

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LINFOMAS CUTÂNEOS EM CÃES: ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO, MORFOLÓGICO, IMUNOFENOTÍPICO E
SEROPROTEICO.**

Giovanni Vargas Hernández

Médico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LINFOMAS CUTÂNEOS EM CÃES: ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO, MORFOLÓGICO, IMUNOFENOTÍPICO E
SEROPROTEICO.**

Giovanni Vargas Hernández

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para exame de Defesa para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

2017

V297l Vargas-Hernández, Giovanni
Linfomas cutâneos em cães: estudo epidemiológico, morfológico, imunofenotípico e seroproteico. / Giovanni Vargas Hernández. – – Jaboticabal, 2017
xix, 86 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Mirela Tinucci Costa

Banca examinadora: Silvia Regina Ricci Lucas, Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, Andriago Barbosa de Nardi, Sabrina Gouveia Calazans.

Bibliografia

1. Linfoma Cutâneo. 2. Canino. 3. Classificação. 4. Quimioterapia. 5. Imuno-histoquímica. 6. Proteínas. 7. Eletroforese. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006.6:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: LINFOMAS CUTÂNEOS EM CÃES: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, MORFOLÓGICO, IMUNOFENOTÍPICO E SEROPROTEICO

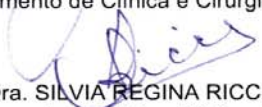
AUTOR: GIOVANNI VARGAS HERNÁNDEZ

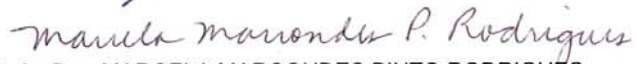
ORIENTADORA: MIRELA TINUCCI COSTA

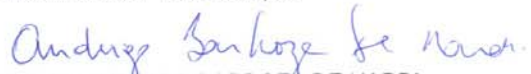
COORDENADOR: JOSÉ ANTONIO SANCHES JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. SILVIA REGINA RICCI LUCAS
Departamento de Clínica Médica / USP/FMVZ - São Paulo, SP


Profa. Dra. MARCELA MARCONDES PINTO RODRIGUES
FMVZ / UNESP - Botucatu, SP


Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS
Departamento de Ciência Animal / UNIFRAN - Franca/SP

Jaboticabal, 09 de março de 2017

Dados Curriculares

GIOVANNI VARGAS HERNÁNDEZ – nascido na cidade de Bogotá – Colômbia em 13 de outubro de 1972. Concluiu o curso de Tecnólogo em Administração Agropecuária pelo Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA – Mosquera – Colômbia, em 1994. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidad Nacional de Colombia – UN - campus Bogotá, em 2002. Durante a graduação, participou como monitor de aulas práticas de Clínica Médica de pequenos animais para estudantes de último ano da Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Trabalhou como autônomo em Clínica Veterinária, até 2004. Em 2005 trabalho como professor na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidad de Pamplona – Nte. de Santander – Colômbia. Em 2006, foi convidado pela Faculdade de Medicina Veterinária y Zootecnia da Universidad Cooperativa de Colômbia – Campus Bucaramanga em Santander, para assumir as aulas de semiologia e Clínica-Cirúrgica de pequenos animais. Durante os meses de julho a dezembro de 2007, realizou estágios voluntários de treinamento e aperfeiçoamento nos setores de Clínica Médica, Nutrição Clínica e Oncologia de cães e gatos do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil. Trabalhou como voluntário durante dois períodos (2008/2010 e 2013/2016) no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil, na forma de plantões semanais, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Em 2009, concluiu o curso de Pós-Graduação *latu sensu* em Patologia Clínica Veterinária na Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil, sob orientação do Prof. José Jurandir Fagliari. Em 2010, concluiu curso de Mestrado em Medicina Veterinária na área de concentração em Clínica Médica da Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Ingressou em 2010 e atualmente é professor em licença de estudo, do Departamento em Saúde Animal na Faculdade de Medicina Veterinária e de Zootecnia da Universidade Nacional da Colômbia. Ingressou em março de 2013, no curso de Doutorado em Medicina Veterinária na área de concentração em Clínica Médica da Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal – SP – Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa.

AGRADECIMENTOS

Meu trabalho de doutorado foi resultado de várias peças, umas maiores outras menores que se encaixaram, como as engrenagens de uma máquina perfeita.

Cada um de vocês representa uma peça, sua ausência teria levado a que esta máquina tivesse parado.

Falando com outras palavras e tentando que minha ideia fique clara, cada um de vocês sem interessar sua ajuda ou aporte foi fundamentais para concluir esta etapa de Doutorado e permitir meu crescimento como ser humano.

Cada pagina escrita foi possível porque existiram pessoas que doaram criotubos, outros me emprestaram o carro para transportar amostras, outros me escutavam nas noites no meio de alegrias e tristezas, outros foram corretores de língua portuguesa, outros conselheiros, confidentes, outros me passaram seus conhecimentos em patologia, clinica, fisiologia, estadística, etc, etc, etc....

Início meus agradecimentos à Deus, nestes quatro anos tivemos uma relação bem diferente quando comparada com outras etapas da minha vida, obrigado por cada novo ensinamento e cada novo problema que vc coloco na minha frente.

À minha família, meu pai Arquimedes (*"in memorian"*), minha mãe Lucia, meus irmãos Martha, Carmenza, Wilson e Elizabeth, meus sobrinhos Steven e Zharik. Meu pequeno e prezado tesouro, minha filha Maya, que me acompanhou nestes quatro anos de correrias.

Ao minha Orientadora, Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa depois de oito anos a senhora tem se convertido em minha amiga, conselheira e mãe. Obrigado por tudo.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Jose Antônio Sanches, pelos ensinamentos e o grande interesse que teve, pela minha pesquisa.

Aos Professores Doutores: Annelise Camplessi, Felipe Sueiro, Sabrina Calazans, Rosangela Zacarias Machado, Marcos Rogerio André, Tiago Balbuena, Andriago Barbosa de Nardi, Geórgia Modé Magalhães, Pamela Moreira e Mirian Nacagami Sotto.

Aos meus grandes colegas e amigos de coração: Leonardo Cotamo, Giovanna Rossi, Maria Teresa Lemos, Beatriz Pato, Gabriela Noronha, Neli Silvia, Anny Celis, Claudinei Ferreira, Camilo Forero e Kalina Simplicio.

A todos os pacientes e seus respectivos proprietários, que colaboraram com a realização deste trabalho.

À Unesp por ter aberto suas portas e ter me acolhido como um filho da casa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida no programa PEG-PG.

À Universidade Nacional de Colômbia, por ter me outorgado minha comissão de estudos de Doutorado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

"E quando a tempestade acabar você não vai se lembrar de como você fez para atravessá-la, como você conseguiu sobreviver. Você nem mesmo vai ter certeza, se a tempestade realmente acabou. Mas uma coisa é certa. Quando você sai da tempestade, você não vai ser a mesma pessoa que entrou, é pra isso que a tempestade existe. "

Haruki Murakami.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	 1
Introdução.....	1
Revisão de Literatura	2
Epidemiologia	2
Classificação atual na espécie canina	2
1. Linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE).....	2
1.1.Micose fungóide	3
1.1.1.Reticulose pagetóide (Variante da MF)	4
1.2.Síndrome de Sézary.....	4
2.Linfoma cutâneo não epiteliotrópico (LCNE).....	4
2.1.Linfoma cutâneo de células T indolente (Não-epiteliotrópico).....	5
2.2.Linfoma Cutâneo de células B (Não-epiteliotrópico)	5
Classificação WHO – EORT, aspectos comparativos entre a espécie humana e canina.....	6
Referências.	10
 CAPITULO 2: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO LINFOMA CUTÂNEO EM CÃES..	 14
Resumo	14
Abstract	15
Introdução.....	16
Material e métodos.....	17
Resultados.....	18
Discussão	27
<i>Aspectos epidemiológicos.....</i>	<i>27</i>
<i>Alterações clínicas e laboratoriais ao diagnóstico</i>	<i>29</i>

<i>Evolução clínica e resposta ao tratamento</i>	32
Conclusões	34
Referências	34
 CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DO LINFOMA CUTÂNEO: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS ESPÉCIES CANINA E HUMANA.	39
Resumo	39
Abstract	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	43
<i>Animais</i>	43
<i>Imunotipificação</i>	44
<i>Algoritmo diagnóstico dos linfomas cutâneos</i>	45
<i>Análise estatística</i>	47
Resultados.....	48
<i>Morfologia dos linfócitos neoplásicos</i>	48
<i>Imunotipificação dos linfomas cutâneos</i>	51
<i>Efeito das variáveis sobre o tempo de sobrevivência</i>	55
Discussão	56
<i>Caracterização imunofenotípica</i>	58
Conclusões.....	59
Referências.	62
 CAPÍTULO 4 – PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CÃES COM LINFOMA CUTÂNEO	66
Resumo	66
Abstract	67
Introdução.....	68
Material e métodos.....	70
Resultados.....	72
<i>Concentração das frações proteicas do grupo-estudo e do grupo-controle</i>	72

<i>Correlação PFA vs. tempo de sobrevivência</i>	75
Discussão	77
Conclusão.....	78
Referências	80
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 83
ANEXO 1	86
APÊNDICE 1	87

CERTIFICADO CEUA



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Correlação entre a avaliação clínico-evolutiva e a caracterização morfológica, imunofenotípica e perfil proteico de linfomas cutâneos caninos”** protocolo nº 10.339/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Mirela Tinucci Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	11/07/2016 a 10/02/2017
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	45
Peso / Idade	Todas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Serviço de Oncologia Veterinária e canil com animais saudáveis do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/UNESP/Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

IgG - Imunoglobulina G

IgG2 - Imunoglobulina G2

LC - Linfoma cutâneo

LCCCT - Linfoma cutâneo canino de células T

LCE - Linfoma cutâneo epiteliotrópico

LCNE - Linfoma cutâneo não-epiteliotrópico

MF - Micose fungóide

NK - Natural killer

OMS-EORTC - Organização Mundial da Saúde – Organização Européia de
Investigação e Tratamento do Câncer

SRD - Sem raça definida

TCR - Receptor das células T

WHO - World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 2

Figura 1: Fotografia da região ventral do abdômen de cão da raça YorkshireTerrier, 9 anos, apresentando lesões mistas de padrão anular (seta azul), serpiginosa (seta verde) e arciforme (seta preta). Material didático Unesp/Jaboticabal (2014).....20

Figura 2: Fotografia de lesões comprometendo as junções mucocutâneas de narina e lábios, além da pele de um cão da raça boxer de 8 anos. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015)21

Figura 3: Fotografia de lesão na língua (seta), de cão da raça Golden Retriever de 8 anos. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015).....21

Figura 4: Fotografia da lateral esquerda de cão da raça boxer, de 8 anos apresentando nódulos generalizados, com distribuição difusa e assimétrica. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015).....22

Figura 5: Fotografia da lateral esquerda de cão SRD, de 6 anos apresentando uma massa única lobulada. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015).....22

Capítulo 3

Figura 1: Abordagem algorítmica para o diagnóstico de neoplasias de células T e NK. Linfoma anaplásica de grandes células (ALCL); linfomas de células T associadas com enteropatia (EATL);, linfoma de células T periférico(PTCL), não especificado de outra forma(NOS);,distúrbio linfoproliferativo(LPD); micosefungóide(MF); linfoma de células T semelhante a paniculite subcutânea(SPTCL); síndrome de Sézary(SS).....47

Figura 2: Fotomicrografias de linfomas cutâneos de cães (coloração de hematoxilina e eosina) A. Derme e hipoderme, com infiltrado de linfócitos neoplásicos de

distribuição difusa na periferia de glândulas anexas (seta) (aumento de 40x). B. Epiderme evidenciando infiltrado de linfócitos atípicos, alguns hipercromáticos com halos claros (seta) (aumento de 400X). C. Marcado infiltrado neoplásico em derme e epiderme (aumento de 400x). D. Hipoderme com infiltrado de células grandes, de núcleo redondo com múltiplos nucléolos pequenos adjacentes a membrana nuclear com aparência blástica (setas), na qual também se observam algumas figuras de mitoses (aumento de 400x). E. Infiltrado difuso na periferia de glândulas anexas (seta), derme e hipoderme (aumento de 40x). F. Infiltrado nodular neoplásico em hipoderme (setas) e ausência de infiltrado em derme e periferia de glândulas anexas (aumento de 40x)50

Figura 3: Representação dos resultados da marcação das reações imuno-histoquímicas com os anticorpos CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, CD56, CD7 e Granzima B, obtidos das amostras de 25 casos de linfoma cutâneo em cães.....51

Figura 4: Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica para detecção dos anticorpos primários CD3, CD20, CD4 e CD8. Método polímero DAB. Linfoma cutâneo canino. A. Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcação pelo anticorpo CD3 (400x). B. Derme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo CD3 (400X). C. Hipoderme com infiltrado de linfócitos com imunomarcação pelo anticorpo CD20 (200x). D. Derme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo CD20 (400x). E. Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcação pelo anticorpo CD4 (400x). F. Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcação pelo anticorpo CD8 (400x).54

Figura 5: Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica para detecção dos anticorpos primários CD7, CD30, CD56 e Granzima B. Método polímero DAB. Linfoma cutâneo canino. A. Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcação pelo anticorpo CD7 (200x). B. Derme com infiltrado de linfócitos e imunomarcação pelo anticorpo CD30 (400X). C. Derme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo CD56 (400x). D. Hipoderme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo Granzima B (200x).55

Figura 6: Curva de Kaplan Meier para a probabilidade de sobrevida em função do tempo de sobrevida (dias) dos cães com linfoma cutâneo, em vermelho o intervalo de confiança 95%.....56

Capítulo 4

Figura 1: Concentrações de proteínas séricas de cães com linfoma cutâneo (doentes), comparado com o grupo controle (sadios). IgG (cadeia pesada) (A), IgG (cadeia leve) (B) e PM 34000 Daltons (C). Teste F e Teste de Kolmogorov-Smirnov. Significância $P < 0,05$73

Figura 2: Concentrações proteínas séricas de cães com linfoma cutâneo (doentes), comparado com o grupo controle (sadios), da Albumina (A), transferrina (B), GPA (C) e PM 23000 Daltons (D). Teste F e Teste de Kolmogorov-Smirnov. Significância ($P < 0,05$).74

Figura 3: Concentrações de proteínas séricas IgA (A), haptoglobina (B), ceruloplasmina (C), AAT (D) de cães com linfoma cutâneo (doentes) e grupo controle (sadios), que não apresentaram diferença significativa. Teste F e Teste de Kolmogorov-Smirnov.....75

Figura 4: Curva de Kaplan Meier para a probabilidade de sobrevida em função do tempo de sobrevida (dias) dos cães com linfoma cutâneo, em vermelho o intervalo de confiança 95%.....76

Figura 5: Correlação entre as concentrações das PFA (Transferrina e Albumina) vs. tempo de sobrevida em dias, dos 26 cães com linfoma cutâneo. A. Transferrina / Tempo de sobrevida ($n=26$; $R^2=0,261$; $P < 0,05$). B. Albumina / Tempo de sobrevida ($n=26$; $R^2=0,246$; $P < 0,05$).....77

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Classificações das lesões cutâneas (primárias e secundárias) encontradas nos 29 cães com linfoma cutâneo.....19

Tabela 2: Protocolos utilizados em resposta à quimioterapia antineoplásica dos pacientes acometidos por linfoma cutâneo. Jaboticabal, SP24

Tabela 3: Distribuição dos efeitos adversos mais comuns observados nos 11 cães com Linfoma Cutâneo que receberam tratamento quimioterápico, de acordo com Grupo de Cooperação em Oncologia Veterinária - Critérios terminológicos comuns para eventos adversos (VCOG-CTCAE) (2011).....26

Tabela 4: Associação entre as variáveis do estudo e o tempo de sobrevivência de 29 cães acometidos por linfoma cutâneo, são descritas a confiabilidade, erro e significância ($P < 0,1$) de cada variante, Jaboticabal, SP27

Tabela 5: Incidência de linfoma cutâneo relatado em Instituições de Ensino Superior de Medicina Veterinária nos estados do Paraná e São Paulo29

Tabela 6: Sinais e lesões dermatológicas detectadas nos 29 cães que receberam o diagnóstico de linfoma cutâneo. Jaboticabal, SP, 2016.31

Capítulo 3

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados em linfomas cutâneos caninos, com seus respectivos locais de marcação, clones, marcas, diluições e tampões empregados. 2016.....45

Tabela 2: Resumo das características morfológicas encontradas nos 25 casos de linfoma cutâneo canino49

Tabela 3: Imunofenótipo identificado nos seis casos de linfoma cutâneo canino epiteliotrópico (LCE). Jaboticabal 2016.50

Tabela 4: Imunofenótipo identificado nos 19 casos de linfoma cutâneo canino não epiteliotrópico (LCNE). Jaboticabal 2016.....52

Tabela 5: Descrição dos fenótipos predominantes, detectados nos 25 casos de linfoma cutâneo canino e sua distribuição segundo o epiteliotropismo.....53

Capítulo 4

Tabela 1: Médias, desvios-padrão e valor de P, das concentrações de proteínas séricas (mg/dL) de cães com linfoma cutâneo e cães saudáveis, obtidas pela técnica SDS-PAGE. Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si72

Tabela 2: Associação linear entre as variáveis albumina e transferrina, com o tempo de sobrevivência. Correlação de Pearson superior ($R > 0.5$), significância bilateral ($P < 0.05$)76

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.

Introdução

O linfoma cutâneo (LC) em cães é uma doença que se caracteriza pela proliferação clonal de linfócitos atípicos na pele (MILLER et al., 2013). É um linfoma não-Hodgkin, formado por um grupo de doenças neoplásicas malignas de linfócitos T e B e células Natural Killer (NK), cuja primeira manifestação clínica é a presença de lesões cutâneas, sem existir lesão extra cutâneas no momento do diagnóstico (RUEDA; CORTES, 2008). A apresentação clínica é inespecífica e pode mimetizar muitas dermatites (FONTAINE et al., 2010). Nas fases iniciais da doença torna-se difícil diferenciar a condição neoplásica de quadro inflamatório linfocítico cutâneo (MURPHY; OLIVRY 2000). Descrita pela primeira vez em 1972 (KELLY et al., 1972), e para muitos autores a doença rara e de etiologia desconhecida (FONTAINE et al., 2009; WITHROW et al., 2013).

Diversos estudos mencionaram novas variedades e formas de apresentação do LC na espécie canina baseadas principalmente nos resultados de reações imuno-histoquímicas, comportamento clínico da neoplasia e nas frequentes mudanças da classificação desta doença na espécie humana, que tem levado na classificação em novas variantes de LC (WILLEMZE et al., 2005; DE BOSSCHERE; DECLERCQ, 2008; AFFOLTER et al., 2009; FONTAINE et al., 2009; MILLER et al., 2013; MOORE et al., 2012). Nas últimas três décadas, a classificação morfológica e imunofenotípica do LC em medicina veterinária baseou-se nos critérios de classificação utilizados em humanos (VALLI et al., 2011).

O objetivo desta revisão é definir quais são as atuais variantes, tipos e subtipos do LC em cães e estabelecer as principais semelhanças e diferenças com a classificação existente na espécie humana.

Revisão de Literatura

Epidemiologia

Poucos estudos epidemiológicos determinaram a prevalência do linfoma cutâneo no mundo. Um estudo conduzido entre 1994 e 2001 detectou prevalência de 0,02% entre todos os casos atendidos na rotina do Hospital de pequenos animais da Universidade da Florida (SANTORO et al., 2007). Na década de 90, estimava-se que de 3% a 8% de todas as apresentações de linfoma canino, eram cutâneas (MOORE; OLIVRY, 1994). Nas Américas Central e do Sul se desconhece as formas de apresentação e prevalência desta enfermidade. No Brasil, relatos de casos tem evidenciado a presença da doença (FIGHERA et al., 2003; CARDOSO et al., 2006; RODIGHERI et al., 2007; FRANÇA et al., 2011; PALUMBO et al., 2015), e alguns trabalhos epidemiológicos limitam-se ao estado de São Paulo (TORRES NETO et al., 2015; DIAS et al., 2015; JARK et al., 2014), e um único estudo no estado do Paraná, no qual Moreno et al. (2010) analisou 49 casos desta neoplasia.

Classificação atual na espécie canina

Uma abordagem inicial até hoje utilizada em medicina veterinária foi a proposta por Moore e Olivry, (1994), subdividindo LC em dois grandes grupos, baseado no tropismo das células neoplásicas pelo epitélio; linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE) e linfoma cutâneo não-epiteliotrópico (LCNE).

1. Linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE)

O LC epiteliotrópico é representado por infiltração de linfócitos T neoplásicos em epiderme e estruturas anexas, pelo que também se denomina na medicina veterinária como um linfoma cutâneo canino de células T (LCCCT) (MOORE; OLIVRY, 1994, MILLER et al., 2013). A classificação de linfoma epiteliotrópico está bem estudada na literatura humana, mas é ainda controversa na medicina veterinária (GROSS et al., 2005).

Trabalhos na espécie canina subdividiram o LCE em três tipos: micose fungóide (MF), reticulose pagetóide (formas localizada e generalizada) e síndrome de Sézary (MOORE; OLIVRY, 1994, MILLER et al., 2013). O consenso em humanos de 2005 da OMS-EORTC (Organização Mundial da Saúde – Organização Européia

de Investigação e Tratamento do Câncer) propuseram a reclassificação da “reticulose pagetóide” convertendo-a a uma variante da MF, pelo qual recentes trabalhos na medicina veterinária, fundamentados nesta reclassificação sugerem que o LCE canino deveria ser subdividido só em dois tipos: MF e síndrome de Sézary e a reticulose pagetóide passaria a ser considerada uma variante da MF (WILLEMZE et al., 2005).

1.1. Micose fungóide

A micose fungóide (MF) é considerada a forma mais comum de LC na espécie canina e humana (MOORE; OLIVRY, 1994; WILLEMZE et al., 2005). Acomete principalmente cães adultos e idosos que inicia-se na forma de manchas e placas precedendo o estado tumoral. A progressão é mais rápida quando comparada com humanos e lesões mucocutâneas são também frequentes sendo mais comuns na espécie canina. O prognóstico é desfavorável e a média de sobrevida é de meses até dois anos nos cães (SCHMIDT, 2011). A MF pode se manifestar no estado de tumor, sem passar pelos estados prévios de manchas e placas e quando isto acontece, esta forma recebe o nome de MF de d’emblée (FONTAINE et al., 2009).

A lesão histopatológica clássica caracteriza-se pelo tropismo das células neoplásicas pela epiderme e estruturas anexas (folículo piloso, glândulas apócrinas e glândulas sebáceas). Os linfócitos na epiderme podem apresentar distribuição difusa ou agregados discretos denominados microabscessos de Pautrier’s. As estruturas anexas podem ser obliteradas pelo infiltrado neoplásico. Podem apresentar moderada hiperqueratose, acantose epidérmica e mucino folicular. A infiltração neoplásica pode ter progressão lenta na derme e panículo ou rápida na MF de d’emblée (MOORE; OLIVRY, 1994; MACHICOTE; GONZÁLEZ, 2008; FONTAINE et al., 2009).

Estudos imuno-histoquímicos têm demonstrado que 80% dos casos de MF são de células T citotóxicas (CD3+/CD4-/CD8+), 20% dos casos são (CD3+/CD4-/CD8-) (FONTAINE et al., 2009, 2010; WITHROW et al., 2013). Outra proteína presente na superfície das células neoplásicas é o receptor das células T (TCR), caracterizado por duas cadeias $\alpha\beta$, $\gamma\delta$. Em cães com MF, o fenótipo TCR $\gamma\delta$ é o mais frequente

(MOORE et al., 2009). Além disso, outra proteína com expressão elevada é a integrina $\beta 1$ (VLA-4) (AFFOLTER, 2007).

1.1.1. Reticulose pagetóide (Variante da MF)

Foi descrito em cão com lesões na mucosa oral, epitélio nasal e coxim plantar e as alterações histopatológicas foram similares à reticulose pagetóide humana (JOHNSON; PATTERSON, 1981). Clinicamente é impossível diferenciar a reticulose pagetóide da MF (FONTAINE et al., 2010). Na reticulose pagetóide as células linfóides malignas apresentam semelhança morfológica com as chamadas células de Paget (células de carcinoma ductal). Quando o infiltrado neoplásico está limitado estritamente à epiderme e glândulas anexas recebe o nome de forma “Woringer-Kolopp” a qual é geralmente localizada.

1.2. Síndrome de Sézary

A síndrome de Sézary está associada com eritema e escamas na pele (eritrodermia) e nos linfonodos e no sangue periférico é observada a presença de linfócitos neoplásicos grandes com núcleo hipercromático que apresentam dobras na estrutura nuclear de aparência cerebroide (células de Sézary). As lesões histológicas cutâneas são similares às da MF e sua apresentação também é pouco frequente (MACHICOTE; GONZÁLEZ, 2008; FONTAINE et al., 2009).

2. Linfoma cutâneo não epiteliotrópico (LCNE)

Este tipo de linfoma é pouco descrito na literatura veterinária. Para vários autores o LCNE na espécie canina é de rara apresentação e menos comum que o LCE (MOORE; OLIVRY, 1994; FONTAINE et al., 2009; MILLER et al., 2013). Moore et al. (2012) consideram que o LCNE é uma enfermidade complexa e heterogênea. A manifestação clínica na maioria das vezes é generalizada e multifocal, os nódulos/tumores são presentes na maior parte dos casos podendo apresentar formas bizarras do tipo arciforme e serpiginosa (MILLER et al., 2013). A OMS classifica os LCNE como linfoma cutâneo de células T periférico, sem outra especificação (MOORE et al., 2012; TORRES NETO et al., 2015),

Na avaliação histopatológica são classicamente caracterizados por massas não encapsuladas, predominantemente localizadas na derme profunda e subcutâneo, composta por lençóis, aglomerados ou agregados perivascularares nodulares de células relativamente monomórficas. As células usualmente são grandes e semelhantes aos histiócitos. No entanto, as células podem ter grande variação na sua morfologia. Os infiltrados neoplásticos possui distribuição ampla e densa na derme e limítrofe com a epiderme. Geralmente existe infiltrado periférico nas glândulas anexas e o epitélio delas não é invadido, embora existam exceções (MOORE; OLIVRY et al., 1994; GROSS et al., 2006).

Os LCNE em cães também são bastante heterogêneos e em relação a sua caracterização imunofenotípica (MILLER et al., 2013) poucos trabalhos existentes mencionam um fenótipo de células T (CD3+, CD45+, CD8+/CD4- ou CD8-/CD4-) e raramente de células B (MOORE; OLIVRY, 1994, DAY 1995; MOORE et al., 2012). O prognóstico é desfavorável devido a sua rápida progressão, com média de sobrevida de quatro a oito meses (MACHICOTE; GONZÁLEZ, 2008).

2.1. Linfoma cutâneo de células T indolente (Não-epiteliotrópico)

Affolter et al. (2009) avaliaram oito cães com um infiltrado linfoide cutâneo restrito na derme, em estágio quiescente prolongado e com progressão lenta, que na avaliação histopatológica possuíam semelhança com quadro benigno de linfocitose cutânea observado em felinos e comumente em humanos. No acompanhamento feito nos cães não se observou regressão das lesões e foi confirmada a presença de células T neoplásicas, juntamente com teste de clonalidade para o receptor de células T. A progressão lenta não é comum para um linfoma cutâneo, portanto foi concluído que se tratava de uma forma de linfoma cutâneo indolente de células T, que ao longo do tempo pode progredir para um linfoma cutâneo de alto grau.

2.2. Linfoma cutâneo de células B (Não-epiteliotrópico)

A caracterização imunofenotípica realizada em cães com LCNE identificou dois casos com o imunofenótipo B, mediante a detecção da cadeia pesada da imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina G2 (IgG2) no citoplasma dos linfócitos (DAY, 1995). Um cão Golden Retriever de 10 anos apresentou lesões nodulares e

de lenta progressão na pele. No exame histopatológico observou-se infiltrado na derme e na periferia das glândulas anexas e o imunofenótipo foi estabelecido pela reação positiva ao anticorpo CD79a (DE BOSSCHERE; DECLERCQ, 2008).

Classificação WHO – EORT, aspectos comparativos entre a espécie humana e canina

Desde 1972, quando se descreveu pela primeira vez a doença no cão, em diferentes publicações foi mencionada a semelhança com a MF humana (KELLY et al., 1972). Ponce et al., (2010) sugerem que o cão, por se tratar de um companheiro próximo ao homem e submetido às mesmas influências ambientais, frequentemente é considerado modelo útil para o estudo da etiologia e a terapia do câncer. O valor do modelo canino, neste aspecto, depende de distinguir os principais subgrupos de linfomas em ambas as espécies utilizando uma classificação de confiança.

O último consenso elaborado pela OMS– EORT reformulou a classificação do linfoma cutâneo na espécie humana (Tabela 1). Uma das razões que motivou esse consenso foi o variado comportamento biológico dos linfomas cutâneos, quando comparados com os linfomas nodais (WILLEMZE et al., 2005). No consenso foram avaliados achados clínicos, características histológicas (arquitetura de tumor, morfologia das células tumorais e atividade mitótica), imunofenótipo e em alguns casos, alterações genéticas para estabelecer um diagnóstico final da doença.

De acordo com as diretrizes atuais e aplicando esta classificação na espécie canina, dos 20 tipos de LC humano até hoje descritos, unicamente quatro neoplasias (MF, Reticulose Pagetóide e Síndrome de Sézary, LC primário de célula T periférica) tem sido identificadas e relatadas na espécie canina (FONTAINE et al., 2010; SCHMIDT, 2011; MOORE et al., 2012) (Tabela 1). O LC de células T indolente e o LC de células B, relatados na espécie canina e acima citados, não foram referenciados neste consenso.

Na literatura avaliada na medicina veterinária destacaram-se as revisões e pesquisas realizadas por Peter Moore e colaboradores desde os anos 90, um resumo da classificação ainda empregada do LC canino na literatura veterinária, pode ser observado a Tabela 2.

Tabela 1: Classificação OMS-EORTC para os linfomas cutâneos humanos com manifestações primárias cutâneas. Em negrito as neoplasias identificadas na espécie canina (MF, Reticulose Pagetóide e Síndrome de Sézary) (WILLEMZE et al., 2005).

LINFOMAS CUTÂNEOS DE CÉLULAS T E DE CÉLULAS NK
Micose fungóide Micose fungóide – variantes e subtipos MF foliculotrópica Reticulose pagetóide Cútis laxa granulomatosa Síndrome de Sézary Linfoma/leucemia de célula T do adulto Doenças linfoproliferativas CD30+ cutâneas primárias Linfoma cutâneo primário de grande célula anaplásica Papulose linfomatóide Linfoma subcutâneo de células T, paniculite-símile Linfoma extranodal de célula T/NK, tipo nasal
Neoplasias não especificadas ou provisórias
Linfoma cutâneo primário de célula T periférica, não especificado Linfoma cutâneo primário agressivo de célula T CD8+ epidermotrópica (provisório) Linfoma cutâneo de célula T $\gamma\delta$ (provisório) Linfoma cutâneo primário de pequena e média célula T CD4+ pleomórfica (provisório)
Neoplasia de Precursor Hematológico
Neoplasia hematodérmica CD4+CD56+ (linfoma de célula NK blástica)
LINFOMAS CUTÂNEOS DE CÉLULAS B
Linfoma de células B de zona marginal cutâneo primário (LZM) Linfoma centro folicular cutâneo primário Linfoma difuso de células grandes B cutâneo primário, tipo das pernas Linfoma difuso de células grandes B cutâneo primário Linfoma de células grandes B intravascular (LCBGIV)

Tabela 2: Classificação do linfoma cutâneo canino baseada em distintas referências da área de Medicina Veterinária (MOORE; OLIVRY, 1994; DAY, 1995; MOORE et al., 1998; DE BOSSCHERE; DECLERCQ, 2008; AFFOLTER et al., 2009; FONTAINE et al., 2009; MILLER et al., 2013; MOORE et al., 2012).

LINFOMA CUTÂNEO DE CÉLULA T (Epiteliotrópicos).
Micose fungóide forma clássica. Variante MF: Reticulose pagetóide Síndrome de Sézary
LINFOMA CUTÂNEO DE CÉLULA T (Não epiteliotrópico).
Linfoma cutâneo primário de células T periférico, não especificado Linfoma cutâneo de células T Indolente, não epiteliotrópico
LINFOMA CUTÂNEO DE CÉLULAS B (Não epiteliotrópico).
Linfoma Cutâneo não-epiteliotrópico de células B

Em cães, o LC de células T é definido como doença de células CD8+, contrariamente à forma humana, onde predominam as células CD4+ maduras (MOORE; OLIVRY et al., 1994; FOURNEL-FLEURY et al., 2002). Desta forma, o LC de células T canino pode ser melhor modelo para os subtipos raros de LC de células T CD8+ humano (ex: LC primário agressivo de célula T CD8+ epidermotrópico), incluindo certas variantes que se apresentam principalmente antes dos 20 anos de idade (DE LORIMIER, L.P. 2006; MILLER et al., 2013).

A maioria dos estudos na medicina veterinária mencionaram a semelhança entre a MF humana e canina (KELLY et al., 1972, MOORE; OLIVRY et al., 1994; MILLER et al., 2013) e pesquisas também evidenciaram marcantes diferenças entre as duas espécies (Tabela 3) (MOORE; OLIVRY, 1994; WILLEMZE et al., 2005; AFFOLTER, 2007; MACHICOTE; GONZÁLEZ, 2008; FONTAINE et al., 2009; MOORE et al., 2012; MILLER et al., 2013; MIYASHIRO; SANCHES, 2015).

Tabela 3: Principais diferenças entre micose fungóide canina e humana (MOORE; OLIVRY, 1994; WILLEMZE et al., 2005; AFFOLTER, 2007; MACHICOTE; GONZÁLEZ, 2008; FONTAINE et al., 2009; MILLER et al., 2013; MOORE et al., 2012; MIYASHIRO; SANCHES, 2015).

Tópico	Caninos	Humanos
Clínica	Comprometimento comum das junções mucocutâneas e cavidade oral	Comprometimento raro das junções mucocutâneas e cavidade oral
	A MF canina é agressiva no cão, com reduzida resposta ao tratamento, rápida progressão, reduzidos intervalo livre de doença e tempo de sobrevida	A MF é considerada doença indolente, com resposta satisfatória ao tratamento e sobrevida longa
Morfologia Celular	Epiteliotropismo é frequentemente relatado. Formas dérmicas e subcutâneas são infrequentes	Epiteliotropismo reduzido está associado a progressão da doença e invasão na derme. Formas dérmicas e subcutâneas são frequentes
	Frequente infiltrado neoplásico com tropismo pelo epitélio do folículo piloso e glândulas anexas.	Raramente observado infiltrado neoplásico no epitélio do folículo piloso e glândulas anexas.
Fenótipo	Linfomas cutâneos de células B e NK, são raramente descritos na literatura veterinária	Linfomas cutâneos de células B e NK são frequentemente encontrados na rotina clínica
	Pacientes com MF é comum o fenótipo CD3+, CD4-, CD8+, TCR $\gamma\delta$	Pacientes com MF é comum o fenótipo CD3+, CD4+, CD8-, TCR $\alpha\beta$

O desenvolvimento das técnicas diagnósticas na medicina veterinária, como a imuno-histoquímica e técnicas moleculares, permitirá no futuro reconhecer novas variantes de LC, que hoje a avaliação clínica e o estudo histopatológico não conseguem reconhecer e diferenciar. São necessários estudos sobre incidência e prevalência em cães, que permitam conhecer o verdadeiro impacto desta doença em outras regiões do mundo.

Referências

AFFOLTER, V. K. Round cell tumors. **Workshop Skin Oncology**. Bern. July 5-7, p72-73. 2007.

AFFOLTER, V.K.; GROSS, T.L.; MOORE, P.F. Indolent cutaneous T-cell lymphoma presenting as cutaneous lymphocytosis in dogs. **Vet. Dermatol.** 20: p.577–585, 2009.

CARDOSO, M.; NETO TORRES, R; AMORIM, R.; FABRIS, V. Micose fungóide em um cão. **Vet. e Zootec.** v. 13, n.2, p. 137-143, 2006.

DAY M.J. Immunophenotypic Characterization of Cutaneous Lymphoid Neoplasia in the Dog and Cat. **J. Comp. Path.** Vol. 112, 79-96, 1995.

DE BOSSCHERE H.; DECLERCQ J. Cutaneous nonepitheliotropic B-cell lymphoma in a Golden retriever. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, 77- P 315-318. 2008.

DE LORIMIER L.P. Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. **Vet. Clin. of Nor. Am. Small Ani. Prac.**; 36: p.213–28, 2006.

DIAS, F.R.; ANAI, L.A; JARK, P. et al., Estudo Retrospectivo de 33 casos de Linfoma Cutâneo Canino. **Anais do I simpósio de oncologia comparada. Investigaçãofranca/SP/Br.**v. 14, n. 3, 2015.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; RODRIGUES A.; SHMIDT, C.; BARROS C.S. Micose fungóide em um cão. **Clinica Veterinaria**, n.45, p.34-8, 2003.

FRANÇA RKN, DALTRO SRT, ANDERLINI GPOS, FERRI RC. **Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária.** Caracterização e diagnóstico das manifestações clínico-patológicas do linfoma epiteliotrópico (micose fungóide) em cães: relato de caso. Pag. 56-59, 2011.

FONTAINE, J.; BOVENS, C.; BETTENAY, S.; MUELLER, R. S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2009.

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

FOURNEL-FLEURY C.; PONCE F.; FELMAN P.; BLAVIER A. et al., Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. **VetPathol** 39:92–109, 2002.

GROSS T. L., IHRKE P. J., WALDER E. J., AFFOLTER V. K. Skin diseases of the dog and cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd Ed., **Blackwell Publishing, Iowa**, pp. 882 – 888, 2006.

JARK, P.; VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANAI, .L.A.; TINUCCI-COSTA, M. Epidemiological Study of 60 cases of Cutaneous Lymphoma in Dogs in São Paulo State, Brazil. (Abstract) In: **39th World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Congress**, Cape Town, South Africa, 16 - 19 Sep. 2014.

JOHNSON J. A.; PATTERSON J. M. Canine Epidermotropic Lymphoproliferative Disease Resembling Pagetoid Reticulosis in Man. **Veterinary Pathology**. 18: 487-493 (1981)

KELLY D.F.; HALLIWELL R. E.; SCHWARTZMAN R. M. Generalized cutaneous eruption in a dog, with histological similarity to human mycosis fungoides. **British Journal of Dermatology**. 86, 164, 1972.

MACHICOTE, G.; GONZÁLEZ, J. L. Linfoma Cutáneo. **Clin. Vet. Peq. Anim**, 28 (1): 31-37, 2008.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. CAMPBELL, K Tumors of lymphoid Origem. In: **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p.810-840, 2013.

MIYASHIRO, D.R.; SANCHES, J.S. Cutaneous lymphomas: A review. **Cumhuriyet Medical Journal**, Volume: 37, P.267-86, 2015.

MORENO, K. Aspectos epidemiológicos, morfológicos e terapêuticos do linfoma cutâneo e índices de proliferação celular (PCNA e ki-67) no linfoma multicêntrico em cães. Teses de Doutorado. **Universidade Estadual De Londrina**. 96 folhas, 17 de dezembro de 2008.

MOORE P. F.; AFFOLTER V. K.; OLIVRY T.; SCHRENZEL M. D. The use of immunological reagents in defining the pathogenesis of canine skin disease involving proliferation of leukocytes. In: Kwochka K. W., Willemse T. en von Tscharner C. **Advances in Veterinary Dermatology**. Vol. 3, Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 77 - 94. 1998.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T. Cutaneous lymphomas in companion animals. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n.4, p. 499-505, 1994.

MOORE, P.; AFFOLTER, V.; KELLER, S. Canine inflamed nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: a diagnostic **conundrum** **Advances in Veterinary Dermatology**. Edited by Sheila M. F. Torres. The Authors. Journal compilation. ESVD and ACVD, p.220 – 227, 2012.

MOORE, P.F.; AFFOLTER, V.K.; GRAHAM, P.S.; HIRT, B. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: an investigation of T-cell receptor immunophenotype, lesion topography and molecular clonality. **Veterinary Dermatology**, 20, 569–576, 2009.

MURPHY M.; OLIVRY T.; Comparison of T-lymphocyte proliferation in canine epitheliotropic lymphosarcoma and benign lymphocytic dermatoses. **Veterinary Dermatology**. Volume 11, Issue 2 Pages 99–105, 2000.

PALUMBO, M.I.P.; ROSSETT, V.J.V.; TORRES NETO, R.; et al., Epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma associated with melanoma in a dog: case report. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.3, p.664-670, 2015.

PONCE, F.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P.; et al., A Morphological Study of 608 Cases of Canine Malignant Lymphoma in France with a Focus on Comparative Similarities between Canine and Human Lymphoma Morphology. **Veterinary Pathology** 47(3) 414-433, 2010.

RODIGHERI, S.M.; FARIAS, M.R.; WERNER, J.; MACEDO, T.R.; OSTROWSKI, M.A.B. Síndrome de Sézary em cadela. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1330-1332, 2007.

RUEDA X., CORTÉS C. Linfomas Cutáneos. **Rev Asoc Col Dermatol**. Volumen 16, número 2, junio de, pág. 143-158, 2008.

SANTORO, D.; MARSALLA, R.; HERNANDEZ, J. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. **Veterinary Dermatology**; 18: p.101–6, 2007.

SCHMIDT, V. Epitheliotropic T-cell cutaneous lymphoma in dogs. **Companion Animal**. Vol 16 April, 2011.

TORRES NETO, R.; WERNER, J.; SEQUEIRA, J.L.; LAUFER AMORIM, R. Linfoma cutâneo de células t canino: estudo anatomo clínico de 57 casos (2013-2015). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 59-60, 2015.

VALLI, V. E. SAN MYINT, M. BARTHEL, A. BIENZLE, D. et al. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria **Veterinary Pathology**; Volume: 48 issue: 1, page(s): 198-211, 2010.

WILLEMZE R, JAFFE ES, BURG G, CERRONI L, BERTI E, SWERDLOW SH, ET AL., WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. **Blood**; 105: 3768-86, 2005.

WITHROW, S.J.; VAIL, M. D. Hematopoietic Tumors. In: **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St Louis: Saunders, p. 608, 2013.

CAPITULO 2: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO LINFOMA CUTÂNEO EM CÃES

Resumo

Foram analisados neste estudo 29 casos de linfoma cutâneo canino atendidos no Hospital Veterinário da Unesp (Universidade Estadual Paulista), campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Os cães acometidos foram provenientes de 13 cidades diferentes do Estado de São Paulo; um terço não apresentaram definição racial e a média de idade no momento do diagnóstico foi de 7,8 anos. A apresentação clínica predominante das lesões cutâneas foi nódulos/tumores (86,2%), seguida por úlceras (75,8%) e placas (51,7%). Na avaliação histopatológica, a forma não epiteliotrópica foi a mais frequente (75%). Lomustina e prednisolona foram os fármacos terapêuticos de eleição (70-90mg/m²). O tempo de sobrevida média após o momento do diagnóstico foi de 26 dias. As variáveis que tiveram influência positiva ($P < 0,1$) na sobrevida foram o epiteliotropismo e alterações hematológicas pós quimioterapia (anemia, leucopenia e trombocitopenia). Observou-se resposta desfavorável ao tratamento, progressão rápida da neoplasia e sobrevida reduzida nos 29 cães deste estudo.

Palavras chaves: epiteliotrópico, quimioterapia, caninos, incidência.

CHAPTER 2 - EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF CUTANEOUS LYMPHOMA IN DOGS

Abstract

This study analyzed 29 cases of canine cutaneous lymphoma attended at the Veterinary Hospital of Unesp (Universidade Estadual Paulista), Jaboticabal, SP, Brazil. Results showed that they were from 13 different cities at State of São Paulo; a third of all dogs had no racial definition and the average age at diagnosis was 7.8 years. The predominant clinical presentation of skin lesions was nodules / tumors (86.2%), followed by ulcers (75.8%) and plaques (51.7%). Histopathological evaluation revealed that the epitheliotropic form was the most frequent (75%). Lomustine was the therapeutic protocol of choice (70-90mg/m²). The average survival time after diagnosis was 26 days. The variables that had a positive influence ($P < 0.1$) on survival were epitheliotropism and hematological alterations after chemotherapy (anemia, leukopenia and thrombocytopenia). Poor response to treatment, rapid neoplasia progression and reduced survival were observed in the 29 dogs in this study.

Keywords: chemotherapy, incidence, dogs, epitheliotropic

Introdução

O linfoma é considerado uma neoplasia maligna comum e compreende 7% de todas as neoplasias que afetam os cães. A variante cutânea do linfoma, por sua vez, é considerada incomum com incidência de 5% entre todos os linfomas (WITHROW et al., 2013). A ausência ou a presença de linfócitos neoplásicos no epitélio é uma característica utilizada para classificá-lo em: linfoma cutâneo epiteliotrópico (LCE), com tropismo de linfócitos T pela epiderme e estruturas anexas e o linfoma cutâneo não epiteliotrópico (LCNE), com invasão de linfócitos T ou B exclusivamente na derme e / ou panículo (MOORE et al., 1994).

A classificação do linfoma cutâneo em humanos é muito mais complexa, controversa e constantemente sujeita a mudanças baseadas no comportamento clínico, achados na histopatologia e no imunofenótipo. A micose fungóide e suas variantes compreendem o LC mais prevalente (50% de todos os LC) e estudado em humanos (MIYASHIRO E SANCHES, 2015).

O LCE e o LCNE mimetizam outras dermatopatias e a apresentação clínica de ambas as formas é muito variável, não sendo possível sua diferenciação pelo exame físico. Geralmente iniciam-se com eritrodermia, que progride para manchas, placas e finalmente lesões nodulares/tumorais. A fase disseminada é rara e as células neoplásicas podem ser detectadas no sangue circulante e linfonodos (síndrome de Sézary). A pele é o local mais comum de apresentação, porém lesões também podem ser encontradas na cavidade oral e nas junções mucocutâneas (FONTAINE et al., 2009; MILLER et al., 2013).

A citologia pode confirmar neoplasia de células redondas ou linfoma e o diagnóstico é confirmado com biópsias de pele. Mesmo assim, em alguns casos, a avaliação histopatológica pode ser inconclusiva e sugerem como diferencial as desordens histiocíticas, que devem ser caracterizadas com auxílio da técnica de imuno-histoquímica (MOORE et al., 1994; FONTAINE et al., 2009).

Na maioria dos casos, o diagnóstico é realizado em estados avançados da doença e o uso de quimioterapia antineoplásica é a primeira opção terapêutica, sendo nestes casos a lomustina o quimioterápico de escolha no tratamento de LCE e LCNE. Alguns trabalhos referem remissão completa em cães com doses de 50 mg/m² (GRAHAM; MYERS, 1999; DE LORIMIER, L.P. 2006). Outros trabalhos

referem remissões completas e parciais (78%-83%) com doses de entre 60 - 70 mg/m² e em média três a quatro doses (RISBON et al., 2004; WILLIAMS et al., 2006). As respostas terapêuticas são variáveis e o prognóstico destas neoplasias é desfavorável (DE LORIMIER, L.P. 2006; MOORE et al., 2012).

Entre 2007 e 2012 foi realizado um levantamento da casuística de LC no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp, campus de Jaboticabal - SP, o qual detectou um total de 60 ocorrências, com média anual de 10 casos e incidência de 0,35% ao ano (JARK et al., 2014). Estes dados são superiores aos reportados em estudos realizados na Florida e Reino Unido, com incidências de 0,02% e 0,08%, respectivamente (EDWARDS et al., 2003; SANTORO et al., 2007).

O frequente diagnóstico desta doença na casuística deste Hospital Veterinário motivou esta pesquisa, com o intuito de se analisar os casos de LC, determinar variáveis epidemiológicas e clínico-evolutivas e comparar os resultados obtidos com a literatura mundial.

Material e métodos

O referido estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV - Unesp, Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 10.339/16). Realizou-se um estudo descritivo e retrospectivo de cães com resultados de biópsias positivas para LC, provenientes do estado de São Paulo e atendidos entre abril de 2013 e fevereiro de 2016 (34 meses), no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV – Unesp, campus de Jaboticabal – SP.

Foram incluídos 29 casos e o critério de inclusão foi o resultado de biópsia positivo para LC (placas, nódulo ou tumor). De cada ficha clínica foram compilados dados referentes a raça, sexo, idade, cidade de origem, antecedentes de dermatopatias, avaliação semiológica das lesões e as análises de laboratório obtidas na avaliação inicial, antes do início do tratamento quimioterápico (hemograma, ALT, creatinina, proteínas totais e albumina).

Foram também observados os protocolos quimioterapêuticos e a cada sessão de quimioterapia foram avaliadas as respostas obtidas frente ao tratamento, conforme descrito por Dhaliwal et al. (2003): remissão completa (desaparecimento

da doença clínica), remissão parcial (diminuição maior ou igual a 50% do tamanho do tumor sem novos focos), doença estável (diminuição ou aumento menor que 50% do tamanho do tumor) e doença progressiva (aumento em pelo menos 50% do tamanho do tumor, ou o aparecimento de novos focos). Também foram registrados os eventos adversos após quimioterapia (alterações no exame clínico e nas análises de laboratório) e determinado o grau de toxicidade, baseado no consenso do grupo de oncologia cooperativa veterinária (VCOG-CTCAE, 2011). Finalmente foi determinado o tempo de sobrevida de cada paciente, considerando este como o tempo decorrido entre o diagnóstico do linfoma cutâneo e o óbito do animal.

Os dados coletados foram registrados em uma base de dados do programa Excel para posterior análise descritiva das variáveis em estudo, determinando a frequência absoluta e percentual das variáveis quantitativas. A sobrevida foi obtida pelo teste de Kaplan Meier com um intervalo de confiança de 95% utilizando o software GraphPadPrism versão 5. Também foram analisadas as correlações entre o tempo de sobrevida (em dias) e as variáveis em estudo, pelos métodos de LongRank, Breslow e Tarone-Ware, utilizando o programa SPSS Statistics, com um intervalo de confiança de 90%. As análises foram feitas no Departamento de Ciências Exatas da FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP.

Resultados

Dos 29 cães que participaram deste estudo, 34,4 % (10/29) eram cães sem raça definida (SRD) e 65,5% (19/29) de diferentes raças, dentre elas: Boxer (5), Golden Retriever (4), Yorkshire Terrier (2), Poodle (2), Lhasa Apso (1), Fox Paulistinha (1), Cocker Spaniel (1), Bulldog Inglês (1), Dálmata (1), Husky Siberiano (1). Neste estudo, 15 eram fêmeas e 14 eram machos e a média de idade no momento do diagnóstico foi de 7,8 anos, com intervalo 3 a 15 anos.

Os cães eram provenientes de seis diferentes microrregiões do estado de São Paulo (PALMER et al., 2002), sendo 13 de Araraquara (Matão, Araraquara, Fernando Prestes, Santa Ernestina, e Borborema), 10 de Ribeirão Preto (Jaboticabal, Ribeirão Preto, Jardinópolis e Sertãozinho), dois de Barretos (Bebedouro), dois de Catanduva (Catanduva), um de Orlândia (São Joaquim da Barra) e um de Campinas (Campinas).

Cinco cães apresentavam quadro de dermatite no momento do atendimento (dermatite atópica, dermatite acral por lambedura, escabiose acompanhada de otite externa bilateral crônica, dermatite alérgica a picada de pulgas (DAPP), dermatite úmida).

As lesões cutâneas associadas com a neoplasia foram classificadas em primárias e secundárias (Tabela 1) (GROSS et al., 2005).

Tabela 1: Classificações das lesões cutâneas (primárias e secundárias) encontradas nos 29 cães com linfoma cutâneo (adaptado de GROSS et al., 2005).

Lesões primárias	(n)	%
Nódulo/tumor	25/29	86,2%
Placa	15/29	51,7%
Eritema	14/29	48,2%
Lesões secundárias	(n)	%
Úlceras	22/29	75,8%
Crostras	6/29	20,6%
Escamas	3/29	10,3%
Erosões	2/29	6,8%

Algumas das lesões primárias apresentaram padrão morfológico variado, sendo observados arranjo anular em 6,9% (2/29), arciforme em 3,4% (1/29), serpiginosa em 10,3% (3/29) e mistas em 20,6% (6/29) (Figura. 1).



Figura 1: Fotografia da região ventral do abdômen de cão da raça Yorkshire Terrier, 9 anos, apresentando lesões mistas de padrão anular (seta azul), serpiginosa (seta verde) e arciforme (seta preta). Material didático Unesp/Jaboticabal (2014)

Outros sinais dermatológicos registrados em iguais proporções foram prurido e alopecia em 27,5% (8/29).

As junções mucocutâneas estavam comprometidas em 34,4% (10/29) dos casos, principalmente localizadas nas pálpebras, lábios e narinas (Figura 2). Lesões na cavidade oral foram detectadas em 17,2% (5/29), localizadas exclusivamente na língua (Figura 3).



Figura 2: Fotografia de lesões comprometendo as junções mucocutâneas de narina e lábios, além da pele de um cão da raça boxer de 8 anos. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015)



Figura 3: Fotografia de lesão na língua (seta), de cão da raça Golden Retriever de 8 anos. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015)

As lesões exibiram distribuição generalizada, difusa e assimétrica em 96,5% (28/29) dos casos, acometendo principalmente o pescoço, região dorsal de tórax e

abdômen (Figura 4). A forma localizada foi identificada em apenas um animal (3,4%), como tumor solitário na parede tóraco-abdominal esquerda (Figura 5).



Figura 4: Fotografia da lateral esquerda de cão da raça boxer, de 8 anos apresentando nódulos generalizados, com distribuição difusa e assimétrica. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015).



Figura 5: Fotografia da lateral esquerda de cão SRD, de 6 anos apresentando uma massa única lobulada. Material didático Unesp/Jaboticabal (2015)

Edema subcutâneo em diferentes locais (membros torácicos ou pélvicos, região ventral do tórax ou abdômen) estiveram presentes em 31% dos casos (9/29).

Linfonodomegalia no momento do diagnóstico foi observada em 72,4% (21/29) dos cães, dentre os quais apenas um animal recebeu laudo citológico

sugestivo de linfoma. Como não foram realizadas citologias ou biópsias dos linfonodos, a verdadeira natureza do aumento do tamanho não ficou caracterizada.

Foram encontradas anormalidades nas análises laboratoriais no hemograma, como anemia de leve a moderada, do tipo normocítica / normocrômica foram registradas em 65,5% (19/29) dos casos, trombocitopenia (média 143.000 plaq/ μ L) em 34,5% (10/29) e leucopenia (média 4.266 cel/ μ L) em 20,6% (6/29). As anormalidades bioquímicas mais encontradas foram elevação da alanina aminotransferase (ALT) (média dos animais doentes: 342,3 U/L) em 10% (3/29) dos casos, da creatinina sérica (média dos animais doentes: 3mg/dL) em 10% (3/29), hiperproteinemia (média dos animais doentes: 9,4 g/dL) em 40% (11/29), hipoproteinemia (média dos animais doentes: 5,3 g/dL) em 10% (3/29), hipoalbuminemia (média dos animais doentes: 2,04 g/dL) em 55% (16/29).

A citologia prévia do nódulo/tumor ou placa cutânea mostrou resultados sugestivos de linfoma. A confirmação foi dada pela biópsia e exame histopatológico, por meio do qual os linfomas cutâneos foram classificados como LCNE (n=22) ou como LCE (n=7).

Dos 29 cães com linfoma, 82,79% (24/29) receberam tratamento quimioterápico. Em 22 cães, o protocolo de primeira escolha foi a base de lomustina (70-90 mg/m²) a cada 21 dias, associado a prednisona. Um cão recebeu CHOP (vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona), devido a inexistência de lomustina no mercado naquele momento; outro apenas a prednisona como única modalidade terapêutica, devido a carência de recursos econômicos do proprietário (Tabela 2).

A associação de lomustina com outros quimioterápicos foi utilizada em dois casos. Um deles recebeu L-asparaginase e o outro fosfoetanolamina, metotrexato e bleomicina, este último por via intratumoral. Estas associações foram implementadas devido a grave progressão dos tumores cutâneos após a utilização da lomustina isoladamente. Dos 29 cães, cinco não receberam tratamento quimioterápico por apresentarem alterações clínicas e laboratoriais, que contraindicavam o uso destes fármacos.

A resposta à quimioterapia antineoplásica foi variável nos 24 cães tratados (Tabela 2); remissão parcial apresentada em 10 cães teve duração média de 14 dias

(7-34 dias), seguida por progressão da doença, apesar do tratamento. A média de sobrevida desses cães foi de 44 dias (15-114 dias). Nos 14 cães com doença progressiva, a média de sobrevida foi de 40 dias (10-120 dias). Remissão completa e doença estável não se verificou em nenhum dos pacientes deste estudo.

Tabela 2: Protocolos utilizados e resposta à quimioterapia antineoplásica dos pacientes acometidos por linfoma cutâneo. Jaboticabal, SP.

Tratamento	Nº	Remissão Parcial 34,4% (10/29)	Doença progressiva 48,2% (14/29)
Lomustina/Prednisona	20	9	11
Lomustina/Prednisona (associadas)	2	1*	1**
CHOP	1	0	1
Prednisona	1	0	1

*L-asparaginase

** fosfoetanolamina, metotrexato e bleomicina (IT)

Dos cinco cães que não receberam tratamento quimioterápico, a doença foi progressiva em 13,7% (4/29); um (3,4%) apresentou remissão parcial após tratamento de gastrite, posteriormente houve progressão da doença. A média de sobrevida destes cinco cães foi de 12 dias (6-16).

O efeito tóxico da quimioterapia foi percebido em 11 dos 24 cães tratados. Leucopenia por neutropenia e anemia foram detectadas em 63,6% (7/11), trombocitopenia e vômito em 54,5% (6/11), anorexia e elevação de enzimas hepáticas em 36,3% (4/11), diarreia em 27,2% (3/11) e azotemia em 18%(2/11). Treze cães não retornaram ao Hospital Veterinário após a primeira sessão de quimioterapia, pelo qual não foi possível sua reavaliação. A distribuição dos efeitos adversos mais comuns, de acordo com Grupo de Cooperação em Oncologia Veterinária - Critérios terminológicos comuns para eventos adversos (VCOG-CTCAE), em 2011 estão representados na Tabela 3. A média de sobrevida dos 29 animais com LC foi de 26 dias, representada pela curva de Kaplan-Meier (Figura 6). Quinze pacientes do estudo morreram por causas desconhecidas e 14 sofreram eutanásia por solicitação dos proprietários. A decisão foi pautada por uma somatória de sinais clínicos, dentro dos quais se descrevem: anorexia, vômito, prostração,

diarreia, edema nos membros e região ventral de abdômen, dispneia, progressão da doença cutânea e dor.

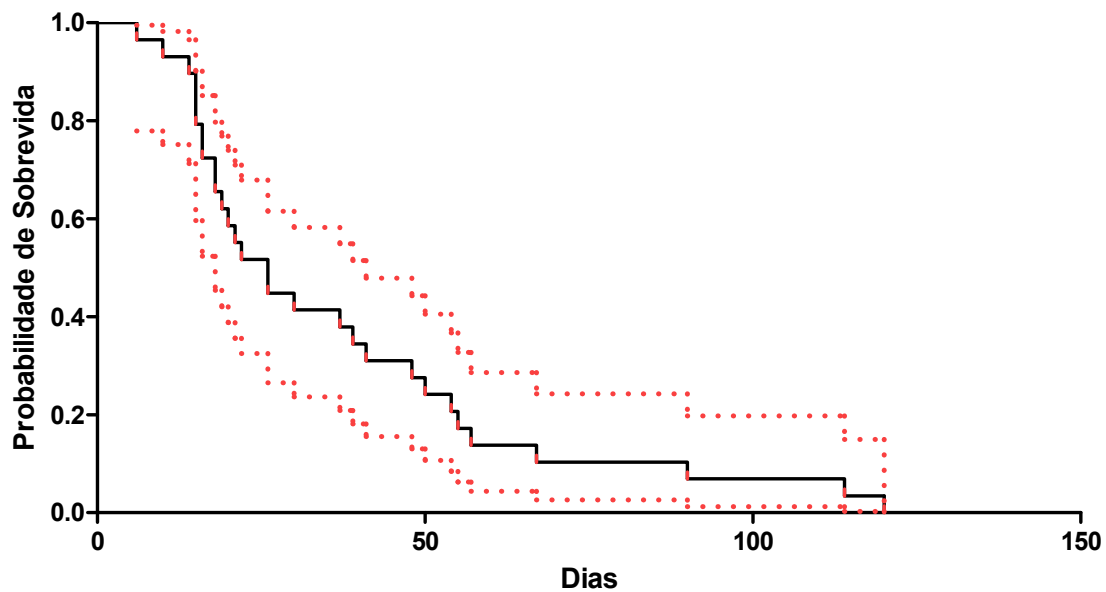


Figura 6: Curva de Kaplan Meier para a probabilidade de sobrevida em função do tempo de sobrevida (dias) dos 29 cães com linfoma cutâneo, em pontilhado o intervalo de confiança 95%

Tabela 3: Distribuição dos efeitos adversos mais comuns observados nos 11 cães com Linfoma Cutâneo que receberam tratamento quimioterápico, de acordo com Grupo de Cooperação em Oncologia Veterinária - Critérios terminológicos comuns para eventos adversos (VCOG-CTCAE) (2011).

Evento adverso e Grau		n=11	Protocolo
Leucopenia/neutropenia		7 (63,6%)	
Grau 1	1500-Limite normal baixo	4 (36,3%)	Lomustina/Prednisona
Grau 2	1000-1499 μ L	2 (18,1%)	Lomustina/Prednisona CHOP
Grau 3	500-999 μ L	1 (9%)	Lomustina/Prednisona
Anemia		7 (63,6%)	
Grau 1	30%- Limite normal baixo	4 (36,3%)	Lomustina/Prednisona Prednisona (1)
Grau 2	20 a $\leq$ 30%	3 (27,2%)	Lomustina/Prednisona CHOP (1)
Trombocitopenia		6 (54,5%)	
Grau 1	100.000 μ L – Limite normal baixo	2 (18,1%)	Lomustina/Prednisona
Grau 2	50.000-99.000 μ L	3 (27,2)	Lomustina/Prednisona CHOP (1)
Grau 3	25.000-49.000 μ L	1 (9%)	Lomustina/Prednisona
Elevação enzima hepática (ALT)		4 (36,3%)	
Grau 1	$\geq$ Limite superior do normal ate 1.5x LSN	1 (9%)	Lomustina/Prednisona
Grau 2	$\geq$ 1.5 – 4.0x LSN	1 (9%)	Lomustina/Prednisona
Grau 3	$\geq$ 4.0 – 10X LSN	2 (18,1%)	Lomustina/Prednisona Prednisona
Incremento da creatinina		2 (18,1%)	
Grau 2	$\geq$ 1.5 – 2.0X LNS	1 (9%)	Lomustina/Prednisona
Grau 4	$\geq$ 2.0 – 3.0X LNS	1 (9%)	Prednisona

*LSN (limite superior normal)

As variáveis que tiveram influência positiva na sobrevida, segundo as análises estatísticas (significância $P < 0,1$) foram: epiteliotropismo, anorexia, anemia, leucopenia e trombocitopenia. As outras variáveis mencionadas neste estudo não apresentaram significância estatística ($P < 0,1$) no tempo de sobrevida ou prognóstico dos pacientes (Tabela 4).

Tabela 4: Associação entre as variáveis do estudo e o tempo de sobrevida de 29 cães acometidos por linfoma cutâneo, são descritas a confiabilidade, erro e significância ($P < 0,1$) de cada variante, Jaboticabal, SP.

Tipo de variante	Variante	Confiabilidade %	Erro %	Significância $P < 0,1$
Epidemiológica	Sexo	<90%	>10%	NS
	Idade	<90%	>10%	NS
Clínica	Edema	<90%	>10%	NS
	Dermatite	<90%	>10%	NS
	Prurido	<90%	>10%	NS
	Lesão mucocutânea	<90%	>10%	NS
	Lesão oral	<90%	>10%	NS
Achados laboratoriais	Anemia	<90%	>10%	NS
	Leucopenia	<90%	>10%	NS
	Trombocitopenia	<90%	>10%	NS
	Hiperproteinemia	<90%	>10%	NS
	Hipoalbuminemia	<90%	>10%	NS
	Epiteliotropismo	93,5%	6,5%	0,065
Evolução clínica e resposta ao tratamento	Protocolo Quimioterápico	<90%	>10%	NS
	Resposta ao tratamento	<90%	>10%	NS
	Anorexia	93,6%	6,4%	0,064
	Vômito	<90%	>10%	NS
	Elevação alanina aminotransferase	<90%	>10%	NS
	Anemia	93,8%	6,2%	0,062
	Leucopenia	91,8%	8,2%	0,084
	Trombocitopenia	94,6%	5,4%	0,054

NS: Não significativa

Discussão

Aspectos epidemiológicos

Frequentemente os trabalhos de revisão e estudos retrospectivos sobre cães acometidos por LC desenvolvidos no exterior, mencionaram raças puras, tais como os Cocker Spaniel, Poodles e Boxer como as mais predispostas (MOORE; OLIVRY, 1994; FONTAINE et al., 2009; FONTAINE et al., 2010). Entretanto, no estudo em tela, a incidência do LC foi maior nos cães SRD, o que corrobora com outros estudos realizados no Brasil (JARK et al., 2014; TORRES NETO et al., 2015; DUARTE et al., 2016). Desconhece-se a causa desta incidência em cães SRD e sugere-se que a maior incidência se deva ao fato que estes cães são expressivamente mais numerosos na casuística do HV / Unesp / Jaboticabal. Nos últimos sete anos foram atendidos nesse mesmo hospital uma média anual de 2733 cães, aproximadamente 50% destes eram SRD. O HV / Unesp / Jaboticabal, atende principalmente pessoas da classe social com poucos recursos econômicos, que usualmente adquirem cães SRD, principalmente da rua ou em campanhas de adoção nos centros de zoonoses e organizações não governamentais (ONGs). Isto pode explicar, ao menos em parte, a alta incidência de LC nesses cães. Quanto aos cães de raça, os mais acometidas foram Golden Retriever e Boxer, esta última raça também relatada na literatura mundial (FONTAINE et al., 2009).

Os cães acometidos por LC neste estudo foram animais de meia idade a idosos, concordando com o relatado em outros países e regiões do mundo (FONTAINE et al., 2010; JARK et al., 2014; DUARTE et al., 2016). Uma menor porcentagem, 13,7% dos casos de LC, eram adultos jovens (entre dois e quatro anos de idade). Assim, esta doença pode se apresentar em qualquer faixa etária, ao menos nesta região do estado de São Paulo, Brasil.

Quanto a predisposição sexual, houve similaridade entre os gêneros, tal como o descrito em outros estudos (FONTAINE et al., 2009; DIAS et al., 2015). Portanto, esse fator parece não exercer influência na etiopatogenia do LC.

O número de cães afetados pelo linfoma cutâneo no Brasil é desconhecido. A maioria dos estudos apresenta a incidência desta enfermidade em alguns Hospitais Veterinários de instituições educativas do estado de São Paulo e Paraná (Tabela 5). No campus da Unesp / Botucatu / SP, um estudo desenvolvido entre 2013 e 2015 refere um total de 57 casos (TORRES NETO et al., 2015). Na mesma instituição, Duarte et al., (2016) analisaram a resposta ao tratamento em 15 cães com LC. Na

universidade do Estado de São Paulo /USP, são relatados um total de 13 casos entre 1995 e 2009 (KIMURA et al., 2011). Na Universidade de Franca, SP (Unifran) descrevem 33 casos com diagnóstico de LC nas cidades de Franca, Jaboticabal e Ribeirão Preto, sem contudo referir o período da coleta de dados (DIAS et al., 2015). Em Jaboticabal, SP, 60 casos foram atendidos entre os anos de 2007 e 2013 (JARK et al., 2014), principalmente provenientes das cidades de Jaboticabal, Araraquara e Matão (22/60). Resultados similares foram obtidos nesta pesquisa (16/29), muito embora esses dados de incidência possam estar sendo influenciados pela localização geográfica do HV/Unesp/Jaboticabal, onde o estudo foi desenvolvido. De qualquer forma, a alta incidência nesta região do Estado de São Paulo suscita a necessidade de novas pesquisas que determinem possíveis fatores etiológicos desta neoplasia.

No estado do Paraná, especificamente na Universidade Estadual de Londrina (UEL), entre 1990 e 2008, foi realizado um estudo retrospectivo de LC, reportando 49 casos. Exame histopatológico realizado em 21 casos mostrou que 12 eram LCNE e nove LCE (MORENO et al., 2010) (Tabela 5).

Tabela 5: Incidência de linfoma cutâneo relatado em Instituições de Ensino Superior de Medicina Veterinária nos estados do Paraná e São Paulo.

<i>Estado</i>	<i>Universidade</i>	<i>Ano/Divulgação</i>	<i>(n)</i>
Paraná	UEL / Londrina	2010	49
São Paulo	USP / São Paulo	2011	13
São Paulo	Unesp / Jaboticabal	2014	60
São Paulo	Unesp / Botucatu	2015	57
São Paulo	Unifran / Franca	2015	33
São Paulo	Unesp / Botucatu	2016	15
São Paulo	Unesp / Jaboticabal	Presente estudo / 2017	29

Alterações clínicas e laboratoriais ao diagnóstico

A associação entre dermatite e LC tem sido pesquisada. Estudos em humanos mostram aumento nos casos de micose fungóide em pacientes com

antecedentes de dermatite atópica (FONTAINE et al., 2009). Os autores relacionam a desregulação do sistema imune quando exposto por longos períodos ao estímulo antigênico induzindo a proliferação das células tumorais e potencialmente desencadeando o LC. Em medicina veterinária apenas um estudo preliminar apresentou a associação entre as duas enfermidades, contudo o número de animais (19 cães) e a curta duração do estudo (cinco anos) impedem afirmar uma relação causa-efeito (SANTORO et al., 2009). Em nosso estudo, 17,2% dos cães tinham antecedentes de dermatopatias associadas a estímulos crônicos antigênicos (dermatite atópica, dermatite alérgica a picada de ectoparasitas, dermatite úmida aguda, escabiose e otite crônica), o que pode figurar como fator predisponente no desenvolvimento do câncer, conforme sugerido na literatura (FONTAINE et al., 2009). Entretanto, apenas um cão apresentava quadro dermatológico crônico avançado (dermatite atópica) no momento do diagnóstico do LC.

As lesões dermatológicas encontradas no estudo em tela podem ser comparadas com outras de casos publicados na literatura (Tabela 6) (BEALE et al., 1993; FONTAINE et al., 2010), e desta forma confrontar a forma clínica mais comumente apresentada nos cães, segundo a classificação proposta por Miller et al. (2013). Estes autores propõem que o LC seja decorrente de um quadro progressivo de lesões que se sobrepõem; assim descrevem cinco apresentações clínicas: eritrodermia esfoliativa, manchas/placas, nódulo/tumor, enfermidade ulcerativa da mucosa oral e a forma mucocutânea, sendo isoladas ou associadas entre as diferentes formas. Em nosso estudo, não foi possível reconhecer as formas isoladas de lesões e a apresentação mais comum foi a de nódulo/tumor (28/29), a qual esteve acompanhada das outras formas de apresentação (placas, úlceras na mucosa oral e formas mucocutâneas) gerando complexas apresentações mistas. As formas de eritrodermia esfoliativa e mancha não foram detectadas neste estudo.

Tabela 6: Sinais e lesões dermatológicas detectadas nos 29 cães que receberam o diagnóstico de linfoma cutâneo. Jaboticabal, SP, 2016.

	Presente estudo 2017. (Brasil). %	Fontaine et al., 2010 (Bélgica). %	Beale et al., 1993 (USA). %
Eritema	48.2	86.6	80.8
Placas	51.7	73.3	61.5
Erosão/Ulcera	75.8	60	42.3
Escamas	10.3	60	61.5
Nódulos/Tumores	86.2	53.3	57.7
Crostas	20.6	46	38.5
Mucocutâneas	34.4	50	38.5
Cavidade oral	17.2	Não disponível	Não disponível
Prurido	27.5	40	38.5

Adaptado de Fontaine et al., (2010).

Nos históricos obtidos, 65% dos proprietários referiram que o surgimento das lesões (placas ou nódulos) ocorreu de modo súbito e apresentaram crescimento rápido (de 11 a 60 dias). Trinta e cinco por cento dos pacientes restantes apresentaram períodos um pouco mais longos de evolução da doença (60 a 180 dias). Nos EUA, o surgimento das lesões apresenta períodos de tempo variados. Segundo Miller et al. (2013) o quadro de LCE é progressivo de meses a anos (quadro indolente), enquanto para Moore e Olivry, (1994) e Moore et al. (2012) cães com LCNE têm quadros agressivos e de progressão rápida, o que foi condizente com este estudo onde houve uma correlação positiva ($P < 0,05$) entre o epitelitropismo e o tempo de sobrevida. Cães com LCE tiveram sobrevidas mais longas (média 58 dias) quando comparado com os cães com LCNE (média de sobrevida de 31 dias), evidenciando um comportamento mais agressivo neste último grupo de cães.

Na maioria dos casos de LC, a distribuição das lesões é generalizada, difusa e assimétrica (FONTAINE et al., 2009, MILLER et al., 2013), tal como no presente estudo, tendo em vista que apenas um cão apresentou uma massa localizada na parede tóraco-abdominal esquerda (Figura 5). Vale acrescentar que o comportamento deste tumor em especial foi extremamente agressivo, mesmo com o uso de poliquimioterapia (lomustina, metotrexato, bleomicina intratumoral e

fosfoetanolamina) a sobrevida foi de 54 dias. Este caso pode ser associado a uma variante do LC descrita em humanos denominada como forma d'emblée, caracterizada pelo surgimento de um tumor de forma súbita, sem passar por fases prévias como manchas, placas ou nódulos. Esta forma d'emblée está sendo reclassificada em humanos e se considera que seja um subtipo de linfoma T periférico (MOORE; OLIVRY, 1994; GOMEZ; PEREZ, 2001).

Alterações clínicas não referidas na literatura consultada e associadas com LC que neste estudo estiveram presentes, foram o edema em uma porcentagem apreciável dos pacientes (40%). O edema subcutâneo localizado nos membros pélvicos, torácicos e região ventral de tórax e abdômen foi atribuído ao comprometimento da drenagem linfática causada pelas massas cutâneas infiltradas, associado à hipoalbuminemia. Outra causa citada, que não foi possível confirmar neste estudo e que pode ser associada ao quadro avançado de LC é o acometimento dos linfonodos pelo tumor, comprometendo também a drenagem linfática, como referenciado por Fighera et al. (2006).

Na abordagem inicial dos pacientes verificou-se, na avaliação laboratorial anemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia e trombocitopenia. Todas estas alterações são comumente encontradas em doenças neoplásicas de curso crônico, com ou sem associação de síndromes paraneoplásicas (WITHROW et al., 2013), assim também como em doenças transmitidas pelos carrapatos (*Ehrlichia sp.*, *Babesia sp.*, *Anaplasma sp.*, *Hepatozoon sp.*) (NEER et al., 2002; VIERA et al., 2011), comuns nesta região do Brasil, além de outras enfermidades crônicas. A presença de co-morbilidades é uma situação ainda pouco estudada na avaliação de pacientes caninos com câncer e o impacto delas seria capaz de influenciar negativamente a resposta ao tratamento e o prognóstico.

Evolução clínica e resposta ao tratamento

Em cães, o LC é uma doença complexa com características clínicas e morfológicas heterogêneas. Dois grandes grupos foram classificados, o LCNE e LCE. Os poucos trabalhos relacionados com a incidência destas duas formas referem que o LCE possui taxa de apresentação maior quanto comparado com LCNE (MOORE; OLIVRY, 1994; MILLER et al., 2013). Pesquisas no Brasil

detectaram, pelo contrário, maior incidência do LCNE (DIAS et al., 2015; DUARTE et al., 2016), concordante com o presente estudo. O LCNE é caracterizado por um baixo índice de resposta ao tratamento e prognóstico desfavorável, sendo citados em alguns trabalhos sobrevida média de nove meses (1-24) (FONTAINE et al., 2009; FONTAINE et al., 2010; MOORE et al., 2012). Interessante ressaltar que na casuística de LC do hospital veterinário onde foi desenvolvido este estudo, a sobrevida média dos pacientes a partir do diagnóstico foi de 26 dias (6 -114 dias) e só coincidente com o trabalho de Duarte et al. (2016), que observou uma média de 22 dias. Esta curta sobrevida pode estar relacionada com estágios avançados da doença no momento do diagnóstico.

A quimioterapia antineoplásica com lomustina é o tratamento de eleição de cães com LC (GRAHAM; MYERS, 1999; DE LORIMIER, L.P. 2006), tal como o empregado na maior parte dos pacientes do presente estudo. A taxa de remissão completa não foi alcançada, mesmo com doses entre 70-90mg/m², sendo que apenas 31% apresentaram remissão parcial, com posterior progressão da doença. Vários fatores, alguns deles já discutidos, podem ser a causa da baixa resposta a lomustina e baixa sobrevida dos pacientes, quando comparadas com outros trabalhos: estágio avançado da doença e co-morbilidades infecciosas. Duarte et al. (2016), também referem a baixa resposta a lomustina, (53%) e sugerem a necessidade de estabelecer adequação terapêutica, já que doses de 90 mg/m², levaram a respostas moderadas, entretanto a importantes efeitos adversos nos pacientes. Outro fator que está em estudo é a resistência à lomustina gerada pela presença de proteína de reparação do ADN-alquil transferase alkyl guanine-ADN O6 (AGT), o que torna as células neoplásicas resistentes aos efeitos biológicos induzidos por agentes como a lomustina (RABIK et al., 2006).

A avaliação da toxicidade gerada pelo tratamento quimioterápico não foi realizada em todos os pacientes, pois dos 24 cães que receberam quimioterapia, apenas em 11 deles foi feito acompanhamento após a primeira sessão. Leucopenia e trombocitopenia foram as alterações de maior relevância. Citopenias devido à mielossupressão foram documentadas com o uso de lomustina (DE LORIMIER, L.P. 2006) Em outros trabalhos há menção de hepatotoxicidade, caracterizada por elevações de ALT (KRISTAL et al., 2004; LARA et al., 2004), o que não foi

evidenciado neste estudo, talvez devido ao reduzido número de sessões de lomustina administradas aos pacientes, muito embora o único paciente que foi submetido a cinco sessões de lomustina, também não apresentou sinais clínicos, ou mesmo alterações laboratoriais sugestivas de disfunção hepática. Um resultado do nosso estudo foi a correlação positiva ($P < 0,1$) entre as alterações clínicas (anorexia) e hemáticas (anemia, leucopenia e trombocitopenia) após quimioterapia e o tempo de sobrevida dos pacientes. Wang et al. (2015), confirmaram como o tempo de sobrevida foi prolongado em cães com linfoma que apresentaram leucopenias/neutropenias após quimioterapia. A mielosupressão causada pela quimioterapia evidencia que células de crescimento rápido foram lesadas pelo fármaco o que inclui as células neoplásicas. Sendo assim, o controle da doença pode ter influenciado o tempo de sobrevida mais prolongado dos pacientes. Outro fator a se considerar neste estudo foi o grau de toxicidade nas alterações hematológicas que foram leves a moderadas (Grau 1 – Grau 2, respectivamente); reações adversas de maior severidade (Graus 4 ou 5) poderiam ter diminuído o tempo de sobrevida (VCOG-CTCAE, 2011).

Conclusões

Linfomas cutâneos em cães se apresentam como lesões generalizadas, mais frequentes em cães de raça, de meia idade, sem predileção de gênero, independentemente de lesões cutâneas preexistentes, têm pobre resposta a quimioterapia, reduzida sobrevida, e ocorrência registrada em cidades da região nordeste do Estado de São Paulo, SP. Os cães doentes apresentam-se anêmicos e forma epiteliotrófica parece ter prognóstico mais favorável.

Referências

BEALE, K.M.; BOLON, B.; IHRKE, P.J. et al., Canine cutaneous lymphoma sarcoma epitheliotropic and non epitheliotropic, a retrospective study. In: **Advances in Veterinary Dermatology**, Vol. 2. New York, Pergamon Press, p.273–84, 1993

DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.8, p.573-581, 2003.

DE LORIMIER L.P. Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. **Vet. Clin. of Nor. Am. Small. Ani. Prac.**; 36: p.213–28, 2006.

DIAS, F.R.; ANAI, L.A; JARK, P. et al. Estudo Retrospectivo de 33 casos de Linfoma Cutâneo Canino. **Anais do I simpósio de oncologia comparada. Investigação Franca/SP/Br.v.** 14, n. 3, 2015.

DUARTE, A.R.; MARQUES, J.A.; ZAHN, F.S. et al., Clinical and laboratorial evaluation of dogs with cutaneous lymphoma treated with lomustine. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 39-47, 2016.

EDWARDS, D.S.; HENLEY, W.E.; HARDING, E.F. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. **Vet. and Comp. Oncology**. 1 : 200 – 206, 2003.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; RODRIGUES A.; BARROS C.S. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. **MEDVEP – Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim. Estim.**; 4(12), p.139-146, 2006.

FONTAINE, J.; BOVENS, C.; BETTENAY, S.; MUELLER, R. S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2009.

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

GROSS T. L., IHRKE P. J., WALDER E. J., AFFOLTER V. K. Skin diseases of the dog and cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd Ed., Blackwell Publishing, Iowa, pp. 882 – 888, 2006.

GÓMEZ, D.; PÉREZ O. Micosis fungoide y síndrome de Sézary. **Actas Dermosifiliogr.** 92:p.193-206, 2001.

GRAHAM, J.C.; MYERS, R.K. Pilot study on the use of lomustine (CCNU) for the treatment of cutaneous lymphoma in dogs [abstract 125]. In: **Proceedings of the 17th Annual Forum of the College of Veterinary Internal Medicine**. Chicago: p. 723, 1999.

JARK, P.; VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANAI, .L.A.; TINUCCI-COSTA,M. Epidemiological Study of 60 cases of Cutaneous Lymphoma in Dogs in São Paulo State, Brazil. (Abstract) In: **39th World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Congress**, Cape Town, South Africa, 16 - 19 Sep. 2014.

KIMURA, K.; ZANINI, D.; NISHIYA, A. et al; Morphology and Immunophenotypes of Canine Lymphomas: a Survey from the Service of Animal Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil. **Braz J Vet Pathol**; 4 (3), 199-206, 2011.

KRISTAL, O.; RASSNICK, K. M.; GLIATTO, J. M.; et al., Hepatotoxicity associated with CCNU (Lomustine) chemotherapy in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 1, p. 75-80, 2004.

LARA, A.; KISSEBERTH, W.C.; COUTO C.G. Hepatotoxicity associated with lomustine treatment in dogs with cancer [abstract]. In: **Proceedings of the 24th Annual Conference of the Veterinary Cancer Society**. Kansas City (MO):p. 14, 2004.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. CAMPBELL, K Tumors of lymphoid Origem. In: **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p.810-840, 2013.

MIYASHIRO, D.R.; SANCHES, J.S. Cutaneous lymphomas: A review. **Cumhuriyet Medical Journal**, Volume: 37, P.267-86, 2015.

MORENO, K.; BOSELLI, C.; SILVA, O.; BRACARENSE, A.P. Cutaneous lymphoma in dogs: epidemiology, morphology, response to therapy and survival. **Clínica Veterinária (São Paulo)**, v. 15, p. 32-38, 2010.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T. Cutaneous lymphomas in companion animals. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n.4, p. 499-505, 1994.

MOORE, P.; AFFOLTER, V.; KELLER, S. Canine inflamed non-epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: a diagnostic conundrum *Advances in Veterinary Dermatology*. Edited by Sheila M. F. Torres. **The Authors. Journal compilation. ESVD and ACVD**, p.220 – 227, 2012.

NEER, M.; BREITSCHWERDT, E.; GREENE, R.; LAPPIN, M. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease. Study Group of the ACVIM. **J Vet Intern Med**; 16, p.309–315, 2002.

PALMER, L.; MOREIRA, R.; TEIXEIRA, S. Divisão Territorial Brasileira, 2002. Disponível em: <<http://www.ipeadata.gov.br/>>. Acesso em: 30 ago.2016.

RABIK, C.A.; NJOKU, M.C.; DOLAN, M.E. Inactivation of O6-alkylguanine DNA alkyl transferase as a means to enhance chemotherapy. **Cancer Treat Rev**. Jun; 32(4), p.261-76, 2006.

RISBON, R.E.; BURGESS, K.; SKORUPSKI, K. et al., CCNU (lomustine) for cutaneous epitheliotropic lymphoma: a retrospective study of 46 dogs (1999–2004) [abstract]. In: **Proceedings of the 24th Annual Conference of the Veterinary Cancer Society**. Kansas City (MO): p. 15, 2004.

SANTORO, D.; MARSALLA, R.; HERNANDEZ, J. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. **Veterinary Dermatology**; 18: p.101–6, 2007.

TORRES NETO, R.; WERNER, J.; SEQUEIRA, J.L.; LAUFER AMORIM, R. Linfoma cutâneo de células t canino: estudo anatomoclínico de 57 casos (2013-2015). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 59-60, 2016.

Veterinary Co-operative Oncology Group (VCOG) Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following

chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. **Vet Comp Oncol.** 2: 195–213; 2011.

VIERA, C.; BIONDO, A.; GUIMARÃES, A. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** (Online) vol.20 no.1 Jaboticabal Jan./Mar. 2011.

WANG S.L.; LEE J.J.; LIAO. A.T. Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma. **The Veterinary Journal.** 205 69–73, 2015.

WILLIAMS, L.E.; RASSNICK, K.M.; POWER, H.T. et al., CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. **J Vet Intern Med.**, Jan-Feb; 20, p.136-43. 2006.

WITHROW, S.J.; VAIL, M. D. Hematopoietic Tumors. In: **Small animal clinical oncology.** 5. ed. St Louis: Saunders, p. 608, 2013.

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DO LINFOMA CUTÂNEO: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS ESPÉCIES CANINA E HUMANA

Resumo

O linfoma cutâneo canino é considerado uma neoplasia rara, com comprometimento primário da pele e características clínicas, morfológicas e imunofenotípicas ainda pouco estudadas e compreendidas. O objetivo deste estudo foi comparar achados de 25 biópsias cutâneas de cães com linfoma cutâneo com os achados morfológicos e perfil imunofenotípico da literatura da mesma patologia na espécie humana. Amostras foram coletadas no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – Unesp - Campus de Jaboticabal, entre 2013 e 2016. A avaliação morfológica revelou 19 casos de linfoma cutâneo não epiteliotrópico e seis de linfoma cutâneo epiteliotrópico. Na caracterização morfológica, o padrão de distribuição do infiltrado neoplásico difuso foi o mais comum (56%), com células neoplásicas predominantemente grandes (56%), infiltrado periférico em glândulas anexas (88% dos casos) e índice mitótico alto em 68% dos casos. O painel imuno-histoquímico desenhado para este estudo identificou em 52% dos casos o fenótipo CD3+/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ Granzima B+, correspondente aos linfomas cutâneos de células T periférico em humanos (LCTP) e em 40% dos casos o fenótipo CD3+/ CD8+/ CD30+/ CD56+ ou CD56-/ Granzima B+, frequente no linfoma cutâneo primário de grande célula anaplásico. Neste estudo, a forma não epiteliotrópica do linfoma cutâneo canino apresentou morfologia e fenótipo semelhante ao linfoma cutâneo de célula T periférico em humanos.

Palavras chaves: pleomorfismo, micose fungóide, marcadores, Granzima.

CHAPTER 3 – MORPHOLOGICAL AND IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF CUTANEOUS LYMPHOMA: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN CANINE AND HUMAN SPECIES.

Abstract

Canine cutaneous lymphoma is considered a rare neoplasm, with primary involvement of the skin, clinical, morphological and immunophenotypic features still poorly studied and understood. The objective of this study was to compare the morphological findings and immunophenotypic profile of 25 cutaneous biopsies in dogs with cutaneous lymphoma. The samples were collected at the Oncology Service of the "Governador Laudo Natel" Veterinary Hospital - Unesp - Jaboticabal Campus between 2013 and 2016. The morphological evaluation revealed 19 cases of cutaneous non-epitheliotropic lymphoma and six cases of cutaneous epithelial lymphoma. In the morphological characterization, the distribution pattern of the diffuse neoplastic infiltrate was the most common (56%), with predominantly large neoplastic cells (56%), peripheral infiltrates in adjacent glands (88% of cases) and high mitotic index in 68% of Cases. The immunohistochemical panel designed for this study identified the CD3 + / CD8 + / CD30- / CD56- / Granzyme B + phenotype, frequently found in peripheral cutaneous T-cell lymphomas in humans and in 40% of The CD3 + / CD8 + / CD30 + / CD56 + or CD56- / Granzyme B + phenotype, common in primary cutaneous large cell anaplastic lymphoma. In this study, the non-epitheliotropic form of cutaneous canine lymphoma presented morphology and phenotype similar to peripheral cutaneous T-cell lymphoma in humans.

Keywords: Granzyme, markers, mycosis fungoides, pleomorphism.

Introdução

Linfoma cutâneo canino é uma neoplasia de linfócitos, subdividido nas formas epiteliotrópica e a não epiteliotrópica, segundo o tropismo da célula neoplásica pela epiderme (MILLER et al., 2013). Cada forma pode apresentar variantes, dependendo do comportamento clínico, particularidades morfológicas e fenótipo. Em humanos, o linfoma cutâneo epiteliotrópico apresenta duas variantes: a micose fungóide e a síndrome de Sézary (FONTAINE et al., 2010). Nos cães a forma não epiteliotrópica é menos estudada (MOORE et al., 2012). No Brasil, o linfoma cutâneo já foi identificado em cães e novas pesquisas estão se desenvolvendo visando determinar a incidência e características desta neoplasia nesta região do mundo (JARK et al., 2014; TORRES NETO et al., 2015; DUARTE et al., 2016).

A classificação do linfoma canino vigente se fundamenta na classificação humana proposta pela Organização Mundial da Saúde (WILLEMZE et al., 2005). Nessa classificação, são avaliados achados clínicos, características histológicas (arquitetura de tumor, morfologia das células tumorais e atividade mitótica), imunofenótipo e alterações genéticas, que reunidas definem a variante de linfoma cutâneo, concluindo diagnóstico definitivo, na maioria das vezes (SOO et al., 2011).

Em pacientes humanos com neoplasias cutâneas, faz parte da abordagem diagnóstica determinar a origem e o tipo de célula que caracteriza o tumor (BARRA, 2006, LARA-TORRES; ORTIZ-HIDALGO, 2009). No diagnóstico final, a determinação do imunofenótipo usando anticorpos monoclonais é uma etapa obrigatória para tomar decisões terapêuticas e estabelecer um prognóstico. Em teoria, alguns marcadores são específicos para um tipo particular ou origem celular, mas pode ocorrer sobreposição, devido a uma única célula precursora que possui capacidade de originar diferentes tipos de células maduras, permitindo que marcadores indiquem a linhagem de desenvolvimento comum que possam estar expressos em diferentes tipos de células. Sendo assim, o padrão de expressão de um marcador CD é fortemente sugestivo de um determinado tipo ou linhagem celular, mas pode não ser definitivo. Para se aproximar de forma mais precisa e confiável do diagnóstico são desenhados algoritmos baseados em painéis de marcadores celulares que permitem determinar o tipo (CD3, CD20, CD79a, CD56

entre outros) e subtipo celular (CD4, CD8, entre outros), assim como seu grau de agressividade (Granzima B, TIA1, entre outros) (CAMPBELL et al., 2010).

O método diagnóstico utilizado em humanos com linfoma cutâneo está baseado no uso de painéis imuno-histoquímicos, já que apenas um único marcador celular não consegue diferenciar os diferentes tipos, subtipos e variantes de linfomas cutâneos classificados. Este tipo de abordagem permite caracterizar as populações linfóides neoplásicas e outras populações não neoplásicas de origem T, B ou NK (GALLARDO; PUJOL, 2004).

Uma primeira triagem é feita com anticorpos que permitem diferenciar as populações T (CD3), B (CD20) e NK (CD56). Uma segunda etapa diagnóstica em linfomas de células T é determinar a progressão do processo linfoproliferativo maligno, obtido pelas análises de vários marcadores e entre eles o CD7 e CD30. O marcador CD7 é expresso normalmente em linfócitos maduros, e a perda da sua expressão acontece na transformação tumoral. O marcador CD30 permite identificar o nível de atividade das células T, e sua marcação permite diferenciar variantes de linfoma cutâneo com piores prognósticos (CAMPBELL et al., 2010). Finalmente, o grau de agressividade e citotoxicidade do tumor é dado por diferentes marcadores, dentre eles o Granzima B, perforinas e o antígeno intracelular de células T (TIA 1), cuja marcação sinaliza pior prognóstico para o paciente (GALLARDO; PUJOL, 2004, CAMPBELL et al., 2010).

Frente à semelhança do linfoma cutâneo humano e canino relatada em vários estudos (MOORE e OLIVRY, 1994, FONTAINE et al., 2010; MILLER et al., 2013), o objetivo da presente pesquisa foi determinar as semelhanças e diferenças morfológicas e imunofenotípicas desta neoplasia entre ambas as espécies, utilizando como população de estudo, cães atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” - Unesp - Câmpus de Jaboticabal com diagnóstico de linfoma cutâneo e compará-los com os critérios utilizados pela WHO – EORT em humanos com esta neoplasia (morfologia e fenótipo) (WILLEMZE, et al., 2005).

Especificamente foram pesquisadas as diferentes variantes morfológicas de linfoma cutâneo canino, segundo a classificação utilizada na espécie humana; determinado o imunofenótipo de cada paciente, empregando painel imuno-histoquímico utilizado na rotina diagnóstica de humanos com linfoma cutâneo. A

seguir, foram analisadas as variantes do linfoma cutâneo humano que maior semelhança apresentou com o fenótipo canino identificado. Finalmente avaliaram-se as correlações entre o tempo de sobrevida (em dias) e as variáveis morfologias e fenótipos obtidos neste estudo.

Material e métodos

Animais

O referido estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 10.339/16). Um total de 29 cães com LC, diagnosticados por meio de exame histopatológico foram atendidos no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – Unesp - Campus de Jaboticabal, no período de abril de 2013 a fevereiro de 2016. Para a coleta do material, todos os pacientes foram submetidos a anestesia geral, de acordo com os protocolos empregados no setor de anestesiologia do Hospital Veterinário. Foram coletadas amostras das lesões cutâneas (tamanhos entre 0,5 e 1cm³) evitando áreas de necrose que em seguida foram fixadas em formalina 10% tamponada com PBS, por 24 a 48 horas e transferidas para álcool onde permaneceram até seu processamento histopatológico. Das 29 amostras selecionados, cinco foram excluídas, devido as amostras terem sido danificadas durante o processamento histológico.

As referidas amostras, após processamento histotécnico de rotina, foram avaliadas por dois patologistas colaboradores de acordo com o consenso proposto pela World Health Organization - WHO e a European Organization for Research and Treatment of Cancer – EORTC, onde são classificados os linfomas cutâneos humanos (WILLEMZE et al., 2005). Dentro dos aspectos analisados foram considerados:

- Padrão arquitetural do infiltrado celular (difuso ou nodular).
- Tropismo do infiltrado neoplásico (epidérmico, dérmico ou hipodérmico).
- Tamanho das células neoplásicas (linfócitos pequenos, médios ou grandes).
- Localização das células neoplásicas: periférica ou infiltrante nas estruturas anexas da epiderme (foliculo piloso, glândulas sebáceas)

- Índice mitótico.

O índice mitótico foi estimado nas amostras histopatológicas contando-se as figuras mitóticas em 10 campos de grande aumento (400x). Um baixo índice mitótico foi definido como, 0-2 mitoses / 10 campos, intermediário 3-5 mitoses / 10 campos e alto 6 ou mais mitoses / 10 campos (CARTER et al., 1986; Fournel-Fleury et al., 2002).

Imunotipificação

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias VETPAT, na cidade de Campinas, SP, onde as amostras tumorais foram incluídas em parafina e seccionadas em cortes de 3µm de espessura e, posteriormente foram dispostas em lâminas de vidro polarizadas silanizadas (Starfrost®). Os cortes foram submetidos à desparafinização e hidratação em uma sequência de xilóis e alcoóis. Posteriormente foi realizada o bloqueio da peroxidase endógena por meio de imersão das lâminas em solução de 70mL de metanol e 30mL de peróxido de hidrogênio (30vol.), por 15 minutos. Para recuperação antigênica utilizaram-se duas soluções tampão, ou citrato 10 mM, pH 6,0, ou Tris-EDTA com Tween 20, pH 9,0 (Tab.1). A recuperação antigênica de todos os anticorpos foi em banho-maria a 92°C, por 20 minutos.

Após o resfriamento das lâminas por 20 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se o bloqueio das proteínas inespecíficas através da incubação das lâminas em leite em pó Molico® (5%) diluído em PBS, durante 25 minutos. Os cortes foram incubados em câmara úmida com os anticorpos primários *overnight* (por 18 horas), seguindo os protocolos descritos na Tabela 1.

Subsequentemente, todas as lâminas foram incubadas com complexo de polímeros ligados a peroxidase (Kit Advance, DAKO). As reações foram reveladas pelo substrato cromógeno Diamino benzidina - DAB (segundo recomendações do Kit – DAB Reagent Set KPL®) de 5-8 minutos e contra coradas com hematoxilina de Harris por um minuto.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados em linfomas cutâneos caninos, com sua respectiva localização de marcação, clones, marcas, diluições e tampões empregados. 2016.

Anticorpos	Localização Marcação	Clone	Marca	Diluição	Tampão Recuperação Antigênica
CD3	Membrana	T3	DAKO	1:300	Citrato
CD4	Membrana	4B12	DAKO	1:30	EDTA
CD8	Membrana	C8/144B	DAKO	1:30	Citrato
CD7	Membrana	CBC.37	DAKO	1:20	EDTA
CD30	Membrana/Golgi	BER-H2	DAKO	1:50	EDTA
CD20	Membrana	L26	DAKO	1:50	Citrato
CD56	Membrana	123C3	DAKO	1:100	EDTA
Granzima B	Grânulos citoplasmáticos	EP230	Cell Marque	1:30	EDTA

Entre as etapas foram realizadas duas lavagens das lâminas em solução tampão salina com fosfato (PBS) pH 7,2, com duração de cinco minutos cada, com exceção da etapa entre o bloqueio das proteínas inespecíficas e o anticorpo primário.

Como controle positivo utilizaram-se cortes de linfonodos de cães saudáveis. O controle negativo foi conseguido pela substituição do anticorpo primário por imunoglobulina G de camundongo. A avaliação dos resultados das reações imuno-histoquímicas foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz acoplado à câmera digital. As células positivas foram identificadas de forma manual pela visualização de localização da marcação celular (membrana, citoplasma, núcleo).

Algoritmo diagnóstico dos linfomas cutâneos

Depois de obtidos os resultados das reações de imuno-histoquímica foram empregados nas amostras de cães um algoritmo para o diagnóstico dos linfomas cutâneos de célula T e NK na espécie humana (Figura 1) (SOO et al., 2011).

- Na primeira etapa, foram diferenciadas as neoplasias de células T das neoplasias de células B mediante a expressão dos marcadores Pan-T (CD3, CD7) e ausência do marcador Pan-B (CD20) (Figura 1, Etapa I).
- Tendo identificada a população de células T, a seguinte etapa foi classificar os grupos CD30+ e CD30- (Figura 1, Etapa II).
- Subsequentemente foram identificadas a presença de granulações citotóxicas (Granzima B) na população CD30+ e CD30-, respectivamente (Figura 1, Etapa III).
- Na última etapa foram identificados os subtipos celulares T (CD4, CD8) e a população de células NK (CD56) (Figura 1, Etapa IV).
- Com esta triagem foram determinados os diferentes fenótipos de linfoma cutâneo nos cães do estudo.
- A partir do fenótipo foram identificadas as diferentes variáveis e subtipos de linfoma cutâneo (diagnósticos diferenciais) das amostras de cães deste estudo (Figura 1. Etapa V).

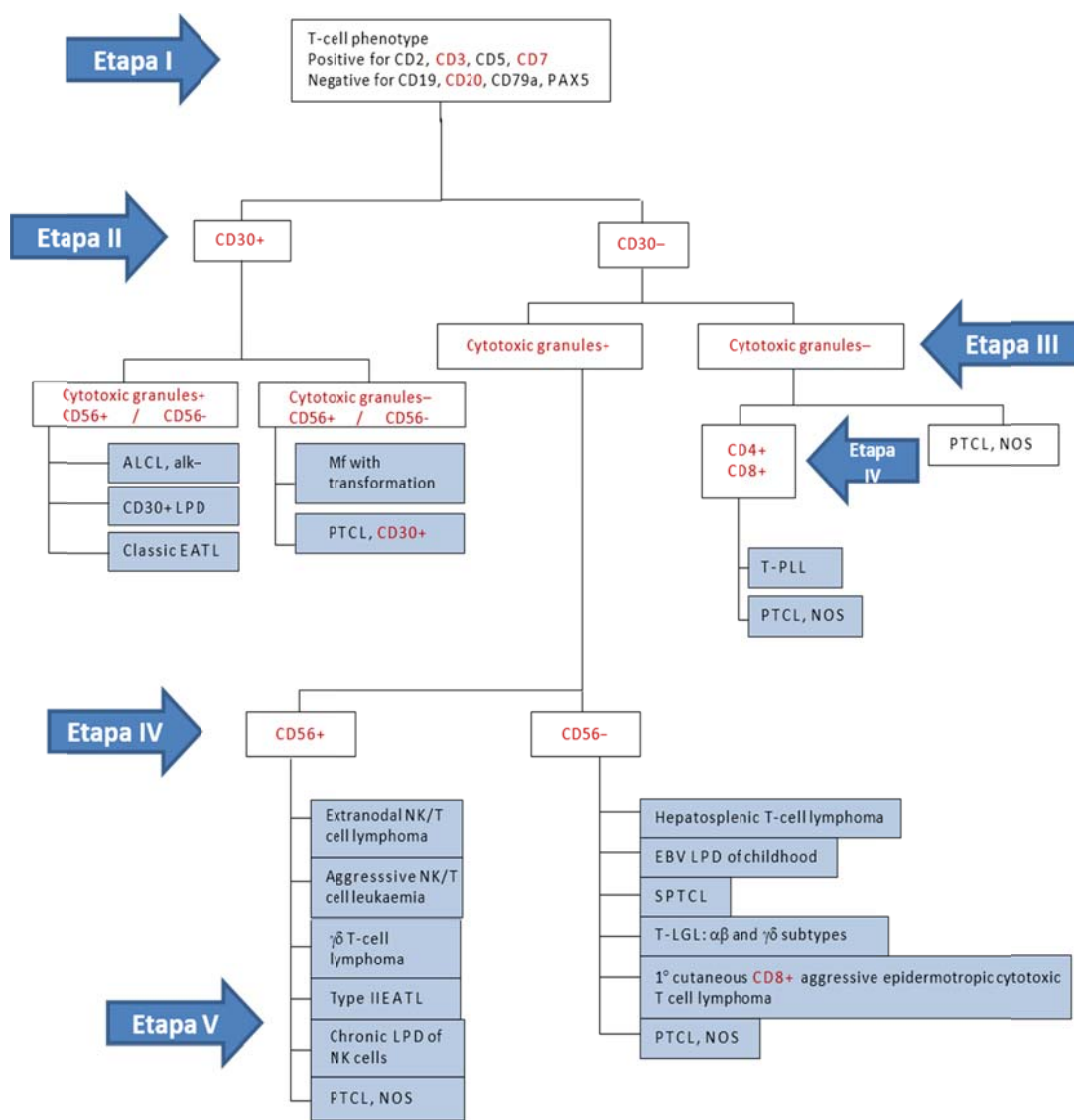


Figura 1: Abordagem algorítmica para o diagnóstico de neoplasias de células T e NK. Linfoma anaplásico de grandes células (ALCL); linfomas de células T associados com enteropatia (EATL); linfoma de células T periférico (PTCL); não especificado de outra forma (NOS); distúrbio linfoproliferativo (LPD); micose fungóide (MF); linfoma de células T semelhante a paniculite subcutânea (SPTCL); síndrome de Sézary (SS) (Modificado de SOO et al., 2011).

Análise estatística

Análise descritiva das variáveis em estudo (morfológicas e fenotípicas), determinando as frequências absolutas e percentuais das variáveis quantitativas. A sobrevida foi obtida pelo teste de Kaplan Meier com intervalo de confiança de 95%, utilizando o software Graph Pad Prism versão 5. Finalmente analisaram-se as correlações entre o tempo de sobrevida (em dias) e as variáveis em estudo, pelo

método de Long Rank, utilizando o programa SPSS Statistics, com um intervalo de confiança de 95%. As análises foram feitas no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

Resultados

Morfologia dos linfócitos neoplásicos

A avaliação morfológica dos 25 casos de linfoma cutâneo deste estudo estão resumidos na Tabela 2 e detalhados no Apêndice 1. Distribuição difusa (Figura 2. A e E) foi observada em 56% dos casos (14/25), difusa/nodular em 32% dos casos (8/25) e nodular em 12% dos casos (3/25) (Figura 2. F). Epiteliotropismo foi detectado em 24% dos casos (6/25) (Figura 2. B) e não epiteliotropismo em 76% (19/25) (Figura 2. A e C). As células neoplásicas apresentaram tamanhos variados, sendo 56% (14/25) de tamanho grande, 24% (6/25) (Figura 2. D) uma combinação de células de tamanho grande e médio, 12% (3/25) de tamanho pequeno e 8% (2/25) de tamanho médio.

Infiltrado neoplásico na periferia das estruturas anexas da epiderme (folículo piloso, glândulas sebáceas, apócrinas e sudoríparas) foi evidenciado em 88% dos casos (22/25) (Figura 2. A e E) e ausente em 12% dos casos (3/25) (Figura F).

O índice mitótico foi alto em 68% dos casos (17/25), médio em 32% dos casos (8/25) e o índice mitótico baixo não foi observado em nenhum caso.

Tabela 2: Resumo das características morfológicas encontradas nos 25 casos de linfoma cutâneo canino

Avaliação		Resultado
Distribuição	Difusa	56% (14/25)
	Difusa/nodular	32% (8/25)
	Nodular	12% (3/25)
Epiteliotropismo	Epiteliotropismo	24% (6/25)
	Não epiteliotropismo	76% (19/25)
Tamanho das células	Grande	56% (14/25)
	Grande/médio	24% (6/25)
	Pequeno	12% (3/25)
	Médio	8% (2/25)
Infiltrado neoplásico/ periferia das estruturas anexas	Presente	88% (22/25)
	Ausente	12% (3/25)
Índice mitótico	Alto	68% (17/25)
	Médio	32% (8/25)
	Baixo	0%

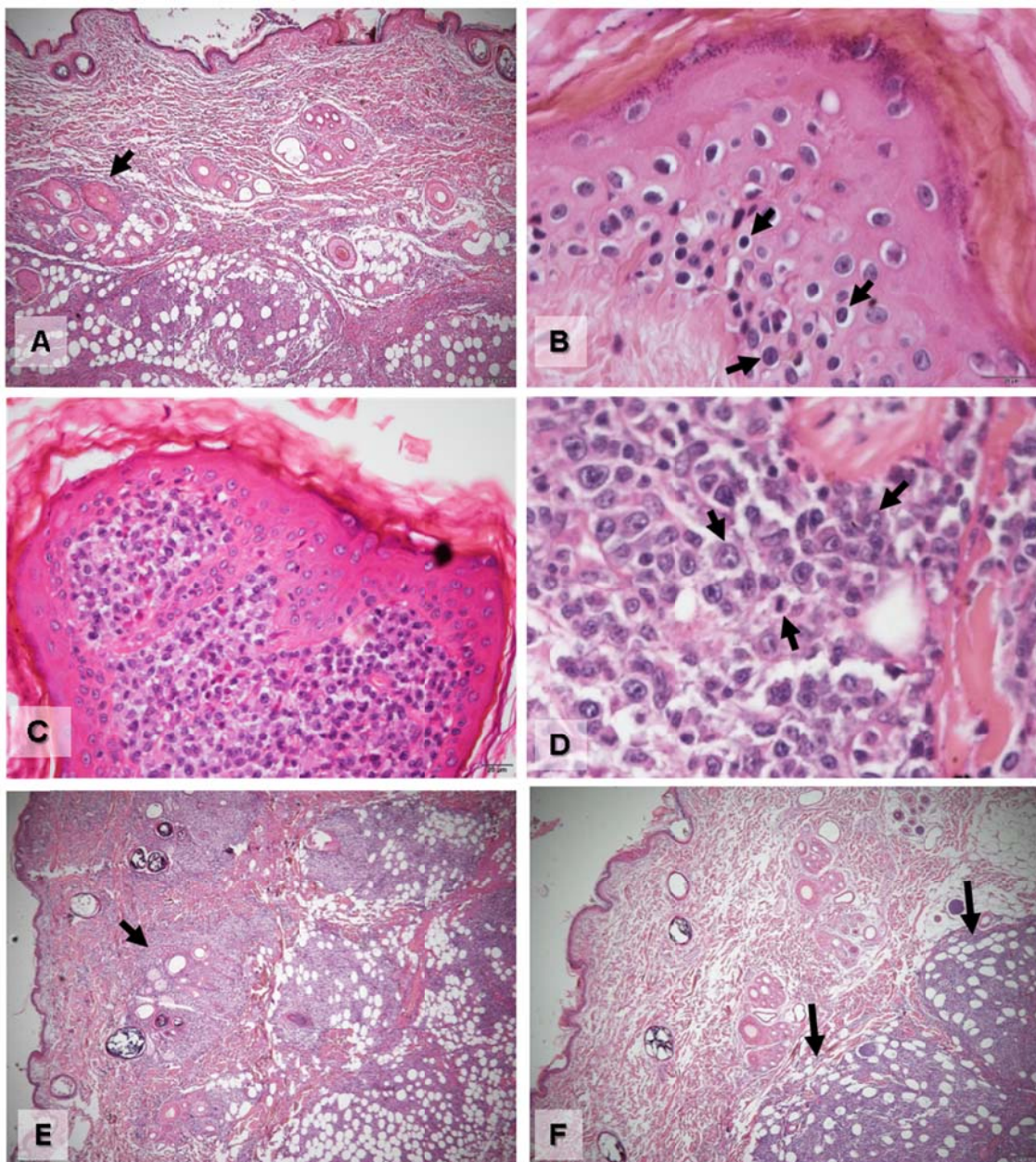


Figura 2: Fotomicrografias de linfomas cutâneos de cães (coloração de hematoxilina e eosina) **A.** Derme e hipoderme, com infiltrado de linfócitos neoplásicos de distribuição difusa na periferia de glândulas anexas (seta) (aumento de 40x). **B.** Epiderme evidenciando infiltrado de linfócitos atípicos, alguns hiper Cromáticos com halos claros (seta) (aumento de 400X). **C.** Marcado infiltrado neoplásico em derme e epiderme (aumento de 400x). **D.** Hipoderme com infiltrado de células grandes, de núcleo redondo com múltiplos nucléolos pequenos adjacentes a membrana nuclear com aparência blástica (setas), na qual também se observam algumas figuras de mitoses (aumento de 400x). **E.** Infiltrado difuso na periferia de glândulas anexas (seta), derme e hipoderme (aumento de 40x). **F.** Infiltrado nodular neoplásico em hipoderme (setas) e ausência de infiltrado em derme e periferia de glândulas anexas (aumento de 40x)

Imunotipificação dos linfomas cutâneos

Os resultados das imunomarcações de CD3, CD20, CD4, CD8, CD7, CD30, CD56 e Granzima B, das biopsias de LC de cães estão representados na Figura 3, os quais permitiram determinar o imunofenótipo dos 25 casos e agrupá-los segundo o epiteliotropismo encontrado na avaliação morfológica (LCNE e LCE) (Tabelas 3 e 4).

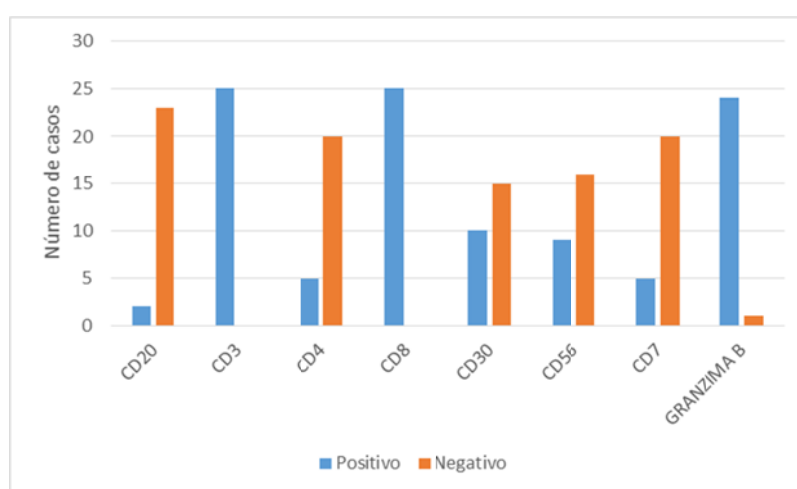


Figura 3: Representação dos resultados da marcação das reações imuno-histoquímicas com os anticorpos CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, CD56, CD7 e Granzima B, obtidos das amostras de 25 casos de linfoma cutâneo em cães.

Tabela 3: Imunofenótipo identificado nos seis casos de linfoma cutâneo canino epiteliotrópico (LCE). Jaboticabal 2016.

Nº	Identificação dos animais	Imunofenótipo LCE
1	03	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
2	05	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56-/ CD7-/ Gra+
3	12	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
4	17	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7+/ Gra+
5	20	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
6	23	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+

Tabela 4: Imunofenótipo identificado nos 19 casos de linfoma cutâneo canino não epiteliotrópico (LCNE). Jaboticabal 2016.

Nº	Identificação dos animais	Imunofenótipo LCNE
1	01	CD20+/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56-/ CD7-/ Gra+
2	02	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
3	04	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56+/ CD7+/ Gra+
4	06	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
5	07	CD20-/ CD3+/ CD4+/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
6	08	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
7	09	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56+/ CD7-/ Gra+
8	10	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56+/ CD7+/ Gra+
9	11	CD20-/ CD3+/ CD4+/ CD8+/ CD30+/ CD56+/ CD7+/ Gra+
10	13	CD20+/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
11	14	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56-/ CD7-/ Gra+
12	15	CD20-/ CD3+/ CD4+/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
13	16	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7+/ Gra-
14	18	CD20-/ CD3+/ CD4+/ CD8+/ CD30-/ CD56+/ CD7-/ Gra+
15	19	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56+/ CD7-/ Gra+
16	21	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56+/ CD7-/ Gra+
17	22	CD20-/ CD3+/ CD4+/ CD8+/ CD30+/ CD56+/ CD7-/ Gra+
18	24	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ CD7-/ Gra+
19	25	CD20-/ CD3+/ CD4-/ CD8+/ CD30+/ CD56+/ CD7-/ Gra+

Todas as amostras (100%) apresentaram marcação para as células T (CD3+) e células T citotóxicas (CD8+) (Figura 4. A, B e F). Interessante que 20% (5/25) das

amostras CD8+, também apresentaram marcação por CD4 (células auxiliares) (Figura 4. E) o que permitiu definir uma população com dupla marcação CD8+/CD4+. Na totalidade das amostras a dupla marcação negativa (CD4-/CD8-), não foi detectada.

Células B foram identificadas pelo marcador CD20 em 8% dos casos (2/25) (Figura 4. C e D). Uma população mista T+ e B+ foi observada em 8% dos casos (2/25).

O antígeno de linfócitos T maduros CD7, foi evidenciado em 20% dos casos (5/25) (Figura 5. A). O marcador de ativação de linfócitos T (CD30) foi evidenciado em 40% dos casos (10/25) (Figura 5. B) e de células NK (CD56) em 36% dos casos (9/25) (Figura 5. C)

A molécula citotóxica Granzima B, foi positiva em 96% dos casos e apenas um caso não houve marcação (1/25) (Figura. 5. D).

A análise dos 25 imunofenótipos mediante o algoritmo diagnóstico desenhado para este estudo permitiu identificar três fenótipos predominantes (Tabela 5). Cinquenta e dois por cento dos cães (13/25) apresentaram o fenótipo CD3+, CD8+, CD30-, CD56- e Granzima B+, dos quais oito eram não epiteliotrópicos e cinco epiteliotrópicos. Quarenta por cento (10/25) apresentaram o fenótipo CD3+, CD8+, CD30+, CD56+ ou CD56- e Granzima B+; destes, nove foram não epiteliotrópicos e um epiteliotrópico. Oito por cento (2/25) apresentaram fenótipo CD3+, CD8+, CD30-, CD56+ e Granzima B+ e eram do tipo não epiteliotrópicos.

Tabela 5: Descrição dos fenótipos predominantes, detectados nos 25 casos de linfoma cutâneo canino e sua distribuição segundo o epiteliotropismo

FENÓTIPO	Casos	%	LCNE	LCE
CD3+/ CD8+/ CD30-/ CD56-/ Granzima B+	13	52	8	5
CD3+/ CD8+/ CD30+/ CD56+ ou CD56-/ Granzima B+	10	40	9	1
CD3+/ CD8+/ CD30-/ CD56+/ Granzima B+	2	8	2	0

LCNE - linfoma cutâneo não epiteliotrópico; LCE - linfoma cutâneo não epiteliotrópico

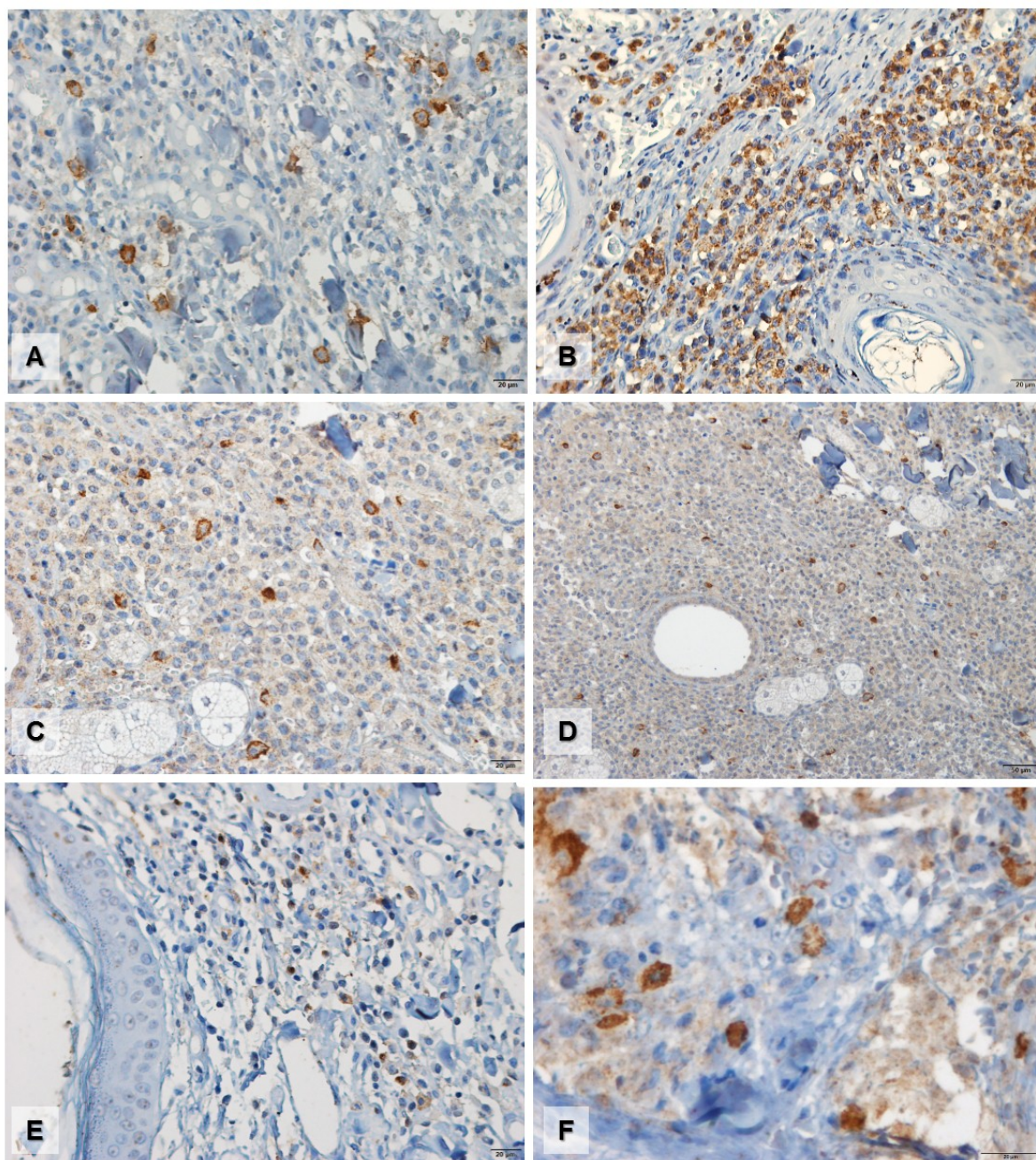


Figura 4: Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica para detecção dos anticorpos primários CD3, CD20, CD4 e CD8. Método polímero DAB. Linfoma cutâneo canino. **A.** Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcagem pelo anticorpo CD3 (400x). **B.** Derme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo CD3 (400X). **C.** Hipoderme com infiltrado de linfócitos com imunomarcagem pelo anticorpo CD20 (200x). **D.** Derme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo CD20 (400X). **E.** Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcagem pelo anticorpo CD4 (400x). **F.** Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcagem pelo anticorpo CD8 (400x).

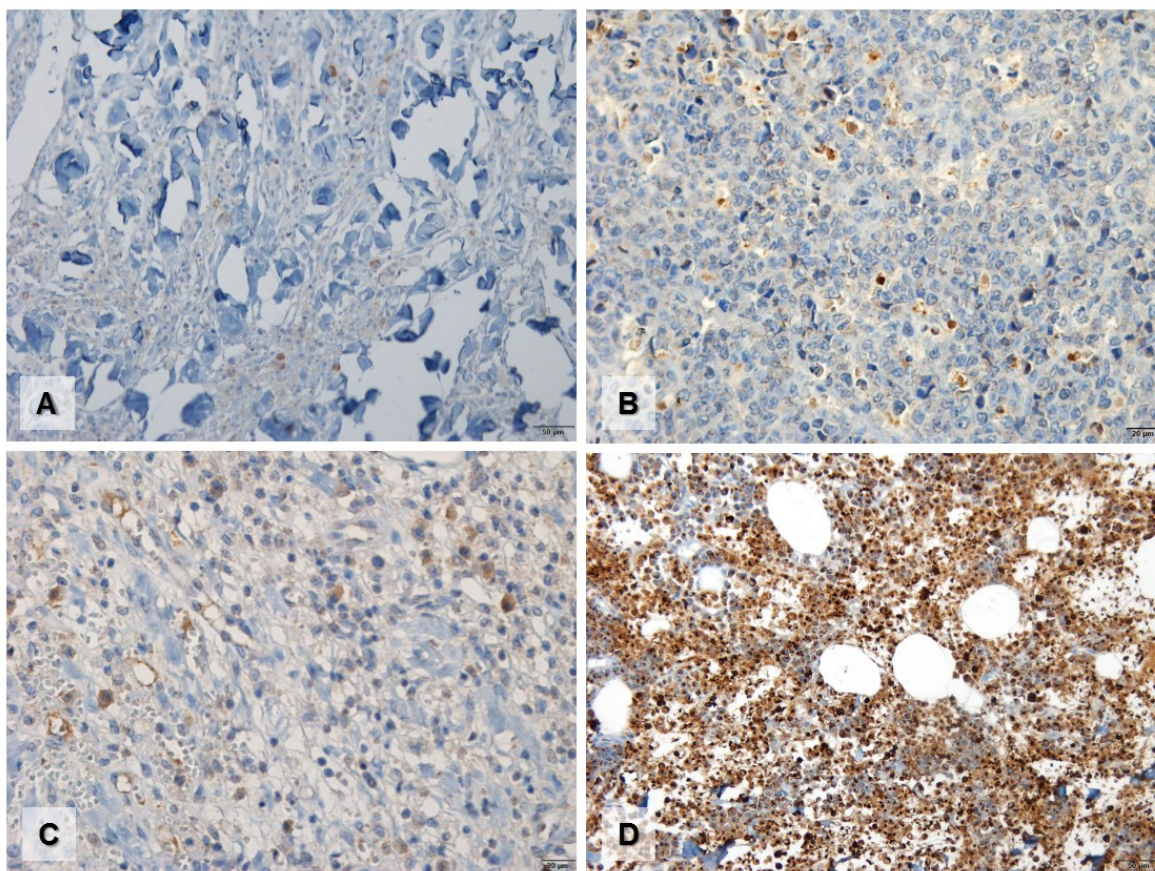


Figura 5: Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica para detecção dos anticorpo primários CD7, CD30, CD56 e Granzima B. Método polímero DAB. Linfoma cutâneo canino. **A.** Derme com infiltrado de linfócitos com imunomarcção pelo anticorpo CD7 (200x). **B.** Derme com infiltrado de linfócitos e imunomarcção pelo anticorpo CD30 (400X). **C.** Derme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo CD56 (400x). **D.** Hipoderme com infiltrado de linfócitos imunomarcados pelo anticorpo Granzima B (200x).

Efeito das variáveis sobre o tempo de sobrevida.

A média de sobrevida dos 25 animais com LC foi de 28 dias, representada pela curva de Kaplan-Meier (Figura 6). Neste estudo não foram encontradas correlações positivas ou negativas entre as características morfológicas ou fenotípicas com o tempo de sobrevida dos pacientes. O valor de confiança foi inferior ao 90% e o nível de erro superior ao 10%.

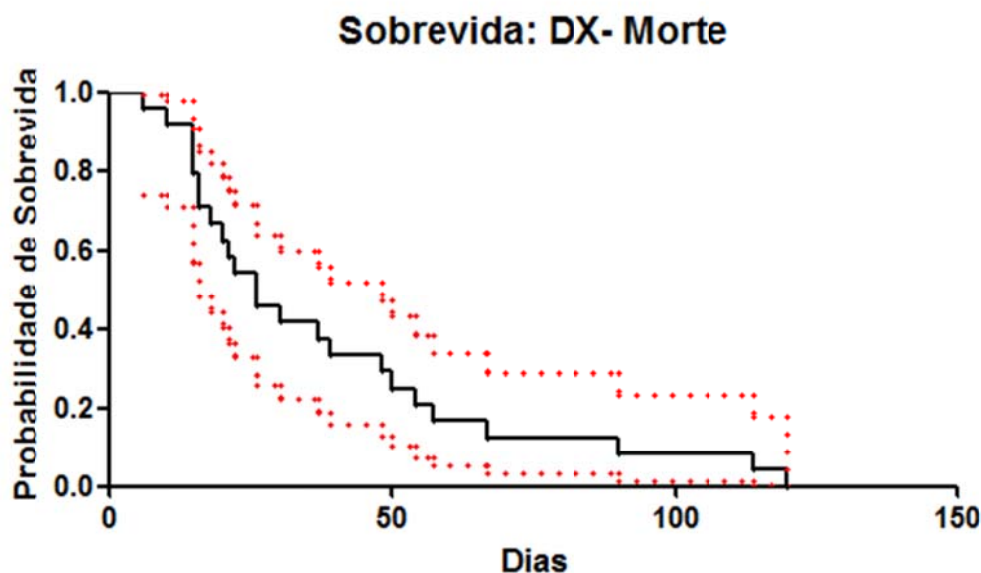


Figura 6: Curva de Kaplan Meier para a probabilidade de sobrevida em função do tempo de sobrevida (dias) dos cães com linfoma cutâneo, em vermelho o intervalo de confiança 95%.

Discussão

Neste estudo a avaliação morfológica evidenciou maior frequência de LCNE (76%) quando comparada ao LCE, mormente estudos de prevalência e incidência desta neoplasia em outras partes do mundo mostrem predomínio de LCE. Moore; Olivry (1994) mencionaram que a forma não epiteliotrópica é menos comum na espécie humana e canina e frequente em felinos, conceito partilhado por outros autores (FONTAINE; DAY, 2010; MILLER et al., 2013). No Brasil, frequência similar entre LCNE e LCE foi detectada em estudo desenvolvido em Minas Gerais, com 34 cães com LC (44% LCE e 41% LCNE) (ARAÚJO et al., 2012), como também em outra pesquisa de Londrina em que de 21 cães com a neoplasia, 57% foram LCNE e 43% LCE (MORENO, 2010). Da mesma forma, em Botucatu, SP, Brasil, um estudo de 15 casos evidenciou maior incidência da forma não epiteliotrópica (86%). Estes resultados apontam para uma apresentação do linfoma cutâneo no Brasil diferente quando comparado com o resto do mundo.

Em humanos, pesquisadores têm estudado como a localização geográfica pode influenciar nas diferentes variantes e subtipos de linfoma cutâneo. Em algumas regiões do Japão, ilhas do Caribe, África central, Bahia e Rio de Janeiro, no Brasil, a

infecção por um vírus linfotrópico predispõe a uma leucemia/linfoma de células T do adulto (com manifestação cutânea) (CORTEZ-FRANCO; QUIJANO-MORENO, 2009; SOO et al., 2011). Na espécie canina ainda é desconhecido o papel de agentes infecciosos na fisiopatogênica do câncer, fator já pesquisado na espécie felina e humana (WITHROW et al., 2013, SANCHES et al, 2006).

Os seis casos de LCE, apresentaram reduzido epiteliotropismo e o característico achado histológico de microabscessos de Pautrier, que definem este tipo de linfoma (MOORE; OLIVRY, 1994), só foram observados em um caso. A invasão da derme e hipoderme foi comum, ocorrência frequentemente relatada em humanos (MIYASHIRO; SANCHES, 2015). A presença de células de grande tamanho foi constante (infiltrado de células grandes e medianas) comum nos estados de nódulo/tumor (FONTAINE et al., 2009). Na avaliação morfológica todas as alterações observadas foram sugestivas da variante micose fungóide, todavia, não foram achadas lesões sugestivas de reticulose pagetóide ou síndrome de Sézary, condizente com a literatura que refere estas apresentações como raras e consequentemente os relatos existentes são escassos (GROSS, et al., 2005; MILLER et al., 2013).

A morfologia dos LCNE deste estudo, corresponde em vários aspectos com as características até hoje relatadas na espécie canina. Em nossa avaliação a invasão do epitélio pelas células tumorais foi escassa e o infiltrado neoplásico na periferia das glândulas anexas foi constante como referido na literatura veterinária (MOORE; OLIVRY, 1994, GROOSS, et al, 2005; MOORE et al., 2012). Não foi detectado o infiltrado inflamatório de eosinófilos e histiócitos, assim como a invasão de vasos frequentemente presente neste tipo de linfoma (MOORE et al., 2012).

Moore e Olivry (1994) mencionaram a dificuldade que existe em diferenciar um LCNE com atrofia da epiderme de um LCE em estado avançado (nódulo/tumor) com invasão da derme e/ou panículo. Em nossos resultados a atrofia da epiderme foi identificada em quatro casos, três foram classificados como LCNE e um como LCE, o que gerou discussão entre patologistas consultados, uma vez que, em estádios avançados da enfermidade, é impossível determinar pela morfologia o momento exato onde aconteceu a invasão da epiderme (no LCE ocorre nos estádios iniciais da doença e no LCNE nos estádios finais).

O índice mitótico alto e médio foi característica presente em 68% e 32% dos casos, respectivamente. Esta particularidade está associada a linfomas de células T de alto grau de malignidade e comportamento agressivo, manifestando-se com reduzido tempo de sobrevida (MILLER et al., 2013). Neste estudo, estatisticamente não foi observada uma correlação positiva entre estas duas variáveis.

Caracterização imunofenotípica

Nosso estudo foi desenvolvido com marcadores empregados na rotina diagnóstica humana com comprovada reatividade cruzada com antígenos de cão. Ruiz et al. (2005) afirmam que, em medicina veterinária, uma das limitações nas pesquisas utilizando a técnica de imuno-histoquímica é a validação de anticorpos produzidos para tecido humano, ou de outras espécies, mas que ao mesmo tempo provejam alta sensibilidade e especificidade nos resultados.

Para imunotipificação dos linfomas cutâneos em cães, tem-se empregado os marcadores CD79a, CD20, CD3, CD4, CD8, e os resultados têm permitido concluir que o fenótipo mais frequente nesta espécie é CD3+/CD20-/CD4-/CD8+, que corresponde ao fenótipo de células T citotóxico, frequentemente presente nesta neoplasia (MOORE e OLIVRY, 1994; DAY, 1995, FONTAINE et al., 2009, MILLER et al., 2013). Nós corroboramos este resultado em 76% dos casos. Um fenótipo misto (CD4+/CD8+) foi encontrado em cinco pacientes, e estudos têm associado este fenótipo a linfócitos dérmicos que provavelmente sejam uma população mista de linfócitos reativos (MAGNOL et al., 1996; FONTAINE et al., 2009).

Dois casos apresentaram a coexpressão de CD20+, CD3+, e isso é uma rara condição com escassos relatos na medicina e medicina veterinária. É considerado fenótipo aberrante e a maioria dos casos relatados de células T CD20+, estão associados com linfomas de células T periféricas sem outra especificação (LEE et al., 2011).

Brachelente et al. (2016) observaram um caso de LCE (micose fungóide) em um cão de 14 anos. A patogenia desta variante é ainda desconhecida e tem que ser confirmado os rearranjos do gene da cadeia pesada da imunoglobulina e do receptor das células -T, para se ter certeza que a variante é de origem T (LEE et al., 2011; BRACHELENTE et al., 2016).

O marcador de linfócitos ativados CD30 foi expresso em 40% dos casos. A marcação dele é fundamental na medicina e é uma das principais características para classificar algumas variantes de linfoma cutâneo (linfoma cutâneo primário de grande célula anaplásica e papulose linfomatóide) (LARA-TORRES e ORTIZ-HIDALGO, 2009). Na medicina veterinária um relato incomum em cinco cães com linfoma cutâneo apresentou fenótipo CD3+/CD30+ e a invasão do infiltrado neoplásico dérmico, pela morfologia os autores classificaram estas variantes como linfoma cutâneo periférico e linfoma cutâneo primário de grande célula anaplásica (BAHAL et al. 2016).

Em medicina, o marcador CD56 é expresso em subgrupo de linfócitos com funções NK e subgrupo de linfócitos T ativados e está presente em alguns tipos de linfomas cutâneos periféricos de células T (BARRA et al., 2006). Na medicina veterinária não foram achados estudos que mostrem a expressão deste marcador em cães com linfoma, no sangue periférico de cães saudáveis já foram detectados linfócitos T que expressaram CD56+ (OTANI et al., 2002). Ponce et al.(2010) também sugeriram realizar novas pesquisas em cães para distinguir e diferenciar os linfomas de células T, utilizando os marcadores CD56 e Granzima B. Nosso trabalho é pioneiro no emprego deste marcador para identificar sua expressão em linfomas cutâneos caninos.

As pesquisas na medicina referem perda da expressão do marcador CD7 (membrana das células T) durante a progressão da doença. Isto é considerado transformação no fenótipo da célula maligna e relacionado com tipos agressivos de câncer e neoplasias de células NK, que também expressam este antígeno. Todas elas estão associadas com um prognóstico ruim (BARRA et al., 2006; SANCHES, et al., 2006), motivo pelo qual este marcador é incluído no procedimento diagnóstico. Na literatura veterinária consultada e relacionada com linfomas cutâneos caninos não encontramos estudos empregando este marcador, ou pesquisas avaliando a transformação no fenótipo celular das células malignas. A perda na expressão deste marcador aconteceu em 80% dos cães deste estudo o que pode sugerir ou indicar uma transformação no fenotípico da célula T. Para se afirmar isso é necessário incluir em futuras pesquisas outros marcadores que avaliam a transformação das células T (CD5, CD2), além de estudos moleculares (clonalidade e rearranjos de

genes) que indiquem esta transformação, como sugerido por Wilkerson et al. (2005). Estes autores adicionalmente afirmam que nos linfomas caninos não é possível determinar uma linhagem celular absoluta empregando um único marcador.

Nesta pesquisa foi possível observar marcação positiva para Granzima B em 94% dos casos. Em humanos, o comportamento agressivo dos linfomas cutâneos é avaliado pela expressão deste marcador nas células CD8 e NK (HAMEED et al., 1991; SANCHES, et al., 2006). Acreditamos que este marcador pode ser um indicador sensível para avaliar a agressividade desta neoplasia em cães, que junto a uma marcação positiva de CD8 em 100% dos pacientes, determinaria um linfoma cutâneo agressivo, principalmente de tipo não epiteliotrópico. Nossos resultados são similares aos obtidos por Moore et al. (2012) o qual detectaram um fenótipo similar em cinco cães com LCNE (CD8+/Granzima B+).

O algoritmo diagnóstico proposto por Soo et al. (2011) e modificado pelos autores do estudo em tela, permitiu agrupar os resultados de imuno-histoquímica obtido em cada paciente, em três fenótipos bem distintos. Cada um deles está associado a diferentes variáveis, ou subtipos de linfoma cutâneos reconhecidos pela WHO-EORTC (2005), com características clínicas e morfologias específicas (WILLEMZE et al., 2005).

Em humanos o fenótipo CD3+/CD8+/CD30-/CD56-/Granzima B+ e o fenótipo CD3+/CD8+/CD30-/CD56+/Granzima B+ estão presentes em um grupo heterogêneo de linfomas chamado: linfomas cutâneo de células T periféricas - não especificado (LCTP-NS) representam todas as neoplasias de células T que não se encaixam em nenhum dos subtipos bem definidos de linfoma ou leucemia de células T.

Em humanos o LCTP-NS se apresentam como nódulos/tumores generalizados, ulcerados com necrose central, sendo comum o epiteliotropismo e não exclui as formas dérmicas e subcutâneas; as células neoplásicas podem ser grandes, médias ou pequenas com um fenótipo principalmente citotóxico (CD8+), na maioria dos casos são agressivos e o tempo de sobrevida é reduzido (SANCHES et al., 2006; SOO et al., 2011). A descrição anterior se enquadra às características morfológicas, imunofenóticas, assim como com o tempo de sobrevida de 60% dos cães deste estudo.

Na medicina o terceiro fenótipo CD3+/CD8+/CD30+/CD56+ ou CD56-/Granzima B+, é encontrado frequentemente no linfoma cutâneo primário de grande célula anaplásica (LCGA). Eles são caracterizados pela presença de nódulos/tumores solitários, localizados principalmente no tronco e membros torácicos, morfológicamente o infiltrado é não epiteliotrópico e as células são anaplásicas; sua principal característica é a marcação CD30+, CD4+ e excepcionalmente CD8+ e a metade deles marcam proteínas citotóxicas (Granzima B). Em humanos, o prognóstico, na maioria de casos, é bom (WILLEMZE et al., 2005; SANCHES et al., 2006; CAMPBELL et al., 2010; SOO et al., 2011). Quando comparamos estas características com as encontradas nos restantes dos LC dos cães que participaram deste estudo (40%), encontramos poucas semelhanças: nos cães a anaplásia não foi identificada, CD8+, Granzima B+, estiveram presentes em todos os LC e a agressividade, com reduzido tempo de sobrevida foi uma constante. Por esta razão não foi possível estabelecer uma semelhança entre a variante de LCGA humana com o fenótipo canino encontrado, a não ser pela positividade de CD30.

Interessante observar que os cães deste estudo apresentaram uma evolução diversa, vindo a óbito em uma média de 28 dias, muito embora tenham apresentado diversos imunofenótipos. Isto demonstra que a evolução clínica do LC nos cães é muito mais grave que em humanos e que existem outros fatores de agressividade que ainda não foram elucidados na espécie canina, características meio ambientais, presença de agentes infecciosos e o papel de comorbidades, tem que ser pesquisadas.

Ampliar o número de marcadores celulares pode melhorar a acurácia dos resultados deste estudo. Em humanos existem variantes raras que requerem uma grande variedade de marcadores celulares, em casos onde o comportamento e a evolução não correspondem com as variantes comumente postuladas na literatura (SANCHES et al., 2006; SOO et al., 2011).

Conclusões

Analizando os resultados deste estudo foi possível concluir que:

Linfoma cutâneo não epiteliotrópica predomina entre os cães, diferentemente dos humanos;

O imunofenótipo dominante entre os cães foi o de LC do tipo CD8+, com marcada expressão de grânulos citotóxicos, similar às formas agressivas do linfoma cutâneo de humanos;

Porcentagem inferior a 50% dos LC de cães foram CD30+, que nos humanos identifica os linfomas cutâneos de grandes células T, sem contudo mostrarem semelhanças clínicas e patológicas entre as duas espécies;

Há uma semelhança entre os LC de cães com o linfoma cutâneo de células T não especificado, descrito em humanos;

Não houve correlação entre a morfologia e fenótipo dos LC em cães com a sobrevida.

Referências.

ARAÚJO M.R.; PREIS I.S.; LAVALLE G.E.; CASSALI G.D.; ECCO R. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(8):772-780. 2012.

BAHAL, D.N.; MESHRAM, P.V.; MOREGAONKAR, S.D. et al. Unusual, findings of cutaneous lymphomas in dogs. **Indian Journal of Canine Practice**. Volume 8 Issue 2, 2016.

BARRA M. B. Uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 50 (2): 173-184, abr.-jun. 2006

BRACHELENTE, V.; AFFOLTER, K.; FONDATI A.; CD3 and CD20 Coexpression in a Case of Canine Cutaneous Epitheliotropic T-Cell Lymphoma (Mycosis Fungoides). **Veterinary Pathology**, Vol. 53(3) 563-566; 2016.

CAMPBELL, S.; PETERS, S.; ZIRWAS, M.; WONG, H. Immunophenotypic Diagnosis of Primary Cutaneous Lymphomas. A Review for the Practicing Dermatologist. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology** Vol.3, Num.10. p. 21-25, 2010.

CARTER, R.F.; VALLI, V.E.O; LUMSDEN, J.H.; The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according the National Cancer Institute Working Formulation. **Can J Vet Res** 50:154–164, 1986

CORTEZ-FRANCO F.; QUIJANO-GOMERO, E. Manifestaciones cutáneas de la infección por el virus linfotrópico T humano (HTLV-I). **Dermatología Peruana**, Vol 19(1), 2009.

DAY M.J. Immunophenotypic Characterization of Cutaneous Lymphoid Neoplasia in the Dog and Cat. **J. Comp. Path.** Vol. 112, 79-96, 1995.

DUARTE, A.R.; MARQUES, J.A.; ZAHN, F.S. et al., Clinical and laboratorial evaluation of dogs with cutaneous lymphoma treated with lomustine. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 39-47, 2016

FONTAINE, J.; BOVENS, C.; BETTENAY, S.; MUELLER, R. S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2009.

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

FOURNEL-FLEURY C.; PONCE F.; FELMAN P.; BLAVIER A. et al., Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. **Vet. Pathol** 39:92–109, 2002.

GALLARDO. F; PUJOL, R.M. Diagnóstico y tratamiento de los linfomas cutáneos de células T primarios. **Actas Dermo-Sifiliográficas**. 95 (8):473-90, 2004.

GROSS T. L., IHRKE P. J., WALDER E. J., AFFOLTER V. K. Skin diseases of the dog and cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd Ed., **Blackwell Publishing, Iowa**, pp. 882 – 888, 2006.

HAMEED, A.; TRUONG, L.; PRICE, V. et al. Immunohistochemical Localization of Granzyme B Antigen in Cytotoxic Cells in Human Tissues. **American Journal of Pathology**, Vol. 138, No. 5, May 1991

JARK, P.; VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANAI, .L.A.; TINUCCI-COSTA, M. Epidemiological Study of 60 cases of Cutaneous Lymphoma in Dogs in São Paulo State, Brazil. (Abstract) In: **39th World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Congress**, Cape Town, South Africa, 16 - 19 Sep. 2014.

LARA-TORRES C.; ORTIZ-HIDALGO C. Diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial. **Patología**; 47(1):35-45, 2009.

LEE K.; JEON Y.; HONG J. et al. CD20 Positive T Cell Lymphoma Involvement of Skin. **Ann Dermatology** Vol. 23, No. 4, 2011

MAGNOL JP; GHERNATI I; MARCHAL T; CHABANNE L; DELVERDIER A; FOURNEL C. Clinical, morphologic and immunophenotypic data based on 10 cases of canine muco-cutaneous epidermotropic T-lymphoma (analogous to Mycosis Fungoid). Important of an animal model of spontaneous pathology. **Bull Acad Natl Med**. Feb; 180(2):449-62, 1996.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. CAMPBELL, K Tumors of lymphoid Origem. In: **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p.810-840, 2013

MIYASHIRO, D.R.; SANCHES, J.S. Cutaneous lymphomas: A review. **Cumhuriyet Medical Journal**, Volume: 37, P.267-86, 2015.

MORENO, K.; BOSELLI, C.; SILVA, O.; BRACARENSE, A.P. Cutaneous lymphoma in dogs: epidemiology, morphology, response to therapy and survival. **ClínicaVeterinária** (São Paulo), v. 15, p. 32-38, 2010.

MOORE, P. F.; OLIVRY, T. Cutaneous lymphomas in companion animals. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n.4, p. 499-505, 1994.

MOORE, P.; AFFOLTER, V.; KELLER, S. Canine inflamed nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: a diagnostic **conundrum** **Advances in Veterinary Dermatology**. Edited by Sheila M. F. Torres. The Authors. Journal compilation. ESVD and ACVD, p.220 – 227, 2012.

OTANI I.; NIWA T.; TAJIMA M.; CD56 is expressed exclusively on CD3+ T lymphocytes in canine peripheral blood. **J Vet Med Sci**. May; 64 (5): 441-4. 2002.

PONCE, F.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P.; et al., A Morphological Study of 608 Cases of Canine Malignant Lymphoma in France with a Focus on Comparative Similarities between Canine and Human Lymphoma Morphology. **Veterinary Pathology** 47(3) 414-433, 2010.

RUIZ F.; ALESSI A. C.; CHAGAS C.; et al. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **J Bras Patol Med Lab**. v. 41, n. 4, p. 263-70, agosto, 2005.

SANCHES JR. J.Á.; MORICZ C.Z.M., NETO C.F. Processos linfoproliferativos da pele. Parte 2 – Linfomas cutâneos de células T e de células NK. **Anais Brasileiros de Dermatologia**; 81(1):7-25, 2006.

SOO K. L.; SHUSTIK D., YUSOFF L. Z. et al. An algorithmic approach to the diagnosis of NK and T cell lymphomas. **Pathology** 43(7), pp. 673–681; December, 2011.

TORRES NETO, R.; WERNER, J.; SEQUEIRA, J.L.; LAUFER AMORIM, R. Linfoma cutâneo de células t canino: estudo anatomoclínico de 57 casos (2013-2015). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 59-60, 2015.

WILLEMZE R, JAFFE ES, BURG G, CERRONI L, BERTI E, SWERDLOW SH, ET AL., WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. **Blood**; 105: 3768-86, 2005.

WITHROW, S.J.; VAIL, M. D. Hematopoietic Tumors. In: **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St Louis: Saunders, p. 608, 2013.

CAPÍTULO 4 – PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CÃES COM LINFOMA CUTÂNEO

Resumo

Foram comparadas as concentrações seroproteicas de cães com linfoma cutâneo (n=26) e de cães saudáveis (n=15), utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os cães com linfoma cutâneo quando comparados com os cães saudáveis, apresentaram elevação significativa ($P < 0,05$) nas concentrações de IgG (Cadeias pesada e leve) e de uma proteína de PM34000 Daltons; redução significativa ($P < 0,05$) nas concentrações de albumina, transferrina, alfa-1 Glicoproteína Ácida (GPA) e de uma proteína PM 23000 Daltons. Não foram observadas significâncias nas concentrações séricas de IgA, haptoglobulina, ceruloplasmina, alfa-1 antitripsina (AAT), entre ambos os grupos ($P > 0,05$). Nos cães doentes foi encontrada associação positiva entre o tempo de sobrevivência e as concentrações baixas das proteínas albumina e transferrina. A hipergamaglobulinemia monoclonal (IgG) sugere uma estimulação antigênica crônica no momento da avaliação dos pacientes. Albumina e Transferrina são proteínas de fase aguda com comportamento negativo, que podem influenciar no prognóstico de cães com linfoma cutâneo.

Palavras chaves.

Proteínas, Eletroforese, câncer, citocinas, caninos.

CHAPTER 4 - SERUM PROTEIN PROFILE OF DOGS WITH CUTANEOUS LYMPHOMA

Abstract

Seroprotein concentrations of dogs with cutaneous lymphoma (n = 26) and healthy dogs (n = 15) were compared using sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Dogs with cutaneous lymphoma when compared to healthy had a significant increase ($P < 0.05$) in the concentrations of immunoglobulin G (IgG) and PM 34000 Daltons protein, a significant reduction ($P < 0.05$) in the concentrations of albumin, Transferrin, alpha-1 acid glycoprotein (GPA) and the PM 23000 Daltons protein. Significance was not observed in the serum concentrations of IgA, haptoglobin, ceruloplasmin, alpha-1 antitrypsin (AAT) in both groups ($P > 0.05$). Positive association between survival time and low concentrations of albumin and transferrin proteins was found in diseased dogs. Monoclonal hypergammaglobulinemia (IgG) suggests chronic antigenic stimulation at the time of patient evaluation. Albumin and transferrin are acute phase proteins with negative behavior that may influence the prognosis of dogs with cutaneous lymphoma.

Keywords.

Proteins, Electrophoresis, Cancer, Cytokines, Canine.

Introdução

As proteínas são biomoléculas formadas de sequências de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas, com grande variedade estrutural e complexas funções biológicas. Várias doenças levam a alterações proteicas de tipo quantitativo ou qualitativo no sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e outros fluidos biológicos (BARRERO; MASGRAU, 2001).

A concentração sérica das proteínas não é afetada somente pelo balanço entre síntese e degradação, pois na enfermidade as proteínas são fundamentais na primeira reação imunológica do corpo frente à injúria, a qual é inespecífica e precede as reações imunes específicas (QUEIROZ et al., 2016).

Dentre das respostas inespecíficas, a resposta de fase aguda (RFA) é considerada uma importante reação orgânica a distúrbios homeostáticos locais ou sistêmicos, causados pela infecção, dano tecidual, trauma, cirurgias, desordens imunológicos ou neoplasias (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001). Esta RFA é caracterizada pela liberação de citocinas pró inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF) no local da injúria, as quais migram até o fígado onde será feita a síntese de proteínas de fase aguda (PFA) (CERÓN et al., 2005). As PFA podem ser classificadas de acordo com sua variação quantitativa nas concentrações séricas, pela sua elevação (PFA positivas) ou diminuição (PFA negativas). Proteína C-reativa (PCR), amiloide A-sérica (AAS), haptoglobina, alfa-1 Glicoproteína Ácida (GPA), alpha-1 antitripsina (AAT) e ceruloplasmina, são exemplos de PFA positivas. Albumina e transferrina são PFA negativas (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001; ECKERSALL, 2008; QUEIROZ et al., 2016).

Outro grupo de proteínas presentes nas respostas imunes específica são as imunoglobulinas que apresentam elevação de suas concentrações em alguns processos inflamatórios crônicos ou em neoplasmas de origem linfóide (plasmocitomas, linfomas e leucemia linfocítica, entre outros) (OLIVEIRA et al., 2013).

Existem vários métodos para a detecção destas proteínas, as quais apresentam diversos graus de sensibilidade e especificidade. Alguns destes métodos são: ELISA, radioimunoensaio, nefelometria, imunoturbidimetria, western blot, análise de RNA (GRUYS et al., 2005; QUEIROZ et al., 2016), entre outros. Uma

técnica padrão para identificação e quantificação de proteínas é a eletroforese, que permite a separação das proteínas em géis de agarose ou poliacrilamida, de acordo com sua carga elétrica e peso molecular. É uma técnica que auxilia o clínico a ter uma visão global da composição e homeostase das proteínas do paciente, além disso, permite identificar aqueles pacientes que requerem uma quantificação mais específica por técnicas mais sensíveis, como por exemplo, a espectrofotometria de massas (CAMPUZANO-MAYA, 2006).

As proteínas séricas citadas são pesquisadas em várias espécies animais por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (MUNHOZ et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014; SIMPLÍCIO et al., 2015). Em cães com câncer, Calazans et al. (2009) compararam o perfil das PFA em soro de cães saudáveis e com linfoma multicêntrico, detectando uma elevação da ceruloplasmina e haptoglobina, assim como uma diminuição na albumina, nos cães com linfoma. Viera et al. em 2010, avaliaram o comportamento das PFA no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento quimioterápico de cães com linfoma multicêntrico. No momento do diagnóstico, os cães apresentaram concentrações elevadas de GPA e transferrina e diminuição de AAT, quando comparados com cães saudáveis. Além disso, os níveis elevados de transferrina se mantiveram ao longo do tratamento quimioterápico. Battisti et al. (2013) avaliaram as PFAs em cadelas com neoplasia mamária, detectando concentrações da haptoglobina elevadas e de albumina diminuídas nas cadelas com tumores ulcerados, quando comparadas com o grupo controle. Semelhantemente, Tecles et al. (2009), empregando diferente metodologia pesquisaram PFAs em cadelas com tumores mamários (kits comerciais para albumina, haptoglobina, PCR e AAS), e também detectaram concentrações diminuídas de albumina e elevadas de haptoglobina, AAS, PCR nas cadelas com tumor em estágio avançado (metástases, tumores ulcerados e maiores de 5cm), quando comparadas com o grupo controle. Estudos utilizando kits comerciais, como o desenvolvido por WINKEL et al. (2015) avaliaram em gatos com linfoma, as concentrações séricas, de GPA (imunoradiodifusão radial) e AAS (imunoensaio sandwich de fase sólida), no momento do diagnóstico e em vários momentos ao longo do tratamento. Seus resultados detectaram diferenças significativas com o

grupo controle (felinos saudáveis) e diminuição nas concentrações destas PFA durante a remissão, demonstrando a utilidade clínica destes marcadores.

O linfoma é uma neoplasia que pode ter uma apresentação anatômica variada e cada uma delas é acompanhada de alterações clínicas e fisiopatológicas que as diferencia das outras. A forma cutânea do linfoma é caracterizada por lesões na pele (eritrodermia, manchas, placas e nódulos/tumores). Na pele, o tropismo das células neoplásicas também pode apresentar variabilidade, gerando a forma epiteliotrópica e a forma não epiteliotrópica. A variante cutânea do linfoma está associada com prognóstico desfavorável, tendo em vista a resposta desfavorável aos agentes quimioterápicos com consequente reduzido tempo de sobrevida (FONTAINE et al., 2009; MILLER et al., 2013; WITHROW et al., 2013).

Na literatura consultada não há dados sobre o comportamento destas proteínas em cães com linfoma cutâneo. Entre 2013 e 2016 no Hospital Veterinário da Unesp campus de Jaboticabal (HV/Unesp/Jaboticabal) foram armazenados 26 alíquotas de soros sanguíneos de cães com linfoma cutâneo e cães saudáveis com o objetivo de comparar as concentrações séricas das proteínas entre ambos os grupos, além de pesquisar a relação entre as proteínas séricas dos cães doentes com o prognóstico.

Material e métodos

O referido estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 10.339/16). Soro de 41 cães sem predileção de raça, sexo ou idade foram analisados pela técnica SDS-PAGE. Foram constituídos dois grupos experimentais, a saber: grupo estudo - foi constituído por 26 cães que apresentavam lesões cutâneas (placas, nódulos/tumores), que após biópsia incisional e exame histopatológico receberam o diagnóstico de linfoma cutâneo (quinze machos e onze fêmeas) e grupo controle - foi formado por 15 cães saudáveis (oito machos e sete fêmeas).

De todos os cães foram coletadas amostras de sangue (8-10 mL) por venopunção jugular após prévia desinfecção local, e as amostras individualmente distribuídas em tubos específicos sem a presença de anticoagulante. Após 30

minutos, e uma vez formados os coágulos procedeu-se a centrifugação a 3000/RPM durante cinco minutos. A seguir, os soros foram individualmente armazenados em criotubos de 1,5 mL e mantidos a -70°C até as análises.

As concentrações de proteínas totais do soro foram determinadas pelo método de Biureto, com um kit comercial (LabQuest®) e leitura em analisador de fotometria automático.

O proteinograma foi obtido por fracionamento eletroforético em sistema vertical pela técnica SDS-PAGE, segundo método descrito por Laemmli (1970). Para tanto, as amostras de soro sanguíneo foram diluídas em tampão fosfato (30 µL PBS) e gel mix (20 µL). A seguir, as amostras foram aquecidas sobre vapor de água em ebulição durante 10 minutos. Uma fração de 5µL desta mistura foi depositada no fosso do gel contido em uma placa que foi colocada em suporte apropriado, em contato com a solução tampão de pH 6,5 e submetida à corrente elétrica de 50 mA, em fonte apropriada. Terminada a separação, o gel foi corado durante 60 minutos em solução de azul de Comassie 0,2% e, em seguida, descolorido em solução de ácido acético glacial a 7%, até que as frações se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados mediante leitura em densitômetro computadorizado (Densitômetro Shimatzu CS-9301 – Tóquio – Japão), e as concentrações obtidas por cálculos manuais (Naoum, 1999). Para a identificação das proteínas no gel, foram utilizados 10 marcadores de pesos moleculares que variavam de 20 a 200 kDa, além das proteínas purificadas ceruloplasmina, transferrina, α 1-antitripsina, IgG e haptoglobina.

Para determinar se as concentrações das frações proteicas diferiram significativamente entre o grupo-estudo e o grupo-controle, os dados foram inicialmente submetidos a prova de normalidade (Shapiro-Wilk), a fim de escolher o melhor teste para analisar as variáveis com ou sem distribuição normal. Os dados que apresentaram distribuição paramétrica ou normal, foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) pelo Teste F ($p < 0,05$) e os de distribuição não paramétrica, foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Nos cães doentes a sobrevida foi obtida pelo teste de Kaplan Meier com um intervalo de confiança de 95% utilizando o software GraphPadPrism versão 5. Finalmente foi determinado o grau de associação linear entre os níveis de proteínas

dos cães doentes e o tempo de sobrevivência calculando o coeficiente de correlação de Pearson ($R > 0.5$ correlação média), e com os resultados obter uma regressão linear identificando o coeficiente de determinação (R^2) do modelo.

As análises foram feitas pelo programa SPSS Statistics, no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

Resultados

Concentração das frações proteicas do grupo-estudo e do grupo-controle

Cães com linfoma cutâneo apresentaram as concentrações de proteínas plasmáticas totais de $8,4\text{g/dL} \pm 2,0$ sem diferença significativa quando comparadas com o grupo controle $7,83\text{g/dL} \pm 1,21$.

O fracionamento proteico obtido no gel de poliacrilamida permitiu a identificação de 29 bandas proteicas (com uma variação de 27 a 31 bandas), tanto nos cães do grupo estudo e grupo controle. Foram detectadas as PFAs positivas (ceruloplasmina, AAT, haptoglobina, GPA), as PFAs negativas (transferrina, albumina), as imunoglobulinas (IgA, IgG cadeia pesada e leve) e duas proteínas de nome desconhecido de PM 23000 e PM 34000 daltons, que apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).

Os cães com linfoma cutâneo apresentaram concentrações elevadas e significativas ($P < 0,05$) de IgG (cadeia pesada e leve) e da proteína de PM34000 D (Tabela 1)(Figura 1), quando comparados aos cães saudáveis. Neste mesmo grupo também diminuíram significativamente ($P < 0,05$) as concentrações da GPA, da proteína de PM 23000 D., albumina e transferrina (PFAs negativas), quando comparadas com os cães saudáveis (Tabela 1)(Figura 2).

As médias de IgA, ceruloplasmina, AAT e haptoglobina, não diferiram entre os grupos (Tabela 1) (Figura 3).

Tabela 1. Médias, desvios-padrão e valor de P, das concentrações de proteínas séricas (mg/dL) de cães com linfoma cutâneo e cães saudáveis, obtidas pela

técnica SDS-PAGE. Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si.

Proteína	Cães Doentes(n=26)	Cães sadios(n=15)	P < 0,05
IgA	33,82 ± 16,71	32,36 ± 13,48	NS
Ceruloplasmina	84,80 ± 41,88	103,66 ± 44,06	NS
Transferrina	239,26 ± 90,50 ^a	334,87 ± 72,73 ^b	0,001
Albumina	3371,44 ± 691,94 ^a	4347,88 ± 552,08 ^b	0,00003
α1-Antitripsina	132,00 ± 126,54	110,99 ± 29,19	NS
IgG cadeia pesada	2115,18 ± 1043,03 ^a	1084,96 ± 440,50 ^b	0,001
Haptoglobina	21,22 ± 11,88	14,72 ± 7,50	NS
α1-Glicoproteína ácida	19,60 ± 22,45 ^a	26,97 ± 18,34 ^b	0,03
PM 34000 Daltons	246,16 ± 161,24 ^a	112,27 ± 78,40 ^b	0,005
IgG cadeia leve	933,92 ± 543,49 ^a	418,49 ± 161,33 ^b	0,001
PM 23000 Daltons	366,91 ± 147,74 ^a	607,59 ± 164,49 ^b	0,00002

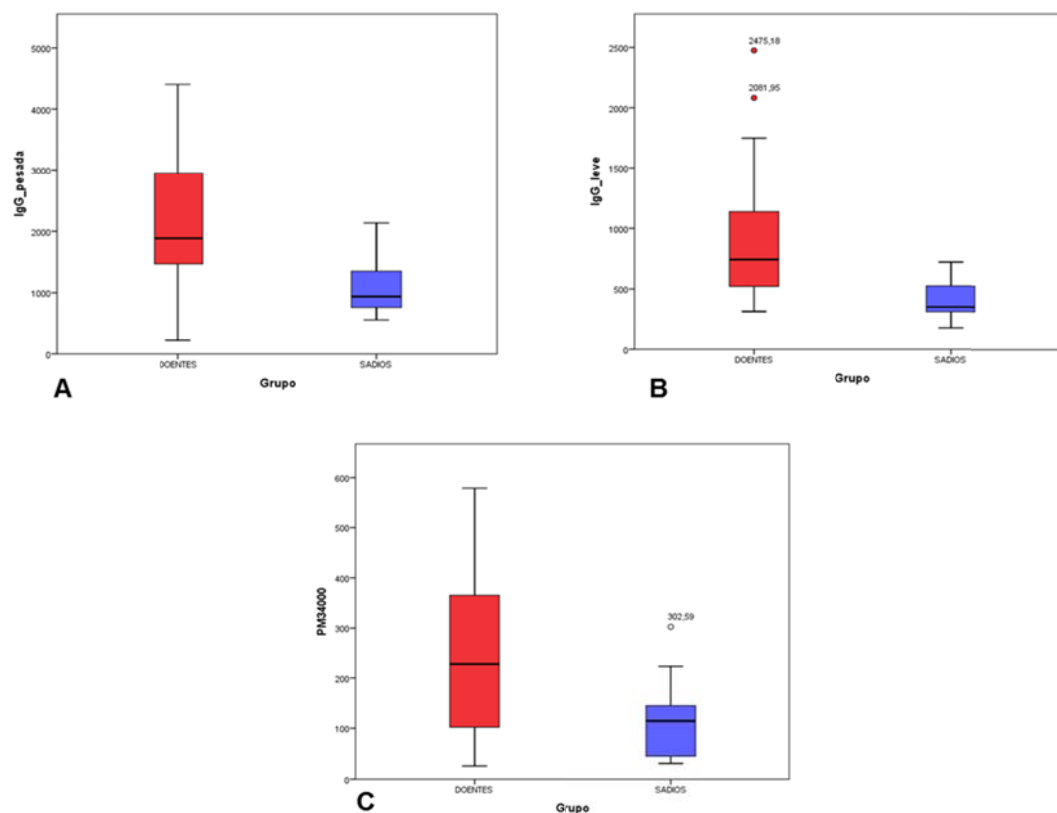


Figura 1: Concentrações de proteínas séricas de cães com linfoma cutâneo (doentes), comparado com o grupo controle (sadios). IgG (cadeia pesada) (A), IgG (cadeia leve) (B) e PM 34000 Daltons (C). Teste F e Teste de Kolmogorov-Smirnov. Significância P < 0,05

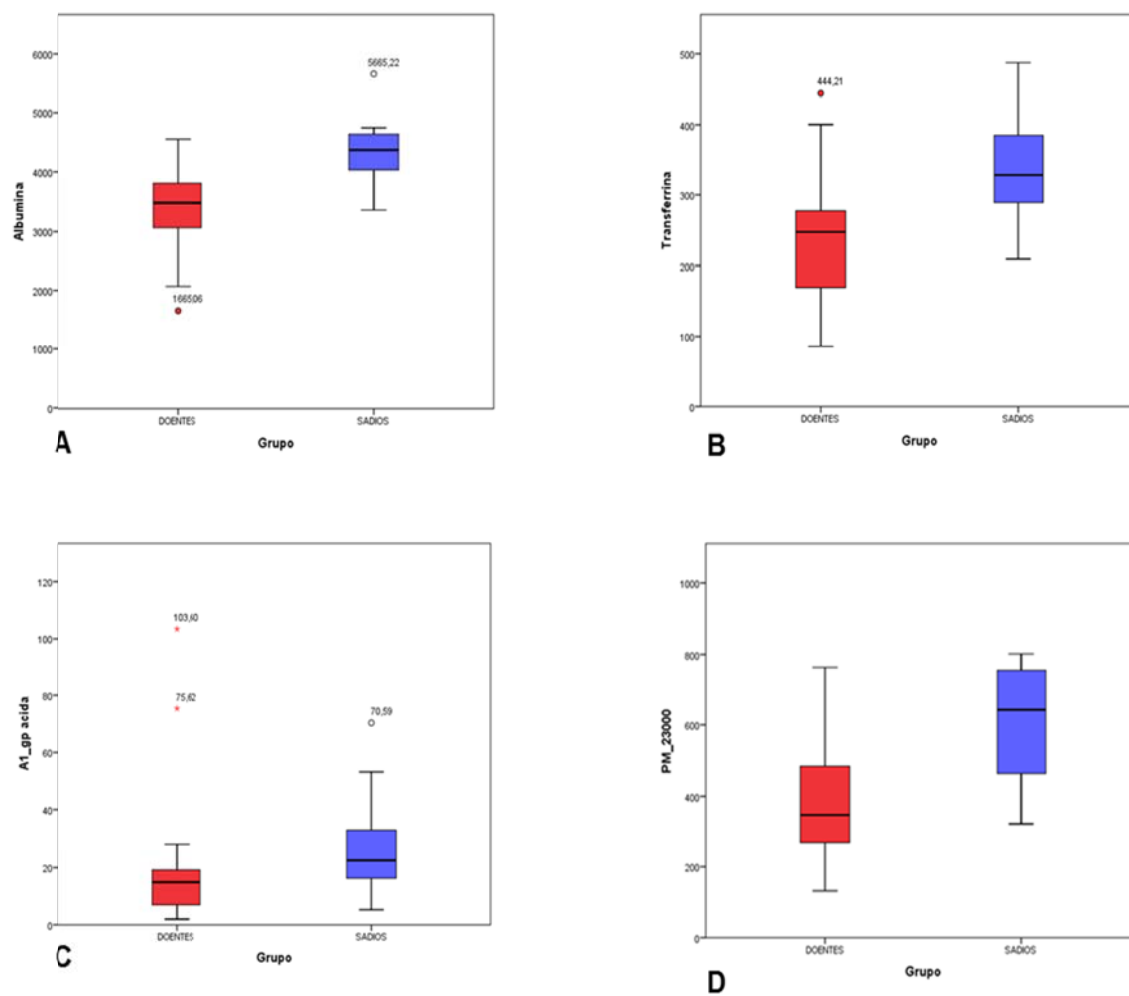


Figura 2: Concentrações proteínas séricas de cães com linfoma cutâneo (doentes), comparado com o grupo controle (sadios), da Albumina (A), transferrina (B), GPA (C) e PM 23000 Daltons (D). Teste F e Teste de Kolmogorov-Smirnov. Significância ($P < 0,05$).

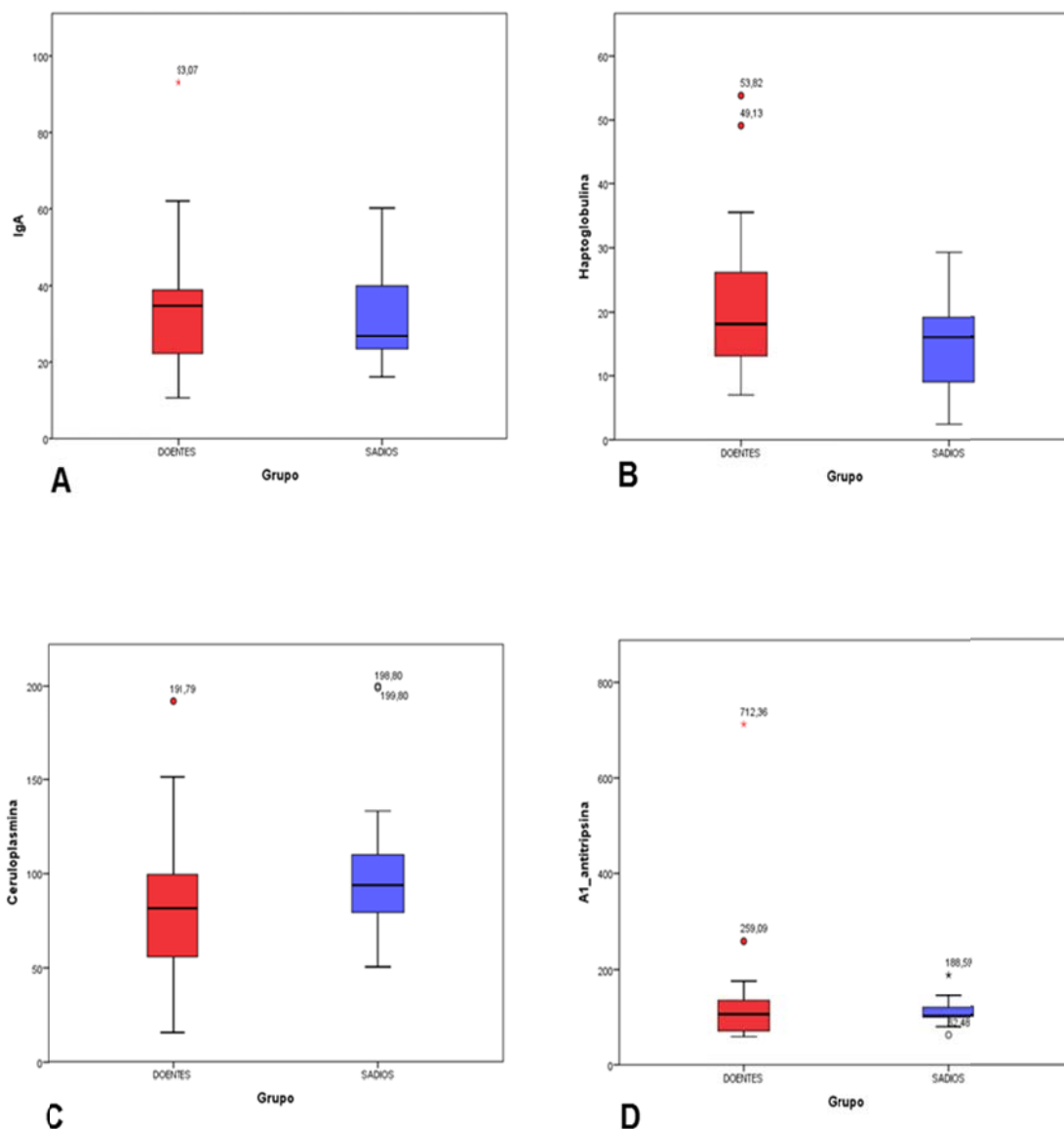


Figura 3: Concentrações de proteínas séricas IgA (A), haptoglobina (B), ceruloplasmina (C), AAT (D) de cães com linfoma cutâneo (doentes) e grupo controle (sadios), que não apresentaram diferença significativa. Teste F e Teste de Kolmogorov-Smirnov.

Correlação PFA vs. tempo de sobrevivência

A média de sobrevivência dos 26 animais com LC foi de 28 dias, representada pela curva de Kaplan-Meier (Figura 4).

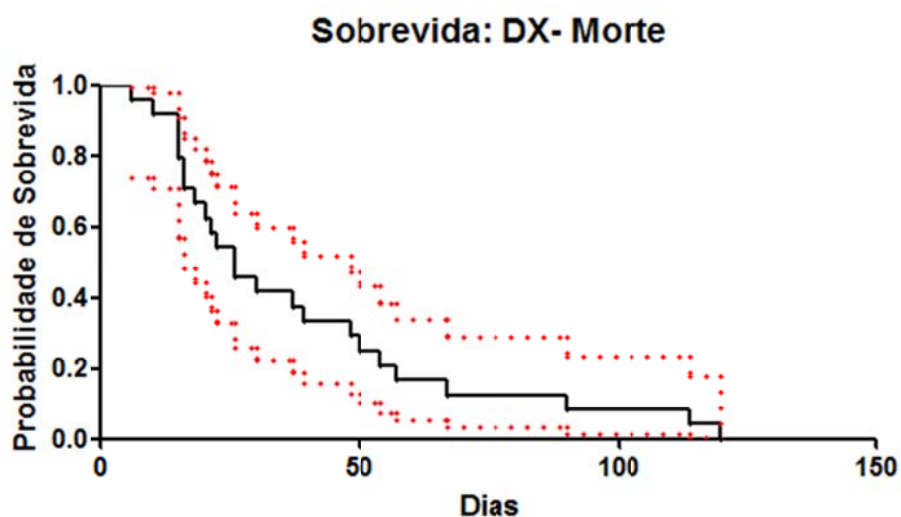


Figura 4: Curva de Kaplan Meier para a probabilidade de sobrevida em função do tempo de sobrevida (dias) dos cães com linfoma cutâneo, em vermelho o intervalo de confiança 95%.

Nos cães doentes foi observada associação linear entre as concentrações diminuídas de transferrina e albumina com o tempo de sobrevida, identificando-se correlação positiva e significativa superior a 0.50 com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0.24 (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 2. Associação linear entre as variáveis albumina e transferrina, com o tempo de sobrevida. Correlação de Pearson superior ($R > 0.5$), significância bilateral ($P < 0.05$).

	Albumina / Sobrevida	Transferrina / Sobrevida
Correlação de Pearson / R	0,496a*	0,511a*
Sig. (Bilateral)	0,01	0,008
R quadrado	0,246	0,261

a Variável preditora. * A correlação é significativa ao nível 0,05 (bilateral).

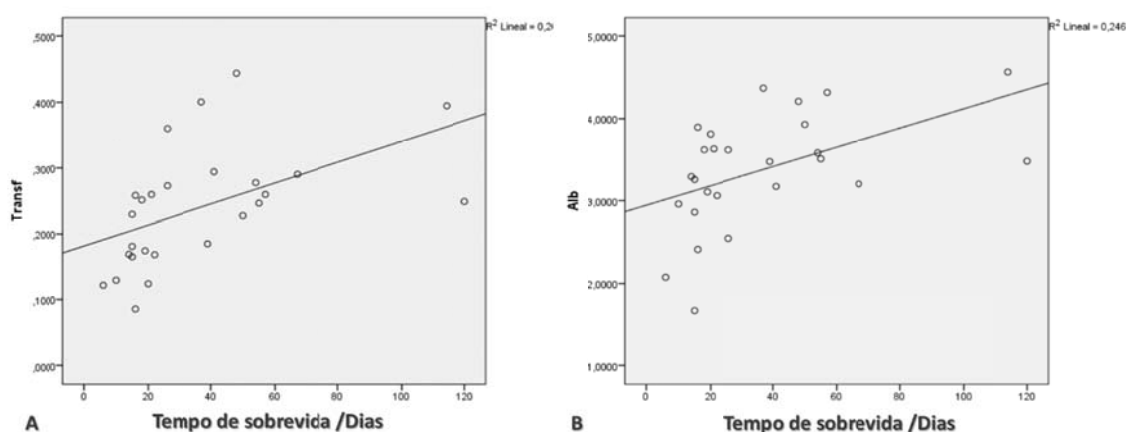


Figura 5: Correlação entre as concentrações das PFA (Transferrina e Albumina) vs. tempo de sobrevida em dias, dos 26 cães com linfoma cutâneo. A. Transferrina / Tempo de sobrevida (n=26; $R^2=0,261$; $P < 0,05$). B. Albumina / Tempo de sobrevida (n=26; $R^2=0,246$; $P < 0,05$).

Discussão

O linfoma cutâneo em humanos é uma neoplasia que apresenta muitas variantes, algumas delas com comportamento indolente e tempo de sobrevida longo; outras agressivas de prognóstico desfavorável (MILLER et al. 2013, SANCHES et al. 2015). Nos cães esta entidade é rara, pouco estudada e se desconhecem muitos aspectos relacionados com sua patogenia.

Em humanos com micose fungóide, uma variante indolente e frequente de linfoma cutâneo, já foi demonstrada uma reação inflamatória clara, com elevação de citocinas pró-inflamatórias e de PFA (PAWLACZYK e SOBIESKA, 2006). Alguns autores sugerem que as concentrações destas moléculas variam muito durante a progressão da doença. Já foi demonstrado que nos estadios iniciais e finais da doença a intensidade da reação de fase aguda é muito maior, quando comparada com os estadios intermediários, ou de progressão da doença (PAWLACZYK et al., 2001). Nos cães deste estudo, a evolução da doença foi rápida e estes apresentaram um tempo de sobrevida muito reduzido, por quanto se supunha que se encontrariam variações significativas nas concentrações destas proteínas no grupo de cães doentes.

Pela técnica PAGE-SDS, albumina e transferrina foram as únicas PFA que apresentaram variações significantes entre grupos (doentes e sadios) e também uma associação significativa com o tempo de sobrevida no grupo de cães doentes.

Na RFA estas duas proteínas (consideradas as principais PFA negativas no cão) (CERON et al., 2005) apresentam diminuição nas suas concentrações. Coincidentemente, níveis baixos de albumina foram apresentados por Calazans et al. (2008) em cães com linfoma nodal e por Battista et al. (2013) em cadelas com câncer de mama, empregando a mesma técnica do nosso estudo.

Cerón et al. (2005) referem como a Transferrina apresenta valores diminuídos em cães com RFA. Na espécie canina esta proteína é utilizada, principalmente, para avaliar o metabolismo e homeostase do ferro (SMITH et al., 1997; BRAUN et al., 2001; CERON et al., 2005). Outras pesquisas avaliando a transferrina na espécie canina mostraram resultados opostos aos encontrados no presente estudo. Níveis elevados de transferrina foram encontrados por Munhoz et al. (2012), em cães que apresentaram RFA após infecção experimental com *Ehrlichia canis*. Assim como Viera et al. (2010), também observaram elevação significativa em cães com linfoma nodal.

Neste estudo, os cães que apresentaram os níveis mais baixos de transferrina (35% dos casos) e de albumina (31% dos casos), notadamente apresentaram o tempo de sobrevida reduzido (< 20 dias), como pode ser observado na Figuras 5. A transferrina é considerada um marcador biológico muito mais sensível quanto comparado com a albumina. A transferrina apresenta vida média curta e suas reservas no organismo são reduzidas, sendo assim, as variações nas suas concentrações tem maior valor diagnóstico e prognóstico. Por sua vez, a albumina, ao contrário têm vida longa e grandes reservas no organismo e suas variações dependem de múltiplas alterações orgânicas (DONATO, 2009).

A GPA apresentou diminuição significativa nos cães com linfoma cutâneo quando comparados com os cães do grupo controle. A literatura na medicina veterinária tem demonstrado níveis altos desta proteína em infecções e câncer (VIERA et al., 2010; MUNHOZ et al., 2012; WINKEL et al., 2015). Nossos resultados são aparentemente contraditórios devido às concentrações diminuídas desta PFA, ou podem sugerir que no momento da coleta, os cães doentes não apresentavam o suficiente estímulo pro-inflamatório para influenciar a elevação das concentrações desta proteína, como explicado por Cerón et al. (2005). Outro fato que pode apoiar esta hipótese foi o comportamento das outras PFA positivas pesquisadas neste

estudo (haptoglobulina, ceruloplasmina e AAT), as quais não apresentaram alterações com significativas. É relevante ressaltar que um cão apresentou uma concentração elevada da GPA (5,2 vezes acima da média. Figura 2. C) e outro cão apresentou uma concentração elevada da AAT (5,4 vezes acima da média. Figura 3. D), evidenciando provavelmente uma RFA nestes cães.

Elevação significativa nas concentrações de IgG dos cães doentes foi detectada neste estudo, condizente com pesquisas que avaliaram a resposta humoral em pacientes humanos acometidos por linfoma cutâneo e encontraram hipergamaglobulinemia. Talpur et al. (2002) sugerem a produção de uma substância chamada “fator solúvel” que induz a ativação das células B normais e posterior elevação da IgG. Nossos resultados não permitem afirmar que esta seja a causa. Nós sugerimos que a razão desta elevação, seja um estímulo antigênico persistente pela doença que estimula a ativação das células B. Um aspecto a elucidar em futuras pesquisas é a função desta IgG nos cães com linfoma cutâneo, o seu papel protetor, ou pelo contrário de autoimunidade.

Duas proteínas de nome desconhecido identificadas pelo seu peso molecular como PM34000 Dalton e PM23000 Dalton apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos. Pesquisas utilizando a técnica SDS-PAGE também identificaram proteínas com os mesmos pesos moleculares em cães com linfoma multicêntrico (CALAZANS et al., 2009; VIERA et al., 2010). Isto remonta a necessidade de identificação e funcionalidade que necessitam ser esclarecidas podendo se perfilar como fatores prognósticos em novos trabalhos.

Limitantes do nosso estudo foram as particularidades que cada tumor tinha com seu hospedeiro, tendo em vista características histológicas, onde encontramos tumores difusos, outros nodulares, necrose, atrofia da epiderme, entre outras na avaliação inicial dos pacientes e no momento da mensuração das PFA. Estas variações podem ter interferido nas suas concentrações. Assim como ter feito uma única dosagem das PFA, de forma que a dinâmica e cinética nas concentrações destas não foi analisada.

Conclusão

Nos cães deste estudo podemos concluir que:

Redução da Albumina e transferrina podem ser associadas a diminuição no tempo de sobrevivência;

A detecção de altos níveis de IgG sugerem que o linfoma cutâneo em cães cause estímulo da resposta humoral.

Os valores normais das PFA (ceruloplasmina, haptoglobulina e AAT) somado a uma incomum e significativa diminuição na concentração de GPA, sugere que o linfoma cutâneo em cães não produza a RFA, ou que ela possa acontecer antes de os animais manifestarem a doença clínica.

Referências

BARRERO, M.; MASGRAU, R. El proteinograma en medicina clínica. **Medicina Integral**, Vol. 38, Núm.9, Novembro 2001.

BATTISTI, M.K.; SILVA, D.M.; REUSINGI, M.S. et al., Proteínas de fase aguda em cadelas com neoplasia mamária. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.43, n.5, p.902-907, mai, 2013

BRAUN J.P.; BACHELLERIE R.; GUELFY J.F. et al. Iron metabolism and testing in the dog. **Rev Med Vet.** 152:515–521, 2001.

CALAZANS, S.G.; DALECK C.R.; FAGLIARI J.J. et al. Proteinograma sérico de cães saudáveis e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1044-1048, 2009.

CAMPUZANO-MAYA. La electroforesis de proteínas más que una prueba de laboratorio. **Medicina & laboratorio**, vol. 12, números 1-2, 2006

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

DONATO H. Anemia ferropénica. Guía de diagnóstico y tratamiento. Sociedad Argentina de Pediatría. Subcomisiones, Comités y Grupos de Trabajo. **Arch. Argent. Pediatr.** 107(4):353-361 / 2009.

ECKERSALL, PD. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: KANEKO, JJ.; HARVEY, JW.; BRUSS ML. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press,. p. 117- 155. 2008

FONTAINE, J.; BOVENS, C.; BETTENAY, S.; MUELLER, R. S. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2009.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.; NIEWOLD, T.; KOOPMANS, S. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ. Sci. B, Hangzhou**, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, 227, 680-685, 1970.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M.; CERÓN, J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **J. An. Vet.** (Murcia) 17: 97-114 (2001).

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. CAMPBELL, K Tumors of lymphoid Origem. In: **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p.810-840, 2013

MUNHOZ, T.D.; FARIA, J. L. M.; VARGAS-HERNANDEZ, G. et al., Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** (Impresso), v. 21, p. 206-212, 2012.

NAOUM, P. C.; CERON, C. R.; DOMINGOS, C. R. B. Conhecimentos Básicos de Eletroforese. In: NAOUM, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, p. 1-38, 1999.

NOGUEIRA, A. F. S.; FILIPPO, P.; ANAI, L. A. ; VIEIRA, M. C. ; SIMPLÍCIO, K.M.M.G. ; SANTANA, A. E. . Establish mentos peritoneal liquid electrophoretogram from healthy horses and horses submitted to experimentally induced intestinal obstruction. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Online), v. 66, p. 665-671, 2014.

OLIVEIRA, K.; HORTA, R.; SILVA, C.; LAVOR, M. Principais síndromes paraneoplásicas em cães e gatos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.9, n.17; p. 2073, 2013.

PAWLACZYK M.; SOBIESKA M.; WIKTOROWICZ K. Generalised inflammatory reaction present in plaque stage of mycosis fungoides. *Skin Cancer*; 16: 115–22, 2001.

PAWLACZYK M.; SOBIESKA M. A correlation between acute phase proteins and cytokines in patients suffering from mycosis fungoides. **Acta Dermatoven APA**. Vol 15, No 3, 2006.

QUEIROZ, L.; CASTRO, L.; ARIZA, C. et al., Proteínas de fase aguda (PFA) em cães enciclopédia **Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.13 n.23; p. 1086, 2016.

SIMPLÍCIO, K.M.M.G.; SANCHEZ, D. C. C.; ROCHA, T. G.; COTRIM, F.; SILVA, P. C.; FAGLIARI, J. J. Proteínas de fase aguda em ovinos portadores de enfermidades agudas de ocorrência natural. **Investigação**, v. 14, p. 67-73, 2015.

SMITH JE. Iron metabolism and its disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4th ed. New York: Academic Press; 223–240, 1997.

TALPUR, R.; LIFSHITZ, O.; BREUER-MCHAM, J. et al. Increased serum immunoglobulin levels are common in mycosis fungoides and Sézary syndrome. **Jour. Am Acad Dermatol**. Nov; 47(5):685-91, 2002.

TECLES, F.; CALDÍN, M.; ZANELLA, A.; MEMBIELA, F. et al., Serum Acute Phase Protein Concentrations in Female Dogs with Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 21: 214, 2009.

VIEIRA, M.; COLETA, F.; GODOY, A. et al., Acute Phase Proteins in Canine Lymphoma During Antineoplastic Chemotherapy. **Braz J Vet Pathol**; 3(2), 86-92, 2010.

WINKEL, V.M. ; PAVAN, T.L.R. ; WIRTHL, V. A. B. F. ; ALVES, A. L. N. ; LUCAS, S. R. R. . Serum alfa-1 acid glycoprotein and serum amyloid A concentrations in cats receiving antineoplastic treatment for lymphoma. **American Journal of Veterinary Research**. Vol. 76, p. 983-988, November 2015.

WITHROW, S.J.; VAIL, M. D. Hematopoietic Tumors. In: **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St Louis: Saunders, p. 608, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

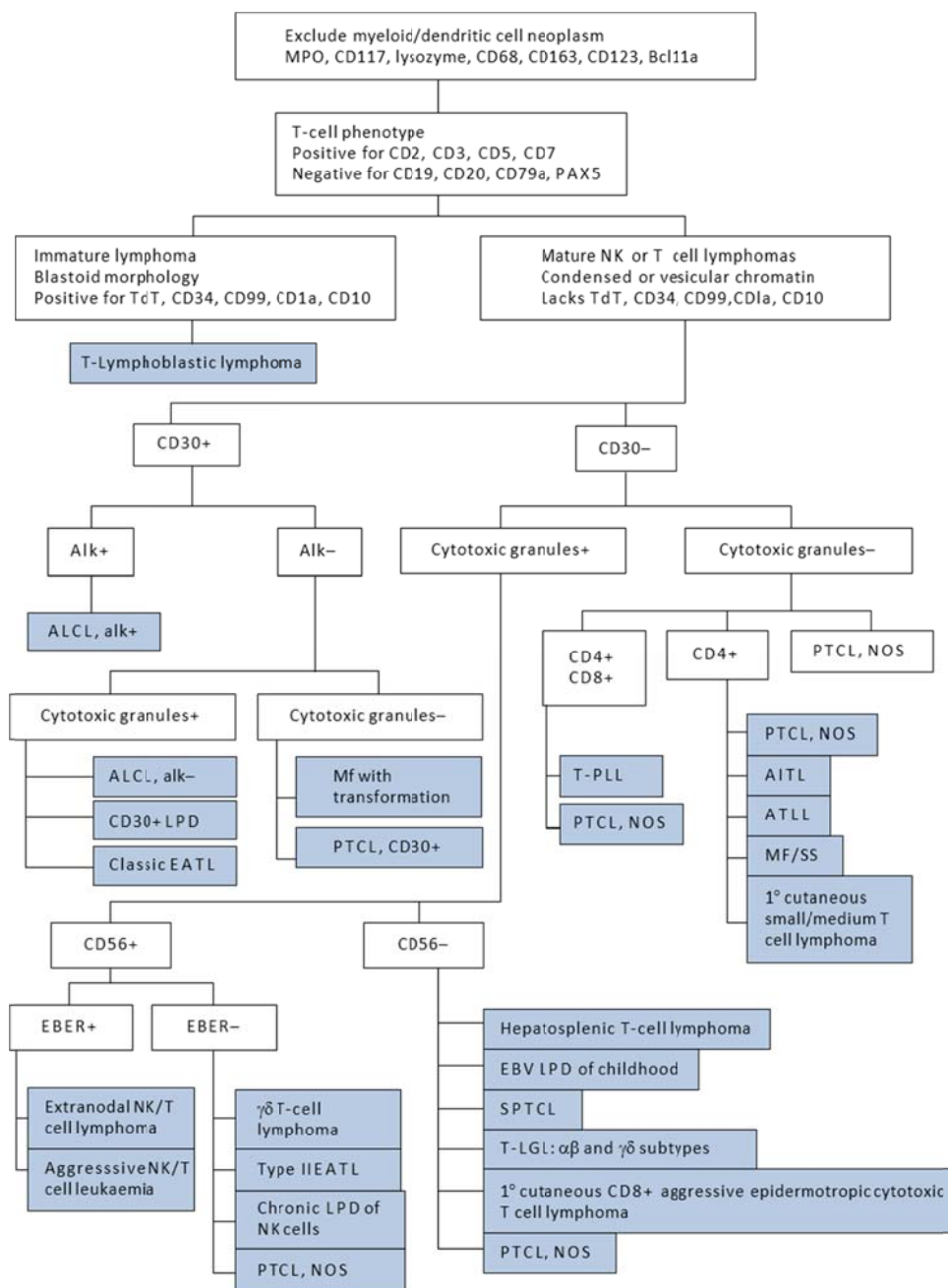
Na atualidade, é possível constatar a dificuldade do oncologista para promover o estadiamento do linfoma cutâneo canino, pois o sistema de classificação preconizado e recomendado pela OMS foi desenvolvido para a forma multicêntrica da doença. Dessa forma, com o intuito de favorecer e facilitar a avaliação da enfermidade nos pacientes, as pesquisas futuras devem dedicar especial atenção à investigação dos linfonodos sentinelas por meio dos exames citológico e histopatológico (biopsia incisional ou excisional), assim como da medula óssea pelo mielograma. A associação e a correta interpretação dos resultados obtidos a partir de tais exames podem facilitar na compreensão mais fidedigna da evolução da doença. É possível, então, diferenciar o linfoma cutâneo primário que, em estádios avançados podem invadir e comprometer a medula óssea, do linfoma multicêntrico que pode acometer a pele do paciente de forma secundária.

Em humanos, a classificação do linfoma cutâneo é definida pelas características clínicas, histopatológicas, imunofenotípicas e moleculares. A importância disso remete-se às informações preditivas e prognósticas obtidas, o que favorece um planejamento terapêutico personalizado, visando maior tempo livre de doença e sobrevida dos pacientes. Na literatura acadêmica veterinária, constata-se que os estudos no linfoma cutâneo em cães são preliminares e conflitantes. A falta de padronização do grupo experimental, bem como do número amostral geram resultados variados, o que dificulta o julgamento e a comparação desses dados. Outro agravante é o emprego de anticorpos humanos para a imunomarcagem das neoplasias caninas. Para gerar resultados corretos, há a necessidade da comprovação da imunorreatividade no tecido a ser testado.

Entretanto, não se pode negar a relevância da busca de marcadores moleculares que possam caracterizar o fenótipo das células neoplásicas do linfoma cutâneo canino. Com o aprofundamento das pesquisas, no futuro, talvez seja possível estabelecer uma classificação capaz de prever o prognóstico mais fidedigno dos linfomas cutâneos epiteliotrópicos e não epiteliotrópicos. Sobretudo, desenvolver fármacos capazes de alterar o curso da doença, controlar de forma mais efetiva esse câncer e aumentar a sobrevida com qualidade de vida. Por isso,

estudos nessa temática são imprescindíveis, pois ainda estamos muito incipientes no assunto.

ANEXO 1



Abordagem algorítmica para o diagnóstico de neoplasias de células NK e T Proposto por SOO et al 2011. ALCL, linfoma anaplásico de grandes células; AITL, linfoma de células T angioimunoblásticas; ATLL, leucemia / linfoma de células T adultas; EATL, linfomas de células T associadas com enteropatia; EBV, vírus de Epstein-Barr; PTCL, NOS, linfoma de células T periférico, não especificado de outro modo; LPD, distúrbio linfoproliferativo; MF, micosis fungoide; SPTCL, linfoma de células T semelhante a paniculite subcutânea; SS, síndrome de Se'zary; T-PLL, leucemia de células T polymphocytic.

APÊNDICE 1 – Resumo dos achados de morfologia encontrados nos 25 casos de linfoma cutâneo canino

<i>Identificação</i>	<i>Distribuição</i>	<i>Tropismo do Infiltrado neoplásico</i>	<i>Características Celulares</i>	<i>Anexos</i>	<i>Índice Mitótico</i>	<i>Outros</i>
1	Difusa	Derme	Grande (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	Úlcera, Necroses
2	Difusa	Derme, Hipoderme	Grande e Médio (Lin.GranularGran.)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	Necroses
3	Difusa	Epiderme, Derme e Hipoderme	Grande (Cerebriforme grande)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Acantoses
4	Difusa/Nodular	Derme profunda, Hipoderme	Grande (Blastos)	Normais	Alto	Necroses, Úlcera
5	Difusa	Epiderme, Derme superficial	Médio (Lin.GranularGran.)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Úlcera, Necroses, Pautrier
6	Nodular	Derme profunda, Hipoderme	Grande e Médio (Lin.GranularGran.)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	Necroses focal, Úlcera.
7	Difusa	Derme, Hipoderme focal.	Médio, Grande (Cerebriforme grande)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Necroses focal
8	Nodular	Derme, Hipoderme.	Pequena (Monocitoide)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Atrofia epiderme.
9	Difusa/Nodular	Derme, Hipoderme.	Grande (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	–
10	Difusa/Nodular	Derme, Hipoderme.	Grande (Cerebriforme grande)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	–
11	Difusa/Nodular	Derme, Hipoderme.	Médio ((Lin.GranularGran.)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	–
12	Difusa	Epiderme, Derme e Hipoderme	Grande (Cerebriforme grande)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Hemorragia der. Necroses foc.
13	Difusa/Nodular	Derme profunda e Hipoderme	Grande (Blastos)	Normais	Alto	Edema
14	Difuso	Derme, Hipoderme, Muscular.	Grande (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Hemorragia der. Úlcera. Necro
15	Difusa/Nodular	Derme, Hipoderme.	Médio (Lin.GranularGrad.) Grad. (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Necroses. Úlcera
16	Nodular	Hipoderme, Muscular.	Grande (Blastos)	Normais	Alto	Necroses. Hemorragia hipode.
17	Difusa	Epiderme. Derme.	Grande (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	Necroses Focal
18	Difusa	Derme, Hipoderme	Grande (Cerebriforme grande)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Necroses Focal
19	Difusa	Derme, Hipoderme	Grande (Cerebriforme grande)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Úlcera. Neovascular.
20	Difusa/Nodular	Epiderme, Derme e Hipoderme	Pequena (Monocitoide)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	Atrofia Epiderme.
21	Difusa/Nodular	Derme, Hipoderme	Grande (Cerebriforme grande)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Necroses, Atrofia Epiderme
22	Difusa	Derme, Hipoderme, Muscular	Médio, Grande (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Necroses focal.
23	Difusa	Epi., Derme, Hipod, Muscular	Médio, Grande (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Necroses focal.
24	Difusa	Derme, Hipoderme, Muscular.	Pequena (Monocitoide)	Infiltrado Peri-anexos	Médio	Úlcera. Atrofia epiderme.
25	Difusa	Derme, Hipoderme, Muscular.	Grande (Blastos)	Infiltrado Peri-anexos	Alto	Necrose, hemorragia (Hipod.)