic Tumors. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6thed.). (732-747). Missouri: Elsevier Saunders.
- Vail, D.M. & Young, K.M. (2007). Hematopoietic Tumors. In S.J., Withrow & MacEwen, E.G. *Small Animal Clinical Oncology*, (4^aed.). (pp. 699-717), Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Valdovich, P., Psáder, R., Tóth, Z.A. & Perge, E. (2004). Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Veterinary Pathology*, 41 (4), 338-345. Acedido em Jun. 5, 2009, disponível em: <http://www.vetpathology.org/cgi/reprint/41/4/338>
- Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L., Vernau, W. & Moore, P.F. (2002). Histological Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals. In *World Health Organization International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals*.
- Van Vechten, M. Helfand, S.C. & Jeglum, K.A. (1990). Treatment of relapsed canine lymphoma with doxorubicin and dacarbazine [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4 (4), 187-191. Acedido em Jun. 20, 2009, disponível em: <http://www.labmeeting.com/paper/19325036/van-vechten-1990-treatment-of-relapsed-canine-lymphoma-with-doxorubicin-and-dacarbazine>
- Vaughan, A., Johnson, J.L. & Williams, L.E. (2007). Impact of chemotherapeutic dose intensity and hematologic toxicity on first remission duration in dogs with lymphoma treated with a chemoradiotherapy protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (6), 1332-1339.

- Veldhoen, N., Stewart, J., Brown, R. & Milner, J. (1998). Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene*, 16, 249- 255. Acedido em Jun 21, 2009, disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/v16/n2/pdf/1201489a.pdf>
- Venzke, W.G. (1986). Timo. In R. Guetty. *Anatomia dos animais de companhia*. (5ªed). (pp.167). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Von Euler, H., Einarsson, R., Olsson, U., Lagerstedt, A.S., Eriksson, S. (2004). Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18 (5), 696-702.
- Vonderhaar, M.A. & Morrison, W.B.(1998). Lymphosarcoma. In W.B. Morrison. *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*. (pp. 667-695). Philadelphia: Williams & Wilkins.
- Von Euler, H.P., Rivera, P., Arosson, A.C., Bengtsson, C., Hansson, L.O. & Eriksson, S.K. (2008). Monitoring therapy in canine malignant lymphoma and leukemia with serum thymidine kinase 1 activity – evaluation of a new, fully automated non-radiometric assay. *International Journal of Oncology*, 34 (2), 505-510. Acedido em Mai. 20, 2009, disponível em: http://www.spandidos-publications.com/ijo/article.jsp?article_id=ijo_34_2_505
- Wakshlag, J.J. & Kallfelz, F.A. (2008). Nutritional status of dogs with cancer: dietetics evaluation and recommendations. In P. Pascale, V. Blourge & D. Elliott (Eds.). *Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition* (pp. 408-425). Acedido em Jun.22, 2009, disponível em: <http://www.ivis.org/advances/rc/chap13part06/chapter.asp?LA=1>
- Washizu, T., Azakami, D., Bonkobara, M., Washizu, M. & Arai, T. (2005). Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in canine lymphoma cells. *Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 67 (6), 615-616. Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/67/6/615/_pdf
- Waters, D.J. (2006). Cancer Regulation in senior animals [versão electrónica]. In *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, 7-11 January 2006*, pp. 846-847.
- Weller, R.E., Holmberg, C.A., Theilen, G.H. & Madewell, B.R. (1980). Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma [abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 41 (8), 1310-1314. Acedido em Jun. 22, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6893792>
- Williams, L. E., Johnson, J. L., Hauck, M. L., Ruslander, D. M., Price, G. S. & Thrall, D. E. (2004). Chemotherapy Followed by Half-Body Radiation Therapy for Canine Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18 (5), 703-709.
- Willmann, M., Müllauer, L., Guija de Arespachoga, A., Reifinger, M., Mosberger, I. & Thalhammer, J.G. (2009). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128 (4), 359-365. Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD5-4TX78YS-3-9&_cdi=5189&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=04%2F15%2F2009&_sk=998719995&view=c&wchp=dGLbVzz-zSkWb&md5=9a0790e9232acb4d622e9f2ada11a1f8&ie=/sdarticle.pdf

- Withrow, S.J. (2001). Biopsy principles. In S.J., Withrow & E.G., MacEwen. *Small Animal Clinical Oncology*. (3rd ed.). (pp. 63-69). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Wolfesberger, B., Tonar, Z., Witter, K., Guija de Arespacohaga, A., Skalicky, M., Walter, I., Thalhammer, J.G. & Egger, G.F. (2008). Microvessel density in normal lymph nodes and lymphomas of dogs and their correlation with vascular endothelial growth factor expression. *Research in Veterinary Science*, 85 (1), 56-61. Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WWR-4PPNMG1-2-5&_cdi=7137&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=08%2F31%2F2008&_sk=999149998&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWb&md5=272b7e2da06adc20b43b099ef634570a&ie=/sdarticle.pdf
- Yamazaki, J., Baba, K., Goto-Koshino, Y., Setoguchi-Mukai, A., Fujino, Y., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2008). Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126 (3-4), 321-331. Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD5-4TGHN73-3-C&_cdi=5189&_user=2459750&_orig=search&_coverDate=12%2F15%2F2008&_sk=998739996&view=c&wchp=dGLzVzz-zSkWz&md5=c6bd5d72e093bdec3c3a7b9579184635&ie=/sdarticle.pdf
- Yasuda, D., Fujita, M., Yasuda, S., Taniguchi, A., Mura, H., Hasegawa, D. & Orima, H. (2004). Usefulness of MRI compared with CT for diagnostic of mesenteric lymphoma in a dog. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66 (11), 1447-1451. Acedido em Jun. 21, 2009, disponível em: http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/66/11/1447/_pdf
- Young, K.M. (2007). Cytologic evaluation of lymph nodes in dogs and cats [versão eletrônica]. In *Proceedings of the 56th SCIVAC Congress 2007*, Acedido em Jun. 10, 2009, disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2007/young3_en.pdf?LA=3

VI. Anexos

1. Métodos de diagnóstico, exames complementares, doenças concomitantes e terapêutica instituída na população total do estudo.

Animal 1	
Diagnóstico	PAAF linfonodos poplíteos
Classificação OMS	III-b
Ultrasonografia	Não realizada
Radiografia	Torácica: Suspeita de linfadenomegália mediastínica e traqueobrônquica, padrão alveolar nos lobos diafragmáticos
Doenças Concomitantes	Ausentes
Terapêutica	Protocolo CHOP 19 semanas
Resposta à terapêutica	Positiva
Remissão da doença	RC de 5 meses
Tempo de sobrevivência	Vivo até à data de fim deste estudo

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; CHOP, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona; RC, remissão completa

Animal 2	
Diagnóstico	PAAF linfonodos poplíteos e submandibular
Classificação OMS	III-b
Ultrasonografia	Abdominal: Linfadenomegália subaórtica, aumento da espessura da parede da bexiga
Radiografia	Tóraca: Deslocação dorsal da traqueia, suspeita de linfadenomegália mediastínica;
Doenças Concomitantes	Cistite
Terapêutica	Protocolo CHOP 19 semanas
Resposta à terapêutica	Positiva
Remissão da doença	RC de 1 mês
Tempo de sobrevivência	Vivo até à data de fim deste estudo

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; CHOP, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona; RC, remissão completa

Animal 3	
Diagnóstico	PAAF esplênica e biópsia hepática
Classificação OMS	V-a
Ultrasonografia	Abdominal: focos hipocogênicos e irregulares no baço, heterogeneidade parênquima hepático, esplenomegália Ecocardiografia: sem alterações Testicular: suspeita de neoplasia
Radiografia	Torácica: sem alterações
Doenças Concomitantes	Tumor testicular das células de Leydig; otite bilateral; sopro sistólico grau III/IV
Terapêutica	Não realizada
Tempo de sobrevivência	5 meses - eutanásia

PAAF, punção aspirativa por agulha fina

Animal 4	
Diagnóstico	PAAF linfonodos retrofaríngeos, esplênica e de medula óssea
Classificação OMS	IV-b
Ultrasonografia	Abdominal: Esplenomegália, focos hipocogênicos e irregulares no baço, heterogeneidade parênquima hepático, espessamento da parede da bexiga e do intestino
Radiografia	Torácica: sem alterações
Doenças Concomitantes	Insuficiência renal
Terapêutica	Prednisolona
Resposta à terapêutica	Sem resposta
Remissão da doença	DP
Tempo de sobrevivência	5 meses

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; DP, doença progressiva

Animal 5	
Diagnóstico	PAAF linfonodo poplíteo
Classificação OMS	IV-b
Ultrasonografia	Abdominal: Aumento dos linfonodos hepáticos, sublobares, esplênico e mesentéricos; ovário com ecogenecidade alterada; baço com nódulos hipoeogénicos, heterogeneidade do parênquima hepático
Radiografia	Abdominal: suspeita de linfadenomegália mesentérica
Doenças Concomitantes	Ausentes
Terapêutica	Prednisolona
Resposta à terapêutica	Sem resposta
Remissão da doença	DP
Tempo de sobrevivência	1 mês – eutanásia

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; DP, doença progressiva

Animal 6	
Diagnóstico	PAAF linfonodo submandibular e pré-escapular
Classificação OMS	III-b
Ultrasonografia	Não realizada
Radiografia	Não realizada
Doenças Concomitantes	Ausentes
Terapêutica	Protocolo CHOP
Resposta à terapêutica	Positiva
Remissão da doença	Início da remissão dos sintomas. Encontrava-se ainda a realizar a terapêutica quando foi terminado o estudo
Tempo de sobrevivência	Vivo até à data de fim deste estudo

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; CHOP, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona

Animal 7	
Diagnóstico	Realizado previamente por PAAF dos linfonodos
Classificação OMS	III-b
Ultrasonografia	Aumento da ecogeneidade prostática
Radiografia	Torácica: suspeita de linfadenomegália mediastínica
Doenças Concomitantes	Insuficiência renal
Terapêutica	Prednisolona
Resposta à terapêutica	Sem resposta
Remissão da doença	DP
Tempo de sobrevivência	1 mês e ½

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; DP, doença progressiva

Animal 8	
Diagnóstico	PAAF linfonodo poplíteo e pré-escapular
Classificação OMS	IV-b
Ultrasonografia	Abdominal: Aumento linfonodos sublobares, mesentéricos, hepático, esplenomegália Ecocardiografia: sem alterações dignas de registro
Radiografia	Torácica: Deslocação dorsal da traqueia, suspeita de linfadenomegália traqueobrônquica; padrão broncointersticial
Doenças Concomitantes	Sopro cardíaco de grau IV/VI
Terapêutica	Protocolo CHOP de 19 semanas
Resposta à terapêutica	Positiva
Remissão da doença	Início da remissão dos sintomas. Encontrava-se ainda a realizar a terapêutica quando foi terminado o estudo
Tempo de sobrevivência	Vivo até à data de fim deste estudo

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; CHOP, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona

2. Valores de referência das analíticas sanguíneas (Feldman, Zinkl & Jain, 2000).

Parâmetros	Valores de referência
Eritrócitos	5,5-8,5x10 ⁶ /μl
Plaquetas	200-500x10 ³ /μl
Hemoglobina	12-18 g/dl
Hematócrito	37-55%
VCM	60-77 fL
HCM	19,5-24,5 pg
CHCM	32-36 g/dl
Leucócitos	6-17x10 ³ /μl
Neut. Não segmentados	0-300/μl
Neut. segmentados	3000-11500/μl
Linfócitos	1000-4800/μl
Monócitos	150-1350/μl
Eosinófilos	100-1250/μl

3. Protocolos quimioterápicos CHOP, completos e parciais, dos 4 canídeos com os dias correspondentes a cada sessão e com as respectivas alterações hematológicas.

	Animal 1											
	Leu	Erit	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Plaq	Neut	Linf	Mon	Eos
Vincristina 14/05/08	6,88	6,33	14,8	45,1	71,3	23,3	32,8	139 ↓	5848	344 ↓	619	69
Ciclofosfamida 21/05/08	11,8	6,27	14,9	45,2	72	23,8	33	319	10620	944 ↓	236	0
Vincristina 21/05/08	Indisponível											
Doxorrubicina 9/6/08	9,51	5,99	14,3	43,2	72,1	23,9	33,1	419	8274	951 ↓	285	0
Vincristina 2/7/08	Indisponível											
Ciclofosfamida 10/07/08	5,63↓	6,36	15,3	46	72,3	24	33,2	363	4279	732 ↓	450	169
Vincristina 24/7/08	4,42↓	5,88	13,9	42,4	72,1	23,7	32,8	199 ↓	30006	1061	221	133
Doxorrubicina 31/7/08	5,1 ↓	5,77	14	41,7	72,2	24,3	33,6	306	3570	1122	306	51 ↓
Vincristina 14/08/08	7,4	5,82	13,7	41,8	71,9	23,5	32,7	221	5328	1258	666	148
Ciclofosfamida 21/08/08	Indisponível											
Vincristina 28/08/08	7,44	6,66	15,8	48,4	72,7	23,7	32,6	221	5357	1414	446	223
Doxorrubicina 11/09/08	7,98	6,98	16,4	50,3	72	23,5	32,7	232	5985	1516	160	319
Vincristina 25/09/08	6,08	6,9	16,1	49,4	71,6	23,4	32,7	216	4864	851↓	365	0
Ciclofosfamida 9/10/08	10,7	6,86	16,2	48,7	71	23,6	33,2	210	7811	1712	749	428
Vincristina 23/10/08	6,33	7,01	16,6	49,8	71,7	23,7	33,3	169 ↓	3735	2026	253	317
Doxorrubicina 8/11/09	7,22	6,59	15,1	43,3	65,6	22,9	34,8	156 ↓	5271	1372	289	289

Observações: Havia agregação plaquetária concomitantemente às trombocitopénias ligeiras registadas.

Leu, leucócitos; Erit, eritrócitos; Hem, hemoglobina; HT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; Plaq, plaquetas; Neut, neutrófilos; Linf, linfócitos, Mon, monócitos; Eos, eosinófilos. ↓ - Parâmetro Diminuído; ↑ - Parâmetro Aumentado.

Animal 2												
	Leu	Erit	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Plaq	Neut	Linf	Mon	Eos
Vincristina 19/08/08	19,5↑	6,38	13,6	40,7	63,7	21,2	33,3	331	7995	9555↑	1560↑	390
Ciclofosfamida 26/08/08	8,62	5,96	12,8	38,7	64,9	21,5	33,2	500	5948	2069	603	0↓
Vincristina 2/09/08	6,82	5,73	12,5	37,9	66,1	21,8	32,9	383	4910	1364	477	68↓
Adiada 9/09/08	3,59↓	5,4↓	11,6↓	35,9↓	66,3	21,4	32,3	393	1687↓	1041	790	72↓
Doxorrubicina 16/09/08	7,93	5,83	12,5	38,2	65,5	21,4	32,7	474	4362	1983	714	872
Vincristina 30/09/08	7,24	6↑	12,8	39,1	65,2	21,3	32,7	518	4489	1738	217	796
Adiada 7/10/08	2,13↓	5,09↓	10,7↓	32,1↓	63,1	21	33,2	12,7↓	511↓	1363	170	85↓
Ciclofosfamida 14/10/08	14	6,91	15,5	47,7	69,1	22,4	32,5	227	9240	1960	1960↑	840
Vincristina 21/10/08	5,37↓	6,03	12,6	39	64,6	20,9	32,3	278	3061	1718	376	215
Doxorrubicina 28/10/08	9,55	5,72	9,59↓	35,7↓	62,5	16,8↓	26,9↓	130↓	3629	3820	2006↑	96↓
Adiada 4/11/08	11,7	5,37	10,6↓	31,5↓	38,6↓	19,7	33,7	8↓	8073	2106	936	585
Vincristina 12/11/08	16,2	5,65	11,2↓	32,7↓	57,9↓	19,8	34,2	472	11826↑	2106	1620↑	648
Ciclofosfamida 24/11/08	10,9	6,94	13,7	39,6	57,0↓	19,8	34,7	257	7303	2616	763	218
Vincristina 9/12/08	12,4	7,58	14,8	43,2	57,0↓	19,5	34,2	84,9↓	10044	868↓	744	744
Adiada 22/12/08	9,45	7,88	15,3	44,6	56,6	19,4↓	34,2	16,6↓	5954	2457	189	851
Doxorrubicina 6/01/09	12,8	7,63	14,9	43,1	56,4↓	19,5	34,5	112↓	10240	1024	1152	384
Adiada 20/01/09	10,2	6,4	9,84↓	35,2↓	55↓	15,4↓	28↓	15,9↓	7854	1020	1122	204
Vincristina 26/01/09	8,55	7,14	11↓	39,3	55,0↓	15,5↓	28,1↓	102↓	5985	1539	342	684
Adiada 10/02/09	9,62	6,6	12,7	36,6↓	55,5↓	19,2↓	34,7	4,54↓	6734	2405	192	289
Ciclofosfamida 23/02/09	8,8	6,62	13	38,1	57,6↓	19,7↓	34,2↓	72,5↓	5896	1408	616	880
Adiada 10/03/09	7,8	6,53	13	38,4	58,8↓	19,9	33,9	1,19↓	4524	2730	312	234
Vincristina 26/03/09	6,43	6,83	13,6	39,5	57,9↓	19,8	34,3	105↓	5594	579↓	193	64↓
Doxorrubicina 7/04/09	9,3	7,16	14,5	41,6	58,7↓	20,3	34,9	201	6603	2604	93	0

Leu, leucócitos; Erit, eritrócitos; Hem, hemoglobina; HT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; Plaq, plaquetas; Neut, neutrófilos; Linf, linfócitos; Mon, monócitos; Eos, eosinófilos. ↓ - Parâmetro Diminuído; ↑ - Parâmetro Aumentado.

Animal 6												
	Leu	Erit	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Plaq	Neut	Linf	Mon	Eos
Vincristina 6/02/09	31↑	6,16	13,8	29,9	64,8	22,4	34,6	214	19840↑	7130↑	2790↑	1240
Ciclofosfamida 13/02/09	15,4	5,59	12,7	36,4 ↓	65	22,8	35	373	13090↑	770 ↓	1540	0
Vincristina 20/02/09	3,94↓	5,08↓	11,4↓	33,1↓	65,1	22,5	34,6	397	3428	236 ↓	236	39 ↓
27/02/09 Adiada	10,4	4,87↓	10,8↓	31,5↓	64,6	22,2	34,4	26↓↓	7800	2184	312	104
Doxorrubicina 6/03/09	10,1	4,88 ↓	11,1 ↓	31,4 ↓	64,3	22,7	35,4	277	7979	808 ↓	1212	101
Vincristina 20/03/09	5,04 ↓	4,71 ↓	10,6 ↓	30,1 ↓	63,9	22,5	35,3	338	3629	1310	101 ↓	0 ↓
26/03/09 Adiada	3,52 ↓	4,62 ↓	10,2 ↓	29,4 ↓	63,6	22,1	34,7	586 ↑	1474 ↓	1615	351	70 ↓
Ciclofosfamida 3/04/09	9,18	4,86 ↓	10,7 ↓	31↓	63,7	22	34,5	610 ↑	5875	1652	459	1193
Vincristina 24/04/09	9,07	5,35 ↓	11,3 ↓	35,5 ↓	66,3	21,2	31,9 ↓	446	7347	1361	272	91 ↓
Doxorrubicina 6/05/09	7,94	5,55	11,5 ↓	35,9 ↓	64,7	20,8	32,1	424	6352	953 ↓	397	238
Vincristina 27/05/09	10,6	6,35	13,1	40,7	64	20,6	32,2	500	8904	1160	530	0 ↓

Leu, leucócitos; Erit, eritrócitos; Hem, hemoglobina; HT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; Plaq, plaquetas; Neut, neutrófilos; Linf, linfócitos; Mon, monócitos; Eos, eosinófilos. ↓ - Parâmetro Diminuído; ↑ - Parâmetro Aumentado.

Animal 8												
	Leu	Erit	Hem	HT	VCM	HCM	CHCM	Plaq	Neut	Linf	Mon	Eos
Vincristina 29/04/09	20,3↑	4,72↓	11,7↓	35,5 ↓	75,2	24,8↑	33	112 ↓	13398↑	5481↑	1218	203
Ciclofosfamida 6/05/09	12,4	4,4 ↓	12,1	33,4 ↓	75,8	27,4	36,2	206	7564	3224	1488↑	124
Vincristina 13/05/09	17,4↑	4,47↓	11 ↓	34,1 ↓	76,2	24,6	32,3	153 ↓	14442↑	1566	1218	174
Doxorrubicina 20/05/09	6,62	4,19↓	10,3↓	32 ↓	76,3	24,7	32,3	96,4↓	3773	2052	662	132

Leu, leucócitos; Erit, eritrócitos; Hem, hemoglobina; HT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; Plaq, plaquetas; Neut, neutrófilos; Linf, linfócitos; Mon, monócitos; Eos, eosinófilos. ↓ - Parâmetro Diminuído; ↑ - Parâmetro Aumentado.