

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS E CARDÍACOS DO
LINFOMA EM CÃES

Elisa Barp Neuwald

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS E CARDÍACOS DO
LINFOMA EM CÃES**

Autor: Elisa Barp Neuwald

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias
na área de Morfologia, Cirurgia e
Patologia Animal

Orientador: Félix Hilario Diaz
González

Porto Alegre

2013

Elisa Barp Neuwald

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS E CARDÍACOS DO
LINFOMA EM CÃES

Aprovada em 12 de março de 2013

Félix Hilario Diaz González

Orientador e Presidente da Comissão

Daniel Guimarães Gerardi (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Membro da Comissão

Rafael Almeida Figuera (Universidade Federal de Santa Maria)

Membro da Comissão

Simone Tostes de Oliveira Stedile (Universidade Federal do Paraná)

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivete e Rovaldo, pelo amor, confiança, apoio e dedicação incondicionais. Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhas, pelo companheirismo e amizade.

Agradeço à minha família de Porto Alegre, Sílvia, João Batista e Eliza, pelo amor e apoio em todas as horas.

Obrigada a todos os meus amigos e familiares, que mesmo próximos ou distantes estão sempre me apoiando nos momentos mais importantes.

Ao meu orientador, professor Félix Hilario Diaz González, pela oportunidade e confiança.

Agradeço a todos meus colegas do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, meus colegas de pós-graduação, funcionários, residentes e estagiários, pelo auxílio, carinho e dedicação durante estes quatro anos. Em especial, meus grandes amigos e companheiros de projeto Luciele Texeira, Francisco Conrado, Alejandra Barrera, Mariana Dreyer e Nicole Hlavac.

A toda a equipe do setor de Oncologia Veterinária do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, pela dedicação e auxílio no meu trabalho e também pelo carinho e atenção com os pacientes. Também agradeço aos residentes e todos os veterinários e estagiários que auxiliaram de alguma forma a realização deste projeto.

Ao pessoal do Centro de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas da UFRGS e do Laboratório VetPat, pelo auxílio na realização dos exames.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS pela oportunidade.

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS E CARDÍACOS DO LINFOMA EM CÃES

Autor: Elisa Barp Neuwald

Orientador: Félix Hilario Diaz González

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os aspectos clínicos e imuno-histoquímicos, bem como a ocorrência de síndromes paraneoplásicas e alterações laboratoriais, e correlacionar com os tempos de sobrevida e de remissão, em cães com linfoma. Além disso, visou monitorar a função cardíaca dos pacientes que receberam quimioterapia com protocolo que incluía doxorrubicina. Trinta cães com linfoma foram atendidos no período de maio de 2010 a maio de 2012 no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram avaliados através de exame clínico, hemograma e análises bioquímicas, concentração sérica de troponina cardíaca I, eletrocardiograma e ecocardiograma, no momento do diagnóstico e mensalmente por mais quatro meses até o término do protocolo quimioterápico CHOP (prednisona, vincristina, ciclofosfamida e doxorrubicina). Posteriormente, os cães foram avaliados a cada dois meses até completar um ano após o diagnóstico. A maior parte dos cães diagnosticados neste estudo eram machos (60%), com média de 9 anos de idade e sem raça definida (23%). A forma multicêntrica foi a mais comumente observada (87%), principalmente associada ao imunofenótipo B (62%) e os cães apresentaram-se comumente nos estádios clínicos IV e V (64%) e subestádio “b” (83%). Alterações laboratoriais e síndromes paraneoplásicas foram frequentemente observadas no momento do diagnóstico, e incluíam anemia (57%), hipoalbuminemia (53%), leucocitose (40%), trombocitopenia (33%), hiperglobulinemia (20%), hiperproteinemia (17%) e hipercalcemia (13%). Os cães que apresentaram alterações na contagem de plaquetas, basicamente trombocitopenia, e alterações na concentração sérica da fração β_2 das globulinas, bem como aqueles nos estádios clínicos IV-V e em condição corporal 1-2 no momento do diagnóstico, tiveram menor tempo de sobrevida. Os cães com hipercalcemia, trombocitopenia e elevação no volume corpuscular médio mostraram um menor tempo de remissão com maior chance de recidiva. Dos 30 cães com linfoma, 23 receberam o protocolo quimioterápico contendo doxorrubicina; não foram observadas alterações significativas nos exames cardiológicos realizados durante e após a quimioterapia. Este estudo demonstrou que os aspectos clínicos de cães com linfoma em Porto Alegre são similares aos observados em outras regiões do mundo, e alguns exames simples e de rotina se mostraram úteis para avaliar os tempos de sobrevida e remissão no momento do diagnóstico. Além disso, a doxorrubicina se mostrou uma droga segura para utilizar em cães com linfoma, desde que sejam adequadamente monitorados.

Palavras-chave: síndromes paraneoplásicas, sobrevida, recidiva, doxorrubicina, cardiotoxicidade.

EPIDEMIOLOGICAL, LABORATORIAL AND CARDIAC FEATURES OF LYMPHOMA IN DOGS

Author: Elisa Barp Neuwald

Advisor: Félix Hilario Diaz González

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the clinical and immunohistochemical features of dogs with lymphoma, as well as the occurrence of paraneoplastic syndromes and laboratory abnormalities, and their correlation with survival and remission times in those patients. Furthermore, we monitored the cardiac function of the patients receiving doxorubicin. Thirty animals with lymphoma were treated between May 2010 and May 2012 in the Veterinary Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul and were evaluated by clinical examination, complete blood count and biochemical analysis, serum cardiac troponin I measurement, electrocardiogram and echocardiogram at diagnosis, and monthly for four months until the end of the chemotherapy protocol, which contained prednisone, vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin. The animals were evaluated every two months until one year after diagnosis. Most animals diagnosed in this study were males (60%) with a mean age of 9 years and mixed-breed (23%). The multicentric form was the most commonly observed with predominance of the B cell phenotype (62%) and the animals were frequently in clinical stages IV and V (64%) and sub-stage "b" (83%). Paraneoplastic syndromes and laboratory abnormalities were frequently observed at diagnosis, corresponding to anemia (57%), hypoalbuminemia (53%), leukocytosis (40%), thrombocytopenia (33%), hyperglobulinemia (20%) and hypercalcaemia (13%). The animals that showed alterations in platelet count, especially thrombocytopenia, and β_2 serum globulin fraction as well as the ones in clinical stages IV-V and with body condition scores between 1-2 at diagnosis had lower survival times. The animals with hypercalcaemia, thrombocytopenia and elevated mean corpuscular volume showed a shorter remission time with a higher incidence of relapse. Twenty three dogs received doxorubicin in the chemotherapy protocol, and there were no significant changes in the cardiac evaluations performed during and after chemotherapy. This study demonstrated that the clinical aspects of dogs with lymphoma in Porto Alegre are similar to those observed in other studies worldwide, and some simple and routine tests proved useful in the prediction of survival and remission rates at the time of diagnosis. In addition, doxorubicin proved to be a safe drug when administered in dogs with lymphoma if properly monitored.

Keywords: *paraneoplastic syndromes, survival, recurrence, doxorubicin, cardiotoxicity.*

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

	Pág
Figure 1. PCV values in dogs that achieved complete remission and relapsed (black line) compared with those animals that were in remission and that did not relapse (dashed line).....	67

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Pág
Tabela 1. Classificação histológica do linfoma não-Hodgkin pelos critérios da Working Formulation e pelo sistema Kiel modificado (Moreno & Bracarense, 2007).....	20
Tabela 2. Sistema de estadiamento clínico da Organização Mundial de Saúde para o linfoma em animais domésticos.....	32
Tabela 3. Protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento de cães com linfoma.....	39

ARTIGO 1

	Pág
Table 1. Population characteristic of dogs with lymphoma diagnosed in Porto Alegre, RS – Brazil.....	47
Table 2. Occurrence of laboratory abnormalities and paraneoplastic syndromes in 30 dogs with lymphoma.....	47

ARTIGO 2

	Pág
Table 1. Chemotherapy protocol, re-evaluations and exams performed in 26 animals with lymphoma and without heart disease at the time of diagnosis.....	59
Table 2. COP chemotherapy protocol performed in those animals that had heart disease.....	60
Table 3. Outcome in 30 dogs with lymphoma that received chemotherapy.....	63
Table 4. Variables that influenced survival in dogs with lymphoma.....	63
Table 5. Effect of the categorical variables measured in dogs with lymphoma on survival.....	64
Table 6. Variables associated with reduced remission times and relapses in dogs	

with lymphoma.....	65
Table 7. Effect of the categorical variables measured in dogs with lymphoma on relapse.....	66
Table 8. Median LDH activities and mean PCV values in dogs with lymphoma that achieved complete remission (18 animals) and that relapsed compared with readings from those animals that were in remission and that did not relapse.....	66

ARTIGO 3

	Pág
Table 1. Chemotherapy protocol, re-evaluations and exams performed in 26 animals with lymphoma and without cardiac disease at the time of diagnosis....	79
Table 2. Mean and standard deviation of heart rate values of dogs with lymphoma treated with a protocol containing doxorubicin chemotherapy according to the number of doses received during treatment.....	82
Table 3. Mean and standard deviation values of left ventricle diastolic (LVDd) and systolic (LVSd) diameters during doxorubicin therapy in dogs with lymphoma according to the number of doses received. Values are expressed in centimeters.....	83
Table 4. Mean and standard deviation values of fractional shorting (FS) and ejection fractions (EF) in dogs with lymphoma receiving doxorubicin chemotherapy, according to the number of doses received. Values are expressed in centimeters.....	83
Table 5. Comparison of clinical data and the first evaluation of cTnI of treatment and control groups. Variables with symmetric distribution are shown as the mean and standard deviation, variables with asymmetric distribution are shown as the median and minimum and maximum.....	85
Table 6. Mean and standard deviation values of cardiac troponin I (cTnI) serum concentrations in dogs with lymphoma receiving doxorubicin chemotherapy according to the number of doses. Values are expressed in ng/mL.....	85

SUMÁRIO

	Pág
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos gerais	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Linfoma Canino	13
3.1.1 Etiologia.....	14
3.1.2 Patologia.....	15
3.1.3 Manifestações Clínicas.....	20
3.1.4 Síndromes Paraneoplásicas.....	23
3.1.5 Diagnóstico.....	27
3.1.6 Estadiamento Clínico.....	32
3.1.7 Tratamento.....	32
3.1.8 Prognóstico.....	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Artigo 1	42
4.2 Artigo 2	56
4.3 Artigo 3	76
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
6 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1 INTRODUÇÃO

Com a evolução da medicina veterinária a oncologia é uma especialidade que tem se desenvolvido bastante (Hahn & Richardson, 1995). Embora dados sobre a incidência de tumores sejam escassos, estimativas conservadoras sugerem que um em cada 10 cães desenvolverá algum tumor durante a sua vida (Morris & Dobson, 2007). Nos Estados Unidos, um estudo com 2000 cães revelou que as neoplasias foram a causa mais comum de morte, perfazendo um total de 23% dos animais (Bronson, 1982). Estes dados são semelhantes aos encontrados no Reino Unido, onde 16% dos cães morreram de câncer (Michell, 1999). No Brasil, em estudo realizado no Rio Grande do Sul, as neoplasias foram a segunda principal causa de morte em cães, com uma prevalência de 7,8 % (ficando atrás apenas de causas infecciosas e parasitárias) e considerando-se apenas os animais idosos, esta prevalência aumentou para 32% (Figuera et al., 2008).

O linfoma (ou linfossarcoma) é uma das neoplasias mais comuns em cães, representando 83% das neoplasias hematopoiéticas nesta espécie (Vail & Young, 2007). Estimativas da incidência do linfoma em cães variam de 24 (Dorn et al., 1967) a 33 (Teske, 1994) casos em cada 100 mil cães. Além disso, a frequência de diagnóstico de linfoma está aumentando na medicina veterinária e na medicina humana, provavelmente pela melhoria nos métodos de diagnóstico e tratamento, pelo envelhecimento da população canina e pela exposição a fatores de risco (Fisher & Fisher, 2004; Jemal et al., 2004; Vail & Young, 2007; Marconato et al., 2011).

O linfoma em cães é considerado um neoplasma agressivo, que acomete principalmente os órgãos linfoides, como linfonodos e baço. Outras localizações anatômicas comuns incluem o fígado, o trato intestinal e a pele, mas, pode ocorrer em virtualmente em qualquer local do organismo (Moreno & Bracarense, 2007; Vail & Young, 2007). Além da sua malignidade primária, o linfoma está associado a uma série de síndromes paraneoplásicas, as quais estão relacionadas às ações não invasivas do tumor, sendo, muitas vezes, o primeiro sinal de malignidade (Morris & Dobson, 2007; Ramos et al., 2008). Dentre essas síndromes paraneoplásicas destacam-se caquexia/anorexia, hipercalcemia, hipoglicemia, hiperglobulinemia, anemia, alterações em leucócitos e plaquetas (Bergman, 2007). Anemia, por exemplo, está associada a uma menor taxa de sobrevivência em cães com linfoma (Abbo & Lucroy, 2007; Miller et al., 2009), o que também já foi relatado nos casos de hipercalcemia (Greenlee et al., 1990; Keller et al., 1993; Marconato et al., 2011). Além da ocorrência de síndromes

paraneoplásicas, outros fatores prognósticos negativos foram descritos para cães com linfoma, e incluem o imunofenótipo T, o estadiamento clínico avançado, a presença de sinais clínicos e o sexo masculino (MacEwen et al., 1987; Price et al., 1991; Keller et al., 1993; Jagielski et al., 2002; Marconato et al., 2011).

O linfoma canino é considerado uma doença sistêmica e, assim, requer uma terapia sistêmica para alcançar a remissão e prolongar a sobrevivência. A quimioterapia é a terapia de escolha para o linfoma em cães (Cardoso et al., 2003; Vail & Young, 2007). Inúmeros protocolos quimioterápicos já foram testados em cães com linfoma, no entanto, os melhores resultados são obtidos quando a doxorubicina é utilizada (Baskin et al., 2000; Hosoya et al., 2007; Marconato et al., 2011). Porém, o uso de doxorubicina em cães com linfoma é limitado em função dos efeitos cardiotoxicos, que podem levar a cardiomiopatia irreversível (Dal Farra et al., 1995).

A cardiotoxicidade decorrente do uso da doxorubicina em cães é dose-dependente, e sua ocorrência já foi relatada a partir de doses cumulativas de 90 mg/m² (Susaneck, 1983; Mauldin et al., 1992). Por isso, a avaliação cardíaca é fundamental no monitoramento dos cães recebendo doxorubicina. Os achados eletrocardiográficos durante a quimioterapia com doxorubicina já foram bastante estudados, e as arritmias supra-ventriculares e ventriculares as alterações mais comumente observadas (Price et al., 1991; Mauldin et al., 1992; Ratterree et al., 2012). No entanto poucos estudos avaliaram as alterações ecocardiográficas em cães com linfoma recebendo doxorubicina (Ratterree et al., 2012; Tater et al., 2012). Além destes exames de rotina, os marcadores cardíacos se tornaram uma ferramenta interessante no monitoramento de animais submetidos à quimioterapia com doxorubicina (Sisson et al., 1998; Rodaski & De Nardi, 2004; Couto, 2006). Marcadores cardíacos são utilizados rotineiramente para avaliar a toxicidade da quimioterapia com doxorubicina em medicina humana (Lipshultz et al., 1997; Cardinale et al., 2000). Em medicina veterinária, aumentos nas concentrações séricas de troponinas cardíacas T e I foram detectados em cães com diferentes neoplasias tratados com doxorubicina (Neuwald, 2009). Ao avaliar cães com linfoma, aumento nas concentrações séricas de troponinas T e I foram detectados em animais recebendo quimioterapia com doxorubicina (DeFrancesco et al., 2002; Selting et al., 2004). Assim, devido ao possível desenvolvimento de cardiomiopatia em cães recebendo doxorubicina, a detecção precoce de alterações cardíacas é fundamental para minimizar a cardiotoxicidade e otimizar o uso da quimioterapia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Determinar os aspectos clínicos e achados dos exames laboratoriais em cães com linfoma diagnosticados na região de Porto Alegre, correlacionando com o prognóstico.

Avaliar a ocorrência de alterações cardíacas ao longo da quimioterapia com doxorrubicina em cães com linfoma.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os aspectos epidemiológicos e clínicos, incluindo raça, sexo, idade, a localização anatômica, o padrão imunofenotípico, a condição corporal e o estadiamento clínico, em cães com linfoma atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul na cidade de Porto Alegre, e correlacioná-los com os tempos de remissão e sobrevida.

Avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas, bem como a ocorrência de síndromes paraneoplásicas em cães com linfoma e sua relação com o prognóstico.

Avaliar a ocorrência de cardiomiopatia em cães com linfoma recebendo um protocolo quimioterápico contendo doxorrubicina.

Determinar as alterações eletrocardiográficas, ecocardiográficas e na concentração sérica de troponina cardíaca I em cães com linfoma que realizaram um protocolo quimioterápico contendo doxorrubicina.

Verificar se aumentos na concentração sérica de troponina cardíaca I detectam precocemente alterações cardíacas causadas pela doxorrubicina em cães.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Linfoma Canino

Os tumores hematopoiéticos são o terceiro tipo mais comum de neoplasias diagnosticadas em cães, representando 8 a 9% de todos os tumores malignos caninos (Cardoso et al., 2003; Morris & Dobson, 2007). As neoplasias hematopoiéticas derivam de precursores linfóides ou não linfóides (mielóides) e são divididas em dois grupos: distúrbios linfoproliferativos e mieloproliferativos. O termo doença linfoproliferativa é utilizado para tumores de órgãos linfóides sólidos, como o linfoma, e também para tumores linfóides derivados da medula óssea, como leucemias linfóides e mieloma múltiplo. Já a doença mieloproliferativa corresponde a um espectro de condições derivadas de células-tronco hematopoiéticas localizadas na medula óssea, incluindo leucemias não linfóides e doenças displásicas, como mielofibrose e síndromes mielodisplásicas (Morris & Dobson, 2007).

O linfoma, também chamado de linfossarcoma, compreende um grupo diverso de neoplasias que têm em comum sua origem nas células linfóides (Vail & Young, 2007). Este tipo tumoral inicia-se em tecidos linfóides, como linfonodos, baço; no entanto, pode se localizar em basicamente todos os tecidos corporais (Ocarino et al., 2005; Vail & Young, 2007; De Nardo et al., 2008). O linfoma é um dos neoplasmas mais comuns de cães; sua incidência anual foi estimada em 24 a 33 casos para cada 100 mil cães (Dorn et al., 1967; Teske, 1994). As taxas de incidência relacionadas com idade são de 1,5 a cada 100 mil cães com até um ano de idade até 84 casos a cada 100 mil cães com mais de 10 anos de idade (Dorn et al., 1967; Pastor et al., 2009). Esta neoplasia representa de 83 a 90% das neoplasias hematopoiéticas malignas (Sequeira et al., 1999; Figuera et al., 2002; Cardoso et al., 2003; Vail & Young, 2007).

O linfoma afeta principalmente cães de meia-idade a idosos, em geral animais de 6 a 9 anos (MacEwen et al., 1987; Sequeira et al., 1999; Cardoso et al., 2003; Vail & Young, 2007). Um risco reduzido foi relatado para fêmeas, mas a maioria dos trabalhos relata que o gênero não é um fator de risco importante (MacEwen et al., 1987; Greenlee et al. 1990, Kiupel et al.1999, Dobson et al.2001, Jagielski et al.2002). As raças caninas mais acometidas incluem Boxer, Bull Mastiff, Basset Hound, São Bernardo, Scottish Terrier, Airedale e Bulldog; e raças com risco reduzido incluem Dachshund e Spitz (Vail & Young, 2007). Um estudo na França demonstrou que o Cocker Spaniel e o

Setter também são raças predispostas (Pastor et al., 2009). As raças Golden Retriever, Pastor Alemão e Poodle também foram as mais predispostas em alguns estudos (MacEwen et al., 1981; MacEwen et al., 1987; Valerius et al., 1997). Dois estudos realizados no Brasil revelaram o aparecimento de linfoma essencialmente em animais de médio e grande porte, sobretudo de cães da raça Pastor Alemão e sem raça definida (Sequeira et al., 1999; Cardoso et al., 2003).

3.1.1 Etiologia

Em medicina humana, a causa da maioria dos casos de linfoma é desconhecida, embora diversas doenças genéticas, fatores ambientais e agentes infecciosos foram associados com o linfoma (DeVitta et al., 2001; Fisher & Fisher, 2004). A etiologia do linfoma canino também é desconhecida e considerada multifatorial (Couto, 2006; Vail & Young, 2007).

Algumas predisposições genéticas já foram relatadas em cães com linfoma nas raças Bulmastiff, Scottish Terrier, alguns Hounds e no Rottweiler (Vail & Young, 2007). Além disso, aberrações cromossômicas já foram detectadas em caninos e em humanos com esta neoplasia (Hahn et al., 1994). A hipótese de que um retrovírus pode estar envolvido na patogênese do linfoma ainda não foi confirmada em cães, no entanto, em gatos o surgimento do tumor foi associado à presença de infecção pelos vírus da leucemia e da imunodeficiência felinas (Strandstrom et al., 1979). Muito se especulou a respeito de linfomas em cães serem induzidos por retrovírus a partir do descobrimento do FeLV como causa de linfoma em gatos, mas apesar do presença de partículas virais e corpúsculos de inclusão em linfócitos neoplásicos de cães, nunca pode-se estabelecer uma relação causa-efeito (Figuera & Graça, 2010). Na medicina humana outros vírus foram implicados na etiologia do linfoma, como o vírus Epstein-Barr, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e o herpesvírus humano tipo 8 (DeVitta et al., 2001; Fisher & Fisher, 2004). Na verdade, estes agentes infecciosos estão relacionados à presença de imunodeficiência, a qual já foi apontada como fator predisponente para o desenvolvimento do linfoma humano e canino (DeVitta et al., 2001; Vail & Young, 2007). Alterações no sistema imunológico de cães, independente da idade ou gênero, já foram associadas com um maior risco de desenvolvimento de linfoma quando comparados com a população em geral (Foster et al., 2000). Em humanos, a terapia

imunossupressiva, como nos pacientes transplantados, aumenta o risco da ocorrência desta neoplasia (DeVitta et al., 2001). Na medicina veterinária, o uso de ciclosporina foi associado ao aparecimento do linfoma em um cão (Blackwood et al., 2004). Além disso, fatores ambientais, como o uso de herbicidas, produtos químicos e residir em áreas industriais, já foram associados ao desenvolvimento de linfoma em cães e humanos (DeVitta et al., 2001; Gavazza et al., 2001; Vail & Young, 2007).

3.1.2 Patologia

O linfoma em cães pode ser classificado por localização anatômica, tipo celular e aparência histológica, e pelo imunofenótipo (Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007).

3.1.2.1 Classificação Anatômica

As formas anatômicas mais comuns do linfoma canino, em ordem decrescente de prevalência, são a multicêntrica, mediastinal, alimentar e misto (ou extra-nodal). As formas primárias extra-nodais, que podem ocorrer em qualquer local fora do sistema linfático, incluem olhos, pele, sistema nervoso central, ossos, testículos, bexiga, coração e cavidade nasal (Ocarino et al., 2005; Vail & Young, 2007).

A forma multicêntrica é a mais comum em cães, representando mais de 80% de todos os linfomas nesta espécie (Sequeira et al., 1999; Couto, 2006; Vail & Young, 2007; Gavazza et al., 2008). O linfoma multicêntrico acomete os linfonodos superficiais e profundos, o baço, o fígado e a medula óssea, caracterizando-se por linfadenopatia bilateral dos linfonodos superficiais (Fighera et al., 2002). O aumento dos linfonodos é indolor e discreto. Aproximadamente 20 a 40% apresentam uma história de perda de peso, letargia, anorexia e febre (Gavazza et al., 2008). Nesta forma podem ocorrer hepatomegalia e esplenomegalia, em consequência da infiltração neoplásica, sendo que o linfoma corresponde a 63% dos tumores secundários do fígado (Fighera et al., 2002). Uma infiltração pulmonar difusa também pode ser observada em 27 a 34% dos cães afetados (Fighera et al., 2002; Vail & Young, 2007).

A forma alimentar ou gastrointestinal é muito menos comum, ocorrendo em 5 a 7% de todos os pacientes com linfoma. Esta forma é mais frequentemente diagnosticada em cães machos do que em fêmeas, similar às observações em seres humanos (Vail & Young, 2007; De Nardo et al., 2008). O linfoma alimentar caracteriza-se pela presença

da neoplasia no trato gastrointestinal e/ou nos linfonodos mesentéricos (Fighera et al., 2002). O linfoma acomete o intestino ao nível do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), constituindo-se na segunda neoplasia do intestino mais comum em cães, atrás apenas do adenocarcinoma (Fighera et al., 2002). Os cães com doença infiltrativa do intestino apresentam perda de peso, anorexia e evidências de má absorção intestinal (Vail & Young, 2007; De Nardo et al., 2008). Morfologicamente, o linfoma ocorre tanto na forma nodular como na difusa. Na forma difusa, há infiltração extensa da lâmina própria e submucosa, causando síndrome da má-absorção. Já na forma nodular, ocorre um espessamento segmentar do intestino, mais frequentemente na região ileocecocólica que poderá causar estreitamento luminal e obstrução intestinal parcial (Fighera et al., 2002).

A forma mediastinal do linfoma ocorre em aproximadamente 5% dos casos (Sequeira et al., 1999; Vail & Young, 2007). Esta forma é caracterizada por aumento dos linfonodos mediastinais e/ou do timo, que causam o surgimento súbito de dispnéia, tosse, regurgitação e anorexia (Fighera et al., 2002; Vail & Young, 2007). Muitas vezes, na forma mediastinal, ocorre a chamada síndrome da veia cava, que se caracteriza por edema e tumefação simétrica da cabeça, pescoço e membros torácicos (Fighera et al., 2002; Couto, 2006).

O linfoma misto corresponde à neoplasia extra-nodal que pode afetar qualquer tecido corpóreo, com várias manifestações clínicas (Fighera et al., 2002). O linfoma cutâneo é uma das formas mais comuns de linfoma extra-nodal nos cães (Couto, 2006). Os sinais clínicos e as características das lesões são extremamente variáveis e podem mimetizar qualquer lesão cutânea primária ou secundária (Couto, 2006). O linfoma cutâneo pode ser solitário ou generalizado e é classificado em epiteliotrópico (micose fungóide) e não epiteliotrópico. A micose fungóide é a forma mais comum de linfoma cutâneo no cão e se origina das células T (Vail & Young, 2007). A micose fungóide ocorre em cães de quatro maneiras distintas: a primeira delas é caracterizada por erupção eritematosa, pruriginosa, descamativa e inespecífica (forma pré-micótica), indistinguível de uma dermatose inflamatória ou alérgica; e pode evoluir para uma segunda forma, cuja característica é a formação de placas ou nódulos solitários ou múltiplos; uma terceira forma, descrita para as junções mucocutâneas, manifesta-se sob a forma de ulcerações associadas à despigmentação, e é confundível com dermatoses auto-imunes; a quarta forma consiste em ulceração oral. Independentemente da forma, a micose fungóide caracteriza-se microscopicamente por uma proliferação linfóide na

porção superior da derme, comprimindo a epiderme ou infiltrando-a, em um padrão semelhante à exocitose linfocitária ou formando agregados conhecidos como microabscessos de Darier-Pautrier. As placas e os nódulos são constituídos principalmente por linfócitos, embora plasmócitos, histiócitos, eosinófilos e neutrófilos possam ser visualizados na lesão. Os linfócitos são grandes, com 15 a 20 micrômetros de diâmetro, possuem citoplasma abundante e núcleo em forma de bastão, contorcido (células de micose) ou cerebriforme (células de Sézary ou células de Lutzner) (Fighera et al. 2003).

Uma forma rara de linfoma cutâneo de células T é caracterizada por envolvimento generalizado da pele com evidências de células T malignas circulando no sangue periférico. Em humanos esta afecção é chamada de síndrome de Sézary, a qual já foi relatada em cães e gatos (Fighera et al., 2002; Fighera et al. 2003; Vail & Young, 2007). Outra forma rara de linfoma cutâneo e descrita poucas vezes no cão é a reticulose pagetoide (doença de Woringer-Kolopp) (Fighera et al. 2003).

Existem vários relatos de linfoma cerebral e medular que, algumas vezes, podem ser primários (Fighera et al., 2002). Além disso, a recidiva do linfoma no sistema nervoso central é uma forma de apresentação relativamente comum em cães que foram tratados com quimioterapia para linfoma multicêntrico por meses a anos; esses pacientes desenvolvem um início agudo de sinais neurológicos, tipicamente enquanto a neoplasia multicêntrica ainda está em fase de remissão (Couto, 2006). O linfoma pode ocorrer também em nervos periféricos e estender-se ao longo dos nervos espinhais e raízes nervosas até o canal medular, resultando em sinais clínicos de doença espinhal (Fighera et al., 2002).

O linfoma hepatoesplênico é uma distinta e incomum forma de apresentação no cão caracterizada pela ausência de linfadenomegalia periférica na presença de infiltração de linfócitos malignos no fígado, baço e medula óssea (Vail & Young, 2007). Esta forma de linfoma é extremamente agressiva e pobremente responsiva a terapia (Fry et al., 2003; Vail & Young, 2007).

O linfoma renal em cães ocorre com uma prevalência bem menor do que em gatos, levando a hematúria de origem renal, renomegalia e insuficiência renal quando bilateral (Fighera et al., 2002). Na cavidade nasal o linfoma é uma afecção neoplásica comum, induzindo sinais clínicos como dispnéia, epistaxe e corrimento nasal (Fighera et al., 2002). O linfoma intravascular é outra forma distinta de linfoma definida pela proliferação de linfócitos neoplásicos dentro do lúmen e parede dos vasos sanguíneos na

ausência de uma massa extravascular primária ou leucemia. Já foi descrita muitas vezes em veterinária e, na maioria dos casos, envolve o sistema nervoso central e periférico, incluindo os olhos (Vail & Young, 2007).

3.1.2.2 Classificação Imunofenotípica

O linfoma também pode ser classificado pelo imunofenótipo. Para cães, 60 a 80% dos linfomas são de células B, enquanto os linfomas de células T correspondem de 10 a 38%. Linfomas mistos, aqueles que ocorrem por uma dupla proliferação celular (células T e B) correspondem a até 22% dos casos, já tumores de células nulas (não imunorreativos a células B e nem T) representam menos do que 5% dos casos (Greenlee et al., 1990, Arespachaga et al., 2007; Vezzali et al., 2009; Ponce et al., 2010).

Não há correlação entre imunofenótipo e tipo morfológico celular, embora linfoma de células T sejam com frequência de grau citomorfológico baixo ou intermediário (Morris & Dobson, 2007). Porém, os cães com linfoma de células T mostram uma menor taxa de resposta completa à quimioterapia e menores períodos de remissão e tempo de sobrevivência que os cães com tumores de células B (Greenlee et al., 1990; Starrak et al., 1997; Kiupel et al., 1999; Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2004; Marconato et al., 2011). Além disso, os linfomas de células T tendem a estar associados à hipercalemia (Greenlee et al., 1990). Também, a maior parte dos linfomas cutâneos apresentam imunofenótipo de células T (Vail & Young, 2007).

Muitos linfomas de alto grau de malignidade são do tipo B, no entanto, existe uma diferença na prevalência de vários imunofenótipos do linfoma baseado nas diferentes raças (Vail & Young, 2007). Por exemplo, cães Cocker Spaniel, Boxer e Doberman tendem a desenvolver linfomas de células T, enquanto Golden Retriever aparentemente têm uma distribuição equivalente entre os tumores de células B e T (Greenlee et al., 1990; Vail & Young, 2007; Ponce et al., 2010). As melhores respostas à quimioterapia ocorrem em animais com linfomas de células B e de intermediário a alto grau de malignidade (Vail & Young, 2007). Assim, determinar o imunofenótipo do tumor promove informações importantes em relação ao prognóstico e à resposta a quimioterapia (Vail & Young, 2007).

8.1.2.3 Classificação Histopatológica

Diferentes classificações histológicas para o linfoma humano têm sido adaptadas para o linfoma canino, na tentativa de associar o tipo celular ao prognóstico. A maioria

deles baseia-se naquele usado para o linfoma não-Hodgkin humano. Dois sistemas de classificação do linfoma humano, a *Working Formulation of Non-Hodgkin's Lymphomas for Clinical Usage* (exposição sistemática dos linfomas não-Hodgkin para uso clínico), do *National Cancer Institute* e o sistema Kiel foram os mais facilmente adaptados e considerados os mais completos quando comparados a outros sistemas de classificação (Tabela 1) (Moreno & Bracarense, 2007; Morris & Dobson, 2007). A Organização Mundial de Saúde também publicou um esquema de classificação histológica, que usa o sistema europeu e americano do linfoma como base para definir a categoria histológica dos tumores hematopoiéticos em animais domésticos (Vail & Young, 2007).

A Working Formulation classifica o tumor em difuso ou folicular, com base no padrão tecidual, e em pequeno, clivado, grande e imunoblástico, de acordo com o tipo celular. Já o sistema Kiel modificado avalia a morfologia celular (centroblástico, centrocítico e imunoblástico) e a imunofenotipagem (células B ou T). Ambos os sistemas classificam se a neoplasia é de baixa, intermediária ou alta malignidade, conforme a Tabela 1 (Moreno & Bracarense, 2007; Vail & Young, 2007). Linfomas de baixo grau de malignidade, caracterizados pela presença de células pequenas com uma baixa taxa de mitose, tipicamente apresentam uma progressão lenta e estão associados com longas taxas de sobrevida, porém são incuráveis. Os linfomas de alto grau de malignidade, com alta taxa mitótica, evoluem rapidamente, mas são mais responsivos à quimioterapia e, em humanos, são potencialmente curáveis (Vail & Young, 2007). O comportamento do linfoma canino é difícil de prever com base na histomorfologia apenas, no entanto, a maioria dos linfomas caninos é de grau intermediário ou alto de malignidade pela maior parte das classificações, sendo a maioria com origem nas células B (Greenlee et al., 1990; Kiupel et al., 1999; Arespacochaga et al., 2007). Apenas uma pequena porcentagem de linfomas caninos (5,3 a 29%) é considerada de baixa malignidade, sendo que destes, a maioria tem origem nas células T (Fournel-Fleury et al., 1997). A forma difusa e imunoblástica aparentemente predominam nos Estados Unidos, enquanto as variações com células grandes e foliculares predominam na Europa (Vail & Young, 2007).

Tabela 1. Classificação histológica do linfoma não-Hodgkin pelos critérios da Working Formulation e pelo sistema Kiel modificado (Moreno & Bracarense, 2007)

Grau de malignidade	Working Formulation	Sistema Kiel
Baixo grau	Linfocítico, pequenas células folicular, com predomínio de células clivadas e pequenas	Linfocítico, linfoplasmocítico Centrocítico (folicular)
	Folicular, misto de células pequenas e grandes clivadas	Centrocítico/centroblástico (folicular)
Grau intermediário	Folicular com predomínio de grandes células	Centrocítico/centroblástico
	Difuso, células pequenas clivadas	Centrocítico (difuso)
	Difuso, misto de pequenas e grandes células	Centrocítico/centroblástico
	Difuso, grandes células	Centroblástico
Alto grau	Imunoblástico	Imunoblástico
	Linfoblástico	Linfoblástico B
	Células não clivadas pequenas	Linfoblástico T

Os sistemas de classificação auxiliam na determinação do prognóstico dos linfomas em relação à resposta a terapia, manutenção da remissão e taxa de sobrevivência (Moreno & Bracarense, 2007). A classificação da *Working Formulation* tem maior correlação na determinação do tempo de sobrevida do animal (Kiupel et al., 1999). O padrão de arquitetura folicular em cães não está correlacionado com prognóstico, sendo encontrado na minoria dos casos (Greenlee et al., 1990; Moreno & Bracarense, 2007). Em seres humanos, ao contrário, aproximadamente 30% dos linfomas não-Hodgkins são foliculares determinando um prognóstico favorável (Moreno & Bracarense, 2007). O sistema Kiel modificado auxilia na determinação do tempo de reincidência nos animais tratados, acreditando-se que também tenha utilização na estimativa do tempo de sobrevida (Kiupel et al., 1999).

3.1.3 Manifestações Clínicas

A apresentação clínica do linfoma varia de acordo com a extensão e a localização do tumor, sendo a forma multicêntrica a mais comum no cão (80%) (Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007). Nesta forma, os cães apresentam linfadenopatia solitária ou generalizada, a qual pode ser acompanhada por hepatoesplenomegalia, envolvimento de medula óssea ou outros órgãos. Os linfonodos ficam massivamente aumentados e duros, mas usualmente são indolores à palpação (Figuera et al., 2002; Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007). Se o aumento dos linfonodos provocar

obstrução mecânica da drenagem linfática pode ocorrer edemas; se ocorrer compressão das vias aéreas, a tosse é a principal queixa no momento do diagnóstico (Couto, 2006). A maioria dos animais com linfoma multicêntrico não apresenta sinais graves de doença sistêmica, no entanto, vários sinais clínicos inespecíficos podem ser observados como anorexia, perda de peso, vômitos, diarreia, prostração, ascite, dispneia, polidipsia, poliúria e febre (Fighera et al., 2002; Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007; Gavazza et al., 2008). Cães com linfoma de células T são mais propensos a apresentar sinais clínicos sistêmicos (Vail & Young, 2007). Aproximadamente 20% dos casos caninos mostram sinais de hipercalcemia como polidipsia, poliúria, anorexia, vômitos, constipação, fraqueza muscular ou arritmias cardíacas (Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007). Os cães também podem apresentar uma história de sinais clínicos associados à discrasias sanguíneas secundárias à infiltração tumoral na medula óssea (mieloptise) ou por anemia, trombocitopenia e neutropenia paraneoplásicas. Estes sinais podem incluir febre, sepse, palidez das mucosas e hemorragias (Vail & Young, 2007). Poucos animais podem mostrar sinais de gamopatia monoclonal, como distúrbios de sangramento, tromboembolia, lesões oculares, sinais neurológicos e infecções (Morris & Dobson, 2007).

O linfoma intestinal ou alimentar pode apresentar infiltração solitária, difusa ou multifocal do trato gastrointestinal com ou sem linfadenopatia mesentérica. Os cães podem apresentar vômito, diarreia, anorexia, perda de peso, disquezia ou tenesmo e, ocasionalmente, peritonite secundária à obstrução completa e ruptura do intestino. Massa abdominal, linfonodos mesentéricos aumentados ou espessamento de alças intestinais podem ser palpáveis (Fighera et al., 2002; Morris & Dobson, 2007; De Nardo et al., 2008).

A forma mediastinal do linfoma caracteriza-se por aumento dos linfonodos mediastinais e/ou do timo, e os sinais clínicos estão associados com a extensão da doença. Esses pacientes podem apresentar distúrbios respiratórios causados pela compressão tumoral ou pela presença de efusão pleural, além de intolerância ao exercício e, possivelmente, regurgitação. Os animais com linfoma mediastinal também podem apresentar síndrome da veia cava, caracterizada por edema da cabeça, pescoço e membros torácicos, secundário à compressão ou à invasão tumoral da veia cava cranial (Fighera et al., 2002; Vail & Young, 2007). A hipercalcemia é comum nesta forma de linfoma em cães, sendo com frequência associada ao imunofenótipo de célula T (Morris & Dobson, 2007).

A forma cutânea do linfoma canino pode ser classificada como primária, originada na pele, ou secundária, associada ao linfoma encontrado predominantemente em outros locais do corpo (Morris & Dobson, 2007). O linfoma cutâneo é generalizado ou multifocal, sendo que os tumores se apresentam como nódulos, placas, úlceras, e dermatite eritematosa ou esfoliativa (Vail & Young, 2007). O linfoma cutâneo primário inclui duas formas, as quais são derivadas de células T e, embora se originem na pele, podem espalhar posteriormente para vísceras abdominais, linfonodos e medula óssea (Morris & Dobson, 2007). A forma epiteliotrófica de células T (micose fungóide) tem um curso clínico crônico, com três aparentes estádios clínicos. Inicialmente, descamação, alopecia e prurido são observados. Com a progressão da doença, a pele vai ficando mais eritematosa, espessada, ulcerada e exsudativa. O estágio final é caracterizado pela presença de placas proliferativas e nódulos com ulceração progressiva. Envolvimento da mucosa oral também pode ocorrer, que pode ser observado como lesões multicêntricas e eritematosas ou nódulos na gengiva e lábios (Figuera et al., 2002; Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007). A forma não-epiteliotrófica (dérmica) é uma doença mais agressiva, espalhando rapidamente lesões cutâneas múltiplas para envolver linfonodos, vísceras abdominais e medula óssea (Morris & Dobson, 2007). O linfoma cutâneo secundário é também caracterizado por células linfóides na derme. Elas com frequência têm achados morfológicos similares aos dos histiócitos (e daí a antiga expressão diagnóstica “linfoma histiocítico”), mas o imunofenótipo pode ser de célula B ou T, dependendo de qual linfoma está no local primário (Morris & Dobson, 2007).

Cães com linfoma primário do sistema nervoso central podem ter tanto envolvimento isolado ou multifocal. Convulsões, paresia e paralisia podem ser observadas (Figuera et al., 2002; Vail & Young, 2007). O linfoma ocular caracteriza-se por infiltração e espessamento da íris, uveíte, hipópio, hifema, sinéquia posterior e glaucoma. Animais com linfoma intravascular geralmente apresentam sinais clínicos relacionados ao sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, ou envolvimento ocular, incluindo paraparesia, ataxia, hiperestasia, convulsões, cegueira, letargia, anorexia, perda de peso, diarreia, poliúria, polidipsia e febre intermitente. Os cães com linfoma hepatoesplênico apresentam sinais clínicos inespecíficos como letargia, inapetência e fraqueza (Vail & Young, 2007). O linfoma renal em cães leva à hematúria de origem renal, renomegalia e insuficiência renal quando o processo é bilateral (Figuera et al., 2002).

3.1.4 Síndromes Paraneoplásicas

Sob a expressão “síndrome paraneoplásica” entende-se um conjunto de sinais clínicos ou achados laboratoriais induzido por um neoplasma e que caracteriza a disfunção de um determinado órgão ou tecido localizado distante do sítio primário desse neoplasma ou de suas metástases, ou seja, são alterações que ocorrem paralelamente ao tumor. Para muitos tumores, as síndromes paraneoplásicas são a base da malignidade e, então, o tratamento adequado da neoplasia primária leva ao seu desaparecimento (Morrison, 1979; Yoneda et al., 1991; Bergman, 2007; Ramos et al., 2008). No entanto, o reaparecimento destas alterações, mesmo com a terapia, geralmente precede a recorrência do tumor. As síndromes paraneoplásicas são, em geral, o primeiro sinal de malignidade e, a identificação dos tipos e causas destas síndromes é primordial para o diagnóstico precoce do câncer e o estabelecimento da terapia adequada. Além disso, as síndromes paraneoplásicas podem causar maior morbidade quando comparadas ao tumor primário, e, muitas vezes, a terapia prioritária deve ser direcionada para estas alterações secundárias (Bergman, 2007; Ramos et al., 2008).

Os efeitos sistêmicos associados ao câncer podem apresentar uma história clínica comum a várias doenças, sendo geralmente manifestados com sinais clínicos inespecíficos (Gorman, 1990). As síndromes paraneoplásicas que têm sido encontradas em cães com linfoma incluem caquexia, hipercalcemia, hiperglobulinemia, citopenias e leucocitose (Couto, 2006; Bergman, 2007; Morris & Dobson, 2007; Ramos et al., 2008).

3.1.4.1 Caquexia

Um efeito sistêmico e importante do câncer em animais é a presença de má-nutrição pronunciada e perda de peso corporal. A perda de peso e as alterações metabólicas observadas em pacientes com câncer mesmo com nutrição adequada são chamadas de caquexia, enquanto que as alterações observadas devido à nutrição inadequada são chamadas de anorexia. O efeito clínico tanto da caquexia quanto da anorexia em pacientes com neoplasias é a progressiva perda de peso, que pode interferir na resposta adequada à terapia e reduzir significativamente o tempo de sobrevivência. A caquexia do câncer ocorre frequentemente na medicina humana, com incidência de 40 a 90% dos pacientes hospitalizados (Bergman, 2007). Porém, a incidência da caquexia

associada a neoplasias na medicina veterinária ainda não é conhecida (Bergman, 2007; Ramos et al., 2008). Apenas 4% dos cães atendidos em um serviço de oncologia apresentaram caquexia (Bergman, 2007). Em um estudo, 71% dos cães com linfoma apresentaram caquexia e/ou anorexia no momento do diagnóstico (Ramos et al., 2008). No entanto, as alterações metabólicas associadas a síndromes paraneoplásicas ocorrem antes que a perda de peso seja detectada e, geralmente persistem por algum tempo mesmo após o tratamento (Bergman, 2007). Não está muito bem entendido, mas a caquexia paraneoplásica é atribuída a um aumento no metabolismo basal e à presença de um déficit calórico (Morrison, 1979).

3.1.4.2 Hipercalcemia

A hipercalcemia associada a neoplasias é a causa mais frequente de hipercalcemia em caninos hospitalizados, e uma das principais complicações metabólicas do câncer. Geralmente está associada a uma baixa expectativa de vida em pacientes com neoplasias, independente da resposta na concentração sérica de cálcio frente ao tratamento (Barri & Knochel, 1996). Está presente em 10 a 40% dos casos de linfoma canino, sendo com frequência associada às formas mediastinal e derivadas de células T (Bergman, 2007; Morris & Dobson, 2007). Na maioria dos casos, a hipercalcemia induzida pelo linfoma resulta de um peptídeo semelhante ao paratormônio (PTHrP), produzido pelas células neoplásicas (Vail & Young, 2007). Este peptídeo aumenta a ressonância óssea de cálcio e estimula a reabsorção tubular renal de cálcio e a excreção de fosfato (Gorman, 1990; Barri & Knochel, 1996). No entanto, a hipercalcemia também pode estar relacionada à produção de vários outros fatores humorais, incluindo interleucina-1, fator de necrose tumoral α , fator de crescimento β e análogo da vitamina D (Vail & Young, 2007). Estes fatores estimulam a atividade osteoclástica, levando a um aumento na ressonância óssea de cálcio (Barri & Knochel, 1996), o que pode levar ao aparecimento de fraturas devido à osteopenia (Figuera et al., 2002).

A hipercalcemia é caracterizada clinicamente pela presença de sinais clínicos inespecíficos, como anorexia, perda de peso, fraqueza muscular, letargia, poliúria, polidipsia e constipação (Barri & Knochel, 1996, Vail & Young, 2007). Sem tratamento, os pacientes desenvolvem sintomas relacionados ao sistema nervoso central como convulsões, comportamento alterado e coma. A hipercalcemia também induz uma disfunção tubular renal com poliúria, acidose tubular renal, glicosúria e hiperfosfatúria

(Barri & Knochel, 1996) e formação de cálculos. A hipercalcemia também já foi associada com arritmias cardíacas, a causa mais comum de morte nos pacientes hipercalcêmicos (Gorman, 1990). A interpretação dos níveis séricos de cálcio deve levar em consideração o pH sanguíneo e a concentração sérica de proteínas totais. Uma vez que aproximadamente a metade do cálcio total sérico é na forma não-ionizada e ligado a albumina, a hipoalbuminemia deve diminuir o limite máximo da concentração sérica normal do cálcio por aumentar a forma não ligada. A acidose vai alterar o equilíbrio entre o cálcio ionizado e o não-ionizado. Tanto a hipoalbuminemia quanto a acidose podem intensificar os sinais de hipercalcemia, já que a forma ionizada é responsável pelos sinais clínicos (Morrison, 1979; Gorman, 1990). Apesar de existir uma correlação positiva entre a concentração sérica de cálcio total e ionizado, sendo esta a forma biologicamente ativa e representando em torno de 55% do cálcio total, a avaliação do cálcio ionizado permite determinar com maior acurácia a verdadeira calcemia do animal (Morris & Dobson, 2007; Messinger et al., 2009).

3.1.4.3 Hipergamaglobulinemia

As gamopatias monoclonais são comuns em pessoas e animais com câncer (Bergman, 2007). Por causar distúrbios na homeostase, o desenvolvimento de neoplasias pode desencadear resposta de fase aguda, ocasionando alteração das proteínas de fase aguda, sobretudo quando há necrose tecidual ou reação inflamatória secundária. Já foi demonstrado em cães com linfoma o aumento na concentração sérica de ceruloplasmina e haptoglobina (Calazans et al., 2009). Além disso, a hipergamaglobulinemia como síndrome paraneoplásica ocorre também devido à produção excessiva de proteínas de uma linha monoclonal de imunoglobulinas produzidas por linfócitos ou células plasmáticas (Bergman, 2007). Nestes cães, a proteína total excede 100g/L (Morrison, 1979). Quando a produção destas imunoglobulinas é extrema, os sinais clínicos de hiperviscosidade se tornam evidentes, como ataxia, depressão, demência, doença ou falência cardíaca, convulsões e coma (Morrison, 1979; Figuera et al., 2002; Bergman, 2007; Ramos et al., 2008). As manifestações neurológicas ocorrem por hipóxia cerebral induzida pela diminuição da perfusão cérebro-vascular. Essa síndrome de hiperviscosidade também está associada a anormalidades oculares (Ramos et al., 2008). Além disso, estas proteínas em grande quantidade interferem na função plaquetária levando a trombocitopatias, e inibem alguns fatores de coagulação, ocasionando diátese hemorrágica (Morrison, 1979;

Fighera et al., 2002).

3.1.4.4 Citopenias

A anemia é uma das síndromes paraneoplásicas mais comumente observada na oncologia humana e veterinária. Aproximadamente 20 a 25% das pessoas com câncer apresentam anemia (Bergman, 2007) e 53% dos pacientes com neoplasias hematológicas apresentam esta síndrome paraneoplásica (Miller et al., 2009). A anemia relacionada ao câncer é uma complicação muito frequente nos pacientes humanos com vários tipos tumorais e pode ter um impacto negativo na qualidade de vida, prognóstico da doença e resposta ao tratamento. Também já foi detectado que cães com linfoma e anemia possuem um menor período de sobrevida em relação aos não-anêmicos (Miller et al., 2009). Os pacientes com linfoma comumente desenvolvem anemia de leve a moderada, sendo causada pela cronicidade da doença (anemia das doenças crônicas), por hemólise (anemia hemolítica imunomediada e anemia hemolítica microangiopática) ou por perda de sangue (anemia hemorrágica) (Gorman, 1990; Fighera et al., 2002; Bergman, 2007). Hiperesplenismo, sangramento gastrointestinal oculto e diminuição no tempo de vida dos eritrócitos também podem contribuir para a anemia associada ao câncer (Morrison, 1979).

A anemia da doença crônica/inflamatória é muito comum em pacientes oncológicos humanos e veterinários com tumores disseminados e ocorre por uma desordem no metabolismo e armazenamento do ferro, redução da meia-vida dos eritrócitos e, ocasionalmente, diminuição da resposta da medula óssea (Bergman, 2007). Esta anemia é tipicamente de grau leve a moderado e normocítica/normocrômica, embora microcitose possa ser observada (Miller et al., 2009). A anemia hemolítica imunomediada ocorre com a destruição prematura dos eritrócitos pelo sistema imune, e pode ser observada em pessoas e animais com câncer (Bergman, 2007). A anemia por perda de sangue resulta em uma redução na concentração de hemoglobina devido a ferropenia, sendo, por isso, microcítica e hipocrômica (Bergman, 2007). Anemia hemolítica microangiopática é um fenômeno secundário à hemólise e ocorre pela deposição de fibrina ou dano endotelial observados principalmente na coagulação intravascular disseminada (Gorman, 1990; Bergman, 2007). Além disso, a infiltração da medula óssea pelo tumor pode ocasionar anemia mielotísica, agravando mais o processo (Fighera et al., 2002).

A anemia induzida pela quimioterapia ocorre frequentemente em pacientes

humanos. No entanto, em veterinária, o grau desta anemia é geralmente leve, com hematócrito de 28 a 32% em cães, sendo que não necessita terapia e melhora após o término da quimioterapia (Bergman, 2007).

A trombocitopenia em pacientes com câncer é tipicamente secundária à quimioterapia, no entanto, sua prevalência em cães antes do início da terapia é de até 36%. Os mecanismos para o aparecimento de trombocitopenia incluem aumento na destruição plaquetária, sequestro/consumo de plaquetas e diminuição na sua produção (Bergman, 2007).

A neutropenia geralmente ocorre secundariamente ao tratamento quimioterápico e muitas vezes se constitui a citopenia limitante da dose e ocasionalmente provoca sepse com risco de vida para os cães (Couto, 2006). O nadir da neutropenia ocorre 7 a 10 dias após o tratamento com doxorrubicina, e a recuperação medular acontece após 21 dias da administração da droga (Lanore & Delprat, 2004; Rodaski & De Nardi, 2004).

3.1.4.5 Leucocitose

Aumentos nos neutrófilos circulantes foram associados ocasionalmente a uma série de tumores, incluindo o linfoma. Infelizmente, muitas vezes é difícil distinguir estas reações leucemóides de uma leucemia verdadeira (Bergman, 2007). O mecanismo exato para estas reações leucemóides é desconhecido, no entanto, a produção de um fator estimulante de colônia como o fator estimulante de colônia granulocítico-macrofágico está sendo implicado na etiologia desta síndrome paraneoplásica (Yoneda et al., 1991; Bergman, 2007). A leucocitose com neutrofilia é de uma significância clínica baixa e responde ao tratamento do tumor primário (Bergman, 2007).

3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de linfoma é, na maioria das vezes, fácil de ser estabelecido, já que não há necessidade de exames complexos para sua realização (Figuera et al., 2002). Para a maior parte dos animais com suspeita de linfoma a avaliação diagnóstica deve incluir um exame clínico completo, hemograma e perfil bioquímico. Além disso, a avaliação torácica e abdominal por radiografia e ultrassonografia pode ser importante para determinar a extensão do envolvimento interno. Finalmente, a coleta de material para biopsia ou citologia para o diagnóstico definitivo é essencial (Blackwood et al., 1997; Vail & Young, 2007).

8.1.5.1 Exame Clínico

A prevalência de linfadenomegalia em cães com linfoma é alta, fazendo deste aspecto o principal achado para determinação da suspeita clínica (Figuera et al., 2002). Assim, o exame clínico do paciente com linfoma deve incluir a palpação de todos os linfonodos acessíveis. As membranas mucosas devem ser inspecionadas para presença de palidez, icterícia, petéquias e ulceração, porque estes sinais podem indicar anemia ou trombocitopenia secundárias à mieloptose ou doença imunomediada ou pode ser uma evidência de falência orgânica ou uremia (Vail & Young, 2007). A palpação abdominal pode revelar organomegalia, espessamento de alças intestinais ou linfadenopatia mesentérica (Couto, 2006; Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007). A auscultação torácica pode sugerir a presença de massa mediastínica, efusão pleural ou ambos. Além disso, o exame ocular (que inclui avaliação do fundo do olho) pode revelar anormalidades como uveíte, hemorragia retiniana e infiltração ocular em aproximadamente um terço a metade dos cães com linfoma (Vail & Young, 2007).

8.1.5.2 Hematologia e Bioquímica Clínica

Uma variedade de anormalidades hematológicas e bioquímicas séricas inespecíficas pode ser identificada nos caninos com linfoma (Couto, 2006). Todos os casos suspeitos de linfoma requerem análise hematológica de rotina para auxiliar na determinação do estágio da doença e para estabelecer a linha de base de parâmetros hematológicos com os quais comparar futuras amostras e acessar o grau de mielossupressão induzida pelo tratamento (Morris & Dobson, 2007). As alterações hematológicas resultam da infiltração de células neoplásicas na medula óssea, hipo ou hiperfunção esplênica, doenças crônicas ou síndromes paraneoplásicas. Certas anormalidades hematológicas (monocitose, reações leucemóides) podem ser provocadas pela produção local ou sistêmica de substâncias bioativas por células tumorais (Couto, 2006). A avaliação hematológica pode estar normal ou pode revelar anemia, trombocitopenia, neutropenia, linfocitose e presença de precursores linfóides imaturos (Morris & Dobson, 2007).

A anemia, geralmente é normocítica e normocrômica (não-regenerativa), consistente com anemia da doença crônica. No entanto, anemia hemolítica também pode ocorrer, e as anemias regenerativas podem refletir hemólise e perda de sangue concomitante. Além disso, se mieloptose estiver presente, a anemia pode estar acompanhada por trombocitopenia e leucopenia. Em animais com anemia e evidências

de sangramentos, contagem de reticulócitos e plaquetas, e testes de coagulação também estão indicados (Vail & Young, 2007).

Trombocitopenia pode ser observada em 30 a 50% dos casos, no entanto a presença de sangramentos raramente é um problema clínico. Neutrofilia pode ser detectada em 25 a 40% dos cães com linfoma (Vail & Young, 2007). Linfocitose é incomum, ocorrendo em aproximadamente 20% dos cães afetados, e quando presente geralmente é de pequena magnitude (10.000 a 12.000 linfócitos/ μ L) (Couto, 2006, Vail & Young, 2007). Linfócitos atípicos circulantes podem indicar envolvimento da medula óssea e/ou leucemia. A diferenciação do linfoma multicêntrico com envolvimento de medula óssea, de leucemia linfoblástica primária é difícil, mas importante para definir o prognóstico (Figuera et al., 2002; Vail & Young, 2007).

As anormalidades bioquímicas séricas mais comuns em cães com linfoma estão relacionadas às síndromes paraneoplásicas, como hipercalcemia e hiperglobulinemia (Couto, 2006) e já foram citadas. As alterações bioquímicas também podem refletir o sítio anatômico envolvido no caso de cães com linfoma (Vail & Young, 2007). Por isso, a avaliação deve incluir enzimas hepáticas e testes de função hepática para detectar a presença de infiltração tumoral no fígado e/ou disfunção hepática; uréia e creatinina para detectar disfunção renal, secundária à infiltração renal pelo tumor, nefrose por hipercalcemia ou azotemia pré-renal causada por desidratação (Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007). Além disso, a urinálise também pode ser utilizada para avaliar a função renal e o trato urinário (Vail & Young, 2007).

Hahn et al.(1999) demonstrou que a mensuração sérica de glicoproteína α -ácida pode ser um método útil para prever recidiva antes do aparecimento de sinais clínicos detectáveis de doença. A concentração sérica desta proteína de fase aguda diminui significativamente no início do período de remissão clínica e aumenta três semanas antes do início dos sinais de recidiva (Hahn et al., 1999).

Além disso, a atividade sérica da enzima lactato desidrogenase (LDH) é muito utilizada na medicina humana como fator prognóstico nos casos de linfoma não-Hodgkin. Em medicina veterinária, um estudo demonstrou que a taxa de sobrevida foi maior em cães com linfoma com níveis séricos baixos de LDH (<312,5 U/L) (Zanatta et al., 2003).

3.1.5.3 Radiografia e Ultrassonografia

O exame radiográfico promove um auxílio importante no diagnóstico do

linfoma, no entanto, as alterações observadas são inespecíficas e não podem ser a base do diagnóstico (Blackwood et al., 1997; Yam et al., 2002). As alterações radiográficas nos cães com linfoma variam de acordo com as diferentes formas anatômicas, mas em geral são secundárias à linfadenopatia ou organomegalia (hepatomegalia, esplenomegalia, renomegalia); ocasionalmente a infiltração em outros órgãos, como os pulmões, pode levar ao aparecimento de anormalidades radiográficas adicionais (Couto, 2006). A radiografia é necessária para auxiliar o diagnóstico em algumas formas anatômicas da doença, como mediastinal, renal, espinhal ou alimentar. Radiografias torácicas e abdominais são também importantes para acessar o envolvimento de linfonodos e órgãos (fígado, baço, pulmões) em estágio de formas multicêntricas da doença (Morris & Dobson, 2007). Além disso, embora muitos cães apresentem múltiplas anormalidades, uma proporção significativa de animais apresenta apenas uma alteração nas radiografias torácicas e abdominais, ou o cão pode ser radiologicamente normal (Blackwood et al., 1997).

As alterações radiográficas de cães com linfoma multicêntrico incluem linfadenopatia esternal e/ou traqueobrônquica; infiltrados pulmonares intersticiais, broncoalveolares ou mistos; derrame pleural; linfadenopatia intra-abdominal; hepatomegalia; esplenomegalia; renomegalia; ou massas intra-abdominais. Raramente lesões ósseas líticas ou proliferativas são identificadas nas radiografias torácicas ou abdominais simples (Couto, 2006). Destas alterações, a linfadenopatia esternal é relatada mais frequentemente, variando de 40 a 60% dos cães com linfoma multicêntrico (Blackwood et al., 1997).

Nos caninos com linfoma mediastinal, as alterações radiográficas são geralmente limitadas à presença de uma massa mediastinal anterior com ou sem derrame pleural. No caso do linfoma alimentar, em menos de 50% dos casos anormalidades são detectadas nas radiografias abdominais simples. Quando presentes variam em natureza, mas incluem principalmente hepatomegalia, esplenomegalia e massas abdominais. A radiografia contrastada do trato gastrointestinal superior geralmente revela anormalidades na maioria dos animais (Couto, 2006).

A ultrassonografia constitui um instrumento valioso na avaliação dos cães com suspeita de linfoma intra-abdominal. A técnica também é útil na avaliação de massas mediastinais. As alterações na ecogenicidade dos órgãos parenquimatosos (fígado, baço, rins) geralmente refletem mudanças secundárias a infiltrações neoplásicas. Além disso, podem ser detectados estruturas ou órgãos linfóides aumentados. Várias anormalidades

podem ser detectadas em caninos com linfoma como hepato/esplenomegalia, alterações na ecogenicidade do fígado ou baço, espessamento intestinal, linfadenopatia, massas esplênicas e efusão (Couto, 2006). A ultrassonografia também pode ser útil para guiar aspirados ou biópsias a fim de confirmar o diagnóstico (Morris & Dobson, 2007).

3.1.5.4 Análises histológica ou citológica

Os sinais clínicos e achados dos exames físico e complementares geralmente sugerem linfoma em cães, no entanto, o diagnóstico deve ser confirmado citológica ou histopatologicamente (Couto, 2006). Na maioria dos cães portadores de linfoma multicêntrico, extranodal, mediastinal ou alimentar, o diagnóstico pode ser facilmente obtido por estudos citológicos do material aspirado por agulha fina dos órgãos ou linfonodos acometidos (Couto, 2006; Vail & Young, 2007). Tipicamente, as células são linfócitos grandes (maiores que os neutrófilos) com nucléolo visível e citoplasma basofílico (Vail & Young, 2007). Aproximadamente 90% dos casos de linfoma em caninos podem ser diagnosticados citologicamente (Couto, 2006). No entanto, para uma avaliação mais exata, um linfonodo inteiro, incluindo a cápsula, deve ser removido e submetido para avaliação histopatológica (Couto, 2006; Morris & Dobson, 2007). Isso também é necessário para classificação histológica completa por tipo celular e padrão de crescimento, em linfomas de baixo, intermediário e alto grau de malignidade, e também para determinação do imunofenótipo (Morris & Dobson, 2007).

No linfoma alimentar, uma biópsia do intestino deve ser obtida através de procedimento cirúrgico; biópsias endoscópicas podem ser inadequadas porque apenas uma amostra superficial é obtida. Para o linfoma cutâneo, biópsias por “punch” podem ser realizadas (Vail & Young, 2007). Biópsia incisional ou por agulha pode ser utilizada nos órgãos afetados ou em massas abdominais ou torácicas (Morris & Dobson, 2007).

3.1.5.5 Avaliação da medula óssea

Biópsia ou aspirado de medula óssea está indicado para avaliar o estágio dos cães com linfoma, e também nos casos com anemia, linfocitose, atipia de linfócitos periféricos ou outra citopenia. A presença de poucos pró-lymphócitos ou grandes linfócitos com nucléolo na circulação pode indicar envolvimento da medula óssea (Vail & Young, 2007). Em um estudo com 53 cães com linfoma, 28% apresentavam linfócitos atípicos circulantes e foram considerados leucêmicos, enquanto a medula óssea indicava envolvimento em 57% dos cães (Raskin & Krehbiel, 1989). Assim, idealmente, a

biópsia de medula óssea deve ser realizada para todos os casos, uma vez que é possível haver infiltração de medula óssea sem alterações óbvias nos parâmetros hematológicos (Morris & Dobson, 2007).

3.1.6 Estadiamento Clínico

Depois de estabelecido o diagnóstico de linfoma, a extensão da doença deve ser determinada e correlacionada ao estágio clínico da doença. O sistema de estadiamento da Organização Mundial de Saúde utilizado rotineiramente para avaliar cães com linfoma está na Tabela 2 (Owen 1980; Vail & Young, 2007). Mais de 80% dos cães com linfoma se encontram nos estádios avançados (III a V) (Vail & Young, 2007).

Tabela 2. Sistema de estadiamento clínico da Organização Mundial de Saúde para o linfoma em animais domésticos.

Sítio anatômico	Estádio (inclui sítio anatômico)
A. Generalizado	I. Envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide em um único órgão (exceto medula óssea)
B. Alimentar	Ia. Estádio I sem sinais sistêmicos
C. Mediastinal	Ib. Estádio II com sinais sistêmicos
D. Cutâneo	II. Envolvimento de muitos linfonodos em uma área regional (com ou sem tonsilas)
E. Leucemia verdadeira	IIa. Estádio II sem sinais sistêmicos
F. Outros	IIb. Estádio II com sinais sistêmicos
	III. Envolvimento generalizado de linfonodos
	IIIa. Estádio III sem sinais sistêmicos
	IIIb. Estádio III com sinais sistêmicos
	IV. Envolvimento de fígado e/ou baço (com ou sem estágio III)
	IVa. Estádio IV sem sinais sistêmicos
	IVb. Estádio IV com sinais sistêmicos
	V. Manifestações no sangue e envolvimento de medula óssea e/ou outros sistemas orgânicos (com ou sem estádios I a IV)
	Va. Estádio V sem sinais sistêmicos
	Vb. Estádio V com sinais sistêmicos

3.1.7 Tratamento

Cães com linfoma que não recebem tratamento podem sobreviver em média 4 a 6 semanas depois que o diagnóstico tenha sido estabelecido (Madewell, 1975). Em geral, o linfoma é uma doença sistêmica, que requer uma abordagem terapêutica

também sistêmica com quimioterapia. Exceções à regra ocorrem nos casos de linfomas extranodais ou em regiões isoladas, em que a terapia local envolvendo tanto a cirurgia como a radioterapia pode estar indicada (Vail & Young, 2007). No entanto, mesmo que o paciente apresente um linfoma nodal ou extranodal no estágio I no momento da apresentação, a disseminação sistêmica da doença geralmente ocorre semanas a meses após o diagnóstico. Portanto, a cirurgia ou a radioterapia podem ser empregadas para tratar linfomas localizados, antes ou durante a quimioterapia (Couto, 2006).

O esquema terapêutico de um paciente com linfoma é determinado pelo estágio ou subestádio da doença, pela presença ou ausência de síndromes paraneoplásicas, o estado fisiológico do paciente, o comprometimento pelo proprietário, e o seu entendimento em lidar com os efeitos colaterais do tratamento (Vail & Young, 2007). Os objetivos na terapia do linfoma visam a cura ou o prolongamento significativo da vida e a redução dos sinais clínicos (Madewell, 1975).

3.1.7.1 Quimioterapia

O método mais utilizado para o tratamento do linfoma canino é a quimioterapia combinada (Morris & Dobson, 2007). Uma série de protocolos quimioterápicos para cães com linfoma foram desenvolvidos nos últimos 15 a 20 anos. As combinações se baseiam no protocolo CHOP, com ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona (Tabela 4), que foi inicialmente designado para a oncologia humana (Vail & Young, 2007). No entanto, muitos outros protocolos são avaliados em medicina veterinária na tentativa de aumentar o período de sobrevida dos cães (Hosoya et al., 2007; Rassnick et al., 2007; Vaughan et al., 2007; Flory et al., 2008; Brodsky et al., 2009; Griessmayr et al., 2009; Lurie et al., 2009; Rassnick et al., 2009; Saba et al., 2009).

As taxas de remissão nos cães com linfoma tratados com vários protocolos quimioterápicos são de aproximadamente 80 a 90% (Madeweel, 1975; Couto, 2006). A maioria dos cães com linfoma tratados com protocolos quimioterápicos com múltiplos agentes tem expectativa de vida de 12 a 16 meses; aproximadamente 20 a 30% dos cães continuam vivos dois anos após o diagnóstico (Couto, 2006). Assim, atualmente, a oncologia veterinária está buscando protocolos terapêuticos que atinjam mais de dois anos de remissão na maioria dos pacientes caninos com linfoma (Legendre, 2007).

No entanto, antes de iniciar a terapia com drogas é essencial estabelecer uma linha de base de parâmetros hematológicos para monitoramento futuro da

mielossupressão associada ao tratamento (Morris & Dobson, 2007). Os propósitos da terapia quimioterápica para a maioria dos cães com linfoma são: induzir uma primeira remissão completa e duradoura do tumor (mais de seis meses); proceder ao tratamento de manutenção quando a remissão for completa; e intensificar o regime com aumento nas doses ou uso de fármacos diferentes se a resposta não for completa (Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007).

O tratamento quimioterápico dos cães com linfoma, de uma maneira geral, é dividido em diversas fases ou estratégias: indução da remissão; manutenção; e reindução da remissão ou resgate. Imediatamente após o diagnóstico, um protocolo quimioterápico de muitos agentes, relativamente agressivo, é usado para induzir a remissão. Durante esta fase, que dura de 6 a 8 semanas, os animais são avaliados semanalmente pelo veterinário e são submetidos a exames físico e laboratorial de rotina (Couto, 2006). Os cães que respondem a quimioterapia e atingem a remissão completa (desaparecimento das massas neoplásicas) se tornam livres de sinais clínicos e adquirem uma boa qualidade de vida (Vail & Young, 2007). Se ao término dessa fase o paciente for considerado em remissão completa, é iniciada a fase de manutenção. Durante esta fase, o protocolo quimioterápico de múltiplos agentes é administrado de maneira que o animal não requer monitoração intensiva (Couto, 2006). No entanto, a quimioterapia de manutenção a longo prazo não é efetiva em pacientes humanos com linfoma não-Hodgkin (Vail & Young, 2007). Em medicina veterinária, estudos com protocolos com base no CHOP somente por um período de seis meses (indução da remissão) não demonstraram diferença estatística em relação ao tempo de sobrevida comparados aos animais que receberam terapia de manutenção associada. Os cães que receberam o protocolo mais curto, mais barato e sem manutenção apresentaram períodos de remissão e de sobrevida semelhantes aos cães que utilizaram o protocolo com terapia de manutenção, além de uma melhor resposta a segundas remissões (Chun et al., 2000; Garret et al., 2002).

De uma maneira geral, o período de manutenção continua até ocorrer a recidiva tumoral, e neste momento inicia-se a fase de reindução. Esta fase é semelhante à fase de indução, na qual são utilizados tratamentos intensivos. Uma vez que a remissão seja obtida, o paciente é submetido novamente a um protocolo de manutenção modificado. Se no fim da fase de reindução o paciente não estiver em remissão completa, é recomendada a intensificação com outra droga antes de iniciar a fase de manutenção (Couto, 2006).

- Quimioterapia com um único agente

Atualmente, os agentes quimioterápicos mais efetivos para o linfoma são doxorubicina, L-asparaginase, vincristina, ciclofosfamida e prednisona. Outros fármacos que também possuem atividade e podem ser consideradas de segunda linha incluem vimblastina, actinomicina-D, mitoxantrona, clorambucil, metrotexato, citosina arabinosina e lomustina. Exceto pela doxorubicina, a indução com um único agente quimioterápico não resulta em períodos longos de remissão quando comparados aos protocolos combinados (Vail & Young, 2007). O uso de doxorubicina sozinha é efetivo e atinge períodos de remissão médios de 131 a 206 dias, usando o protocolo a cada 21 dias na dose de 30 mg/m^2 (Valerius et al., 1997). Em humanos a administração semanal de doxorubicina apresenta menor prevalência de efeitos tóxicos com a mesma eficácia que o protocolo habitual, no entanto, na medicina veterinária a doxorubicina em doses semanais de 10 mg/m^2 não se mostrou efetiva, embora segura em relação aos efeitos tóxicos (Ogilvie et al., 1991).

O cloridrato de doxorubicina é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclina, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, sendo relatado de uso corrente em oncologia humana e menor extensão em oncologia veterinária (Silva et al., 2004; Withrow, 2007). Em geral, os pacientes que recebem doxorubicina, desde que cuidadosamente monitorados, toleram bem os efeitos adversos e são beneficiados com essa terapia (Rodaski & De Nardi, 2004). A toxicidade deste quimioterápico envolve principalmente alterações hematológicas, gastrintestinais, cardiocirculatórias e dermatológicas (Hahn & Richardson, 1995; Lanore & Delprat, 2004; Rodaski & De Nardi, 2004; Withrow, 2007). No entanto, as limitações relacionadas ao uso da doxorubicina estão principalmente relacionadas ao desenvolvimento de uma cardiomiopatia dose-dependente (Ogilvie et al., 1991).

A cardiotoxicidade é uma complicação relativamente comum do tratamento com doxorubicina em cães (Astra et al., 2003; Couto, 2006). O mecanismo de toxicidade às células do miocárdio é incerto, mas a geração de radicais livres e a peroxidação lipídica podem estar envolvidos (Sisson & Thomas, 1997; Pereira Neto et al. 2006). A prevalência da cardiotoxicidade da doxorubicina em cães é variável. Em um estudo com 175 cães, 18% desenvolveram anormalidades cardíacas, mas apenas 4% apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (Mauldin et al., 1992). Em outro estudo de 35 cães com osteossarcoma que receberam doxorubicina com dose cumulativa de 150

mg/m², três animais (8%) morreram ou foram eutanasiados por cardiomiopatia e um (3%) teve morte súbita (Berg et al., 1995). Dois tipos de cardiotoxicidade foram observados em cães que recebem doxorubicina: uma reação aguda que ocorre durante ou logo após a administração; e a toxicidade cumulativa crônica (Fonseca et al. 2000; Couto, 2006). A toxicidade crônica da doxorubicina causa uma falência miocárdica progressiva, que leva a uma cardiomiopatia dilatada podendo ocorrer em cães que recebem doses cumulativas de 150 a 240 mg/m² (Hanai et al., 1996; Sisson & Möise, 1998; Silva & Camacho, 2005). Os sinais clínicos de toxicidade em cães são aqueles relacionados com a insuficiência cardíaca congestiva. O tratamento baseia-se na suspensão da quimioterapia e na administração de medicações para cardiopatia, como os glicosídeos digitálicos ou outros agentes inotrópicos (Couto, 2006; Pereira Neto et al. 2006). O desenvolvimento de cardiomiopatia é indicativo de mau prognóstico, porque as lesões miocárdicas são irreversíveis (Couto, 2006).

A monitoração dos pacientes que recebem doxorubicina é essencial para impedir o desenvolvimento de cardiomiopatia e inclui eletrocardiograma e ecocardiograma (Sisson & Möise, 1998; Couto, 2006). Radiografias torácicas e o eletrocardiograma devem ser realizados antes do início da terapia. Cães com suspeita de doenças cardíacas e aquelas raças com alto risco de cardiomiopatias, como Doberman, Boxer e Dogue Alemão, devem ser avaliados com ecocardiografia antes de iniciar a quimioterapia. Na maioria dos casos, a doxorubicina deve ser evitada em cães com fração de encurtamento menor que 20% (Sisson & Möise, 1998; Lanore & Delprat, 2004; Silva & Camacho, 2005). Após a dose cumulativa de 90 mg/m² do fármaco, todos os cães devem ser avaliados com ecocardiografia, que deve ser repetida a cada dose subsequente. Uma avaliação precoce deve ser realizada se arritmias ou intolerância ao exercício são detectadas (Sisson & Möise, 1998; Andrade et al., 2004; Couto, 2006). O tratamento com doxorubicina deve ser suspenso se a fração de encurtamento diminuir abaixo de 25%, a menos que não exista outro tratamento razoavelmente disponível (Sisson & Möise, 1998; Andrade et al., 2003; Silva & Camacho, 2005).

As determinações séricas das atividades das enzimas musculares foram utilizadas como possíveis parâmetros bioquímicos indicativos de injúria miocárdica (Silva et al., 2004). Alguns trabalhos demonstraram elevação das enzimas lactato desidrogenase (Dal Farra et al., 1995) e creatina quinase em cães tratados experimentalmente com doxorubicina (Silva et al., 2004). No entanto, atualmente está sendo considerada a possibilidade de monitorar a concentração sérica de troponinas

cardíacas para a detecção precoce da lesão de miocárdio causada por doxorubicina (Sleeper et al., 2001; Couto, 2006; Souza & Camacho, 2006). As troponinas são três distintas proteínas (C, I e T) que são expressas na musculatura esquelética e cardíaca e formam um complexo que regula a interação dependente de cálcio da miosina com a actina. A sequência de aminoácidos que codifica as troponinas cardíacas e esqueléticas I e T é diferente, e assim, estas moléculas podem ser diferenciadas por técnicas imunológicas, servindo como marcadores específicos de lesão miocárdica (Coudrey, 1998). Estudos experimentais em ratos tratados com doxorubicina evidenciaram elevações nos níveis séricos das troponinas cardíacas I e T mesmo com alterações histológicas mínimas nos miócitos (O'Brien et al., 1997; Herman et al., 1998; Herman et al., 1999; Koh et al., 2004). Observou-se também aumento sérico de troponina cardíaca T anterior à deterioração do ventrículo esquerdo (Koh et al., 2004). Estudos em humanos revelaram elevações na troponina cardíaca T após terapia com doxorubicina em crianças com leucemia linfoblástica aguda (Lipshultz et al., 1997; Lipshultz et al., 2004). Demonstrou-se também que a magnitude de sua elevação está associada à presença de dilatação ventricular esquerda (Lipshultz et al., 1997). Elevações nos níveis séricos da troponina cardíaca I também foram observadas em pacientes adultos recebendo altas doses de quimioterapia para neoplasias malignas (Cardinale et al., 2000). Em cães em tratamento com doxorubicina, demonstrou-se elevações na concentração de troponina cardíaca T em dois animais que receberam dose cumulativa de 180 mg/m² (DeFrancesco et al., 2002) e na concentração de troponinas cardíacas T e I recebendo doses de até 150 mg/m² (Neuwald, 2009).

- Quimioterapia com combinação de fármacos

Vários protocolos para o tratamento de cães com linfoma já foram relatados (Tabela 3). Os períodos de sobrevida e de remissão mais longos geralmente são associados com o uso de uma combinação de fármacos (MacEwen et al., 1981; Valerius et al., 1997; Vail & Young, 2007). No entanto, de uma maneira geral, a adição de mais fármacos ao protocolo quimioterápico resulta em aumento na prevalência de toxicidade, custos ao cliente e número de visitas ao veterinário. A toxicidade associada aos tratamentos quimioterápicos para o linfoma em cães varia e pode chegar a até 40% quando usados protocolos com várias drogas (Valerius et al., 1997).

O primeiro protocolo quimioterápico usado em pacientes veterinários, uma combinação com ciclofosfamida, vincristina e prednisona (COP), é relativamente

simples e fácil, bem tolerado, atinge taxas de remissão de 60 a 70% e uma sobrevida média de 6 a 7 meses (Vail & Young, 2007). No entanto, já está claramente estabelecido que o protocolo padrão usado em cães com linfoma inclui a doxorrubicina, e sendo variações do protocolo CHOP (Vail & Young, 2007). O protocolo CHOP resulta em um período de remissão mais longo (210 dias) quando comparado com protocolos contendo somente a doxorrubicina (131 a 206 dias) ou a associação de ciclofosfamida, vincristina e prednisona (180 dias) (Valerius et al., 1997). Aproximadamente 25% dos cães que usam protocolos com base no CHOP sobrevivem mais que dois anos, e alguns animais se curam (Vail & Young, 2007). A adição de L-asparaginase ao protocolo CHOP no período de indução demonstrou uma melhor resposta ao tratamento inicial, no entanto, não influenciou nos tempos de remissão e sobrevida (Valerius et al., 1997).

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

Tabela 3. Protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento de cães com linfoma.

Protocolo	Nº cães	Taxa deremissão (%)	Remissão média (meses)	Sobrevida média (meses)	Taxa desobrevida após 1 ano (%)	Referência
D/A + COP	121	88	6,8	7,9	-	Valerius et al., 1997
D	9	78	0,5	-	-	Olgivie et al., 1991
D + Pir	33	79	4,3	6,5	-	Mutsaers et al., 2002
D	42	74	4,9	5,7	-	
O+C+M+A	59	96	4,4	7,3	25	MacEwen et al., 1981
O+C+M+A	147	95	4,6	8,8*	-	MacEwen et al., 1987
COP	71	61	3,1	10,3	32	Hosoya et al., 2007
D/A + COP	30	77	5,8	9,2	45	

A= L-asparaginase; O= vincristina; C= ciclofosfamida; M= metrotexato; D= doxorubicina; P= prednisona; Pir= piroxicam

* somente cães com remissão completa ou parcial.

3.1.7.2 Cirurgia

A maioria dos cães com linfoma apresenta a forma multicêntrica e precisam quimioterapia sistêmica para o tratamento efetivo da doença. No entanto, a cirurgia pode ser indicada para tratar linfomas solitários (estádio I) ou doença extranodal. Nestes casos, o estadiamento cuidadoso é necessário para descartar envolvimento multicêntrico antes que a doença local seja tratada (Vail & Young, 2007).

Além disso, a cirurgia é útil em alguns casos de linfoma mediastinal em que o diagnóstico não foi confirmado por aspirado ou biópsia, e uma toracotomia pode ser necessária para obter material do tumor para diagnóstico ou mesmo para remover a massa. Similarmente, muitos casos de linfoma alimentar requerem laparotomia exploratória para obter material de biópsia. Para massas intestinais solitárias, ressecção cirúrgica e anastomose intestinal podem ser as opções de tratamento, uma vez que há risco de perfuração intestinal em casos em que o tumor envolve toda espessura do intestino. Casos de linfoma espinhal ou massas cutâneas solitárias também podem requerer tratamento cirúrgico (Morris & Dobson, 2007).

3.1.7.3 Radioterapia

O linfoma é um tumor radiosensível e, em teoria, a radioterapia deveria ter grande sucesso no tratamento de todas as formas da doença. Em animais, entretanto, os efeitos colaterais associados à radiação de corpo inteiro ou meio corpo são tantos que as doenças multicêntrica ou cutânea disseminadas não são usualmente tratadas por este método (Morris & Dobson, 2007). As indicações para radioterapia em cães incluem: doença local de estágio I ou II (linfoma nasal ou do sistema nervoso central); paliativo para doença local (linfadenopatia mandibular, linfoma retal, linfoma mediastinal acompanhado de síndrome pré-caval, envolvimento ósseo localizado); irradiação de corpo inteiro combinada com transplante de medula óssea ou de células-tronco; e radiação de meio corpo após atingida remissão com quimioterapia de indução (Vail & Young, 2007).

3.1.7.4 Outros

Casos de linfoma apresentando síndromes paraneoplásicas podem requerer tratamento de suporte imediato enquanto o diagnóstico é confirmado. Hipercalemia prolongada resulta em dano renal irreversível e a hipergamaglobulinemia também necessita de tratamento imediato caso seja grave (Morris & Dobson, 2007).

Algumas formas de linfoma, em particular a cutânea, respondem pobremente à quimioterapia convencional. Outras opções tentadas com sucesso variável para micose fungóide incluem retinóides, como isotretinoína ou etretinato e terapia fotodinâmica. (Morris & Dobson, 2007; Vail & Young, 2007).

Agentes biológicos e imunológicos também já foram utilizados para o tratamento do linfoma canino, no entanto os resultados são controversos. Uma vacina autóloga demonstrou efeitos positivos quando associada à quimioterapia, enquanto que a associação de levamisole com a quimioterapia não demonstrou efeitos satisfatórios (Vail & Young, 2007).

3.1.8 Prognóstico

O prognóstico para cães com linfoma varia e depende de vários fatores, como a localização da doença; a extensão da doença (o estadiamento clínico); a presença ou ausência de sinais clínicos (subestádio); o grau histológico; o imunofenótipo (células B ou T); exposição à quimioterapia prévia ou corticosteróides; processos de morte celular

alterados (apoptose); a taxa de proliferação do tumor; a presença de problemas médicos concomitantes ou síndromes paraneoplásicas (hipercalcemia, perda de peso e insuficiência hepática); e possivelmente o gênero. Embora o linfoma canino seja apenas ocasionalmente curável (menos de 10% dos casos), uma boa resposta e qualidade de vida durante os períodos de remissão são atingidos (Vail & Young, 2007).

O grau histológico de malignidade parece ser o indicador prognóstico mais confiável, com tumores de alto grau dando consistentemente respostas mais pobres. Tumores de alto grau, pela classificação de Kiel, têm capacidade reduzida de resposta completa e intervalos livres de doença mais curtos; tumores de alto grau pela classificação da *Working Formulation* tiveram tempo de sobrevida mais curto. O fenótipo de célula T também é importante e está associado a prognóstico pobre apesar do grau histológico (Morris & Dobson, 2007). Os animais em estádios I ou II respondem melhor à terapia e, conseqüentemente, apresentam um prognóstico mais favorável que os com doença mais avançada (MacEwen et al., 1981; Vail & Young, 2007). Cães com subestádio “a” apresentam maiores períodos de remissão e sobrevida (Valerius et al., 1997).

A hipercalcemia no momento do diagnóstico é um fator de prognóstico negativo, e o tempo de sobrevida médio para cães com concentração sérica de cálcio normal (220 dias) é quase o dobro do que os hipercalcêmicos (112 dias). Os cães com hipercalcemia geralmente apresentam linfoma de células T ou possuem uma alta probabilidade de ter falência renal concomitante ou são classificados no subestádio “b”, o que pode ser relacionado com os menores períodos de remissão e de sobrevida encontrados nos cães hipercalcêmicos. Além disso, as pessoas com linfoma de células T tendem a apresentar hipercalcemia e, conseqüentemente, pior prognóstico (Valerius et al., 1997).

Foi demonstrado que o gênero pode influenciar no prognóstico de cães com linfoma. As fêmeas tendem a ter um melhor prognóstico (MacEwen et al., 1987). Os machos apresentam uma maior incidência do fenótipo de células T, que pode ser responsável pelo pior prognóstico (Vail & Young, 2007).

Os cães pequenos tendem a apresentar um melhor prognóstico, o que pode ser explicado, em parte, como consequência do esquema terapêutico, já que cães pequenos tendem a receber uma concentração maior de droga por kg, quando se usa dose por m², do que os cães maiores (MacEwen et al., 1981; Valerius et al., 1997).

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 1

Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil¹

Elisa B. Neuwald^{2*}, Luciele V. Teixeira², Francisco O. Conrado³, Mariana O.D. da Silva⁴, Nicole R.C. Hlavac², Félix H.D. González⁵

RESUMO. Neuwald E.B., Teixeira L.V., Conrado F.O, Silva M.O.D., Hlavac N.R.C. & González F.H.D.2013. [**Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunohistoquímicos do linfoma canino na região de Porto Alegre, Brasil.**] Epidemiological, clinical and immunohistochemistry aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. E-mail: eneuwald@ibest.com.br

Esse trabalho apresenta os achados epidemiológicos, clínicos e imunohistoquímicos de linfomas caninos diagnosticados na região de Porto Alegre. Trinta cães foram incluídos no estudo; sendo principalmente machos (60%), sem raça definida (23%) e de meia-idade a idosos. A grande maioria (87%) dos cães afetados apresentou a forma anatômica multicêntrica. O imunofenótipo B foi detectado com mais frequência (62%); 37% dos cães apresentavam estadiamento clínico IV e 83% encontravam-se no subestádio “b”. Linfadenopatia foi observada em 67% dos casos; outros sinais clínicos comumente detectados foram dispneia, prostração, diminuição do apetite e vômitos. Anemia foi a alteração laboratorial mais frequente (57%), seguida por leucocitose (40%), trombocitopenia (33%), linfopenia (30%), hiperglobulinemia (20%), hiperproteinemia (17%) e hipercalcemia (13%). Os resultados do presente estudo indicam que as características epidemiológicas e clínicas de cães com linfoma na região de Porto Alegre são semelhantes às observadas em todo o mundo.

Termos de indexação: linfoma, síndromes paraneoplásicas, sinais clínicos, imunohistoquímica, cão.

ABSTRACT. This study describes the epidemiological, clinical and immunohistochemical characteristics of canine lymphomas diagnosed in the region of Porto Alegre. Thirty dogs were enrolled in the study; the majority of the dogs were male (60%), mixed-breed (23%) and middle-aged to older. The B-cell phenotype was most frequently detected (62%); 37% of the animals were in clinical stage IV, and 83% were classified as sub-stage “b”. Lymphadenopathy was observed in 67% of the cases, and dyspnea, prostration, decreased appetite and vomiting were the most common clinical signs encountered. Anemia was a frequently encountered laboratory alteration (57%), as were leukocytosis (40%), thrombocytopenia (33%), lymphopenia (30%), hyperglobulinemia (20%) and hypercalcemia (13%). The results of this study indicate that the clinical features of dogs with lymphoma in the region of Porto Alegre are similar to those observed worldwide.

Index terms: lymphoma, cancer, paraneoplastic syndromes, clinical signs, immunohistochemistry, dog.

INTRODUCTION

Lymphoma is the most common canine hematopoietic neoplasm, with reported incidences of 24 to 33 cases per 100,000 dogs (Dorn et al. 1967, Teske 1994). In Brazil, lymphoma is the second most common canine neoplasm leading to death or euthanasia (Figuera et al. 2008). Although in recent years considerable advances have been made in the treatment of canine lymphoma, it is important to establish a standard diagnostic approach to properly identify the disease and to formulate a correct prognosis and adequate therapeutic protocol (Gavazza et al. 2008).

According to the World Health Organization, canine lymphomas can be classified into five clinical stages and two sub-stages, reflecting the degree of involvement of affected organs and the clinical signs presented by the animal, respectively. The anatomic forms of canine lymphoma in order of occurrence are multicentric, mediastinal, alimentary, cutaneous and extranodal forms (Vail & Yong 2007). The immunophenotype is also related to prognosis and most canine lymphomas are type B (Fournel-Fleury et al. 1997, Vezzali et al. 2009, Ponce et al. 2010). Moreover, lymphoma can lead to paraneoplastic syndromes that can affect the outcome of the patient (Vail & Young 2007). The clinical features of human lymphoma vary

among different countries and regions (Fisher & Fisher 2004); it is possible that such variation also occurs in veterinary medicine.

The purpose of this study was to describe the epidemiological, clinical and immunohistochemical features of canine lymphomas diagnosed in the region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Thirty dogs were enrolled in the study. The dogs were diagnosed with lymphoma cytologically or histologically between May of 2010 and May of 2012 at the veterinary clinical hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul. This study was approved by the ethical review committee (protocol number 18391-CEUA-UFRGS), and informed consent was obtained from each patient's owner. Data from anamnesis was collected to evaluate the occurrence of clinical signs. All dogs underwent a physical examination and diagnostic work-up; whole blood was collected in 4 mL non-additive and in 3 mL EDTA tubes from cephalic and jugular veins. The exams performed included complete blood count (CBC) with differential and platelet count, serum biochemical analysis (albumin, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine phosphokinase, creatinine, alkaline phosphatase, glucose, fructosamine, total protein, urea, globulins, protein electrophoresis, calcium, and lactate dehydrogenase), and abdominal ultrasonography. A bone marrow evaluation was performed in 24 out of the 30 dogs. In three dogs, bone marrow examination was not possible due to repeated dry taps. In three other animals, this procedure was not authorized by the owners. Bone marrow aspirates were performed before starting chemotherapy. The animals were anesthetized (tramadol as preanesthetic and propofol for the induction and maintenance of anesthesia) and the aspiration was performed, preferably from the iliac crest or the proximal humerus.

The diagnosis of lymphoma was based on fine-needle biopsies and cytological examination of enlarged lymph nodes or other affected organs. In 25 dogs, a lymph node sample was collected with a thick needle (40 mm x 1.2 mm). In addition, a small intestine sample was collected from one dog. Immunohistochemistry was not performed in three animals: in two dogs because samples with a thick needle were not collected and in one dog because the spleen was involved and the owner therefore did not authorize the procedure. The tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin wax. Phenotyping of lymphomas was performed with CD3

antibodies¹ to identify T-cells and PAX5² to identify B-cells. A standard avidin-biotin-immunoperoxidase procedure was implemented (Arespacochaga et al. 2007, Vezzali et al. 2009, Ponce et al. 2010) and is described above. Endogenous peroxidase and avidinas blockage was performed with a 30 ml H₂O₂ and 70 ml methanol solution for 15 minutes, and followed by two washes of five minutes in phosphate buffered saline with Tween 20 detergent (PBST). Antigen retrieval was performed in moist heat \pm 90°C for 20 minutes, cooling at room temperature for at least 20 minutes, followed by two 5 minute washes in PBS. Inespecific reactions blockade was done by incubating the slides in commercial milk powder diluted in PBST for 25 minutes. As primary antibodies CD3¹ or PAX5² were used, diluted 1:300 and 1:100 in PBST, respectively, followed by two PBST washes of 5 minutes. The secondary antibody (Goat anti Mouse Biotinilado) was used consecutively, incubated at 25°C for 30 minutes diluted in PBST 1:100 and marked by adding the chromogen tetrachloride 3-3 'diaminobenzidine (DAB) for five minutes. To the amplification and accentuation of the reaction, Avidin-Biotin peroxidase technique was performed, followed by two washings of 5 min in PBS. The washings between the technique steps were performed with PBST at pH 7.6. Counterstaining was performed with Harris hematoxylin. As positive controls, hepatocytes and bile ducts were used, in areas not affected by the tumor and in the same histological sections (internal control), as liver samples of a normal adult dog fixed in 10% formalin for approximately eight hours. As a negative control, the same sections were used, with replacement of primary antibody by PBST.

The anatomical form and the clinical stage of the cases were based on the results of physical examination and diagnostic work-up according to the World Health Organization (Owen 1980). The cutaneous form was classified as clinical stage V. Paraneoplastic syndromes were evaluated based on laboratory tests and physical examinations. The body condition of the dog was evaluated at the time of diagnosis and assigned a value on a scale of 1 to 5 (Kronfeld et al. 1991).

Descriptive statistics were used to describe population characteristics and the occurrence of clinical signs and laboratory abnormalities. The categorical data were expressed as frequencies and quantitative variables were expressed as the means and standard deviations or minimum and maximum values.

¹ Dako Cytomation S3020[®], Dako Cytomation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA, USA.

RESULTS

A total of 30 dogs - 18 males (60%) and 12 females (40%) - were diagnosed with lymphoma during the study period. Characteristics of these dogs are shown in Table 1. The mean age of the subjects was 9 years (range from 3 to 14) and the mean weight was 19.5 kg (range from 2 to 48 kg). The majority of the animals were mixed breed (n=7 - 23.3%). Breeds represented included Poodle (n=5), Labrador Retriever (n=3), Boxer (n=2), Rottweiler (n=2), Bichon Frise (n=2), Shih Tzu, Weimaraner, Saint Bernard, Brazilian terrier, Bull Terrier, German Shepherd, Bulldog, Chow Chow and Scottish Terrier (n=1 each). Multicentric lymphoma was the most frequently encountered anatomical form, occurring in 26 dogs (87%). Two dogs were diagnosed with the cutaneous form (7%), one dog with the intestinal form (3%) and one with the splenic form (3%).

Immunohistochemical evaluation of samples showed that the majority of tumors were B phenotype lymphomas, occurring in 16 dogs (62%). T-cell lymphoma occurred in 10 dogs (38%). All B-cell immunophenotypes were multicentric lymphomas, and the T-cell types were multicentric (7), cutaneous (2) and intestinal (1).

One dog (3%) was classified as being in stage I, 10 dogs (33%) in stage III, 11 dogs (37%) in stage IV and 8 dogs (27%) in stage V. Five dogs were classified as being in sub-stage "a" (17%) and 25 in sub-stage "b" (83%). Lymphadenopathy was observed in 67% of the dogs. Other frequent clinical signs included dyspnea (36%), prostration (32%), decreased appetite (32%), vomiting (32%), emaciation (16%), gagging (16%), skin lesions (8%), anorexia (8%), diarrhea (8%), polydipsia (4%), cough (4%) and increased abdominal volume (4%). No dog showed cancer cachexia; however, 16 dogs (53%) had a body condition score of 2 (out of 5), which is considered underweight.

The alterations in laboratory values and reports of paraneoplastic syndromes observed in this study are shown in Table 2. Anemia was frequently observed, as was leukocytosis, thrombocytopenia, lymphopenia, hyperglobulinemia and hypercalcemia.

Table 1. Population characteristic of dogs with lymphoma diagnosed in Porto Alegre,

RS – Brazil

Number	Breed	Age (years)	Weight (kg)	Sex	Type	Stage	Sub- stage	IH
1	Mixed breed	13	19.3	Male	multicentric	V	b	B
2	Poodle	11	6	Female	multicentric	III	a	B
3	Mixed breed	8	8.5	Female	multicentric	I	b	T
4	Labrador	9	48	Male	multicentric	III	b	B
5	Weimaraner	9	36	Male	multicentric	III	b	T
6	Poodle	14	14	Male	multicentric	V	b	B
7	Fox zebrafish	12	7.4	Female	multicentric	IV	a	B
8	Mixed breed	9	10.7	Male	multicentric	IV	b	B
9	Rottweiler	10	45	Female	multicentric	III	a	B
10	Mixed breed	7	10	Male	multicentric	III	b	T
11	Scottish terrier	9	8.5	Female	multicentric	IV	a	B
12	Mixed breed	7	11.4	Male	multicentric	V	b	B
13	Poodle	14	2	Female	multicentric	III	b	T
14	Bichon frise	13	10	Male	multicentric	V	b	B
15	Boxer	6	31.5	Male	multicentric	III	b	-
16	Bullterrier	3	23	Male	multicentric	III	b	B
17	Labrador	5	31	Male	multicentric	IV	b	B
18	Saint Bernard	8	41.5	Male	multicentric	IV	b	B
19	Poodle	7	12.3	Female	cutaneous	V	b	T
20	Labrador	12	35	Female	multicentric	III	b	T
21	Rottweiler	7	33.2	Female	splenic	IV	b	-
22	Boxer	6	25.7	Female	multicentric	IV	b	B
23	Shih Tzu	7	8	Male	multicentric	IV	b	-
24	German shepherd	9	39	Male	multicentric	III	a	B
25	Bichon frise	6	6.9	Male	multicentric	IV	b	T
26	Mixed breed	8	11.3	Male	cutaneous	V	b	T
27	Mixed breed	14	8.2	Female	intestinal	V	b	T
28	Poodle	13	5	Male	multicentric	IV	b	-
29	Bulldog	3	20	Female	multicentric	IV	b	T
30	Chow chow	12	21	Male	multicentric	V	b	B

*IH=immunohistochemistry

Table 2. Occurrence of laboratory abnormalities and paraneoplastic syndromes in 30 dogs with lymphoma

Type	Reference value	Number of animals	%
Anemia	Hematocrit < 37%	17	57
Leukocytosis	Leukocytes > 17,000/ μ L	12	40
Leukopenia	Leukocytes < 6,000/ μ L	2	7
Thrombocytopenia	Platelets < 200 x 10 ³ / μ L	10	33
Thrombocytosis	Platelets > 500 x 10 ³ / μ L	1	3
Lymphopenia	Lymphocytes < 1,000/ μ L	9	30
Lymphocytosis	Lymphocytes > 4,800/ μ L	2	7
Hyperglobulinemia	Globulin > 44 g/L	6	20
Hyperproteinemia	Total protein > 71 g/L	5	17
Gammopathy	Gamma globulin > 1.8 g/dL	2	7
Hypercalcemia	Calcium > 11.3 mg/dL	4	13

DISCUSSION

The results of this study demonstrated that the majority of dogs with lymphoma in Porto Alegre had the multicentric form with a B phenotype. These data are consistent with results of other studies worldwide. The multicentric form, reported to be the most common anatomical form of lymphoma in dogs and occurring in 68 to 91% of dogs with lymphoma (Sequeira et al. 1999, Cardoso et al. 2003, Ponce et al. 2010), occurred in 87% of cases, similar to another study performed in Brazil, where the multicentric form occurred in 93% of the dogs (Figuera et al. 2006). Some studies have demonstrated that the mediastinal form is the second most frequently anatomical form in dogs, occurring in 6 to 10% of the cases (Sequeira et al. 1999, Cardoso et al. 2003), but this form was not observed in the present study. The cutaneous form represented 7% of all lymphomas diagnosed in dogs in this study; other studies have found variability in the frequency of this type, with values ranging from 1.7 to 12.3% in other countries (Gavazza et al. 2008, Ponce et al. 2010) and in other Brazilian studies (Sequeira et al. 1999, Cardoso et al. 2003, Figuera et al. 2006). The intestinal and splenic forms occurred once each in this study and are considered uncommon in dogs (Gavazza et al. 2008). Ponce et al. (2010) reported an incidence of 1.8% of the splenic form and 1.5% of the intestinal form.

The B-cell lymphoma was the most common immunophenotype in dogs in Porto Alegre, occurring in 62% of the cases evaluated. There are few studies assessing immunohistochemistry of lymphomas in Brazil. Two studies showed a higher occurrence of T immunophenotypes, with prevalences of 53.5 to 60.2% (Moura 2000, Moreno & Bracarense 2007). The findings of the present study are more similar to those observed in France (Ponce et al. 2010) and Austria (Arespacochaga et al. 2007), where 63.8% of cases were of the B-cell type, though other studies in Europe reported even higher frequencies (from 74 to 80%) of the B-cell immunophenotypes (Fournel-Fleury et al. 1997, Vezzali et al. 2009). Therefore, more studies with larger numbers of dogs should be conducted in Brazil to evaluate the incidence and possible regional variations of T-cell lymphomas.

In this study, dogs were most frequently middle-age to older (mean age 9 years). It is known that lymphomas affect dogs of all ages, predominantly those of middle age (Teske 1994). Studies have documented mean ages ranging from 6.2 to 8.9 years in dogs with lymphoma (Dorn et al. 1967, Sequeira et al. 1999, Dobson et al. 2001). Age-specific incidence rates calculated in the USA included 1.5/100,000 in dogs less than one year old and more than 80/100,000 in dogs 10 years old (Dorn et al. 1967).

Although no gender tendency is associated with lymphoma in dogs, males (63%) were predominant in this study, equal to another study conducted in southern Brazil (Figueira et al. 2006). This finding is in agreement with another study performed in Brazil where 61% of dogs with lymphoma were male (Cardoso et al. 2003) and with results from other countries where the proportion of males varied from 53% to 58% (MacEwen et al. 1987, Dobson et al. 2001).

Dobson et al. (2001) observed a mean weight of 31.6 kg (SD=14 kg) in dogs with lymphoma; in this study, the mean weight of affected animals was 19.5 kg, which reflects the occurrence of lymphoma in both small and large breeds. Some small breeds that frequently experience lymphoma include the Poodle and Scottish Terrier (MacEwen et al. 1987, Dobson et al. 2001), which were represented in this study. However, excluding the mixed breed animals, 59% of the dogs in this study were large breed, including the most frequently diagnosed Boxer, Rottweiler and German Shepherd (Dobson et al. 2001, Pastor et al. 2009). Pastor et al. (2009) and Ponce et al. (2010) documented a significant overrepresentation of Boxers with T-cell lymphomas; however, the Boxer in this study had a B-cell lymphoma. Pastor et al. (2009) also reported that German Shepherds and Rottweilers are predisposed to B-cell lymphomas; our results seem to support this observation, as all dogs of these breeds had the B-cell phenotype.

Unlike the status of lymphoma in human medicine, clinical stages IV and V are the most frequently detected stages in dogs, occurring in 51.9 to 74.2% of all cases (MacEwen et al. 1987, Cardoso et al. 2003, Gavazza et al. 2008, Cápua et al. 2011). According to bone marrow evaluation, a technique that is fundamental to the correct clinical staging of lymphomas (Teske 1994), 63.3% of the animals were classified as being in clinical stages IV or V in our study. In addition, 23.33% of the animals in this study were in stage V; in other studies, the percentages of animals in stage V were similar, ranging from 18 to 29% (MacEwen et al. 1987, Cardoso et al. 2003), though one study reported a percentage of only 4.3% (Dobson et al. 2001). Studies performed in the USA evaluating the sub-stage of dogs with lymphoma showed a high percentage of dogs in sub-stage "a" (Valerius et al. 1997, Chun et al. 2000, Garret et al. 2002). In Italy, Dobson et al. (2001) reported an incidence of 49% of animals in sub-stage "a" and 51% in stage "b". In our work, 17% of the animals were in sub-stage "a", and the majority (83%) showed clinical signs compatible with sub-stage "b"; these findings are in accordance with the findings of Cápua et al. (2011) in Brazil, who found 33% of

subjects to be in sub-stage “a” and 67% in sub-stage “b”. The higher incidence of symptomatic animals in Brazil may be related to the fact that owners may not observe enlarged lymph nodes in their animals as early as owners in other countries and may have less access to veterinary services.

The clinical signs associated with canine lymphoma are variable and depend on the location of the tumor. In the multicentric form, a generalized painless lymphadenopathy is the most consistent finding, associated or not with non-specific signs such as depression and emaciation (Teske 1994). Lymphadenopathy was frequently observed in this study (67%), associated with non-specific signs such as prostration, decreased appetite, emaciation and anorexia. These findings are similar to those reported in other studies (Cardoso et al. 2004a, Gavazza et al. 2008, Figuera et al. 2006). However, a large number of patients also showed signs of respiratory distress, such as dyspnea and gagging, which are frequently detected in animals with the mediastinal form (Teske 1994) which was not observed in our study. Nevertheless, the multicentric form may lead to an enlargement of thoracic lymph nodes, which can cause a pleural effusion (Cardoso et al. 2004a). In addition, the increased size of the retropharyngeal and submandibular lymph nodes can cause gagging, as observed in this study.

Anemia was the most frequently encountered laboratory abnormality in this study, occurring in 57% of the animals. Other studies detected anemia in 32 to 48% of dogs with lymphoma (Cardoso et al. 2004b, Gavazza et al. 2008, Miller et al. 2009). The increased number of anemic patients in this study was most likely due to their more advanced clinical stage and sub-stage. Anemia detected in patients with lymphoma is generally consistent with a chronic disease, but can also be related to hemolysis or be of bone marrow origin (Vail & Young 2007). Other frequent alterations observed in the CBC of dogs with lymphoma included leukocytosis (40%), thrombocytopenia (33%) and lymphopenia (30%). Leukocytosis is often detected in dogs with lymphoma, reflecting the inflammatory condition related to the tumor (Cápua et al. 2011). Thrombocytopenia occurs in 15 to 56% of dogs with lymphoma and is related to the immune-mediated destruction and/or bone marrow involvement (Cardoso et al. 2004b, Cápua et al. 2011). Lymphopenia (30%) was a common finding in this study and was encountered more often than lymphocytosis (7%) and occurs due to sequestration of lymphocytes because of lymph stasis (Latimer & Prasse 2003). Lymphocytosis has been observed in 20 to 22% of dogs with lymphoma (Cardoso et al. 2004b, Cápua et al.

2011), but in animals with leukemic lymphoma, the occurrence increases to 86% (Tasca et al. 2009). Although not a common finding in our study, atypical lymphocytes were detected in 17% of the cases, all of them with bone marrow involvement.

Along with changes in blood count, other frequent paraneoplastic syndromes observed in dogs with lymphoma include hypercalcemia and gammopathy (Morrison 1979, Vail & Young 2007), both of which were detected in this study. Studies have reported hypercalcemia in 7 to 45% of dogs with lymphoma (Gavazza et al. 2008, Messinger et al. 2009) in similar proportions to those encountered in this study (13%). According to Messinger et al. (2009), lymphoma is the main cause of increased concentrations of serum ionized calcium in dogs. Protein abnormalities were also frequently detected in this study. While hyperglobulinemia was common (20%), the evaluation of the fractions with protein electrophoresis showed that only 7% of the animals had a gammopathy. Cardoso et al. (2004b) also reported 20% of cases with hyperglobulinemia; however, protein electrophoresis was not performed in their study. The excessive increase in production of immunoglobulin G interferes with platelet function, causing coagulation disorders and a hyperviscosity syndrome, which can lead to neurological, cardiac and renal disorders (Figuera et al. 2002). However, no animal in this study showed clinical signs related to gammopathy.

According to Bergman (2007), cancer cachexia occurs frequently in human medicine, with an incidence of 40 to 90% in hospitalized patients. Although no animal presented with cachexia at the diagnosis of lymphoma in this study, 53% of the animals were malnourished. Few studies have evaluated cachexia and anorexia in dogs with lymphoma. A study performed in an oncology veterinary service reported that 4% of patients with cancer had cachexia and 15% had muscle loss (Michel et al. 2004). In Brazil, one study observed that 71% of dogs with lymphoma had experienced weight loss (Ramos et al. 2008), in similar proportions to those observed in our study. It is likely that this higher occurrence of malnutrition in dogs with lymphoma in Brazil is due to the delay in recognizing the disease by the owners; however, more studies evaluating this paraneoplastic syndrome in dogs with lymphoma must be performed to evaluate this condition and ascertain whether there is a correlation between the condition and the animal's prognosis, as in human oncology.

CONCLUSION

The results of this study indicate that the epidemiological and clinical characteristics of dogs with lymphoma in the region of Porto Alegre are similar to those observed around the world. The multicentric form and the immunophenotype B predominated, and males and dogs of medium to large size were more frequently affected. There was a higher incidence of dogs showing clinical signs, and the main laboratory abnormalities observed were changes in blood count, hypercalcemia and hyperproteinemia. Further studies must be conducted in Brazil to evaluate whether there is regional variation in immunophenotyping of dogs with lymphoma.

REFERENCES

- Arespachoga A.G., Schwendenwein I. & Weissenböck H. 2007. Restrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J. Comp. Path.* 136(2-3):186-192.
- Bergman P.J. 2007. Paraneoplastic syndromes. In: Withrow, Macewen's. *Small Animal Clinical Oncology*. Saint Louis: Saunders Elsevier. Cap 5, p.77-90.
- Cápuá M.L.B., Coleta F.E.D., Canesin A.P.M.N., Godoy A.V., Calazans S.G., Miotto M.R., Daleck C.R. & Santana, A.E. 2011. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo Madison-Wiscosin. *Ciência Rural*. 41(7):1245-1251.
- Cardoso M.J.L., Machado L.H.A., Rocha N.S., Moutinho F.Q. & Ciampolini P. 2003. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. *Biosci. J.* 19(3):131-142.
- Cardoso M.J.L., Machado L.H.A., Moutinho F.Q. & Padovani C.R. 2004a. Sinais clínicos do linfoma canino. *Arch. Vet. Science.* 9(2):19-24.
- Cardoso M.J.L., Machado L.H.A., Moutinho F.Q. & Padovani C.R. 2004b. Linfoma canino – achados clínico-patológicos. *Arch. Vet. Science.* 9(2):25-29.
- Chun R., Garret L.D. & Vail D.M. 2000. Evaluation of a high dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J. Vet. Inter. Med.* 14(2):120-124.
- Dobson J.M., Blackwood L.B., McInnes E.F., Bostock D.E., Nicholls P., Hoather T.M. & Tom B.D.M. 2001. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J. Small. Anim. Pract.* 42(8):377-384.
- Dorn C.R., Taylor D.O.N. & Hibbard H.H. 1967. Epizootic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am. J. Vet. Res.* 28(125):993-1001.

- Eberle N., Babo V., Nolte I., Baumgärtner W. & Betz D. 2012. Splenic masses in dogs: epidemiological, clinical characteristics as well as histopathologic diagnosis in 249 cases (2000-2011). *Tierärztliche Praxis Kleintiere*. 40(4):250-260.
- Figuera R.A., Souza T.M. & Barros C.S.L. 2002. Linfossarcoma em cães. *Ciência Rural*. 32(5):895-899.
- Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965-2004). *Pesq. Vet. Bras*. 28(4):223-230.
- Fisher S.G. & Fisher R.I. 2004. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 23(38):6524-6534.
- Fournel-Fleury C., Magnol J.P., Bricaire P., Marchal T., Chabanne L., Delverdier A., Bryon P.A. & Felman P. 1997. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J. Comp. Path.* 117(1):35-59.
- Garret L.D., Thamm D.H., Chun R., Dudley R. & Vail D.M. 2002. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 16(6):704-709.
- Gavazza A., Lubas G., Valori E. & Gugliucci B. 2008. Restrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Vet. Res. Commun.* 32(S1):S291-S293.
- Kronfeld D.S., Donoghue S. & Glickman L.T. 1991. Body condition and energy intakes of dogs in a referral teaching hospital. *J. Nutr.* 121(S11):S157-S158.
- Latimer K.S. & Prasse K.S. 2003. Leukocytes, p.46-79. In: Latimer K.S., Mahaffey E.A. & Prasse K.W. (Eds), *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 4th ed. Iowa State Press, Iowa.
- MacEwen E.G., Hayes A.A., Matus R.E. & Kurzman I. 1987. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *J.A.V.M.A.* 190(5):564-568.
- Messinger J.S., Windham W.R. & Ward C.R. 2009. Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). *J. Vet. Intern. Med.* 23(3):514-519.
- Michel K.E., Sorenmo K. & Shofer F.S. 2004. Evaluation of body condition and weight loss in dogs presented to a veterinary oncology service. *J. Vet. Intern. Med.* 18(5):692-695.

- Miller A.G., Morley P.S., Rao S., Avery A.C., Lana, S.E. & Olver C.S. 2009. Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 23(1):116-122.
- Moreno K. & Bracarense A.P.F.R.L. 2007. Linfoma canino de células T: aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de 38 casos. *Baz. J. Vet. Anim. Sci.* 44(S):103-110.
- Morrison W.B. 1979. Paraneoplastic syndromes of the dog. *J.A.V.M.A.* 175(6):559-561.
- Moura V.M.B.D. 2000. Classificação citohistológica e imunofenotipagem dos linfomas caninos. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 107p.
- Owen L.N. 1980. TNM Classification of tumours in domestic animals. 1st ed. World Health Organization, Geneva. 53p.
- Pastor M., Chalvet-Monfray K., Marchal T., Keck G., Magnol J.P., Fournel-Fleury C. & Ponce F. 2009. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed association and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J. Vet. Intern. Med.* 23(2):301-310.
- Ponce F., Marchal T., Magnol, J.P., Turinelli V., Ledieu D., Bonnefont C., Pastor M., Delignette M.L. & Fournel-Fleury C. 2010. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet. Pathol.* 47(3):414-433.
- Ramos R.S., Machado L.H.A., Conceição L.C. & Heckler M.C.T. 2008. Estudo da prevalência das principais síndromes paraneoplásicas de 14 cães com linfoma – relato de casos. *Vet. Zootec.* 15(3):38-39.
- Sequeira J.L., Franco M., Bandarra E.P., Figueiredo L.M.A. & Rocha N.S. 1999. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. *Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.* 51(3):245-250.
- Tasca S., Carli E., Caldin M., Menegazzo L., Furlanello T. & Gallego L.S. 2009. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). *Vet. Clin.Pathol.* 38(1):2-12.
- Teske E. 1994. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet. Quaterly.* 16(4):209-219.
- Vail D.M., Young K.M. 2007. Hematopoietic tumors. In: Withrow, Macewen's. *Small Animal Clinical Oncology.* Saint Louis: Saunders Elsevier. Cap 31, p.699-733.

Valerius K.D., Ogilvie G.K., Mallinckrodt C.H. & Getzy D.M. 1997. Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). *J.A.V.M.A.* 210(4):512-516.

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

4.2 Artigo 2

Prognostic features that correlate with survival and relapse in canine lymphoma: a prospective study

E. B. Neuwald¹, L. V. Teixeira¹, F. O. Conrado², M. O. D. Silva³, N. R. C. Hlavac¹, F. H. D. González⁴

¹ MV, MSc, Veterinary Science Post-graduation Program of Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

² MV, Veterinary Science Post-graduation Program of Paraná Federal University (UFPR), Rua dos Funcionários, 1540, CEP 80035-050, Curitiba, PR, Brazil.

³ Graduate student of Veterinary Medicine Faculty (FAVET) of UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ MV, MSc, PhD, Professor of Veterinary Clinical Pathology Department, FAVET, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: E. B. Neuwald, eneuwald@ibest.com.br

ABSTRACT

Haematological and biochemical parameters and clinical variables were investigated at the time of diagnosis of lymphoma in 30 dogs to determine the relationship of each variable to the prognosis. When each variable was tested for its influence on survival using univariate Cox's regression, dogs with alterations in serum β -2 protein electrophoresis fraction ($P= 0.013$) and platelet count ($P= 0.022$), a diagnosis of World Health Organization clinical stages IV-V ($P= 0.019$) and a body condition score of 1-2 ($P= 0.038$) showed significantly shorter survival times. With respect to an analysis of relapse, univariate analysis revealed that those animals that had hypercalcaemia ($P= 0.009$), an increase in mean corpuscular volume ($P< 0.001$) and thrombocytopenia ($P= 0.002$) showed shorter remission times. Although not statistically significant, there was a tendency towards a decrease in packed cell volume values prior to the relapse episode. Hypercalcaemia, anaemia and the WHO clinical stage have already been reported to affect prognosis in dogs with lymphoma; however, this is the first study to demonstrate that platelet counts, protein electrophoresis profiles and low body corporal scores can predict shorter survival and remission times. In conclusion, these biochemical, haematological and clinical evaluations can easily be performed by clinicians upon the

initial presentation of the disease and may help in determining a prognosis for dogs with lymphoma.

INTRODUCTION

Lymphoma is a commonly detected tumour in dogs that causes 83% of all canine hematopoietic malignancies (Vail and Young 2007). As in human medicine, the incidence of lymphoma in the canine population is rising, most likely due to the improvements in diagnostic procedures and treatment, the increasing longevity of the pet dog population and the exposure to environmental risk factors (Fisher and Fisher 2004, Marconato and others 2011). The clinical behaviour of canine lymphoma is aggressive; however, it is one of the most chemoresponsive neoplasms in dogs (Greenlee and others 1990, Teske 1994). Numerous protocols have been used in dogs (Baskin and others 2000, Ponce and others 2004, Hosoya and others 2007, Fahey and others 2011, Flory and others 2011), but only 10% of affected animals survive for 2 years or more (Marconato and others 2011).

Despite the high frequency of positive responses to the chemotherapy, curative treatment remains uncertain for most dogs with lymphoma because many factors affect the response of an individual to treatment (Vail and Young 2007, Marconato and others 2011). There have been many attempts to identify factors that predict therapeutic responses in canine lymphoma. However, across different studies, few factors have consistently correlated with treatment response; with regard to immunophenotypes, the greatest survival times have been observed in dogs with B-cell lymphoma (Greenlee and others 1990, Dobson and others 2001, Marconato and others 2011). Based on evaluations of only haematological and biochemical parameters, dogs with lymphoma showed reduced survival times when anaemia (Abbo and Lucroy 2007, Miller and others 2009) and increased lactate dehydrogenase (LDH) activity (Zanatta and others 2003) were manifest. However, these findings were not confirmed by a more recent study (Marconato and others 2010). Some studies have also noted that serum α 1-acid glycoprotein, C-reactive protein and LDH activity were useful for predicting relapse before recurrence of clinically detectable disease in dogs with lymphoma undergoing chemotherapy (Hahn and others 1999, Nielsen and others 2007, Marconato and others 2010). Another study demonstrated that increases in alkaline phosphatase activity were not related to prognosis or relapse in dogs with lymphoma (Wiedemann and others 2005), whereas Price and others (1991) observed that the remission duration was shorter

in dogs that received glucocorticoids prior to the initiation of chemotherapy. When evaluating protein abnormalities in dogs with lymphoma, only one study has shown that dogs presenting with hypoalbuminaemia exhibited shorter remission times than normoalbuminaemic dogs (Price and others 1991).

The purpose of this study was to identify haematological and biochemical factors at the time of diagnosis that may help determine the prognosis for dogs with lymphoma. Additionally, other variables, such as gender, weight, age, World Health Organisation (WHO) clinical stage and sub-stage, body condition score, anatomical location and immunophenotype, were also evaluated to assess their relationship to survival and latency to recurrences in dogs with lymphoma. LDH activity and packed cell volume (PCV) were also evaluated during chemotherapy for up to one year after diagnosis to assess their value as predictive factors of relapse

MATERIALS AND METHODS

Study population

Thirty dogs with cytological and histopathological diagnoses of lymphoma during the period of May 2010 to May 2012 that were treated in a veterinary clinical hospital were recruited to participate in this study, which was approved by the ethical review committee (Project n° 18391 CEUA/UFRGS). Informed consent was provided by all owners. All animals underwent a complete physical examination, haematological and biochemical analyses, abdominal ultrasonography, electrocardiography and echocardiography at the time of diagnosis. Thoracic radiographs were performed in those animals showing respiratory signs. Bone marrow aspirate smears were evaluated in 24 of these 30 lymphoma cases. This procedure was performed under anaesthesia, and the samples were collected from the iliac crest or humerus. In three dogs, the sample was inappropriate and the analysis was not possible, and in three other animals, this procedure was not authorised by the owners. The data from anamneses, clinical evaluations and laboratory tests were used to classify the lymphoma according to WHO criteria (Owen 1980). The body condition score was determined at the time of diagnosis based on a five-point scale (Kronfeld and others 1991).

Chemotherapy was recommended for all animals; the basic protocol was the 19-week CHOP protocol showed in Table 1 (Vail and Young 2007). This protocol included treatment with prednisone, vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin. The animals diagnosed with heart disease underwent a COP protocol as shown in Table 2 (Lanore

and Delprat 2004) without doxorubicin due to its cardiotoxic effects. Upon completion of four cycles of the COP protocol, the animals were switched to a maintenance protocol and received chemotherapy every two weeks. After each cycle of chemotherapy, the animals were re-evaluated clinically and the laboratory tests were repeated. A complete blood count (CBC) was performed when complications were detected during the chemotherapy cycles, such as vomiting, diarrhoea, lack of appetite or pyrexia. Echocardiograms, electrocardiograms, chest radiographies and abdominal ultrasonographies were performed based on the evolution of each case. When a relapse occurred, two new cycles using vincristine, prednisone, cyclophosphamide and doxorubicin were performed. If a relapse occurred during the period of the first chemotherapeutic protocol or in those animals receiving the COP protocol, L-asparaginase (400 mg/kg IM) was added to the protocol. Lomustine (90 mg/m² PO each four weeks) was used in cases with cutaneous lymphomas.

Table 1. Chemotherapy protocol, re-evaluations and exams performed in 26 animals with lymphoma and without heart disease at the time of diagnosis.

Week	Drug – dose
1	Vincristine 0.7 mg/m ² IV Prednisone 2 mg/kg PO SID
2	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO Prednisone 1.5 mg/kg PO SID
3	Vincristine 0.7 mg/m ² IV Prednisone 1 mg/kg PO SID
4	Doxorubicin 30 mg/m ² IV Prednisone 0.5 mg/kg PO SID
5	<u>Re-evaluation and exams</u>
6	Vincristine 0.7 mg/m ² IV
7	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO
8	Vincristine 0.7 mg/m ² IV
9	Doxorubicin 30 mg/m ² IV
10	<u>Re-evaluation and exams</u>
11	Vincristine 0.7 mg/m ² IV
12	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO
13	Vincristine 0.7 mg/m ² IV
14	Doxorubicin 30 mg/m ² IV
15	<u>Re-evaluation and exams</u>
16	Vincristine 0.7 mg/m ² IV
17	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO
18	Vincristine 0.7 mg/m ² IV
19	Doxorubicin 30 mg/m ² IV
20	<u>Re-evaluation and exams</u>

IV: intravascular, PO: oral administration, SID: once a day.

All dogs were observed on a weekly or monthly basis and were categorised based on their response to chemotherapy as follows: complete response (CR) with complete regression (100%) of all palpable lymph nodes (or tumour masses for extranodal lymphomas); partial response (PR) with greater than 50% but less than 100% regression of palpable lymph nodes (or tumour masses for extranodal lymphomas); or no response (NR) with an increase in size or less than 50% regression of the lymph nodes (or tumour masses for extranodal lymphomas).

Table 2. COP chemotherapy protocol performed in those animals that had heart disease.

Week	Vincristine 0.7 mg/m ² IV	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO	Prednisone
1	X	X	2 mg/kg/day SID
2	X		1.5 mg/kg/day SID
3	X		1 mg/kg/day SID
4	X	X	0.5 mg/kg/day SID
5	Re-evaluation and exams		
6	New cycles without prednisone until 4 cycles were completed in total		

IV: intravascular, PO: oral administration, SID: once a day.

Haematological and biochemical analyses

Blood samples were collected after an 8-hour fast from the jugular, cephalic or saphenous vein using a vacuum system. Blood was collected into EDTAK₂ tubes for CBC and serum tubes for biochemical profile analyses. In all anaemic animals, a reticulocyte count was performed. Biochemical analyses included albumin, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine phosphokinase, creatinine, alkaline phosphatase, fructosamine, glucose, total protein, urea, calcium, and LDH levels as well as protein electrophoresis. All analyses were performed prior to treatment and after each chemotherapy cycle. For animals that completed the therapy, laboratory tests were repeated every two months for one year after their diagnosis. If a relapse occurred, monthly evaluations were performed during chemotherapy. The PCV and LDH values during and after chemotherapy were used to assess the ability to predict relapse in those animals with complete remission.

Immunohistochemical study

Tissue sections were obtained for immunohistochemistry from 26 dogs. Twenty five lymph node samples were collected using a thick needle (40 mm H 1.2 mm) at the

time of bone marrow aspiration. An additional sample was obtained from surgical biopsies of the small intestine. All tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin wax. Immunophenotyping was performed using anti-CD3 antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) to identify T-cells and anti-PAX5 (Dako) to identify B-cells. A standard avidin-biotin-immunoperoxidase procedure was performed as described previously (Arespacochaga and others 2007, Vezzali and others 2009, Ponce and others 2010).

Statistical methods

The Kolmogorof-Smirnoff test was used to assess the distribution of the variables. Descriptive statistics were used to describe the population characteristics. Age (< or > than 8 years), gender (male or female), weight (< or > than 15 kg), anatomic type (multicentric or not), clinical stage (I-III or IV-V), clinical sub-stage (a or b), body condition score (≤ 2 or ≥ 3), immunophenotype (B or T) and haematological and biochemical parameters were examined to determine their influence on the occurrence of relapse and survival time. Survival time was considered from diagnosis to the day of death or euthanasia. Time until relapse was considered the interval between diagnosis and tumour recurrence in those animals that achieved complete remission. Student's t tests were used to compare quantitative variables between groups, and Chi-squared tests were used to compare categorical data between groups (recurrence or survival). For the survival analyses, biochemical and haematological variables were examined using Cox's proportional hazards models and Kaplan-Meier survival curves. To assess the predictive value of LDH and PCV values for the recurrence of lymphoma in dogs without clinically detectable disease, the value of each at the time of recurrence and the preceding two values were compared with the final three values obtained in dogs that were in remission and that did not relapse using an analysis of variance for repeated measures. All statistical analyses were performed using SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences, version 18.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Study population

A total of 30 dogs, 18 males and 12 females, were diagnosed with lymphoma during the study period. The mean age was 9 years (ranging from 3 to 14 years), and the mean weight was 19.5 kg (ranging from 2 to 48 kg). The majority of the animals were

mixed breed (n=7). The breeds included Poodle (n=5), Labrador Retriever (n=3), Boxer (n=2), Rottweiler (n=2), Bichon Frise (n=2) and a Shih Tzu, Weimaraner, Saint Bernard, Brazilian Terrier, Bullterrier, German Shepherd, Bulldog, Chow-Chow and Scottish Terrier (n=1 each). Multicentric lymphoma was the most frequent anatomical form, and it occurred in 26 dogs (87%). Two dogs were diagnosed with cutaneous lymphoma (7%); one dog with the intestinal form (3%) and one dog with the splenic form (3%). One dog (3%) was in stage I, 10 (33%) were in stage III, 11 (37%) were in stage IV and eight (27%) were in stage V. Five animals were in sub-stage a (17%), and 25 were in sub-stage b (83%). With regard to their immunophenotype, 16 dogs were B-cell (62%) type and 10 were T-cell (38%) type. Immunohistochemical analysis was not performed in four animals.

The 19 week-CHOP protocol was performed in 26 animals. One animal was diagnosed with diabetes mellitus, heart disease was detected in four animals, three animals had chronic mitral regurgitation and one animal had sub-aortic stenosis. However, none of the animals showed clinical signs of cardiac abnormality; the animals with cardiac abnormalities underwent the COP protocol.

Survival analysis

Follow-up details are summarised in Table 3. At the time of data closure, nine animals were alive (30%). Eight animals survived for one year (27%), and two lived for more than two years (7%). The mean survival time for all dogs was 220 days (SD=235 days, ranging from 1 day to 977 days). Twenty one animals died (70%); 18 died due to progression of the lymphoma and three died due to other causes. When each variable was tested using univariate Cox's regression for its influence on survival (Table 4), a significant effect was observed for the serum β -2 fraction, determined by protein electrophoresis, and the platelet count. Animals with elevated or decreased β -2 protein (P= 0.013) and platelet counts (P= 0.022) showed significantly shorter survival times as did those animals in WHO stage IV-V (P= 0.019) and with a body condition score of 1-2 (P= 0.038) (Table 5). Other categorical variables (gender, age, weight, anatomical location, sub-stage and immunophenotype) did not have any statistically significant effect on survival in dogs with lymphoma (Table 5).

Relapse analysis

Complete remission was achieved in 18 animals (60%), and a partial response was achieved in four animals (13%). Of those animals that showed complete remission, 10 relapsed (33%). The mean remission duration for dogs in complete remission was

193.5 days. The occurrence of hypercalcaemia ($P= 0.009$), an increase in mean corpuscular volume ($P< 0.001$) and a decrease in platelets ($P= 0.002$) were all shown by univariate analysis to influence relapse (Table 6), and these animals showed shorter remission times. Gender, age, weight, anatomical location, body condition score, and WHO stage and sub-stage did not influence relapse (Table 7). With regard to immunophenotype, those animals with T-cell lymphoma were significantly protected against relapses ($P= 0.038$); however, of 10 dogs with T-cell lymphoma, only three animals showed a complete response and two relapsed. The other dogs with T-cell lymphoma showed no treatment response (intestinal, cutaneous and multicentric forms).

Table 3. Outcome in 30 dogs with lymphoma that received chemotherapy.

Current status	Number of cases	Comments	Survival analysis
Alive, tumour in CR	4	977, 775, 635, 418 days	Censored
Alive, relapse or without CR	5	400, 323, 300, 210, 178 days	Censored
Dead, tumour relapse or failure to respond	18	CR and relapse in 7 No response in 11	
Dead, tumour in CR at time of death	2	Cause of death: neurological lesion and aortic stenosis	Censored
Dead, initiating treatment	1	Cause of death: diabetes mellitus	Censored

CR: complete remission.

Table 4. Variables that influenced survival in dogs with lymphoma.

Variable	Reference	% of dogs dying	Mean survival time days (CI 95%)	P	Hr (CI 95%)
Elevated or decreased protein β -2	> 1.41 g/dL <0.59 g/dL	84%	186 (117-255)	0.013	5.54 (1.23-24.94)
Normal protein β -2	0.6-1.4 g/dL	25%	763(507-1018)		1
Elevated or decreased platelet count	$\geq 500.1H10^3/\mu L$ $\leq 199.9H10^3/\mu L$	82%	125 (66-185)	0.022	3.44 (1.12-10.52)
Normal platelet count	200-500H10 ³ / μL	60%	459 (290-627)		1

CI: confidence interval, Hz: hazard ratio.

There was no significant difference in LDH ($P= 0.196$) or PCV ($P= 0.065$) values between the 10 dogs showing complete remission and the eight relapsed dogs (Table 8). However, there was a tendency for PCV values to decrease prior to the relapse episode (Figure 1).

Table 5. Effect of the categorical variables measured in dogs with lymphoma on survival.

Variable	% of dying dogs	Mean survival time (days – CI 95%)	H _z (CI 95%)	P
Males	71%	247 (130-364)	2.05 (0.71-5.94)	0.177
Females	46%	548 (282-815)	1	
Stage I-III	36%	654 (407-900)	1	0.019
Stage IV-V	77%	173 (98-248)	3.58 (1.15-11.14)	
Sub-stage a	25%	755 (379-1132)	1	0.146
Sub-stage b	67%	295 (169-421)	4.02 (0.53-30.62)	
Multicentric	68%	447 (272-623)	1	0.447
Other location	75%	211 (0-432)	1.62 (0.46-5.65)	
B cell lymphoma	60%	477 (250-705)	1	0.611
T cell lymphoma	80%	293 (114-472)	1.3 (0.47-3.6)	
< 8 years	73%	227 (128-326)	1.33 (0.5-3.54)	0.572
>8 years	67%	455 (248-662)	1	
<15 kg	62%	476 (240-712)	1	0.314
>15 kg	79%	262 (120-405)	1.67 (0.61-4.59)	
BCS 1-2	80%	367 (91-242)	2.87 (1.02-8.04)	0.038
BCS > 3	57%	569 (335-803)	1	

CI: confidence interval, H_z: hazard ratio, BCS: body condition score.

DISCUSSION

This study revealed that some biochemical and haematological parameters assessed at the time of diagnosis correlated with survival time and relapse and may help determine a prognosis for dogs with lymphoma. Relatively few studies have correlated biochemical and CBC parameters with survival and recurrence in dogs with lymphoma (Zanatta and others 2003, Wiedemann and others 2005, Abbo and Lucroy 2007, Marconato and others 2009, Miller and others 2009, Marconato and others 2010). Haematological findings that correlated with a poor prognosis included abnormalities in platelet counts and decreases in mean corpuscular volume. Thrombocytosis and thrombocytopenia are considered paraneoplastic syndromes and are often found in dogs

with lymphoma (Bergman 2007, Gavazza and others 2008, Cápua and others 2011). However, no study has demonstrated that changes in platelet counts correlate with a reduced time of survival or an increase in the frequency of relapse, as was observed in this study. In contrast, three studies showed a correlation between anaemia and a shorter survival time in dogs with lymphoma (Abbo and Lucroy 2007, Miller and others 2009, Cápua and others 2011), which was not observed in our study. Those studies evaluated PCV with respect to degrees of anaemia, and in our study low PCV values (< 37%) were not associated with a poor prognosis, although increases in mean corpuscular volume did correlate with relapse.

The MCV is an index that evaluates the erythrocyte volume, and increases in MCV correlate with regenerative anaemia because immature erythrocytes were detected in the bloodstream (Thrall 2007). The lack of association between the prognosis and anaemia is most likely related to the small number of cases in this present study; however, our evidence of an increase in MCV being associated with recurrence indicates that it is an important parameter to monitor in dogs with lymphoma. Additionally, despite the fact that there was no statistically significant effect, this study also demonstrated that a decrease in PCV precedes the occurrence of a relapse. Further studies with larger numbers of animals should be performed to assess whether this finding is predictive of a recurrence in dogs with lymphoma.

Table 6. Variables associated with reduced remission times and relapses in dogs with lymphoma.

Variable	Reference	% of relapsing dogs	Mean remission time (days) (CI 95%)	Hz (CI 95%)	P
Hypercalcaemia	≥11.4 mg/dL	75%	146 (55-237)	6.56 (1.3-32.91)	0.009
Normal calcium	9-11.3 mg/dL	29%	439 (275-603)	1	
Increased MCV	≥ 70.1	75%	111 (45-177)	29.96(3.07-292.47)	<0.001
Normal MCV	60-70	29%	437 (277-597)	1	
Decreased platelet count	≤199.9H10 ³ /μL	50%	165 (137-193)	15.55 (1.71-141.25)	0.002
Normal platelet count	200-500H10 ³ /μL	25%	517 (324-710)	1	

CI: confidence interval, Hz: hazard ratio.

Table 7. Effect of the categorical variables measured in dogs with lymphoma on relapse.

Variable	% of relapsing dogs	Mean remission time (days – CI 95%)	Hz (CI 95%)	P
Males	29%	265 (185-345)	1.08 (0.31-3.82)	0.900
Females	46%	395 (191-599)	1	
Stage I-III	36%	414 (212-617)	1	0.185
Stage IV-V	35%	227 (141-314)	2.33 (0.64-8.46)	
Sub-stage a	75%	251 (185-317)	1	0.472
Sub-stage b	29%	431 (255-607)	0.60 (0.15-2.44)	
Multicentric	38%	366 (215-517)	1	0.811
Other location	25%	266 (87-445)	0.78 (0.1-6.24)	
< 8 years	41%	266 (154-377)	1	0.956
>8 years	27%	372 (213-531)	1.04 (0.26-4.13)	
<15 kg	33%	482 (282-683)	1	0.059
>15 kg	43%	204 (135-272)	3.27 (0.9-11.9)	
BCS 2	27%	255 (140-369)	1.79 (0.49-6.58)	0.377
BCS 3	46%	405 (236-573)	1	

CI: confidence interval, Hz: hazard ratio, BCS: body condition score.

Table 8. Median LDH activities and mean PCV values in dogs with lymphoma that achieved complete remission (18 animals) and that relapsed compared with readings from those animals that were in remission and that did not relapse.

Relapse status	PCV-1	PCV-2	PCV-3 (relapse)
Relapse (n=10)	35.7%	35.4%	33.1%
Non-relapse (n=8)	35.4%	35.6%	35.8%
	LDH-1	LDH-2	LDH-3 (relapse)
Relapse (n=10)	125.7 U/L	110.5 U/L	142.7 U/L
Non-relapse (n=8)	139.7 U/L	161.9 U/L	78.4 U/L

It was also observed that changes in electrophoresis β -2 fraction protein were associated with decreased survival times. Hyperproteinaemia is a paraneoplastic syndrome that may be detected in dogs with lymphoma and is due to the excessive production of monoclonal immunoglobulin by lymphocytes or plasma cells and it has already been demonstrated in other studies (Giraudel and others 2002, Cardoso and others 2004, Calazans and others 2009). Planinc-Peraica and others (2010) reported increases in α -1 (23%), α -2 (37%) and β (8%) protein fractions in humans with non-Hodgkin's lymphoma. Increases in the level of β -globulin were also detected in a dog with cutaneous lymphoma and in cats with lymphoma (Jacobs and others 1986, Gerou-Ferriani and others 2011). However, no study has demonstrated an influence of alterations in protein profiles on survival times. Price and others (1991) showed that hypoalbuminaemic dogs demonstrated shorter remission times than

normoalbuminaemic dogs. These findings suggest that serum protein electrophoresis may be a good, cheap prognostic factor in dogs with lymphoma.

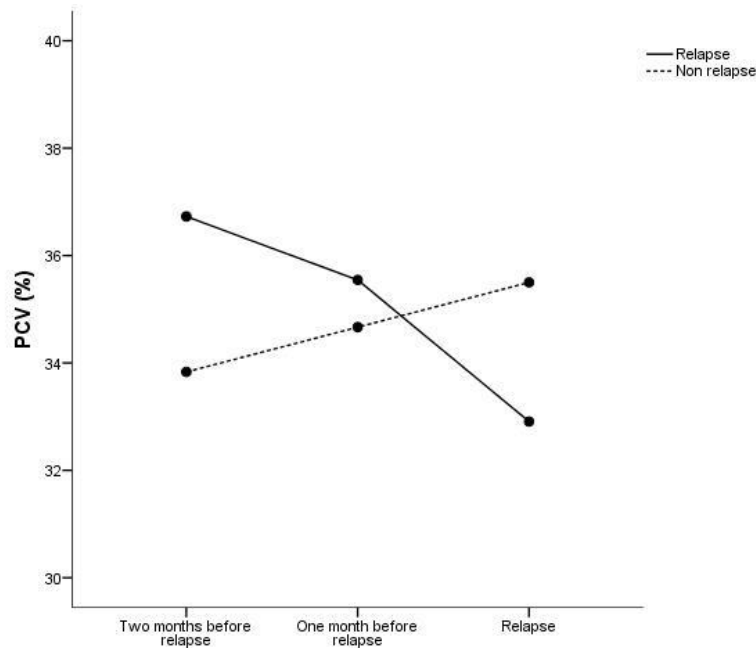


Figure 1. PCV values in dogs that achieved complete remission and relapsed (black line) compared with those animals that were in remission and that did not relapse (dashed line).

Hypercalcaemia is a common paraneoplastic syndrome observed in dogs with lymphoma (Barri and Knochel 1996, Baskin and others 2000, Gavazza and others 2008, Messinger and others 2009), and it has been associated with a poor prognosis. Keller and others (1993) correlated this parameter to shorter remissions and survival times in dogs. Moreover, Greenlee and others (1990) showed that dogs with hypercalcaemia and a T-cell phenotype demonstrated shorter remissions and survival times similar to our study where an increase in total calcium concentration was correlated with a relapse in dogs with lymphoma. Additionally, Marconato and others (2011) demonstrated that dogs exhibiting long-term survival did not show hypercalcaemia at the time of their lymphoma diagnosis.

Some studies have assessed LDH activity in dogs with lymphoma with controversial results. Marconato and others (2009) showed that dogs with lymphoma had significantly higher serum LDH activity than dogs with other tumour types. Zanatta and others (2003) reported a longer survival time in dogs with lower levels of serum LDH activity. Similarly, in human cases, increased LDH activity correlates with a worse prognosis (Cairo and others 2012). However, this association was not detected in

the present study or in other studies (Greenlee and others 1990, Marconato and others 2010). The reference values for serum LDH activity was different in each report and ranged from < 200 to < 312 U/L (< 245 U/L in the present study), and this baseline could have contributed to these controversial results. Additionally, in the present study, LDH was not effective as a predictor of recurrence in dogs with lymphoma, which is consistent with the work of Marconato and others (2010).

Many international studies have been conducted that have assessed prognostic factors in dogs with lymphoma, and most authors agree that the T-cell phenotype is associated with reduced survival times (Greenlee and others 1990, Starrak and others 1997, Kiupel and others 1999, Dobson and others 2001, Ponce and others 2004, Marconato and others 2011). A reduced survival time was also detected in T-cell lymphomas dogs in the present study although it was not statistically significant. Notably, the higher incidence of dogs with a T-cell phenotype (38%) was consistent with other international studies, in which incidences ranged from 13 to 27% (Starrak and others 1997, Dobson and others 2001, Marconato and others 2011). However, within each group of B- and T-cell lymphomas, there are various morphological subtypes that show significant differences in overall survival time and latency to first remission (Ponce and others 2004). The epidemiology of the morphological classifications was not the focus of our study; the frequency of the T-cell phenotype is likely increased in our region, which requires investigation because regional variations in lymphoma presentations have been documented in human medicine (Fisher and Fisher 2004). Furthermore, this study demonstrated that animals with T-cell lymphoma were protected against relapse; however, the majority of these animals showed no response to treatment, thereby causing a statistical bias. As stated above, of the 10 animals with T-cell phenotype lymphoma, only three achieved complete remission and two relapsed.

In the present study, gender, age, weight, WHO sub-stage and anatomical location did not correlate with prognosis in dogs with lymphoma, whereas clinical stages IV-V correlated with shorter survival time. Some studies have demonstrated that animals in initial clinical stages at the time of diagnosis show a higher survival time (Price and others 1991, Jagielski and others 2002, Marconato and others 2011), despite the fact that other studies have demonstrated a lack of correlation between the clinical stage and survival and remission times (MacEwen and others 1987, Greenlee and others 1990, Keller and others 1993). The majority of the dogs in the present study were

diagnosed in clinical stages IV and V (64%), indicating a more advanced disease, which may explain the association that was found with survival. However, the staging system, which was based on WHO criteria, is debatable because a large number of studies have demonstrated that the most advanced stages are not always associated with a worse prognosis (MacEwen and others 1987, Greenlee and others 1990, Keller and others 1993). Nevertheless, it has been demonstrated in both veterinary and human medicine that an early diagnosis improves the outcome of chemotherapy; therefore, clinicians should adjust the methods of diagnosis and shorten the time taken with diagnostic procedures to begin treatment at early stages of the disease (Jagielski and others 2002). When evaluating the WHO sub-stages, Jagielski and others (2002) and Keller and others (1993) observed that animals in sub-stage b showed shorter survival and remission times, which was not observed in the present study. However, an important observation was that animals with low body condition (scores 1 and 2) showed shorter survival times, and cachexia is an important paraneoplastic syndrome in humans and dogs with lymphoma (Bergman 2007). The shorter survival times that were observed in dogs with sub-stage b and cachexia were most likely due to the more advanced stages of disease in these animals. Moreover, these dogs tended not to tolerate chemotherapy and presented complications during the induction period; hence, dose reductions or euthanasia are more frequent in these dogs (Keller and others 1993).

Most studies have failed to prove that age and weight are significant prognostic factors for response to treatment or for survival (MacEwen and others 1987, Greenlee and others 1990, Teske 1994, Kiupel and others 1999, Dobson and others 2001). Some studies have detected a shorter survival times in males (MacEwen and others 1987, Keller and others 1993) whereas the majority of studies have not confirmed this finding (Greenlee and others 1990, Kiupel and others 1999, Dobson and others 2001, Jagielski and others 2002). In the present study, males showed shorter survival times than females; however, there was no statistically significant difference. A large number of the studies that evaluated prognostic factors in dogs with lymphoma were performed using dogs with the multicentric form of the disease (MacEwen and others 1987, Greenlee and others 1990, Price and others 1991, Keller and others 1993, Kiupel and others 1999, Dobson and others 2001, Jagielski and others 2002). However, some studies demonstrated unfavourable outcomes for the cutaneous, alimentary and hepatosplenic forms (Couto and others 1989, Fry and others 2003, Cienava and others 2004). Starrak and others (1997) reported that the presence of cranial mediastinal

lymphadenomegaly showed a negative correlation with remission and survival times and that it occurs most frequently in dogs with the mediastinal form. The non-multicentric form of lymphoma was detected in 13% of the animals in our study (two animals with cutaneous lymphoma, one with alimentary lymphoma and one with the splenic form). No significant association was found between this outcome measure and relapse or survival time, which may have been due to the small number of dogs with anatomical locations other than the multicentric form. Nonetheless, reports have shown that some anatomical locations are associated with specific paraneoplastic syndromes, such as the mediastinal form and hypercalcaemia, which may underlie the shorter survival and remission times in these cases because hypercalcaemia correlates with a poor prognosis (Greenlee and others 1990, Keller and others 1993).

In conclusion, this study demonstrates that alterations in platelets and the β 2-fraction of serum protein correlated with shorter survival times in dogs with lymphoma and that the occurrence of hypercalcaemia, thrombocytopenia and increases in mean corpuscular volume were associated with shorter durations of remission and the occurrence of relapses. These haematological and biochemical tests can be easily performed by the clinician upon the initial presentation of the disease, and they could help in determining prognoses for dogs with lymphoma. Additionally, animals in stages IV-V of lymphoma and with body condition scores of 1-2 showed shorter survival times reflecting the severity of the disease in these patients.

References

- ABBO, A.H. & LUCROY, M.D.(2007)Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 231, 1836-1842.
- ARESPACOCCHAGA, A.G., SCHWENDENWEIN, I. & WEISSENBÖCK, H. (2007) Restrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *Journal of Comparative Pathology* 136, 186-192.
- BARRI, Y.M. & KNOCHEL, J.P.(1996)Hypercalcemia and electrolyte disturbances in malignancy.*Journal of Veterinary Clinical of North America: Small Animal Practice* 10, 775-790.

- BASKIN, C.R., COUTO, G. & WITTUN, T.E. (2000) Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. *Journal of American Animal Hospital Association* 36, 404-409.
- BERGMAN, P.J. (2007) Paraneoplastic syndromes. Chapter 5. In Withrow, MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Saint Louis: Saunders Elsevier. pp.77-90.
- CAIRO, M.S., SPOSTO, R., GERRARD, M., AUPERIN, A., GOLDMAN, S.C., HARRISON, L., PINKERTON, R., RAPHAEL, M., MCCARTHY, K., PERKINS, S.L. & PATTE, C. (2012) Advanced stage, increased lactate dehydrogenase, and primary site, but not adolescent age (≥ 15 years), are associated with an increased risk of treatment failure in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB LMB 96 study. *Journal of Clinical Oncology* 30, 387-393.
- CALAZANS, S.G., DALECK, C.R., FAGLIARI, J.J., REPETTI, C.F., DE NARDI, A.B., CASTRO, J.H.T., FERNANDES, S.C., CÉSAR, J.R.F.N & RODIGHERI, S.M. (2009) Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61, 1044-1048.
- CÁPUA, M.L.B., COLETA, F.E.D., CANESIN, A.P.M.N., GODOY, A.V., CALZANS, S.G., MIOTTO, M.R., DALECK, C.R. & SANTANA, A.E. (2011) Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo Madison-Wisconsin. *Ciência Rural* 41, 1245-1251.
- CARDOSO, M.J.L., MACHADO, L.H.A., MOUTINHO, F.Q. & PADOVANI, C.R. (2004) Sinais clínicos do linfoma canino. *Archives in Veterinary Science* 9, 19-24.
- CIENAVA, E.A., BARNHART, K.F., BROWN, R., MANSELL, J., DUNSTAN, R. & CREDILLE, K. (2004) Morphologic, immunohistochemical, and molecular characterization of hepatosplenic T-cell lymphoma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 33, 105-110.
- COUTO, C.G., RUTGERS, H.C., SHERDING, R.G. & ROJKO, J. (1989) Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3, 73-78.
- DOBSON, J.M., BLACKWOOD, L.B., MCINNES, E.F., BOSTOCK, D.E., NICHOLLS, P., HOATHER, T.M. & TOM, B.D.M. (2001) Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice* 42, 377-384.

FAHEY, C.E., MILNER, R.J., BARABAS, K., LURIE, D., KOW, K., PARFITT, S., LYLES, S. & CLEMENTE, M. (2011) Evaluation of the University of Florida lomustine, vincristine, procarbazine, and prednisone chemotherapy protocol for the treatment of relapsed lymphoma in dogs: 33 cases (2003-2009). *Journal of American Veterinary Medical Association* 239, 209-215.

FISHER, S.G. & FISHER, R.I. (2004) The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 23, 6524-6534.

FLORY, A.B., RASSNICK, K.M., ERB, H.N., GARRETT, L.D., NOTHRUP, N.C., SELTING, K.A., PHILLIPS, B.S., LOCKE, J.E. & CHRETIN, J.D. (2011) Evaluation of factors associated with second remission in dogs with lymphoma undergoing retreatment with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy protocol: 95 cases (2000-2007). *Journal of American Veterinary Medical Association* 238, 501-506.

FRY, M.M., VERNAU, W., PESAVENTO, P.A., BRÖMEL, C. & MOORE, P.F. (2003) Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Veterinary Pathology* 40, 556-562.

GAVAZZA, A., LUBAS, G., VALORI, E. & GUGLIUCCI, B. (2008) Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Veterinary Research Communication* 32, S291-S293.

GEROU-FERRIANI, M., MCBREARTY, A.R., BURCHMORE, R.J., JAYAWARDENA, K.G.I., ECKERSALL, P.D. & MORRIS, J.S. (2011) Agarose gel serum protein electrophoresis in cats with and without lymphoma and preliminary results of tandem mass fingerprinting analysis. *Veterinary Clinical Pathology* 40, 159-173.

GIRAUDEL, J.M., PAGÈS, J.P. & GUELFY, J.F. (2002) Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *Journal of American Animal Hospital Association* 38, 135-147.

GREENLEE, P.G., FILIPPA, D.A., QUIMBY, F.W., PATNAIK, A.K., CALVANO, S.E., MATUS, R.E., KIMMEL, M., HURVITZ, A.I. & LIEBERMAN, P.H. (1990) Lymphomas in dogs a morphological, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66, 480-490.

HAHN, K.A., FREEMAN, K.P., BARNHILL, M.A. & STEPHEN, E.L. (1999) Serum α 1-acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treated with doxorubicin. *Journal of American Veterinary Medical Association* 214, 1023-1025.

- HOSOYA, K., KISSEBERTH, W.C., LORD, L.K., ALVAREZ, F.J., GARCIA, A.L., KOSAREK, C.E., LONDON, C.A. & COUTO, C.G. (2007) Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 1355-1363.
- JACOBS, R.M., COUTO, C.G. & WELLMAN, M.L. (1986) Biclonal gammopathy in a dog with myeloma and cutaneous lymphoma. *Veterinary Pathology* 23, 211-213.
- JAGIELSKI, D., LECHOWSKI, R., HOFFMANN-JAGIELSKA, M., WINIARCZYK, S. (2002) A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *Journal of Veterinary Medicine A* 49, 419-424.
- KELLER, E.T., MACEWEN, E.G., ROSENTHAL, R.C., HELFAND, S.C. & FOX, L.E. (1993) Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7, 289-295.
- KIPEL, M., TESKE, E. & BOSTOCK, D. (1999) Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology* 36, 292-300.
- KRONFELD, D.S., DONOGHUE, S. & GLICKMAN, L.T. (1991) Body condition and energy intakes of dogs in a referral teaching hospital. *Journal of Nutrition* 121, S157-S158.
- LANORE, D. & DELPRAT, C. (2004) Quimioterapia anticancerígena. São Paulo: Editora Roca. 191p.
- MACEWEN, E.G., HAYES, A.A., MATUS, R.E. & KURZMAN, I. (1987) Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *Journal of American Veterinary Medical Association* 5, 564-568.
- MARCONATO, L., CRISPINO, G., FINOTELLO, R., MAZZOTTI, S., SALERNI, F. & ZINI, E. (2009) Serum lactate dehydrogenase activity in canine malignancies. *Veterinary and Comparative Oncology* 7, 236-243.
- MARCONATO, L., CRISPINO, G., FINOTELLO, R., MAZZOTTI, S. & ZINI, E. (2010) Clinical relevance of serial determinations of lactate dehydrogenase activity used to predict recurrence in dogs with lymphoma. *Journal of American Veterinary Medical Association* 236, 969-974.
- MARCONATO, L., STEFANELLO, D., VALENTI, P., BONFATI, U., COMAZZI, S., ROCCABIANCA, P., CANIATTI, M., ROMANELLI, G., MASSARI, F. & ZINI, E. (2011) Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *Journal of American Veterinary Medical Association* 238, 480-485.

- MESSINGER, J.S., WINDHAM, W.R. & WARD, C.R. (2009) Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 514-519.
- MILLER, A.G., MORLEY, P.S., RAO, S., AVERY, A.C., LANA, S.E. & OLVER, C.S. (2009) Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 116-122.
- NIELSEN, L., TOFT, N., ECKERSALL, P.D., MELLOR, D.J. & MORRIS, J.S. (2007) Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 1231-1236.
- OWEN, L.N. (1980) TNM Classification of tumours in domestic animals. 1st ed. Geneva: World Health Organization. 53p.
- PLANINC-PERAICA, A., KOLONIC, S.O., RADIC-KRISTO, D., DOMINIS, M. & JAKSIC, B. (2010) Serum immunoglobulins in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Collegium Antropologicum* 34, 407-411.
- PONCE, F., MAGNOL, J.P., LEDIEU, D., MARCHAL, T., TURINELLI, V., CHALVET-MONFRAY, K. & FOURNEL-FLEURY, C. (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Veterinary Journal* 167, 158-166.
- PONCE, F., MARCHAL, T., MAGNOL, J.P., TURINELLI, V., LEDIEU, D., BONNEFONT, C., PASTOR, M., DELIGNETTE, M.L. & FOURNEL-FLEURY, C. (2010) 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, 414-433.
- PRICE, G.S., PAGE, R.L., FISCHER, B.M., LEVINE, J.F. & GERIG, T.M. (1991) Cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5, 259-262.
- STARRAK, G.S., BERRY, C.R., PAGE, R.L., JOHNSON, J.L. & THRALL, D.E. (1997) Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 38, 411-418.
- THRALL, M.A. (2007) Classificação e diagnóstico de anemia. In Hematologia e bioquímica clínica veterinária 1st ed. Ed. M.A, Thrall. São Paulo: Roca. pp 78-83.
- TESKE, E. (1994) Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. *Veterinary Quarterly* 16, 29S-31S.

- VAIL, D.M. & YOUNG, K.M. (2007) Hematopoietic tumors. In: Withrow, Macewen's. Small Animal Clinical Oncology. Eds. S.J. Withrow & D.M. Vail. Saint Louis: Saunders Elsevier. pp 699-733.
- VEZZALI, E., PARODI, A.L., MARCATO, O.S. & BETTINI, G. (2009) Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to WHO. *Veterinary and Comparative Oncology* 8, 38-49.
- WIEDEMANN, A.L., CHARNEY, S.C., BARGER, A.M., SCHAEFFER, D.J. & KITCHELL, B.E. (2005) Assessment of corticosteroid-induced alkaline phosphatase as a prognostic indicator in canine lymphoma. *Journal of Small Animal Practice* 46, 185-190.
- ZANATTA, R., ABATE, O., D'ANGELO, A., MINISCALCO, B. & MANNELLI, A. (2003) Diagnostic and prognostic value of serum lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes in canine lymphoma. *Veterinary and Research Communication* 27, 449-452.

4.3 Artigo 3

Echocardiography, electrocardiography and cardiac troponin I in dogs with lymphoma receiving doxorubicin chemotherapy: a prospective study

E. B. Neuwald¹, L. V. Teixeira¹, F. O. Conrado², M. O. D. Silva³, N. R. C. Hlavac¹, F. H. D. González⁴

¹ Veterinary Science Post-graduation Program of Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS). ² Veterinary Science Post-graduation Program of Paraná Federal University (UFPR).

³ Veterinary Medicine Faculty (FAVET) of UFRGS.

⁴ Veterinary Clinical Pathology Department, FAVET, UFRGS.

The study was performed at Veterinary Clinical Hospital of UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil, Telephone number (55 51) 3308 8033; Fax (55 51) 3308 6108.

Corresponding author E. B. Neuwald: eneuwald@ibest.com.br

Abstract

Doxorubicin is a chemotherapeutic agent frequently used in canine patients with lymphoma. When administered chronically, this drug can produce an irreversible cardiomyopathy. The purpose of this study was to evaluate the cardiac abnormalities detected by electrocardiography, echocardiography and serum concentration of cardiac troponin I in dogs with lymphoma treated with a protocol containing doxorubicin. Twenty-three dogs were enrolled in this prospective study and received cumulative doxorubicin doses from 30 to 180 mg/m². There were no statistically significant differences among the variables evaluated during doxorubicin treatment, with the exception of heart rate which decreased in animals receiving 90 mg/m². Positive correlations between cTnI and echocardiographic parameters were observed only in patients that achieved complete remission and were followed-up for eight months after completing the doxorubicin chemotherapy. This study demonstrated that total doses of doxorubicin up to 180 mg/m² produced no significant cardiac alterations and is therefore safe to use in dogs with lymphoma without previous cardiac disease.

Key-words: cardiac alterations, cardiomyopathy, cancer, chemotherapy, canine.

Introduction

Malignant lymphoma is one of the most common canine neoplastic diseases and accounts for approximately 83% of all canine hematopoietic malignancies (Vail and Young, 2007). The treatment of lymphoma in dogs involves chemotherapy; numerous protocols have been used in veterinary medicine, but the best results were observed in protocols containing doxorubicin (Baskin et al., 2000; Hosoya et al., 2007; Marconato et al., 2011). Doxorubicin is an important antineoplastic agent of the group of anthracyclines, but it can lead to acute and chronic cardiotoxic effects in humans (Cardinale et al., 2000; Bryant et al., 2007; Chatterjee et al., 2010), dogs (Mauldin et al., 1992; Selting et al., 2004; Silva et al., 2004) and rats (Herman et al., 1998; Koh et al., 2004). Cumulative doses above 150-240 mg/m² in dogs may result in irreversible cardiomyopathy (Mauldin et al., 1992; Souza and Camacho, 2006). The reported incidence of cardiomyopathy induced by doxorubicin with subsequent congestive heart failure in canine patients ranges from 4 to 16% (Price et al., 1991; Mauldin et al., 1992; Ratterree et al., 2012). For this reason, the use of doxorubicin should be monitored to avoid or minimize the risk of developing cardiomyopathy in dogs.

Monitoring methods in dogs receiving doxorubicin chemotherapy include electrocardiography (ECG), echocardiography and measurements of serum cardiac troponins (Mauldin et al., 1992; De Francesco et al., 2002; Selting et al., 2004; Ratterree et al., 2012; Tater et al., 2012). ECG is a commonly performed procedure in the veterinary clinic, and some studies have detected arrhythmias in dogs receiving doxorubicin chemotherapy, with supra-ventricular and ventricular premature complexes being the most frequently detected abnormalities (Mauldin et al., 1992; Pereira Neto et al., 2006; Ratterree et al., 2012). One of the most commonly used methods to evaluate cardiac function includes the measurement of left ventricular fractional shortening (FS) and of the ejection fraction (EF) by echocardiography. Experimental studies in dogs undergoing doxorubicin chemotherapy detected a reduction in FS (Hanai et al., 1996; Silva and Camacho, 2005); however, this finding was not detected in a recent study in dogs with lymphoma (Tater et al., 2012). Other findings detected in the echocardiogram of dogs receiving doxorubicin include increases in the left ventricular systolic and diastolic diameter, decreases in EF and the appearance of mitral regurgitation (Hanai et al., 1996; Silva and Camacho, 2005). Cardinale et al. (2000) demonstrated that increases in serum cardiac troponin I concentrations can predict ventricular dysfunction in human patients receiving high doses of doxorubicin. This finding was also replicated in canine patients that developed doxorubicin-induced cardiomyopathy (Selting et al., 2004).

Despite all these studies, there are no established criteria based on the detection of cardiac abnormalities in the monitoring exams for excluding doxorubicin administration or stopping the treatment in veterinary medicine to avoid the onset of cardiomyopathy. Thus, the purpose of the present study was to evaluate whether electrocardiography, echocardiography and serum concentration of cardiac troponin I abnormalities were associated with each other and if they could predict the occurrence of cardiomyopathy in dogs with lymphoma and treated with a chemotherapy protocol containing doxorubicin.

Materials and methods

Study Population

Twenty-three dogs diagnosed with lymphoma in a veterinary clinical hospital between May 2010 and May 2012 and receiving doxorubicin chemotherapy were enrolled in the study. The study was approved by an ethical review committee (protocol number 18391-CEUA-UFRGS) and informed consent was obtained from the patients' owners. Diagnosis was based on cytological and/or histopathological examinations of the affected organs (lymph nodes, spleen or skin). All dogs underwent a physical examination, hematological and biochemical tests including measurement of serum cardiac troponin I (cTnI) concentration, an ECG and echocardiography before the beginning of chemotherapy. All dogs were free of cardiac disease prior to this study. Bone marrow evaluations were performed in 21 animals. Complete staging was based on physical examination and complementary exams according to the World Health Organization (Owen, 1980). All animals received at least one dose of the doxorubicin schedule of the 19-week CHOP protocol (Vail and Young, 2007) detailed in Table 1. Doxorubicin (Adriablastina; Pharmacia & Upjohn SA) was administered intravenously over 40 to 60 minutes. The animals were re-evaluated one week later with tests including ECG, echocardiography and cTnI. At the end of the chemotherapy protocol, the dogs were evaluated every two months until one year after diagnosis. When relapse occurred, a two-cycle protocol containing prednisone, vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin was performed.

ECG and echocardiograms

A 10-lead computerized ECG (ECG PC TEB) was performed during a period of one to two minutes with dogs positioned in right lateral recumbency. Heart rate, cardiac

rhythm, duration and amplitude of the P wave and QRS complex, length of the PR and QT intervals, abnormalities of the ST segment, polarity of T waves, and mean electrical axis were evaluated. The ECG was recorded at a rate of 50 mm/s and calibrated at 1 mV/cm. The ECG variables were compared with previous values reported for clinically normal dogs (Tilley, 1992).

Table 1. Chemotherapy protocol, re-evaluations and exams performed in 26 animals with lymphoma and without cardiac disease at the time of diagnosis.

Week	Drug – dose
1	Vincristine 0,7 mg/m ² IV Prednisone 2 mg/kg PO SID
2	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO Prednisone 1,5 mg/kg PO SID
3	Vincristine 0,7 mg/m ² IV Prednisone 1 mg/kg PO SID
4	Doxorubicin 30 mg/m ² IV Prednisone 0,5 mg/kg PO SID
5	<u>Re-evaluating and exams</u>
6	Vincristine 0,7 mg/m ² IV
7	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO
8	Vincristine 0,7 mg/m ² IV
9	Doxorubicin 30 mg/m ² IV
10	<u>Re-evaluating and exams</u>
11	Vincristine 0,7 mg/m ² IV
12	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO
13	Vincristine 0,7 mg/m ² IV
14	Doxorubicin 30 mg/m ² IV
15	<u>Re-evaluating and exams</u>
16	Vincristine 0,7 mg/m ² IV
17	Cyclophosphamide 250 mg/m ² PO
18	Vincristine 0,7 mg/m ² IV
19	Doxorubicin 30 mg/m ² IV
20	<u>Re-evaluating and exams</u>

IV: intravascular, PO: oral administration, SID: once a day.

All echocardiographic examinations were performed without sedation in left and right lateral recumbency in accordance with the recommendations of the echocardiography committee of the Speciality of Cardiology of the American College of Veterinary Internal Medicine (Thomas et al., 1993). Echocardiograms were performed with a Mylab 30 Vet (Esaote Group, Genova, Italy) equipped with two sectors transducers ranging from 2 to 10 Mhz. Measurements of EF, FS and systolic and diastolic diameters, were performed in the M-mode at the right parasternal location in the papillary muscles in short-axis view (four cardiac cycles were evaluated and the results averaged), and aortic and left atrium diameters were evaluated with the M-mode

at the left cranial parasternal location in the long axis view and with the B-mode at the right parasternal location in the short axis view. The left apical parasternal location in the four and five-chamber views were used to evaluate mitral, tricuspid and aortic flow and to detect insufficiency using color and pulsatile Doppler. To evaluate the pulmonary flow, a long-axis left parasternal cranial view was performed. All measures were performed with a simultaneous ECG monitoring (Thomas et al., 1993).

Cardiac troponin I evaluation

Concentrations of cTnI were evaluated in serum samples obtained by the centrifugation (15 minutes at 2500 g) of whole blood collected in 4 mL non-additive tubes. The serum was stored at -20°C for up to six months until analysis. Concentrations of cTnI (Opus Plus, Boehringer Diagnostica) were determined using an immunometric technique that had been previously validated in dogs (Schober et al., 1999; Schober et al., 2002). Serum concentrations of cTnI of 23 clinically healthy dogs of the same breed, sex and size were measured and used as controls. These animals were also submitted to physical examination, CBC, ECG, and echocardiography. All control dogs were free of cardiac disease.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the symmetry of variables. Normally distributed variables were expressed as the mean and standard deviation, and non-normally distributed variables were expressed as the median and percentiles. Because not all dogs completed the combination protocol with four administrations of doxorubicin and because some animals relapsed and received six doses, the patients were divided into four groups according to the number of doxorubicin treatments they received prior to reaching a study end-point (defined as dead, change of chemotherapy protocol, lost to follow-up or surviving until one year after diagnosis). Groups 1, 2, 3 and 4 included dogs that received 60, 90, 120 and 180 mg/m^2 body surface area of doxorubicin, respectively. Another evaluation included dogs that completed four doses of doxorubicin and were monitored until surviving 12 months after diagnosis without relapse. Repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used to examine significant differences in ECG (heart rate, cardiac rhythm, P and R amplitude and duration, PR and QT intervals and electrical axis), echocardiography (aortic and left atrium diameters in M-mode and B-mode, intraventricular septum and left ventricle free wall diameter, left ventricle systolic and diastolic diameter, FS and EF) and cTnI variables.

To compare treatment and control groups, the paired Student's t-test was used for normally distributed quantitative variables (age), and the Wilcoxon test was used for continuous, non-normally distributed variables (weight and cTnI). To evaluate categorical variables (sex), the paired test of Mc-Nemar was used to compare frequencies between treatment and control groups. Pearson correlation was performed to compare the values of cTnI with other ECG and echocardiographic parameters at different times of therapy. Statistical analysis was performed using a computer software (Statistical Package for the Social Science, SPSS version 18.0), and values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Population characteristics

A total of 23 dogs participated in the study, including 10 females and 13 males. The median age of the patients was 8 years (range from 1 to 14 years) and the median weight was 12.3 kg (range from 2 to 45 kg). The population consisted of 7 mixed-breed dogs, 3 Poodles, 2 Labrador Retrievers, 2 Rottweilers, 1 Shih Tzu, 1 Weimaraner, 1 Saint Bernard, 1 Cocker Spaniel, 1 Boxer, 1 Bull Terrier, 1 German Shepherd, 1 Scottish Terrier and 1 Bichon Frisé. One animal was classified as WHO stage 1, nine dogs were stage III, ten animals were stage IV and three were stage V; of the 23 dogs, six were classified as sub-stage "a" and 17 as sub-stage "b". According to the anatomical locations of the tumors, 20 dogs had multicentric lymphoma, two had the cutaneous form and one had the splenic form. The median number of doxorubicin treatments was three (range from 1 to 6); one dog received only one dose (30 mg/m^2) and thus was excluded from the statistical analysis. Five animals received two doses (60 mg/m^2), six received three doses (90 mg/m^2), seven received four doses (120 mg/m^2) and four received six doses of doxorubicin (180 mg/m^2), with a median cumulative dose of 90 mg/m^2 . Relapse occurred 5, 6 and 10 months after the diagnosis in three dogs and all had received 180 mg/m^2 of doxorubicin. The dose of 180 mg/m^2 was also administered to a patient that exhibited a poor response to chemotherapy and received a total of six doses. Four dogs showed complete remission after receiving four doses of doxorubicin and survived the one-year period after diagnosis.

Cardiac evaluations

A total of 97 ECGs, echocardiograms and serum cTnI measurements were performed throughout the study. None of the animals developed clinical signs of congestive heart failure or cardiomyopathy. Arrhythmias and conduction disturbances

were detected in six dogs (26%) after initiating doxorubicin chemotherapy and consisted of supra-ventricular premature complexes (n=3), first degree atrioventricular block (n=2) and ventricular premature complexes (n=2). One animal showed first degree atrioventricular block and supra-ventricular premature complexes. These arrhythmias did not require medical intervention. The median cumulative dose associated with the onset of cardiac arrhythmias was 60 mg/m² (range from 30 to 150 mg/m²). There was a significant decrease in the values of heart rate in the dogs of group 2 (Table 2). No statistically significant alterations in other ECG parameters were detected throughout doxorubicin therapy in any groups or in the animals monitored up to one year after diagnosis.

Table 2. Mean and standard deviation of heart rate values of dogs with lymphoma treated with a protocol containing doxorubicin chemotherapy according to the number of doses received during treatment.

H R	Pre- treatment n=22	30 mg/m ² n=22	60 mg/m ² n=22	90 mg/m ² n=17	120 mg/m ² n=11	150 mg/m ² n=4	180 mg/m ² n=4	P
1 n=5	142 (±32)	131 (±30)	136 (±33)					0.372
2 n=6	151 (±20) ^a	117 (±31)	118 (±26) ^b	118 (±22) ^b				0.009
3 n=7	130 (±33)	114 (±29)	117 (±25)	118 (±35)	106 (±21)			0.052
4 n=4	130 (±35)	138 (±65)	123 (±31)	125 (±34)	133 (±25)	145 (±38)	135 (±34)	0.626

HR: heart rate (values are expressed in beats per minutes)

The echocardiography detected eight (35%) cases of valvular insufficiencies at the moment of diagnosis, seven (30%) cases of mild mitral regurgitation, two (9%) of mild tricuspid regurgitation, one (4%) of moderate tricuspid regurgitation and one (4%) of mild pulmonary regurgitation. No animals showed aortic insufficiency before initiating therapy. However, eight animals (35%) that did not have alterations in the pre-treatment exam developed valvular insufficiencies during the doxorubicin treatment (tricuspid, pulmonary and aortic regurgitations were detected in seven, three and one animal, respectively). The FS, EF and systolic and diastolic left ventricle diameters did not change significantly in any of the four groups (Tables 3 and 4) during the cyclic

combination chemotherapy protocol with doxorubicin. However, small, non-significant increases in diastolic and systolic left ventricle diameters were observed in all groups.

Table 3. Mean and standard deviation values of left ventricle diastolic (LVDd) and systolic (LVSd) diameters during doxorubicin therapy in dogs with lymphoma according to the number of doses received. Values are expressed in centimeters.

	Pre-treatment n=22	30 mg/m ² n=22	60 mg/m ² n=22	90 mg/m ² n=17	120 mg/m ² n=11	150 mg/m ² n=4	180 mg/m ² n=4	P
LVDd								
1 n=5	3.73 (±1.36)	3.83 (±1.32)	4.05 (±1.47)					0.169
2 n=6	4.15 (±0.68)	4.48 (±0.93)	4.50 (±0.93)	4.53 (±0.94)				0.070
3 n=7	3.21 (±1.10)	3.23 (±1.16)	3.21 (±1.11)	3.26 (±1.11)	3.35 (±1.16)			0.377
4 n=4	2.57 (±0.81)	2.8 (±0.62)	2.77 (±0.56)	2.76 (±0.57)	2.73 (±0.43)	2.94 (±0.41)	2.9 (±0.54)	0.235
LVSd								
1 n=5	2.27 (±0.93)	2.32 (±0.95)	2.45 (±0.98)					0.220
2 n=6	2.51 (±0.45)	2.80 (±0.63)	2.80 (±0.66)	2.91 (±0.75)				0.053
3 n=7	1.89 (±0.65)	1.96 (±0.74)	1.91 (±0.72)	1.93 (±0.70)	1.99 (±0.73)			0.540
4 n=4	1.54 (±0.55)	1.68 (±0.49)	1.69 (±0.40)	1.69 (±0.39)	1.66 (±0.38)	1.79 (±0.38)	1.68 (±0.40)	0.136

Table 4. Mean and standard deviation values of fractional shorting (FS) and ejection fractions (EF) in dogs with lymphoma receiving doxorubicin chemotherapy, according to the number of doses received. Values are expressed in centimeters.

	Pre-treatment n=22	30 mg/m ² n=22	60 mg/m ² n=22	90 mg/m ² n=17	120 mg/m ² n=11	150 mg/m ² n=4	180 mg/m ² n=4	P
FS								
1 n=5	39.86 (±2.66)	40.47 (±4.70)	40.12 (±4.18)					0.887
2 n=6	39.48 (±4.96)	37.45 (±4.94)	37.95 (4.86)	36.15 (±6.20)				0.083
3 n=7	40.96 (±3.87)	39.77 (±2.39)	41.13 (±4.26)	41.08 (±3.57)	41.16 (±3.04)			0.433
4 n=4	41.02 (±3.55)	40.67 (±5.01)	39.35 (±2.28)	39.02 (±2.35)	39.55 (±4.71)	39.61 (±4.91)	42.40 (±5.22)	0.399
EF								
1 n=5	71.45 (±4.28)	71.75 (±6.40)	71.6 (±5.48)					0.976
2 n=6	71.75 (±5.55)	69.87 (±4.33)	70.44 (±3.79)	69.13 (±3.22)				0.229
3 n=7	72.89 (±5.23)	71.75 (±3.88)	72.90 (±6.04)	73.11 (±4.83)	73.14 (±4.41)			0.644
4 n=4	73.19 (±3.82)	72.56 (±5.26)	71.38 (±3.17)	69.88 (±3.61)	71.56 (±5.65)	71.56 (±6.26)	74.81 (±6.20)	0.401

Clinical data and serum cTnI concentrations of control dogs were compared with clinical data and cTnI concentrations of treated dogs measured at the first evaluation (Table 5). There were no significant differences between the control and treatment groups in terms of sex ($P= 1.0$) and weight ($P= 0.659$). However, age ($P< 0.001$) and cTnI concentrations ($P= 0.001$) were significantly different between the treatment and control groups. In the control group, the median value of cTnI was 0.009 ng/mL (range from 0.006 to 0.067). The reference value for cTnI, assigned as the 95th percentile of control dogs, was 0.052 ng/mL, which was similar to previously reported values for healthy dogs (Sleeper et al., 2001; Burgener et al., 2006). A total of eight (35%) dogs showed increased cTnI concentrations (> 0.052 ng/mL) at diagnosis before any treatment was given; 15 (65%) animals showed increases in cTnI concentrations at some point during treatment. Excluding those animals with increased cTnI prior to the doxorubicin administration, the median cumulative dose from the onset of increased cTnI was 120 mg/m² (range from 90 to 150 mg/m²). No significant differences in the values of cTnI were detected during treatment (Table 6). Positive correlations between cTnI concentrations and echocardiographic variables were observed only in the animals monitored for all 12 months after diagnosis. Eight months after diagnosis (four months after the chemotherapy was finished), positive correlations were detected between the aortic diameter ($P= 0.001$, $r= 0.887$) and the left atrium diameter ($P= 0.007$, $r= 0.816$) measured in B-mode; ten months after diagnosis (six months after the chemotherapy was finished), positive correlations were detected between the left atrium diameter in B-mode ($P= 0.031$, $r= 0.969$), the left ventricle free wall diameter ($P= 0.039$, $r= 0.961$) and the intraventricular septum diameter ($P= 0.004$, $r= 0.996$); 12 months after diagnosis (eight months after the chemotherapy was finished), positive correlations were detected between the left atrium diameter in B-mode ($P= 0.31$, $r= 0.969$), the left ventricle free wall diameter ($P= 0.007$, $r= 0.993$), the intraventricular septum diameter ($P= 0.005$, $r= 0.995$) and the diastolic left ventricle diameter ($P= 0.021$, $r= 0.979$).

Overall survival

At the end of the data collection, nine (39%) animals were still alive, with a mean survival time of 303 days (SD= 237, ranging from 44 to 977 days). Fourteen animals had died, 13 because of lymphoma, and one because of a neurological disease. Necropsies were not permitted by the owners thus were not performed.

Table 5. Comparison of clinical data and the first evaluation of cTnI of treatment and control groups. Variables with symmetric distribution are shown as the mean and standard deviation, variables with asymmetric distribution are shown as the median and minimum and maximum.

Parameter	Treatment group	Control group	P
Sex	Males= 13 Females= 10	Males= 13 Females= 10	1.0
Age (years)	8.9 (\pm 2.9)	4.4 (\pm 2.7)	<0.001
Weight (kg)	12.3 (2-45)	12.5 (3.4-60)	0.659
cTnI (ng/mL)	0.033 (0.006-0.428)	0.009 (0.006-0.067)	0.001

Table 6. Mean and standard deviation values of cardiac troponin I (cTnI) serum concentrations in dogs with lymphoma receiving doxorubicin chemotherapy according to the number of doses. Values are expressed in ng/mL.

cTnI	Pre-treatment n=22	30 mg/m ² n=22	60 mg/m ² n=22	90 mg/m ² n=17	120 mg/m ² n=11	150 mg/m ² n=4	180 mg/m ² n=4	P
1 n=5	0.040 \pm 0.038	0.038 \pm 0.035	0.116 \pm 0.198					0.374
2 n=6	0.035 \pm 0.028	0.022 \pm 0.015	0.033 \pm 0.013	0.119 \pm 0.166				0.246
3 n=7	0.113 \pm 0.145	0.077 \pm 0.097	0.129 \pm 0.213	0.105 \pm 0.135	0.185 \pm 0.138			0.176
4 n=4	0.027 \pm 0.016	0.029 \pm 0.018	0.023 \pm 0.006	0.035 \pm 0.044	0.048 \pm 0.023	0.241 \pm 0.353	0.158 \pm 0.103	0.308

Discussion

The results of this study demonstrated that no significant alterations occurred in serum cTnI concentrations or ECG and echocardiographic parameters in dogs with lymphoma undergoing a cyclic chemotherapy combination with up to 180 mg/m² of doxorubicin. Furthermore, cardiomyopathy was not detected by clinical evaluation or complementary examinations. The occurrence of doxorubicin-induced cardiomyopathy in dogs has been reported in many studies, with incidences varying from 3% to 16% (Price et al., 1991; Mauldin et al., 1992; Selting et al., 2004; Ratterree et al., 2012). The low occurrence of cardiac abnormalities in the present study may be explained by a number of factors: the prolonged infusion period of doxorubicin, the absence of any cardiac disease at the time of diagnosis and the low median cumulative dose.

Gillings et al. (2009) demonstrated that extending the duration of infusion significantly reduced the incidence of conduction disturbances in dogs receiving doxorubicin chemotherapy. Dogs in the present study received doxorubicin for a period

of 40 to 60 minutes, which could account for the lower incidence of cardiac abnormalities. In addition, in a study that demonstrated a 2% incidence of doxorubicin-induced cardiomyopathy in dogs, one animal had shown a heart murmur at diagnosis and before initiating chemotherapy (Ratterree et al., 2012). Echocardiography was not performed prior to the administration of doxorubicin in older studies, suggesting that the higher incidence of cardiomyopathy could be related to subclinical disease, as observed by Price et al. (1991), who detected the occurrence of doxorubicin-induced cardiomyopathy in breeds predisposed to cardiac disease such as the Boxer. In the present study, the animals that had heart murmurs, cardiac diseases or arrhythmias at the time of diagnosis were excluded from the study. There are no guidelines for identifying patients at increased risk of developing doxorubicin-induced cardiomyopathy in veterinary medicine, and animals with cardiac abnormalities at first presentation are supposedly at greater risk.

Experimental studies performed in dogs demonstrated that total doses of doxorubicin of 240 mg/m^2 led to cardiomyopathy (Hanai et al., 1996; Silva and Camacho, 2005). In clinical trials, congestive heart failure has been reported secondary to cumulative doses ranging from 90 to 265 mg/m^2 (Susaneck, 1983; Mauldin et al., 1992; Gillings et al., 2009), with a median total dose of 150 mg/m^2 (Mauldin et al., 1992). Doxorubicin-induced cardiomyopathy is dose-dependent in humans (Chatterjee et al., 2010) and dogs appear to be more sensitive to the cardiotoxic effects of doxorubicin than people (Mauldin et al., 1992). In the present study, the animals received a median total dose of 90 mg/m^2 , which is a lower cumulative dose than used in other studies, a factor that could also explain the lower incidence of cardiotoxicity in this population.

The reported incidence of doxorubicin-induced arrhythmias or conduction disturbances in dogs varies from 7.4 to 17.7%, and ventricular and supra-ventricular premature complexes are the most frequent alterations detected (Price et al., 1991; Mauldin et al., 1992; Ratterree et al., 2012). In the present study, 26% of the animals showed arrhythmias or conduction disturbances at different points during the treatment. However, none of the animals required antiarrhythmic therapy and most arrhythmias were isolated supraventricular premature complexes or first degree atrioventricular block. Furthermore, ECG abnormalities were detected with a median doxorubicin cumulative dose of 60 mg/m^2 , a lower dose than the range of 90 to 120 mg/m^2 detected in others studies (Mauldin et al., 1992; Gillings et al., 2009; Ratterree et al., 2012).

However, isolated ectopic beats and first degree atrioventricular block are not necessarily correlated with cardiac dysfunction and may be related to aging and are sometimes even idiopathically seen in normal hearts (Tilley, 1992). Heart rate was the only significant ECG parameter that decreased in dogs from group 2 (cumulative dose of 90 mg/m^2); however, various factors can affect heart rate and this decrease may have been associated with the handling of the animals during the weekly chemotherapy treatment.

Thirty five percent of dogs showed valvular insufficiencies on the echocardiogram before initiating doxorubicin chemotherapy. Ratterree et al. (2012) found that 53% of dogs had valvular insufficiencies prior to doxorubicin administration. In contrast, 35% of our dogs developed some degree of valvular regurgitation during chemotherapy, a development that had previously been described in dogs receiving doxorubicin chemotherapy (Hanai et al., 1996). However, these insufficiencies varied from mild to moderate, and it is known that mild regurgitations can be found in healthy and older dogs (Boon, 2011). No animal developed severe valvular insufficiencies during doxorubicin chemotherapy in the present study and no increases in left and right atriums diameters were detected.

Increases in systolic and diastolic left ventricle diameters were detected in dogs receiving doxorubicin chemotherapy, as were decreases in FS and EF (Hanai et al., 1996; Silva and Camacho, 2005). Mild increases in systolic and diastolic left ventricle diameters were observed during doxorubicin chemotherapy in the present study (Table 3), but they were not statistically significant. Furthermore, no alterations in FS or EF were detected in dogs with lymphoma receiving doxorubicin chemotherapy; Tater et al. (2012) reported similar findings, suggesting that FS does not change significantly during the administration of a protocol containing doxorubicin. In human medicine, a 4% incidence of systolic dysfunction evidenced by decreases in EF was detected by echocardiography (Toggweiler et al., 2012). The lack of systolic dysfunction in this study could be explained by measurements of FS and EF that were insufficiently sensitive to detect a doxorubicin-induced effect. In addition, only a small number of animals ($n=4$) were monitored up to eight months after the end of chemotherapy with doxorubicin; similarly, only 2% of human patients showed late systolic dysfunction after a median long term follow-up of 3.8 years (Toggweiler et al., 2012). These results indicate that systolic dysfunction may develop later than eight months after the end of doxorubicin chemotherapy in dogs.

A noteworthy observation made in the present study was that increases in serum cTnI concentrations occurred in 35% of animals prior to the doxorubicin administration. Studies evaluating cardiac troponins in dogs with lymphoma showed increases in blood levels of this troponin only after receiving therapeutic doses of doxorubicin ranging from 150 to 180 mg/m² (DeFrancesco et al., 2002; Selting et al., 2004), although one study found higher levels of cTnI in dogs with lymphoma than in dogs without cardiac or other diseases (Serra et al., 2010). Numerous inflammatory conditions have been related to increases in serum cardiac troponin concentrations in dogs, including pyometra (Hagman et al., 2007), gastric dilatation-volvulus (Schober et al., 2002), babesiosis (Lobetti et al., 2002) and erlichiosis (Diniz et al., 2008). The increase in serum cTnI concentration at diagnosis was most likely related to the inflammatory condition of these patients, as 74% of the animals were showing clinical signs (sub-stage “b”) on presentation. While the underlying causes of the myocardial injury in these inflammatory conditions remain unclear, processes such as ischemia or the hypercatecholemia of stress may be involved (O’Brien, 2008).

Selting et al. (2004) detected the highest increases in cTnI in the serum of dogs with neoplasia 3 or 6 months after having received a total dose of 150 mg/m² of doxorubicin, while DeFrancesco et al. (2002) detected increases in cardiac troponin T after doxorubicin treatment of 150 and 180 mg/m² in dogs with lymphoma. The median total dose of doxorubicin in the present study was 90 mg/m², and serial evaluations performed in a small number of animals (n=4) after chemotherapy showed no significant increases in cTnI. In addition, Selting et al. (2004) demonstrated that increases in cTnI generally preceded clinical signs of cardiomyopathy in some dogs, and no such clinical signs were seen in the present study. However, a positive correlation was detected between cTnI and echocardiographic parameters such as aortic and left atrium measures and left ventricular diastolic diameter in animals that were monitored (for at least eight months) after ending the chemotherapy protocol, indicating that increases in serum cTnI concentrations and in certain echocardiographic parameters occur a few months after ending doxorubicin chemotherapy; similar observations have been made in humans (Toggweiler et al., 2012). Cardinale et al. (2000) detected that people without increases in cTnI during high doses of doxorubicin chemotherapy showed a transient reduction in EF, while people with increases in cTnI during therapy showed future left ventricular EF depression. Further studies with longer follow up periods and larger numbers of subjects must be performed in veterinary medicine to

assess if cardiac troponins could predict future systolic dysfunction in dogs receiving doxorubicin.

To our knowledge, this is the first prospective study evaluating cardiac abnormalities by echocardiography, ECG and cTnI in dogs with lymphoma receiving a chemotherapy protocol containing doxorubicin. Despite the low number of subjects in each group, this study demonstrated that total doses of doxorubicin up to 180 mg/m^2 are safe to use in dogs with lymphoma, and no significant cardiac alterations in serum cTnI concentration, ECG or echocardiographic parameters occurred in those patients. As cardiomyopathy was not detected, no exam was able to predict its occurrence.

References

- Baskin, C.R., Couto, G., Wittun, T.E., 2000. Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. *Journal of American Animal Hospital Association* 36, 404-409.
- Boon, J.A. (Ed.), 2011. *Veterinary Echocardiography*. Willey Blackwell, Oxford, 632 pp.
- Bryant, J., Picot, J., Baxter, L., Levitt, G., Sullivan, I., Clegg, A., 2007. Use of cardiac markers to assess the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. *European Journal of Cancer* 43, 1959-1966.
- Burgener, I. A., Kovacevic, A., Mauldin, G. N., Lombard, C. W., 2006. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 277-283.
- Cardinale, D., Sandri, M.T., Martinoni, A., Tricca, A., Civelli, M., Lamantia, G., Cinieri, S., Martinelli, G., Cipolla, C., Fiorentini, C., 2000. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology* 36, 517-522.
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., Karliner, J. S., 2010. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 115, 155-162.
- DeFrancesco, T.C., Atkins, C.E., Keene, B.W., Coats, J.R., Hauck, M.L., 2002. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 553-557.
- Diniz, P.P.V.P., de Moraes, H.S.A., Breitschwerdt, E.B., Schwartz, D.S., 2008. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 1136-1143.

- Gillings, S., Johnson, J., Fulmer, A., Hauck, M., 2009. Effect of a 1-hour IV infusion of doxorubicin on the development of cardiotoxicity in dogs as evaluated by electrocardiography and echocardiography. *Veterinary Therapeutics* 10, 46-58.
- Hagman, R., Lagerstedt, A.S., Fransson, B.A., Bergström, A., Häggström, J., 2007. Cardiac troponin I levels in canine pyometra. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49, 1-8.
- Hanai, K., Takaba, K., Manabe, S., Nakano, M., Kohda, A., Matsuo, M., 1996. Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin. *The Journal of Toxicological Sciences* 21, 1-10.
- Herman, E.H., Lipshultz, S.E., Rifai, N., Zhang, J., Papoian, T., Yu, Z.X., Takeda, K., Ferrans, V.J., 1998. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer research* 58, 195-197.
- Hosoya, K., Kisseberth, W.C., Lord, L.K., Alvarez, F.J., Garcia, A.L., Kosarek, C.E., London, C.A., Couto, C.G., 2007. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 1355-1363.
- Koh, E., Nakamura, T., Takahashi, H., 2004. Troponin T and brain natriuretic peptide as predictors for Adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation Journal* 68, 163-167.
- Lobetti, R., Dvir, E., Pearson, J., 2002. Cardiac troponin in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 63-68.
- Mauldin, G.E., Fox, P.R., Patnaik, A.K., Bond, B.R., Mooney, S.C., Matus, R.E., 1992. Doxorubicin-induced cardiotoxicosis: clinical features in 32 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 6, 82-88.
- Marconato, L., Stefanello, D., Valenti, P., Bonfati, U., Comazzi, S., Roccabianca, P., Caniatti, M., Romanelli, G., Massari, F., Zini, E., 2011. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *Journal of American Veterinary Medical Association* 238, 480-485.
- O'Brien, P.J., 2008. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 245, 206-218.
- Owen L.N. (Ed.), 1980. *TNM Classification of tumours in domestic animals*. 1st ed. World Health Organization, Geneva, 53 pp.
- Pereira Neto, G.B., Andrade, J.N.B., Sousa, M.G., Camacho, A.A., 2006. Holter electrocardiography in dogs showing doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58, 1037-1042.

- Price, G.S., Page, R.L., Fischer, B.M., Levine, J.F., Gerig, T.M., 1991. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5, 259-262.
- Ratterree, W., Gieger, T., Pariaut, R., Saelinger, C., Strickland, K., 2012. Value of echocardiography and electrocardiography as screening tools prior to doxorubicin administration. *Journal of American Animal Hospital Association* 48, 89-96.
- Schober, K.E., Kirbach, B., Oechtering, G., 1999. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *Journal of Veterinary Cardiology* 1, 17-25.
- Schober, K.E., Cornand, C., Kirbach, B., Aupperle, H., Oechtering, G., 2002. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentration in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Journal of Veterinary Medical Association* 221, 381-388.
- Selting, K.A., Lana, S.E., Ogilvie, G.K., Olmstead, A., Mykles, D.L., Bright, J., Richardson, K.L., Walton, J.A., Monnet, E., Fettman, M.J., 2004. Cardiac troponin I in canine patients with lymphoma and osteosarcoma receiving doxorubicin: comparison with clinical heart disease in a retrospective analysis. *Veterinary and Comparative Oncology* 2, 142-156.
- Serra, M., Papakonstantinou, S., Adamcova, M., O'Brien, J.P., 2010. Veterinary and toxicological applications for the detection of cardiac injury using cardiac troponin. *The Veterinary Journal* 185, 50-57.
- Silva, C.E.V., Camacho, A.A., Nakage, A.P.M., Santana, A.E., Canola, J.C., 2004. Efeitos cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos do tratamento crônico experimental com doxorubicina em cães. *Ars Veterinaria* 20, 185-194.
- Silva, C.E.V., Camacho, A.A., 2005. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57, 300-306.
- Sleeper, M.M., Clifford, C.A., Laster, L.L., 2001. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15, 502-503.
- Souza, R.C.A., Camacho, A.A., 2006. Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. *American Journal of Veterinary Research* 67, 1319-1325.
- Susaneck, S.J., 1983. Doxorubicin therapy in the dog. *Journal of Veterinary Medical Association* 182, 70-72.
- Tater, G., Eberle, N., Hungerbuehler, S., Joetzke, A., Nolte, I., Wess, G., Betz, D.,

2012. Ventricular fractional shortening in 108 dogs with malignant lymphoma undergoing chemotherapy with a cyclic combination protocol including doxorubicin. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 40, 261-266.

Thomas, W.P., Gaber, C.E., Jacobs, G.J., Kaplan, P.M., Lombard, C.W., Moise, N.S., Moses, B.L., 1993. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7, 247-252.

Tilley, L. P. (Ed.), 1992. *Essentials of canine and feline electrocardiography*. Lea & Febiger, Philadelphia, 470 pp.

Toggweiler, S., Odermatt, Y., Brauchlin, A., Zander, T., Müller, A., Zuber, M., Winterhalder, R., Erne, P., 2012. The clinical value of echocardiography and acoustic cardiography to monitor patients undergoing anthracycline chemotherapy. *Clinical Cardiology* DOI:10.1002/clc.22074.

Vail, D.M., Young, K.M., 2007. Hematopoietic tumors. In: Withrow, S.J., Vail, D.M. (Eds.), *Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology*. Saunders Elsevier, Saint Louis, pp. 699-733.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou os aspectos epidemiológicos e clínicos, os fatores prognósticos e as complicações relacionadas à cardiotoxicidade induzida pela quimioterapia em cães com linfoma atendidos em um hospital veterinário.

Estudos em medicina humana e veterinária demonstraram um aumento na ocorrência de linfoma em pessoas e em animais nos últimos anos (Fisher & Fisher, 2004; Marconato et al., 2011). Dorn et al. (1967) demonstrou uma incidência de 24 casos em 100 mil cães, enquanto Teske (1994), anos depois, demonstrou um aumento para 33 casos por 100 mil cães. Devido aos poucos dados sobre a ocorrência do linfoma na região de Porto Alegre, e até mesmo no Brasil, esse trabalho avaliou 30 cães com diagnóstico confirmado de linfoma em um período de dois anos, indicando uma elevada ocorrência deste neoplasma.

Dos 30 cães avaliados ao longo do estudo, 18 eram machos e 12 eram fêmeas. A idade média foi de 9 anos (variando de 3 a 14 anos) e o peso médio de 19,5 kg (variando de 2 a 48 kg). Várias raças foram diagnosticadas com linfoma, no entanto, a maioria dos pacientes era sem raça definida. Estes dados são semelhantes aos observados em outros estudos realizados no Brasil (Sequeira et al., 1999; Cardoso et al., 2003; Figuera et al. 2006) e em outros países (Dorn et al., 1967; Teske, 1994).

A maioria dos animais apresentou a forma multicêntrica do linfoma, com estágio clínico de III a V e subestádio “b”, ou seja, apresentando sinais clínicos. A forma multicêntrica é a mais prevalente em cães com linfoma em todo mundo, incluindo no Brasil (Figuera et al. 2006), ocorrendo em cerca de 50 a 91% dos casos, e no momento do diagnóstico os animais apresentam estadiamento clínico elevado (Sequeira et al., 1999; Cardoso et al., 2003; Cápuia et al., 2011). No entanto, uma alta ocorrência de subestádio “b” foi observada neste estudo (83%), dados similares aos observados no Brasil (Cápuia et al., 2011), mas diferentes do que é observado em outros países, onde a maioria dos cães não apresenta sinais clínicos no momento do diagnóstico (Valerius et al., 1997; Chun et al., 2000; Dobson et al., 2001; Garret et al., 2002). Provavelmente este fato se deve à demora do proprietário em identificar um aumento de linfonodos em seu cão, bem como uma possível dificuldade em buscar atendimento médico veterinário.

O imunofenótipo B é o mais comumente diagnosticado em cães, conforme observado no presente estudo. No entanto, um fato importante deste trabalho é uma maior ocorrência de linfomas de células T (38%) quando comparado a outros trabalhos

realizados na Europa, que observaram uma prevalência do imunofenótipo T em 20 a 29% dos casos (Fornel-Fleury et al., 1997; Arespacochaga et al., 2007; Vezzali et al., 2009). Por outro lado, os estudos realizados no Brasil mostraram uma ocorrência ainda maior do imunofenótipo T, variando de 53,5 a 60,2% (Moura, 2000; Moreno & Bracarense, 2007), demonstrando que existe certa variação regional de imunofenotipagem, como ocorre na medicina humana (Fisher & Fiscer, 2004).

As principais alterações laboratoriais e síndromes paraneoplásicas observadas neste estudo foram: anemia (57%), hipoalbuminemia (53%), leucocitose (47%), trombocitopenia (33%), linfopenia (30%), elevações na atividade sérica das enzimas fosfatase alcalina (30%) e alanina aminotransferase (20%), hiperglobulinemia (20%) e hipercalcemia (13%). Poucos são os estudos que avaliaram a ocorrência de síndromes paraneoplásicas observadas em cães com linfoma (Morrison, 1979; Gorman, 1990; Ramos et al., 2008), mas a anemia é frequentemente diagnosticada em animais com câncer e sua ocorrência está relacionada a um pior prognóstico (Abbo & Lucroy, 2007; Miller et al., 2009). Muitos trabalhos também demonstraram a ocorrência de hipercalcemia em cães com linfoma e também correlacionaram a uma menor sobrevida (Greenlee et al., 1990; Keller et al., 1993; Messinger et al., 2009). No entanto, a avaliação da concentração das proteínas séricas por eletroforese não foi muito monitorada em cães com linfoma. Calazans et al. (2009) demonstrou elevações nas concentrações séricas de proteína total, ceruloplasmina e haptoglobina e redução na concentração sérica de albumina em cães com linfoma. Aumento na concentração sérica de globulinas também já foi relatado em cães com linfoma (Jacobs et al., 1986). Outras alterações bioquímicas observadas neste estudo incluíram: elevação na atividade sérica das enzimas fosfatase alcalina (FA) que ocorreu em 30% dos animais, e alanina aminotransferase (ALT), em 20% dos animais, os quais em sua maioria apresentavam envolvimento hepático do linfoma (estadiamento clínico IV); apenas um cão (3%) apresentou elevação na concentração sérica de creatinina, sendo secundário à hipercalcemia causada pelo linfoma; outro cão apresentou hiperglicemia (3%), mas foi diagnosticada com diabetes melito concomitante.

Ao relacionar os achados laboratoriais e alguns aspectos clínicos com o prognóstico, foi demonstrado neste estudo que os cães que apresentaram alterações na fração β_2 das proteínas avaliadas por eletroforese e alterações na contagem de plaquetas, bem como aqueles em estádios clínicos IV e V e condição corporal 1 e 2, tiveram menores taxas de sobrevida. Apesar de inúmeros trabalhos em medicina

veterinária tentarem correlacionar achados laboratoriais no momento do diagnóstico com o prognóstico, nenhum estudo demonstrou que alterações na contagem de plaquetas e na concentração sérica de β 2-globulina estão relacionadas a uma menor sobrevida. Price et al. (1991), demonstraram que cães com linfoma que tornam-se hipoalbuminêmicos apresentaram menores períodos de remissão clínica. Estes fatores são muito importantes, e apesar do número relativamente baixo de cães neste estudo, a realização da contagem de plaquetas e eletroforese de proteínas no momento do diagnóstico pode ser muito importante para o clínico veterinário a fim de avaliar mais parâmetros para estabelecer um prognóstico adequado a cada paciente diagnosticado com linfoma.

Muitos trabalhos já foram realizados a fim de avaliar o prognóstico em cães com linfoma e os dados clínicos são conflitantes. No entanto, a maioria dos estudos demonstrou um pior prognóstico nos cães com imunofenótipo T (Greenlee et al., 1990; Starrak et al., 1997; Kiupel et al., 1999; Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2003). Embora não significativo estatisticamente, os cães com linfoma de células T também apresentaram uma menor sobrevida quando comparados com os de células B. É possível que esta ausência de significância tenha ocorrido pelo número pequeno de cães no estudo, mas também, como aparentemente o linfoma com imunofenótipo T é mais frequente no Brasil que em outros locais do mundo, pode ser que exista uma variação regional na agressividade deste tipo tumoral. Além disso, a classificação morfológica dos linfomas não foi realizada no presente estudo, e já foi demonstrada uma grande variabilidade morfológica mesmo nos diferentes imunofenótipos (T e B), com discrepância em relação à sobrevida e ao tempo de remissão (Ponce et al., 2004). Outros achados clínicos que foram relacionados a uma menor sobrevida no presente estudo foi o estadiamento clínico mais avançado, o que já foi demonstrado em alguns estudos (Price et al., 1991; Jagielski et al., 2002; Marconato et al., 2011), e uma pior condição corporal no momento do diagnóstico. A caquexia é uma síndrome paraneoplásica importante tanto em pessoas quanto em animais com câncer (Bergman, 2007) e apesar de poucas referências de sua ocorrência em cães com linfoma, este estudo demonstrou que aqueles em pior condição corporal no momento do diagnóstico têm menor tempo de sobrevida.

Em relação à resposta à terapia, hipercalcemia, trombocitopenia e elevação no volume corpuscular médio (VCM) estiveram relacionados a um menor período de remissão e uma maior taxa de recidiva. Estudos já demonstraram que cães com

hipercalcemia apresentam menor tempo de remissão e sobrevida (Greenlee et al., 1990; Keller et al., 1993), mas o mesmo não foi observado para aqueles com trombocitopenia e elevação do VCM. No presente trabalho, embora sem significância estatística, observou-se que os cães apresentaram uma redução no hematócrito um mês antes da recidiva, enquanto aqueles que não recidivaram apresentaram aumento no hematócrito. Estes dados são muito importantes para o monitoramento dos cães com linfoma, pois o clínico pode avaliar com mais atenção o seu paciente em remissão que está apresentando alterações no hemograma e na contagem de plaquetas.

O linfoma é um tumor muito agressivo em cães, e o seu tratamento deve ser sistêmico através de quimioterapia (Greenlee et al., 1990; Teske, 1994). Um dos protocolos mais recomendados e estudados em cães com linfoma contém prednisona, vincristina, ciclofosfamida e doxorrubicina (Hosoya et al., 2007; Rassnick et al., 2007; Vail & Young, 2007; Brodsky et al., 2009). No entanto, sabe-se que doses de doxorrubicina a partir de 90 mg/m^2 (três aplicações) podem levar a uma cardiomiopatia irreversível em cães (Mauldin et al., 1992). Por isso alguns estudos foram conduzidos na tentativa de avaliar a cardiotoxicidade da doxorrubicina, mas ainda não ficou esclarecido qual a melhor forma de monitoramento destes pacientes em medicina veterinária, e quais as alterações observadas nos diferentes exames cardiológicos ao longo do tratamento.

Algumas alterações eletrocardiográficas já foram demonstradas em cães recebendo quimioterapia com doxorrubicina, dentre elas a ocorrência de arritmias supra-ventriculares e ventriculares (Mauldin et al., 1992; Souza & Camacho, 2006; Ratterree et al., 2012), as quais também foram observadas no neste estudo. Além disso, dois cães apresentaram distúrbios de condução (bloqueio atrioventricular de primeiro grau), os quais já foram relatados em pacientes recebendo doxorrubicina (Mauldin et al., 1992) e são frequentemente observados em cães idosos (Tilley, 1992). Em relação aos achados ecocardiográficos, três estudos foram conduzidos com animais experimentais e observaram a ocorrência de achados característicos de cardiomiopatia com doses de 240 mg/m^2 , mas alterações no exame ecocardiográfico já iniciaram a partir de 120 mg/m^2 (Hanai et al., 1996; Silva & Camacho, 2005; Souza & Camach, 2006). No único estudo clínico retrospectivo, Tater et al. (2012) não observaram alteração na fração de encurtamento de cães com linfoma que receberam dose total de até 120 mg/m^2 . Ao avaliar as concentrações séricas de troponinas cardíacas em pacientes com linfoma recebendo doxorrubicina, DeFrancesco et al. (2002) observaram aumento na troponina

cardíaca T após doses de 150 mg/m^2 , enquanto Selting et al. (2004) detectaram elevações de troponina cardíaca I em cães recebendo a mesma dose de doxorubicina. Os resultados do presente estudo são similares aos observados por Tater et al. (2012), no qual não foram observadas alterações significativas nos achados do eletrocardiograma, ecocardiograma e na concentração sérica de troponina cardíaca I em cães com linfoma recebendo um protocolo quimioterápico contendo doxorubicina. A diferença em relação ao trabalho de Tater et al. (2012) é que neste estudo não só a fração de encurtamento foi avaliada, mas também outros parâmetros ecocardiográficos e eletrocardiográficos, bem como a concentração sérica de troponina I. Além disso, os cães deste estudo receberam doses de até 180 mg/m^2 de doxorubicina. Na verdade, houve uma redução significativa na frequência cardíaca avaliada pelo eletrocardiograma no grupo de animais que recebeu 90 mg/m^2 de doxorubicina, o que provavelmente esteja associado ao fato de os cães se acostumarem com a manipulação ao longo do tratamento quimioterápico e a realização dos exames complementares.

Outro fato interessante, é que alguns cães que entraram em remissão clínica e não apresentaram recidiva, tiveram o monitoramento cardíaco realizado até completarem um ano após o diagnóstico. Estudos em pessoas demonstraram que aumentos na concentração sérica de troponina cardíaca I precedem o surgimento de disfunção sistólica observada no ecocardiograma meses após o tratamento com doses altas de doxorubicina (Cardinale et al., 2000). Apesar deste fato não ser observado no presente estudo, houve uma correlação positiva entre os valores de troponina cardíaca I e alguns parâmetros ecocardiográficos nestes cães avaliados após o término da aplicação de doxorubicina. Portanto, apesar de não significativas e assintomáticas, alterações cardíacas ocorrem em cães tratados com doxorubicina, e o monitoramento cardíaco é imprescindível nestes pacientes.

6 CONCLUSÕES

Cães com linfoma atendidos na região de Porto Alegre foram predominantemente machos, de meia-idade a idosos, sem raça definida, apresentaram a forma multicêntrica da doença, com estadiamento clínico avançado e imunofenótipo B.

As principais alterações laboratoriais em cães com linfoma foram anemia, hipoalbuminemia, leucocitose e trombocitopenia. Além disso, alguns cães apresentavam síndromes paraneoplásicas no momento do diagnóstico, como hiperglobulinemia e hipercalcemia.

O tempo médio de sobrevida dos cães avaliados foi de 220 dias (variando de 1 a 977 dias), no entanto, os cães com linfoma em que foram detectadas alterações na contagem de plaquetas e na concentração sérica da proteína β_2 , bem como estadiamento clínico IV-V e condição corporal 1-2 no momento do diagnóstico, apresentaram uma menor taxa de sobrevida.

A presença de hipercalcemia, trombocitopenia e elevação no volume corpuscular médio (detectado no hemograma) no momento do diagnóstico foi relacionada a um menor tempo de remissão e maior chance de recidiva em cães com linfoma.

Não foi observada a ocorrência de cardiomiopatia, bem como alterações significativas nos achados eletrocardiográficos, ecocardiográficos e na concentração sérica de troponina I em cães com linfoma recebendo um protocolo quimioterápico contendo doxorubicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBO, A.H.; LUCROY, M.D. Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.231, p.1836-1842, 2007.

ANDRADE, J.N.B.M.; CAMACHO, A.A.; CUEVAS, S.E.; SILVA, C.E.V.; SANTOS, P.S.P.; FANTINATTI, A.; NUNES, N.; STOPIGLIA, A.J. Plicadura da parede livre do ventrículo esquerdo em cão com cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina – relato de caso. **Ars Veterinaria**, v.19, n.1, p.40-43, 2003.

ANDRADE, J.N.B.M.; CAMACHO, A.A.; SANTOS, P.S.P.; FANTINATTI, A.P., NUNES, N.; STOPIGLIA, A.J.; LEAL, J.C.; BRAILE, D.M. Estudo da função ventricular na técnica de plicadura da parede livre do ventrículo esquerdo em cães. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.19, n.2, p.136-143, 2004.

ARESPACOCCHAGA, A.G.; SCHWENDENWEIN, I.; WEISSENBOCK, H. Restrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. **Journal of Comparative Pathology**, v.136, p.186-192, 2007.

ASTRA, L.I.; HAMMOND, R.; TARAKJI, K.; STEPHENSON, L.W. Doxorubicin-induced canine CHF: advantages and disadvantages. **Journal of Cardiac Surgery**, v.18, p.301-306, 2003.

BARRI, Y.M.; KNOCHER, J.P. Hypercalcemia and electrolyte disturbances in malignancy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.10, n.4, p.775-790, 1996.

BASKIN, C.R.; COUTO, G.; WITTUN, T.E. Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.36, p.404-409, 2000.

BERG, J.; WEINSTEIN, M.J.; SPRINGFIELD, D.S.; RAND, W.M. Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 10, p. 1555-1560, 1995.

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

BLACKWOOD, L.; SULLIVAN, M.; LAWSON, H. Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v.38, p.62-68, 1997.

BLACKWOOD, L.; GERMAN, A.J.; STELL, A.J.; O'NEILL, T. Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. **Journal of Small Animal Practice**, v.45, n.5, p.259-262, 2004.

BOON, J.A. **Ecocardiografia bidimensional e em modo-M para o clínico de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005, 97p.

BRODSKY, E.M.; MAULDLIN, G.N.; LACHOWICZ, J.L.; POST, G.S. Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.578-584, 2009.

BRONSON, R.T. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.11, p.2057-2059, 1982.

BRYANT, J.; PICOT, J.; BAXTER, L.; LEVITT, G.; SULLIVAN, I.; CLEGG, A. Use of cardiac markers to assess the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. **European Journal of Cancer**, v.43, p.1959-1966, 2007.

BURGENER, I. A.; KOVACEVIC, A.; MAULDIN, G. N.; LOMBARD, C. W. 2006. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.277-283, 2006.

CAIRO, M.S.; SPOSTO, R.; GERRARD, M.; AUPERIN, A.; GOLDMAN, S.C.; HARRISON, L.; PINKERTON, R.; RAPHAEL, M.; MCCARTHY, K.; PERKINS, S.L.; PATTE, C. Advanced stage, increased lactate dehydrogenase, and primary site, but not adolescent age (≥ 15 years), are associated with an increased risk of treatment failure in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB LMB 96 study. **Journal of Clinical Oncology**, v.30, p.387-393, 2012.

CALAZANS, S.G.; DALECK, C.R.; FAGLIARI, J.J.; REPETTI, C.F.; DE NARDI, A.B.; CASTRO, J.H.T.; FERNANDES, S.C.; CÉSAR, J.R.F.; RODIGHERI, S.M. Proteinograma sérico de cães sadios 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.

CÁPUA, M.L.B.; COLETA, F.E.D.; CANESIN, A.P.M.N.; GODOY, A.V.; CALZANS, S.G.; MIOTTO, M.R.; DALECK, C.R.; SANTANA, A.E. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo Madison-Wisconsin. **Ciência Rural**, v.41, p.1245-1251, 2011.

CARDINALE, D.; SANDRI, M.T.; MARTINONI, A.; TRICCA, A.; CIVELLI, M.; LAMANTIA, G.; CINIERI, S.; MARTINELLI, G.; CIPOLLA, C.M.; FIORENTINI, C. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. **Journal of the American College of Cardiology**, v.36, n.2, p.517-522, 2000.

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; ROCHA, N.S.; MOUTINHO, F.Q.; CIAMPOLINI, P. Linfoma canino: revisão de 54 casos. **Bioscience Journal**, v.19, n.3, p.131-142, 2003.

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q.; PADOVANI, C.R. Sinais clínicos do linfoma canino. **Archives in Veterinary Science**, v.9, p.19-24, 2004a.

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q.; PADOVANI, C.R. Linfoma canino – achados clínico-patológicos. **Archives in Veterinary Science**, v.9, p.25-29, 2004b.

CHATTERJEE, K.; ZHANG, J.; HONBO, N.; KARLINER, J. S. Doxorubicin cardiomyopathy. **Cardiology**, v.115, p.155-162, 2010.

CHUN, R.; GARRET, L.D.; VAIL, D.M. Evaluation of a high dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.120-124, 2000.

CIENAVA, E.A.; BARNHART, K.F.; BROWN, R.; MANSELL, J.; DUNSTAN, R.; CREDILLE, K. Morphologic, immunohistochemical, and molecular characterization of hepatosplenic T-cell lymphoma in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, p.105-110, 2004.

COUDREY, L. The troponins. **Archives of Internal Medicine**, v.158, p.1173-1180, 1998.

COUTO, C.G.; RUTGERS, H.C.; SHERDING, R.G.; ROJKO, J. Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs: a retrospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.3, p.73-78, 1989.

COUTO, C.G. Oncologia. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Manual de medicina interna de pequenos animais**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2006. Cap. 77-84, p. 1059-1117.

DAL FARRA, M.C.T.; CAMACHO, A.A.; DIAS, M.A.; SANTANA, A.E. Estudo dos efeitos cardiotoxicos em cães tratados com doxorubicina (adriablastina). **Ars Veterinaria**, v. 11, n. 1, p. 6-16, 1995.

DE FRANCESCO, T.C.; ATKINS, C.E.; KEENE, B.W.; COATS, J.R.; HAUCK, M.L. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n. 5, p. 553-557, 2002.

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

DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 3235p.

DINIZ, P.P.V.P.; DE MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B.; SCHWARTZ, D.S. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, p.1136-1143, 2008.

DOBSON, J.M.; BLACKWOOD, L.B.; MCINNES, E.F.; BOSTOCK, D.E.; NICHOLLS, P.; HOATHER, T.M.; TOM, B.D.M. Prognostic variables in canine

multicentric lymphosarcoma. **Journal of Small Animal Practice**, v.42, p.377-384, 2001.

DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.N.; HIBBARD H.H. Epizootic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. **American Journal of Veterinary Research**, v.28, n.125, p.993-1001, 1967.

EBERLE, N.; BABO, V.; NOLTE, I.; BAUMGÄRTNER, W.; BETZ, D. Splenic masses in dogs: epidemiological, clinical characteristics as well as histopathologic diagnosis in 249 cases (2000-2011). **Tierärztliche Praxis Kleintiere**, v.40, n.4, p.250-260, 2012.

FAHEY, C.E.; MILNER, R.J.; BARABAS, K.; LURIE, D.; KOW, K.; PARFITT, S.; LYLES, S.; CLEMENTE, M. Evaluation of the University of Florida lomustine, vincristine, procarbazine, and prednisone chemotherapy protocol for the treatment of relapsed lymphoma in dogs: 33 cases (2003-2009). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.239, p.209-215, 2011.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; BARROS, C.S.L. Linfossarcoma em cães. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.895-899, 2002.

FIGHERA R.A.; SOUZA T.M.; RODRIGUES A.; BARROS C.S.L. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais de Estimação**, v.4, n.12, p.139-146, 2006.

FIGHERA R.A.; GRAÇA, D.L. Tecido linfóide. In: SANTOS, R.L., ALESSI, A.C. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2010, p.904.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SILVA, M.C.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS C.S.L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p.223-230, 2008.

FISHER, S.G.; FISHER, R.I. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. **Oncogene**, v.23, p.6524-6534, 2004.

FLORY, A.B.; RASSNICK, K.M.; AL-SARRAF, R.; BAILEY, D.B.; BALKMAN, C.E.; KISELOW, M.A.; AUTIO, K. Combination of CCNU and DTIC chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, p.164-171, 2008.

FLORY, A.B.; RASSNICK, K.M.; ERB, H.N.; GARRETT, L.D.; NOTHRUP, N.C.; SELTING, K.A.; PHILLIPS, B.S.; LOCKE, J.E.; CHRETIN, J.D. Evaluation of factors associated with second remission in dogs with lymphoma undergoing retreatment with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy protocol: 95 cases (2000-2007). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.238, p.501-506, 2011.

FONSECA, S.M.; MACHADO, R.C.L.; PAIVA, D.R.S.; ALMEIDA, E.P.M.; MASSUNAGA, V.M.; JÚNIOR, W.R.; KOIKE, C.; TADOKORO, H. **Manual de quimioterapia antineoplásica**. Rio de Janeiro: Ed. Reichmann & Affonso, 2000. 164p.

FOSTER, A.P.; STURGESS, C.P.; GOULD, D.J.; IWASAKI, T.; DAY, M.J. Phemphigus foliaceus in association with systemic lupus erythematosus, and subsequent lymphoma in a Cocker Spaniel. **Journal of Small Animal Practice**, v.41, p.266-270, 2000.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v.117, p.35-59, 1997.

FRY, M.M.; VERNAU, W.; PESAVENTO, P.A.; BRÖMEL, C.; MOORE, P.F. Hepatosplenic lymphoma in a dog. **Veterinary Pathology**, v.40, p.556-562, 2003.

GARRET, L.D.; THAMM, D.H.; CHUN, R.; DUDLEY, R.; VAIL, D.M. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.704-709, 2002.

GAVAZZA, A.; PRESCIUTTINI, S.; BARALE, R.; LUBAS, G.; GUGLIUCCI, B. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, p.190-195, 2001.

GAVAZZA, A.; LUBAS, G.; VALORI, E.; GUGLIUCCI, B. Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog, therapeutic and prognostic features. **Veterinary Research Communication**, v.32, s.1, p.291-293, 2008.

GEROU-FERRIANI, M.; MCBREARTY, A.R.; BURCHMORE, R.J.; JAYAWARDENA, K.G.I.; ECKERSALL, P.D.; MORRIS, J.S. Agarose gel serum protein electrophoresis in cats with and without lymphoma and preliminary results of tandem mass fingerprinting analysis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40, p.159-173, 2011.

GILLINGS, S.; JOHNSON, J.; FULMER, A.; HAUCK, M. Effect of a 1-hour IV infusion of doxorubicin on the development of cardiotoxicity in dogs as evaluated by electrocardiography and echocardiography. **Veterinary Therapeutics**, v.10, p.46-58, 2009.

GIRAUDEL, J.M.; PAGÈS, J.P.; GUELFI, J.F. Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.38, p.135-147, 2002.

GORMAN, N.T. Clinical management of tumours in geriatric dogs and cats: systemic effects of tumours and paraneoplastic syndromes. **The Veterinary Record**, v.21, p.395-398, 1990.

GREENLEE, P.G.; FILIPPA, D.A.; QUIMBY, F.W.; PATNAIK, A.K.; CALVANO, S.E.; MATUS, R.E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, A.I.; LIEBERMAN, P.H. Lymphomas in dogs. **Cancer**, v.66, n.3, p.480-490, 1990.

GRIESSMAYR, P.C.; PAYNE, S.E.; WINTER, J.E.; BARBER, L.G.; SHOFRER, F.S. Dacarbazine as single-agent therapy for relapsed lymphoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.1227-1231, 2009.

HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A.S.; FRANSSON, B.A.; BERGSTRÖM, A.; HÄGGSTRÖM, J. Cardiac troponin I levels in canine pyometra. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, p.1-8, 2007.

HANAI, K.; TAKABA, K.; MANABE, S.; NAKANO, M.; KOHDA, A.; MATSUO, M. Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.21, p.1-10, 1996.

HAHN, K.A.; RICHARDSON, R.C.; HAHN, E.A.; CHRISMAN, C.L. Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Pathology**, v.31, p.528-540, 1994.

HAHN, K.A.; RICHARDSON, R.C. **Cancer chemotherapy: a veterinary handbook**. Malvern: Ed. Williams & Wilkins, 1995. 255p.

HAHN, K.A.; FREEMAN, K.P.; BARNHILL, M.A.; STEPHEN, E.L. Serum α_1 -acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treated with doxorubicin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, n.7, p.1023-1025, 1999.

HERMAN, E.H.; LIPSHUKTZ, S.E.; RIFAI, N.; ZHANG, J.; PAPOIAN, T.; YU, Z.; TAKEDA, K.; FERRANS, V.J. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Cancer Research**, v.58, p.195-197, 1998.

HERMAN, E.H.; ZHANG, J.; LIPSHULTZ, S.E.; RIFAI, N.; CHADWICK, D.; TAKEDA, K.; YU, Z.X.; FERRANS, V.J. Correlation between serum levels of cardiac troponin-T and the severity of the chronic cardiomyopathy induced by doxorubicin. **Journal of Clinical Oncology**, v.17, n.7, p.2237-2243, 1999.

HOSOYA, K.; KISSEBERTH, W.C.; LORD, L.K.; ALVAREZ, F.J.; GARCIA, A.L.; KOSAREK, C.E.; LONDON, C.A.; COUTO, G. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1355-1363, 2007.

JACOBS, R.M.; COUTO, C.G.; WELLMAN, M.L. Biclonal gammopathy in a dog with myeloma and cutaneous lymphoma. **Veterinary Pathology**, v.23, p.211-213, 1986.

JAGIELSKI, D.; LECHOWSKI, R.; HOFFMANN-JAGIELSKA, M.; WINIARCZYK, S. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). **Journal of Veterinary Medicine A**, v.49, p.419-424, 2002.

JEMAL, A.; TIWARI, R.C.; MURRAY, T.; GHAFOR, A.; SAMUELS A.; WARD, E.; FEUER, E.J.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2004. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.54, p.8-29, 2004.

KELLER, E.T.; MACEWEN, E.G.; ROSENTHAL, R.C.; HELFAND, S.C.; FOX, L.E. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.7, p.289-295, 1993.

KIPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v.36, p.292-300, 1999.

KOH, E.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, H. Troponin-T and brain natriuretic peptide as predictors for adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. **Circulation Journal**, v.68, p.163-167, 2004.

KRONFELD, D.S.; DONOGHUE, S.; GLICKMAN, L.T. Body condition and energy intakes of dogs in a referral teaching hospital. **Journal of Nutrition**, v.121, p.S157-S158, 1991.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Editora Roca, 2004. 191p.

LATIMER K.S.; PRASSE K.S. 2003. Leukocytes, p.46-79. In: Latimer K.S., Mahaffey E.A. & Prasse K.W. (Eds), **Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**. 4th ed. Iowa: Iowa State Press, 2003.

LEGENDRE, A.M. Treatment of dogs with lymphoma: a work in progress. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1166-1167, 2007.

LIPSHULTZ, S.E.; RIFAI, N.; SALLAN, S.E.; LIPSITZ, S.R.; DALTON, V.; SACKS, D.B.; OTTLINGER, M.E. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. **Circulation**, v.96, p.2641-2648, 1997.

LIPSHULTZ, S.E.; RIFAI, N.; DALTON, V.M.; LEVY, D.E.; SILVERMAN, L.B.; LIPSITZ, S.R.; COLAN, S.D.; ASSELIN, B.L.; BARR, R.D.; CLAVELL, L.A.; HURWITZ, C.A.; MOGHRABI, A.; SAMSON, Y.; SCHORIN, M.A.; GELBER, R.D.; SALLAN, S.E. The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.351, n.2, p.145-153, 2004.

LOBETTI, R.; DVIR, E.; PEARSON, J. Cardiac troponin in canine babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.63-68, 2002.

LURIE, D.M.; GORDON, I.K.; THEON, A.P.; RODRIGUEZ, C.O.; SUTER, S.E.; KENT, M.S. Sequential low-dose rate half-body irradiation and chemotherapy for the treatment of canine multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.1064-1070, 2009.

MACEWEN, E.G.; BROWN, N.O.; PATNAIK, A.K.; HAYES, A.A.; PASSE, S. Cyclic combination chemotherapy of canine lymphosarcoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.178, n.11, p.1178-1181; 1981.

MACEWEN, E.G.; HAYES, A.A.; MATUS, R.E.; KURZMAN, I. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.190, n.5, p.564-568, 1987.

MADEWELL, B.R. Chemotherapy for canine lymphosarcoma. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.10, p.1525-1528, 1975.

MARCONATO, L.; CRISPINO, G.; FINOTELLO, R.; MAZZOTTI, S.; SALERNI, F.; ZINI, E. Serum lactate dehydrogenase activity in canine malignancies. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.7, p.236-243, 2009.

MARCONATO, L.; CRISPINO, G.; FINOTELLO, R.; MAZZOTTI, S.; ZINI, E. Clinical relevance of serial determinations of lactate dehydrogenase activity used to predict recurrence in dogs with lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.236, p.969-974, 2010.

MARCONATO, L.; STEFANELLO, D.; VALENTI, P.; BONFATI, U.; COMAZZI, S.; ROCCABIANCA, P.; CANIATTI, M.; ROMANELLI, G.; MASSARI, F.; ZINI, E. Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.238, p.480-485, 2011.

MAULDIN, G.E.; FOX, P.R.; PATNAIK, A.K.; BOND, B.R.; MOONEY, S.C.; MATUS, R.E. Doxorubicin-induced cardiotoxicosis: clinical features in 32 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.6, p.82-88, 1992.

MESSINGER, J.S.; WINDHAM, W.R.; WARD, C.R. Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.514-519, 2009.

MICHEL, A.R. Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, v.145, n.22, p.625-629, 1999.

MICHEL, K.E.; SORENMO, K.; SHOFER, F.S. Evaluation of body condition and weight loss in dogs presented to a veterinary oncology service. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, n.5, p.692-695, 2004.

MILLER, A.G.; MORLEY, P.S.; RAO, S.; AVERY, A.C.; LANA, S.E.; OLVER, C.S. Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.116-122, 2009.

MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Linfoma canino de células T: aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de 38 casos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, p.103-110, 2007.

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

MORRISON, W.B. Paraneoplastic syndromes of the dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.175, n.6, p.559-561, 1979.

MOURA, V.M.B.D. Classificação citohistológica e imunofenotipagem dos linfomas caninos. **Dissertação de mestrado**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2000, 107p.

MUTSAERS, A.J.; GLICKMAN, N.W.; DENICOLA, D.B.; WIDMER, W.R.; BONNEY, P.L.; HANH, K.A.; KNAPP, D.W. Evaluation of treatment with doxorubicin and piroxicam or doxorubicin alone for multicentric lymphoma in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.220, n.12, p.1814-1817, 2002.

NEUWALD, E.B. Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratados com doxorubicina. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2009, 93p.

NIELSEN, L.; TOFT, N.; ECKERSALL, P.D.; MELLOR, D.J.; MORRIS, J.S. Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1231-1236, 2007.

O'BRIEN, P.J.; DAMERON, G.W.; BECK, M.L.; KANG, Y.J.; ERICKSON, B.K.; Di BATTISTA, T.H.; MILLER, K.E.; JACKSON, K.N.; MITTELSTADT, S. Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. **Laboratory Animal Sciences**, v.47, n.5, p.486-495, 1997.

O'BRIEN, P.J. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. **Toxicology**, v.245, p.206-218, 2008.

OCARINO, N.M.; SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; MELO, A.E.; FRANÇA, S.A.; PAIXÃO, T.A. Linfoma ósseo em cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p.140-142, 2005.

OGILVIE, G.K.; VAIL, D.M.; KLEIN, M.K.; POWERS, B.E.; DICKINSON, K. Weekly administration of low-dose doxorubicin for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.198, n.10, p.1762-1764, 1991.

OWEN, L.N. **TNM Classification of tumours in domestic animals**. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 1980. 53p.

PASTOR, M.; CHALVET-MONFRAY, K.; MARCHAL, T.; KECK, G.; MAGNOL, J.P.; FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkins's lymphomas: breed associations and geographic distribution of

608 cases diagnosed throughout France over 1 year. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.301-310; 2009.

PLANINC-PERAICA, A.; KOLONIC, S.O.; RADIC-KRISTO, D.; DOMINIS, M.; JAKSIC, B. Serum immunoglobulins in non-Hodgkin's lymphoma patients. **Collegium Antropologicum**, v.34, p.407-411, 2010.

PEREIRA NETO, G.B.; ANDRADE, J.N.B.; SOUZA, M.G.; CAMACHO, A.A. Holter electrocardiography in dogs showing doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1037-1042, 2006.

PONCE, F.; MAGNOL, J.P.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **Veterinary Journal**, v.167, p.158-166, 2004.

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

PRICE, G.S.; PAGE, R.L.; FISCHER, B.M.; LEVINE, J.F.; GERIG, T.M. Cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, p.259-262, 1991.

RAMOS, R.S.; MACHADO, L.H.A.; CONCEIÇÃO, L.C.; HECKLER, M.C.T. Estudo da prevalência das principais síndromes paraneoplásicas de 14 cães com linfoma – relato de casos. **Veterinária e Zootecnia**, v.10, n.3, p.38-39, 2008.

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

RASSNICK, K.M.; MCENTEE, M.C.; ERB, H.N.; BURKE, B.P.; BALKMAN, C.E.; FLORY, A.B.; KISELOW, M.A.; AUTIO, K.; GIEGER, T.L. Comparison of 3 protocols for treatment after induction of remission in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1364-1373, 2007.

RASSNICK, K.M.; MOORE, A.S.; COLLISTER, K.E.; NORTHRUP, N.C.; KRISTAL, J.D.; CHRETIN, J.D.; BAILEY, D.B. Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.317-322, 2009.

RATTERREE, W.; GIEGER, T.; PARIAUT, R.; SAELINGER, C.; STRICKLAND, K. Value of echocardiography and electrocardiography as screening tools prior to doxorubicin administration. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.48, p.89-96, 2012.

RODASKI, S.; DE NARDI, R.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. Curitiba: Editora Maio, 2004. 307 p.

SABA, C.F.; HAFEMAN, S.D.; VAIL, D.M.; THAMM, D.H. Combination chemotherapy with continuous L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.1058-1063, 2009.

SCHOBER, K.E.; KIRBACH, B.; OECHTERING, G. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.1, p.17-25, 1999.

SCHOBER, K.E.; CORNAND, C.; KIRBACH, B.; AUPPERLE, H.; OECHTERING, G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentration in dogs with gastric dilatation-volvulus. **Journal of Veterinary Medical Association**, v.221, p.381-388, 2002.

SELTING, K.A.; LANA, S.E.; OGILVIE, G.K.; OLMSTEAD, A.; MYKLES, D.L.; BRIGHT, J.; RICHARDSON, K.L.; WALTON, J.A.; MONNET, E.; FETTMAN, M.J. Cardiac troponin I in canine patients with lymphoma and osteosarcoma receiving doxorubicin: comparison with clinical heart disease in a retrospective analysis. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.2, p.142-156, 2004.

SEQUEIRA, J.L.; FRANCO, M.; BANDARRA, E.P.; FIQUEIREDO, L.M.A.; ROCHA, N.S. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, 1999.

SERRA, M.; PAPAKONSTANTINO, S.; ADAMCOVA, M.; O'BRIEN, J.P. Veterinary and toxicological applications for the detection of cardiac injury using cardiac troponin. **The Veterinary Journal**, v.185, p.50-57, 2010.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A.; NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CANOLA, J.C. Efeitos cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos do tratamento crônico experimental com doxorubicina em cães. **Ars Veterinaria**, v. 20, n. 2, p. 185-194, 2004.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 300-306, 2005.

SISSON, D.; THOMAS, W.P. Afecções do miocárdio. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4th ed. São Paulo: Ed. Manole, 1997. p.1382-1429.

SISSON, D.; O'GRADY, M.R.O.; CALVERT, C.A. Myocardial diseases in dogs. In: FOX, P.R.; SISSON, D.; MÖISE, N.S. **Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p.581-620.

SLEEPER, M.M.; CLIFFORD, C.A.; LASTER, L.L. Cardiac troponin I in the normal

dog and cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, n. 5, p. 501-503, 2001.

SOUZA, R.C.A.; CAMACHO, A.A. Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.8, p.1319-1325, 2006.

STARRAK, G.S.; BERRY, C.R.; PAGE, R.L.; JOHNSON, J.L.; THRALL, D.E. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.38, p.411-418, 1997.

STRANDSTROM, H.V.; RIMAILA-PARNANEN, E. Canine atypical malignant lymphoma. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.7, p.1033-1034, 1979.

SUSANECK, S.J. Doxorubicin therapy in the dog. **Journal of Veterinary Medical Association**, v.182, p.70-72, 1983.

TASCA, S.; CARLI, E.; CALDIN, M.; MENEGAZZO, L.; FURLANELLO, T.; GALLEGGO, L.S. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n.1, p.2-12, 2009.

TATER, G.; EBERLE, N.; HUNGERBUEHLER, S.; JOETZKE, A.; NOLTE, I.; WESS, G.; BETZ, D. Ventricular fractional shortening in 108 dogs with malignant lymphoma undergoing chemotherapy with a cyclic combination protocol including doxorubicin. **Tierärztliche Praxis Kleintiere**, v.40, p.261-266, 2012.

THOMAS, W.P.; GABER, C.E.; JACOBS, G.J.; KAPLAN, P.M.; LOMBARD, C.W.; MOISE, N.S.; MOSES, B.L. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.7, p.247-252, 1993.

THRALL, M.A. Classificação e diagnóstico de anemia. In: THRALL, M.A. ed. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*, 1st ed. São Paulo: Roca; 2007: p.78-83.

TESKE, E. Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. **Veterinary Quarterly**, v.16, n.29S-31S, 1994.

TILLEY, LP. Analysis of canine P-QRS-T deflections. In: TILLEY, LP. ed. **Essentials of canine and feline electrocardiography**, 3rd ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1992: p.57-99.

TOGGWEILER, S.; ODERMATT, Y.; BRAUCHLIN, A.; ZANDER, T.; MÜLLER, A.; ZUBER, M.; WINTERHALDER, R.; ERNE, P. The clinical value of echocardiography and acoustic cardiography to monitor patients undergoing anthracycline chemotherapy. **Clinical Cardiology**, DOI:10.1002/clc.22074, 2012.

VAIL, D.M.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, MACEWEN'S. **Small Animal Clinical Oncology**. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. Cap 31, p.699-733.

VALERIUS, K.D.; OGILVIE, G.K.; MALLINCKRODT, C.H.; GETZY, D.M. Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.219, n.4, p.512-516, 1997.

VAUGHAN, A.; JOHNSON, J.L.; WILLIAMS, L.E. Impact of chemotherapeutic dose intensity and hematologic toxicity on first remission duration in dogs with lymphoma treated with a chemoradiotherapy protocol. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1332-1339, 2007.

VEZZALI, E.; PARODI, A.L.; MARCATO, O.S.; BETTINI, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to WHO. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.8, p.38-49, 2009.

WIEDEMANN, A.L.; CHARNEY, S.C.; BARGER, A.M.; SCHAEFFER, D.J.; KITCHELL, B.E. Assessment of corticosteroid-induced alkaline phosphatase as a prognostic indicator in canine lymphoma. **Journal of Small Animal Practice**, v.46, p.185-190, 2005.

WITHROW, S.J. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders, 2007. 844p.

YAM, P.S.; JOHNSON, V.S.; MARTINEAU, H.M.; DICKIE, A.; SULLIVAN, M. Multicentric lymphoma with intestinal involvement in a dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 43, n.2, p.138-143, 2002.

YONEDA, B.T.; AUFDEMORTE, T.B.; NISHIMURA, R.; NISHIKAWA, N.; SAKUDA, M.; ALSINA, M.M.; CHAVEZ, J.B.; MUNDY, G.R. Occurrence of hypercalcemia and leucocytosis with cachexia in a human squamous cell carcinoma of the maxilla in athymic nude mice: a novel experimental model of three concomitant paraneoplastic syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v.9, n.3, p.468-477, 1991.

ZANATTA, R.; ABATE, O.; MINISCALCO, B.; MANELLI, A. Diagnostic and prognostic value of serum lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes in canine lymphoma. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.1, p.449-452, 2003.