

Dayse Helena Lages da Silva

**CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DO
LINFOMA DE GATOS DOMÉSTICOS E SUA
CORRELAÇÃO COM O VÍRUS DA
LEUCEMIA FELINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre na área de concentração de Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Profa Fabiola de Oliveira Paes Leme

Co-orientadores: Prof. Felipe Pierezan

Prof. Rodrigo Horta dos Santos

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária-UFMG
2019**

S586c

Silva, Dayse Helena Lages da, 1987-

Classificação imunofenotípica do linfoma de gatos domésticos e sua correlação com o vírus da leucemia felina / Dayse Helena Lages da Silva. – 2019.
69 p. : il.

Orientadora: Fabíola de Oliveira Paes Leme

Co-orientadores: Felipe Pierezan, Rodrigo Horta dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Gato – Doenças – Teses. 2. Linfoma – Teses. 3. Leucemia felina – Teses. 4. Vírus da leucemia felina – Teses. 5. Imunohistoquímica – Teses. I. Leme, Fabíola de Oliveira Paes. II. Pierezan, Felipe. III. Santos, Rodrigo Horta dos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

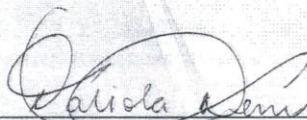
CDD – 636.089 699 4

FOLHA DE APROVAÇÃO

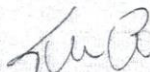
DAYSE HELENA LAGES DA SILVA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS .

Aprovada em 06 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



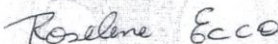
Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Presidente - Orientador



Profª. Tathiana Mourão dos Anjos
Faculdade de Estudos Administrativos - FEAD



Prof. Rodrigo dos Santos Horta
Universidade Vila Velha - UVV



Profª. Roselene Ecco
Escola de Veterinária - UFMG

Dedico este trabalho a todos os gatos, que me proporcionam amor pela veterinária e pela vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus pela oportunidade de ter feito este trabalho, por guiar meu caminho, ter me ajudado a superar todos os obstáculos, me dando forças para continuar mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço imensamente a minha orientadora Fabiola de Oliveira Paes Leme, que foi professora, irmã, e principalmente mãe. Foi a única pessoa que acreditou em mim no momento que mais precisava de apoio, obrigada pelos ensinamentos, pela dedicação, paciência e compreensão. Estará no meu coração para sempre, gratidão eterna.

Ao meu co-orientador Felipe Pierezan por ter me proporcionado conhecimento e oportunidade para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores que me ajudaram na aquisição de amostras: Tathiana Mourão, Marina Moller, e agradecimento especial ao Rodrigo Horta por aceitar a co-orientação e ter conseguido amostras para este trabalho.

Ao setor da Patologia Animal da UFMG por liberar a utilização dos casos de linfomas em gatos, e cedido a estrutura do laboratório para realização do processamento dos materiais. Aos colegas da Patologia Animal que sempre me avisavam quando chegava um caso de suspeita de linfoma: Clarissa Santana, Sóstene Apolo, Samantha Kuran e Luís Henrique.

À minha IC, Rossana Priscilla, que se dedicou muito para o sucesso deste trabalho. À Aline Costa por ter passado horas me ajudando no processamento e confecção dos materiais.

Ao laboratório de Patologia Comparada do ICB por ter fornecido todo o apoio para o processamento da Imuno-histoquímica, em especial ao prof. Geovanni Cassali por ter aceitado ser colaborador e dar todo suporte de estrutura e materiais para a realização da imuno-histoquímica. Um agradecimento muito especial a Aline De Biasi por ter passado incessantes horas e dias executando todo o processamento da imuno-histoquímica.

Ao Retrolab do setor de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, em especial ao prof. Jenner K. Pimenta por ter aceitado a colaboração e cedido a estrutura e os materiais para a elaboração deste trabalho. Um agradecimento muito especial, aos responsáveis por resultados importantes deste trabalho: Raphael Mattoso, Emília Delarmelina e Juliana Marques muito obrigada pela dedicação e apoio.

À profa. Érika Azevedo por ter ajudado no planejamento e nas escolhas de ferramentas para a realização da PCR deste trabalho.

À Escola de Veterinária da UFMG por me proporcionar a realização de um sonho.

O agradecimento especial aos meus gatos que a cada dia me ensinam a amar, compreender, ter esperança e fé. Eles são os responsáveis pela minha história na veterinária e pela realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	9
RESUMO.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO LITERATURA	13
3.1 Epidemiologia do linfoma em gatos domésticos	13
3.2 Etiologia e fatores de risco do linfoma felino.....	15
3.2.1 Vírus da Leucemia Felina.....	15
3.2.1.1 Patogênese do Vírus da Leucemia Felina	16
3.2.1.2 Infecção.....	17
3.2.1.3 Linfomagenese Viral	18
3.2.2 Vírus da imunodeficiência felina.....	20
3.2.3 <i>Gammaherpesvirus 1 Felis catus</i> (FcaGHV1).....	20
3.2.4 Infecções bacterianas.....	21
3.2.5 Exposição à fumaça de tabaco.....	22
3.2.6 Inflamação crônica.....	22
3.2.7 Importância da Dieta e Componentes Genéticos.....	23
3.3 Classificação do linfoma não-Hodgkin em felinos domésticos.....	23
3.3.1 Classificação anatômica do linfoma.....	23
3.3.2 Classificação histológica do linfoma.....	24
3.3.3 Classificação Imuno-histoquímica do linfoma.....	27
3.4 Manifestações Clínicas.....	27
3.5 Diagnóstico do linfoma.....	29
3.5.1 Exames complementares.....	29
3.5.2 Exame de imagem.....	30
3.5.3 Citologia.....	31
3.5.4 Biópsia por Endoscopia X Biópsia por laparotomia.....	32
3.5.5 Histopatologia.....	32
3.5.6 Imuno-histoquímica.....	33
3.5.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
3.6 Prognóstico.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Amostras.....	38
4.2 Histopatologia e imuno-histoquímica.....	38
4.3 Extração do DNA do material parafinizado.....	39
4.3.1 PCR para avaliação da eficiência da extração do DNA.....	39
4.3.2 PCR <i>semi-nested</i> para detecção do FeLV no tecido neoplásico.....	39
4.4 Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47

8.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	48
9.	ANEXO.....	69
9.1	Certificado do projeto na comissão de ética no uso de animais/UFMG.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCIWF) para linfomas....	25
Figura 2- Classificação das neoplasias linfoides segundo a Organização Mundial da Saúde	26
Figura 3- Estadiamento clínico do linfoma felino multicêntrico.....	27
Figura 4- Marcadores imunohistoquímicos usado em cães e gatos.....	34
Figura 5- Etapa da reação do anticorpo primário e suas particularidades.....	38
Figura 6- Descrição dos primers e o tamanho dos produtos para PCR dos genes beta actina e provírus do FeLV	39
Figura 7- Resultado dos casos que foram avaliados PCR para o provírus FeLV do tecido neoplásico e a marcação de imuno-histoquímica.....	40
Figura 8- Linfoma gastrointestinal em região do cárdia.....	41
Figura 9- Imuno-histoquímica. reatividade intramembranosa e citoplasmática de células B neoplásicas com CD79a.....	42
Figura 10- Eletroforese em gel de agarose 1,5%	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNOR: Região organizadora nucleolítica argirofílica
BCR: Receptor de células B
BSAP: Proteína Ativadora específica de células B
BUN: Nitrogênio Uréico sanguíneo
C: constantes
CD: Clusters of differentiation
COP: Ciclofosfamida, Vincristina e Prednisolona
D: diversidade
DAB: Diaminobenzidina
EATCL: Linfoma de células T associado à enteropatia
EBV: Epstein-Barr
ELISA: Ensaio imunoenzimático
enFeLV: Vírus da Leucemia Felina Endógena
env: envelope
EPF: Enterite linfoplasmocitária felina
EUA: Estados Unidos da América
FELV: Vírus da Leucemia Felina
FIV: Vírus da imunodeficiência felina
FOCMA: Antígeno de membrana celular de Oncornavírus felino
gag: antígeno grupo específico
GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue
Hhe: Helicobacter heilmannii
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
Ig: Imunoglobulina
IHQ: Imuno-histoquímica
J: juncionais
KSHV: Sarcoma de Kaposi
LCR: Líquido Cefalorraquidiano
LG: Linfoma gastrointestinal
LGBG: Linfoma Gastrointestinal de baixo grau
LGL: Linfoma de grandes células granulares
LTR: Repetições terminais longas
MALT: Tecido linfoide associado a mucosa
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
NCIWF: Instituto Nacional do câncer nos EUA
NK: Natural killer
OMS: Organização Mundial da Saúde

PAAF: Punção aspirativa por agulha fina
PARR: Rearranjo do receptor de antígeno
PAX: Domínios pareados altamente conservados
PBS: Tampão fosfato salino
PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pol: polimerase
REAL: *Revised European – American Classification of lymphoid neoplasms*
RT: Transcriptase reversa
SIC: Sítio de integração comum
SNC: Sistema nervoso central
TCR: Receptor de células T
V: variáveis
WF: *Working Formulation*
WHO: World Health Organisation

RESUMO

O linfoma é a neoplasia mais comum em gatos, apresenta várias formas anatômicas, sendo a mais comum a gastrointestinal. Entretanto, envolvimento do gammaretrovírus pode predispor a apresentação de outras formas anatômicas como a mediastinal e a multicêntrica. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo retrospectivo do linfoma felino e relacionar à forma anatômica, o imunofenótipo com a presença do DNA proviral do vírus da leucemia felina (FeLV), para tanto foram avaliados 56 casos. A forma do linfoma mais comum foi a gastrointestinal. Não houve diferença significativa na proporção entre linfoma de células T (28) e o de células B (26). Utilizando DNA extraído de tecido parafinizados de 29 gatos, foram obtidos 24 positivos para o DNA proviral do FeLV através do PCR *semi nested*. A forma anatômica multicêntrica apresentou maior percentual (37,5%) da presença do DNA proviral do FeLV, seguida da mediastinal. O imunofenótipo que teve maior correlação com a presença do vírus foi o linfoma de células T (50%). Aparentemente no Brasil, existe uma alta relação entre o linfoma e a presença do DNA proviral do FeLV.

Palavras chave: Imuno-histoquímica, forma anatômica, células T, células B, provírus do FeLV.

ABSTRACT

Lymphoma is the most common neoplasm in cats, presenting several anatomical forms, the most common being gastrointestinal. However, involvement of the gammaretrovirus may predispose the presentation of other anatomical forms such as the mediastinal and multicentric. The objective of this work was to conduct a retrospective study of feline lymphoma and to correlate the anatomical form, the immunophenotype with the presence of feline leukemia virus proviral DNA (FeLV), for which 56 cases were evaluated. The most common form of lymphoma was gastrointestinal. There was no significant difference in the proportion between T-cell (28) and B-cell lymphoma (26). Using DNA extracted from paraffinized tissue from 29 cats, 24 positive for FeLV proviral DNA were obtained through semi nested PCR. The multicentric anatomical form had a higher percentage (37.5%) of the presence of FeLV proviral DNA, followed by mediastinal. The immunophenotype that had the highest correlation with the presence of the virus was T-cell lymphoma (50%). Apparently in Brazil, there is a high relation between the lymphoma and the presence of the proviral DNA of FeLV.

Key words: Immunohistochemistry, anatomical form, T cells, B cells, FeLV provirus.

1. INTRODUÇÃO

O linfoma é definido como uma neoplasia linfoide que se origina em órgãos sólidos, como linfonodos, fígado e baço. Isso diferencia os linfomas das leucemias linfoides, que se originam da medula óssea (Couto, 2001). O linfoma é um tumor de grande importância em gatos domésticos, representando 90% de todos os tumores de origem hematopoiética nesta espécie (Valli et al., 2017).

O linfoma de felinos domésticos é dividido em quatro formas anatômicas: mediastinal, multicêntrica, gastrointestinal e extranodal (Couto, 2001). Atualmente, a imunofenotipagem é uma ferramenta importante no diagnóstico e classificação de neoplasias linfoides. A imuno-histoquímica (IHQ) representa um método simples e eficaz em termos de tempo para avaliar a expressão de proteínas em tecidos, e é uma ferramenta valiosa na pesquisa do câncer. Essa técnica tem sido aplicada em vários linfomas felinos. Foram realizados vários estudos que relataram a utilidade diagnóstica de alguns dos marcadores mais utilizados no linfoma felino. Dentre estes marcadores estão CD3 que identifica linfócitos T e CD79a, BLA 36 e CD20 para linfócitos B (Felisberto et al., 2016).

O câncer ocorre quando há alteração dos processos que controlam o crescimento e a proliferação celular. Há muitos pontos em que o equilíbrio delicado entre a iniciação e a redução do ciclo celular pode ser subvertido e os vírus contribuem para a transformação celular através de diversos mecanismos (Beatty, 2014). A integração do Vírus da leucemia felina (FeLV) no genoma do hospedeiro pode atuar como um mutagênico insercional e alterar o controle de crescimento das células (Rezanka et al., 1992).

Segundo Hardy (1981) a incidência do linfoma em 1968 era de 200 a cada 100.000 gatos. Na década de 70, aproximadamente 70% dos linfomas felinos foram associados à infecção persistente pelo FeLV, nos Estados Unidos (Rojko et al., 1989).

Atualmente o controle do FeLV tem sido considerado bem sucedido nos EUA. As mudanças nas práticas de manejo envolvendo identificação e isolamento de gatos progressivamente infectados foram seguidas pelo desenvolvimento de vacinas contra o FeLV (Hardy et al., 1976; Weijer et al., 1986; Hoover e Mullins, 1991; Hoover et al., 1991; Poulet et al., 2003). Como resultado, a incidência da infecção por FeLV diminuiu nestes países e, com isso, a população em risco de linfoma associado ao FeLV também (Levy et al., 2006; Gleich e Hartmann, 2009; Gleich et al., 2009).

No Brasil, estudos sorológicos realizados em São Paulo e no Rio de Janeiro mostraram que a prevalência do FeLV varia de 12,5 a 20,3%, respectivamente (Hagiwara et al., 1997; Souza et al., 2002). Em um estudo, utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), realizado por Coelho et al. (2011), sobre a ocorrência do FeLV, realizado na cidade de Belo Horizonte, foram coletados amostras de 1072 gatos e, em 507 foram detectados o DNA proviral do FeLV representando 47,5% da população de gatos com a infecção viral.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo realizar um estudo retrospectivo do linfoma de felinos domésticos e avaliar a forma anatômica, a histopatologia, a imuno-histoquímica e a presença do DNA proviral do FeLV pela PCR nas amostras coletadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

O linfoma é um grupo diverso de neoplasias que tem em comum sua origem em células linforreticulares. O linfoma origina, comumente, em tecidos linfóides como linfonodos, fígado e baço, porém, também pode se originar em qualquer outro tecido do corpo. O linfoma é a neoplasia mais comum encontrada em gatos (Vail, 2013).

Na medicina, o linfoma é dividido em Hodgkin e não-Hodgkin. O linfoma do tipo Hodgkin tem sido relatado em gatos, mas a grande maioria dos linfomas em animais domésticos é do tipo não-Hodgkin (Valli et al., 2016). Em humanos, a doença de Hodgkin é descrita como uma neoplasia lentamente progressiva. Origina-se em um único linfonodo ou cadeia de linfonodos e se espalha através dos linfonodos contíguos (Walton e Hendrick, 2001). Encontra-se dividido em duas entidades: o linfoma de Hodgkin de predomínio linfocítico nodular (NLPHL) e o linfoma de Hodgkin clássico. O primeiro é uma neoplasia monoclonal de células B com uma proliferação nodular ou difusa e nodular, com células grandes. É um subtipo de linfoma de Hodgkin embora se diferencie da variante clássica em termos de morfologia, fenótipo, genótipo e apresentação clínica. Provavelmente se origina de células do centro germinativo no estágio de diferenciação centroblastico (Pireli et al., 2002; Swerdlow et al., 2008). O linfoma Hodgkin clássico é composto por células mononucleares (Hodgkin) ou multinucleares (Reed-Sternberg (RS)) residindo num infiltrado contendo uma mistura variável de células não-neoplásicas (linfócitos pequenos, eosinófilos, neutrófilos, histiócitos, plasmócitos e fibroblastos). A célula de RS e suas variantes não é patognomônica da doença, mas é essencial para um diagnóstico histopatológico (Walton e Hendrick, 2001). São grandes, medindo entre 20-60µm de diâmetro, com citoplasma abundante e ligeiramente basofílico e possuem pelo menos 2 núcleos redondos, de cromatina pálida, com uma membrana nuclear proeminente e por vezes irregular, sendo obrigatório a presença de, pelo menos, um nucléolo (Pireli et al., 2002 e Swerdlow et al., 2008).

Como linfoma não-Hodgkin são designadas neoplasias malignas sólidas originadas do tecido linfóide, a partir de células B, T ou *Natural Killer* (NK), podendo se estender para outros órgãos ou tecidos não linfóides. Sua origem pode ser, tanto de células linfóides precursoras, como maduras (Muller, 2005). O comportamento biológico e o resultado clínico dos diferentes subtipos do linfoma não-Hodgkin são variados, de muito indolente a altamente agressivo (Swedlow et al., 2008).

3.1 Epidemiologia do linfoma em gatos domésticos

Os linfomas são os tumores malignos mais comuns em gatos, sendo responsáveis por cerca de 50-90% dos tumores hematopoiéticos (Sapierzyński et al., 2015) e representam 30% de todas as neoplasias malignas que acometem gatos (Malik et al., 2001). Segundo Hardy (1981), em levantamento realizado em 1968, o linfoma acometia 200 a cada 100.000 gatos.

As infecções retrovirais têm sido associadas ao desenvolvimento de linfoma felino. Estudos realizados na década de 1980, antes da ampla vacinação contra o FeLV, especialmente nos Estados Unidos da América (EUA), indicaram que aproximadamente 70% dos gatos com linfoma eram positivos para FeLV (Rojko et al., 1989). A prevalência de viremia em gatos com linfoma varia com a forma anatômica de sua apresentação. Os gatos jovens com linfoma são, geralmente positivos para FeLV, enquanto gatos mais velhos são negativos. Nos últimos anos, a prevalência de infecção por FeLV em gatos com linfoma nos EUA, Europa e alguns países do oriente tem diminuído (Couto, 2001).

Na era pré-vacinação (América do Norte e Europa) o linfoma mediastinal (envolvendo timo, linfonodo esternal e mediastinal) foi a forma anatômica mais comum, representando 20-40% dos casos nos EUA, 10-50% dos casos no Reino Unido e 70% dos casos no Japão (Takahashi et al., 1974). A introdução da vacinação contra o FeLV em 1985 resultou em uma diminuição significativa na prevalência da infecção entre a população felina e, ao mesmo tempo, observou-se uma diminuição da proporção de casos de linfoma felino com a forma mediastinal (Louwerens et al., 2005).

Em um estudo realizado por Louwerens et al. (2005), o hospital de medicina veterinária da Universidade de Davis na Califórnia (EUA) recebeu, no período entre 1983 a 2003, 546 casos de linfomas felinos em que, apenas 79 (14,5%) eram positivos para o antígeno do FeLV, entretanto os 467 casos negativos ao vírus através do teste de antígeno, não foram submetidos a PCR para detectar DNA pró-viral.

Estudos recentes relataram que a forma mediastinal foi observada em menos de 15% dos casos de linfoma felino nos EUA em 1998 e 2005 e, em aproximadamente 25% dos casos na Austrália em 1997 (Vail et al., 1998; Louwerens et al., 2005).

O risco relativo de que gatos positivos para o FeLV desenvolvam linfoma é 60% maior do que o de animais negativos para o vírus. Já para o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o risco é menor, de aproximadamente cinco vezes. No entanto em portadores de FIV e FeLV a probabilidade aumenta, sendo quase 80 vezes maior do que animais negativos (Shelton et al., 1990).

Atualmente o controle do FeLV tem sido considerado bem sucedido nos EUA, Europa, Japão e Austrália. As mudanças nas práticas de manejo envolvendo identificação e isolamento de gatos progressivamente infectados foram seguidas pelo desenvolvimento de vacinas contra o FeLV (Hardy et al., 1976; Weijer et al., 1986; Hoover e Mullins, 1991; Hoover et al., 1991; Poulet et al., 2003). Como resultado, a prevalência global de infecção diminuiu e, com isso, a população em risco de linfoma associado ao FeLV também (Levy et al., 2006; Gleich e Hartmann, 2009; Gleich et al., 2009). Tais medidas resultaram em um aumento na prevalência relativa do linfoma gastrointestinal, uma vez que há fraca associação deste tipo de linfoma com a antigenemia do FeLV (Barrs e Beatty, 2012).

O linfoma gastrointestinal é a forma anatômica de maior ocorrência nos felinos domésticos, representando de 32 a 72% dos casos de linfoma (Wilson, 2008). Afeta predominantemente gatos de meia idade e senis, acima de 10 anos de idade (Barrs e Beatty, 2012). O adenocarcinoma é a segunda neoplasia intestinal mais comum no felino, seguido pelo tumor mastocitário. Em um estudo de 1129

neoplasias intestinais felinas diagnosticadas histologicamente, 55% eram linfomas, 32% eram adenocarcinomas intestinais e 4% eram mastocitomas (Rissetto et al., 2011).

3.2 Etiologia e fatores de risco do linfoma felino

O linfoma é considerado uma doença multifatorial. Várias causas já foram descritas, principalmente o envolvimento de retrovíruses como FeLV, FIV, e atualmente o envolvimento de outros vírus como o gammaherpesvírus. Outros fatores como a exposição à fumaça de tabaco, inflamação crônica, componentes genéticos e a dieta também podem contribuir para o desenvolvimento do linfoma em felinos domésticos (Bertone et al., 2002; Barrs e Beatty, 2012; McLuckie et al., 2016).

3.2.1 Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

O FeLV é um *gammaretrovírus*, membro da subfamília *Oncornavirus* envelopado, com RNA de fita simples e que contém a enzima transcriptase reversa (RT) (Hartmann, 2012a). O genoma do FeLV contém três genes: o gene envelope (*env*) que realiza a codificação para a glicoproteína de superfície gp70 e a proteína transmembrana p15E; o gene polimerase (*pol*) que realiza a codificação para a transcriptase reversa, protease e integrase; e o gene de antígeno específico do grupo (*gag*), que codifica proteínas internas do vírus, incluindo a proteína nucleocapsídeo p27 (Coffin, 1979).

O gato doméstico possui um gammaretrovírus endógeno, semelhante ao FeLV, naturalmente incorporado em seu genoma, que não é transmitido horizontalmente, chamado de vírus da leucemia felina endógeno (enFeLV). Esse retrovírus endógeno, não patogênico, é herdado pelo filhote através da linha germinal materna. Essas frações endógenas de DNA proviral não produzem partículas virais infecciosas, estão presentes em todas as células do felino, mas não se replicam. Sua relevância principal se baseia no fato de que estas frações de DNA podem, potencialmente, recombinar com o DNA proviral do FeLV-A (único subtipo contagioso), dando origem aos demais subtipos do FeLV (B, C e T), antigenicamente relacionados, mas com patogênese distinta e classificados de acordo com os receptores celulares específicos e as respostas às suas ações mutagênicas (Soe et al., 1983; Lutz et al., 2009).

O subtipo A é onipresente e está envolvido em todas as infecções. O subtipo B origina-se da recombinação do FeLV-A com enFeLV. O subtipo C é uma mutação do gene *env*, e o subtipo T representa múltiplas mutações do gene *env* que é definido pelo seu linfotropismo pelos linfócitos T (Lutz et al., 2009).

O FeLV-A é minimamente patogênico na ausência de outras variantes. Uma das variantes, é replicação defeituosa devido a uma mutação no gene *env*, que pode induzir a síndrome da imunodeficiência (Mullins et al., 1986; Overbaugh et al., 1988). O FeLV-C pode ser exclusivamente associado ao desenvolvimento de aplasia pura de células vermelhas. Os isolados de FeLV-B parecem estar associados a uma variedade de propriedades patogênicas. A forma predominante é o linfoma mediastinal, onde a anemia não regenerativa e variedades de neoplasias linfóides e leucemias mielóides agudas também são documentadas (Fujino et al., 2008).

A principal via de transmissão do FeLV-A é por secreção oronasal contendo o vírus. Altas cargas do FeLV estão presentes na saliva de gatos virêmicos (Francis et al., 1979; Gomes-Kellen et al., 2006). Embora o vírus seja relativamente instável no meio ambiente, a transmissão pela saliva é facilitada devido ao comportamento social dos felinos, como hábitos de higiene mútua por lambedura, a partilha de tigelas de alimentação ou por meio de brigas (Francis, 1979).

A transmissão iatrogênica pode ocorrer através de agulhas, instrumentos, fômites ou transfusões de sangue contaminados (Hartmann, 2012a). A transmissão transplacentária pode ocorrer caso a fêmea infectada esteja na fase virêmica, no momento da concepção, podendo resultar em morte embrionária, natimortos ou filhotes virêmicos (Pacitti et al., 1986). Em fêmeas com infecção latente, o vírus não é transmitido pelo útero, podendo o filhote se infectar com o leite ou saliva maternos, após o nascimento (Lutz et al., 2009).

O FeLV se replica dentro de muitos tecidos, incluindo medula óssea, glândulas salivares e epitélio respiratório. Caso, a resposta imune não intervenha após a infecção inicial, o FeLV se espalha para a medula óssea e infecta as células precursoras hematopoiéticas. O genoma de RNA de cadeia simples é transcrito de forma reversa para o DNA, que é integrado aleatoriamente no genoma celular do hospedeiro, sendo o DNA integrado chamado de "provírus" (Hartmann, 2012a).

3.2.1.1 Patogênese do vírus da Leucemia felina (FeLV)

A patogênese do FeLV desde a infecção, até a eliminação viral, pode ser descrita em seis estágios. No estágio I, ocorre o contato do vírus com as células hospedeiras, primariamente nos linfócitos presentes na faringe e tonsilas nos primeiros dois dias após a exposição oronasal ao vírus. Em seguida (estágio 2) o vírus replica-se em linfonodos e o FeLV é transportados através de linfócitos e macrófagos para locais secundários, medula óssea e ao tecido linfoide associado ao intestino – GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) (Rojko e Olsen, 1984). A proliferação do FeLV em locais distantes da inoculação como em baço, linfonodos e GALT ocorre entre 3 e 12 dias (estágio 3). O estágio 4, por sua vez, envolve a replicação viral na medula óssea, em precursores de neutrófilos e plaquetas, e no epitélio das criptas intestinais (7-21 dias). No estágio 5 ocorre infecção de neutrófilos e plaquetas circulantes e estabelecimento da viremia entre 14 e 28 dias. Entre 28 e 56 dias ocorre infecção epitelial generalizada e excreção do vírus, correspondendo ao estágio 6 (Rojko et al., 1979).

A infecção é geralmente estabelecida cerca de duas a seis semanas após a exposição ao vírus. Se não houver uma resposta imune eficiente nessa fase da infecção, existe o potencial de produção maciça de vírus e o estabelecimento de uma viremia persistente. A viremia persistente de origem na medula óssea é geralmente estabelecida cerca de quatro a seis semanas após a infecção. Tanto o vírus livre quanto o celular estão presentes no sangue, e há disseminação da infecção para múltiplos tecidos glandulares e epiteliais, incluindo as glândulas salivares e a mucosa da faringe e nasal, levando à disseminação oronasal do vírus e ao potencial de transmissão (Sparkes, 1997).

A imunidade para o FeLV é construída através da produção de títulos protetores de anticorpos de neutralização do vírus direcionados contra o epítipo da glicoproteína do envelope viral gp70, que impede que o mesmo se ligue à célula hospedeira e elimine o vírus da corrente sanguínea (Rojko e Olsen 1984, Rojko e Kociba 1991).

A maioria dos filhotes são protegidos por anticorpos maternos até a idade de seis semanas. Filhotes infectados no útero ou infectados no período de transição, entre seis a 14 semanas de vida, podem não ser capazes de responder eficazmente à infecção viral e uma proporção significativa desses animais torna-se persistentemente infectados. Gatos adultos expostos a doses muito altas de vírus também podem se tornar persistentemente infectados, especialmente em grandes colônias onde a doença se torna endêmica (Barr, 1998).

A explicação pela qual gatos mais velhos tornam-se mais resistentes ao vírus deve-se ao número de receptores celulares necessários para o FeLV-A entrar nas células-alvo, como linfócitos, macrófagos, e que parece diminuir nesses gatos e, assim, o estabelecimento da infecção torna-se mais difícil (Hartmann, 2012a).

O antígeno de membrana celular de oncornavírus felino (FOCMA) é um antígeno presente na superfície de células transformadas (Essex et al., 1973), sendo considerado o primeiro antígeno celular expresso a partir da infecção por FeLV ou transformação tumoral (Essex et al., 1975; Snyder et al., 1978). O desenvolvimento de grandes quantidades de anticorpos contra FOCMA poderia proteger contra o desenvolvimento de linfomas induzidos por FeLV por lise dependente do complemento de células tumorais (Cotter et al., 1975; Essex et al., 1975; Grant et al., 1980). Os anticorpos anti-FOCMA indicam exposição ao FeLV e podem fornecer um mecanismo protetor contra o desenvolvimento do tumor (Hartmann, 2012a).

3.2.1.2 Infecção

Infecção abortiva: Podem desenvolver uma imunidade humoral e celular efetivas, limitando a replicação viral ao tecido linfóide na região da orofaringe, dessa forma esses gatos não se tornam virêmicos e apresentam altos níveis de anticorpos neutralizantes. Tanto o antígeno viral quanto o RNA viral e DNA proviral não são detectados no sangue. A infecção abortiva provavelmente ocorre quando o gato é exposto a baixas cargas do vírus (Hartmann, 2012a; Hartmann 2012b).

Infecção Regressiva: Desenvolvem uma resposta imune eficaz, sendo a replicação do vírus e a viremia contidos antes ou logo após a infecção da medula óssea. Essa é conhecida como infecção regressiva. Depois da infecção inicial, o vírus se replica e propaga sistematicamente através da infecção de linfócitos e monócitos. Nesse estágio, o gato pode ter resultado positivo nos testes que detectam o antígeno viral no plasma sanguíneo, como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Em alguns gatos, a viremia pode persistir por mais de três semanas. Após este período, as células da medula óssea podem ser infectadas como as células precursoras hematopoiéticas e produzir granulócitos e plaquetas infectados (Hartmann, 2012a; Hartmann 2012b). Essa condição é chamada de “infecção latente”. Embora o DNA proviral permaneça presente dentro do genoma celular, nenhum vírus é produzido ativamente, porque uma resposta imunológica eficiente restringe a replicação e a expressão do vírus. A infecção regressiva pode ser reativada, devido a informação para produção de partículas virais completa que está presente no genoma do gato (Hartmann, 2012a; Hartmann 2012b).

Infecção progressiva: Gatos com infecção progressiva são persistentemente virêmicos. Ocorre extensiva replicação viral, primeiro em tecidos linfóides, seguido pela medula óssea, mucosa e epitélio glandular. As infecções regressiva e progressiva podem ser distinguidas através de testes

rápidos para pesquisa do antígeno viral no sangue periférico. Na infecção regressiva os gatos tornam-se negativos no máximo 16 semanas após a infecção, enquanto na infecção progressiva os gatos infectados permanecem positivos (Hartmann, 2012a; Hartmann, 2012b). Em ambas, as infecções do DNA proviral do FeLV é detectado no sangue pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Mas, quando mensurado no PCR quantitativo, a carga viral da infecção regressiva é baixa, enquanto na infecção progressiva a carga viral é alta (Torres et al., 2005; Pepin et al., 2007).

Infecção focal: A replicação viral atípica persistente, como na glândula mamária, bexiga e olhos pode ser considerada focal ou atípica. Essa replicação pode levar a uma produção intermitente de antígenos, além disso, esses gatos podem ter resultados fracamente positivos ou discordantes na pesquisa de antígenos, ou podem alternar entre resultados positivos e negativos (Levy et al., 2008).

3.2.1.3 Linfomagenese viral

A infecção progressiva do FeLV está associada a indução de várias doenças degenerativas e proliferativas na linhagem de células hematopoéticas em gatos (Linenberger e Abkowitz, 1995; Roy-Burman, 1995; Rohn et al., 1996). O FeLV aumenta 60 vezes o risco de linfoma em gatos infectados, por isso é considerado o vírus mais importante conhecido como indutor de tumor em felinos (Shelton et al., 1990; Rezanka et al., 1992). Alguns estudos evidenciam a ocorrência de linfomas em gatos na infecção regressiva. Um estudo realizado por Jackson e colaboradores (1993) dos 70 casos de linfomas em gatos, 30% eram negativos para o antígeno viral e positivos para PCR, as hipóteses apontadas pelos autores seria a presença de uma infecção latente por FeLV, bem como a presença de um vírus recombinante defeituoso. Além disso também pode haver a presença de apenas uma porção do genoma do FeLV, que também o torna defeituoso na replicação, ou um fenômeno de "batida e corrida", de tal forma que o FeLV induza ao linfoma, mas não se integra ao genoma da célula hospedeira.

A infecção da célula hospedeira é iniciada pelo reconhecimento celular do receptor para a glicoproteína do envelope (gp70). O núcleo viral é internalizado e as duas cópias do genoma do RNA de cadeia simples e senso positivo são liberadas. O RNA viral é dependente da DNA polimerase, transcriptase reversa, que faz uma cópia de DNA do genoma viral, conhecido como provírus. O provírus se integra ao genoma do hospedeiro, ladeado por repetições terminais longas (LTR) que são uma série de nucleotídeos derivados da extremidade 5' e 3' do RNA viral. Dentro da região U3 da LTR estão as sequências promotoras e potenciadoras que controlam a transcrição do gene viral. O provírus forma o modelo para a produção de novos viriões – vírus (Beatty, 2014).

Os tumores induzidos pelo FeLV são causados, pelo menos em parte, pela mutagenese insercional adquirida somaticamente (Forman et al., 2009). Na mutagenese insercional o retrovírus é integrado próximo ao gene celular, como um proto-oncogene. A transcrição do gene pode ser regulada positivamente pela região U3 da LTR retroviral, cuja função promotora e intensificada são elementos necessários para a expressão do gene viral. Por outro lado, se a integração for no gene supressor de tumor, a transcrição pode ser alterada ou interrompida, então a célula adquire vantagens para o crescimento descontrolado (Fujino et al., 2008).

Os proto-oncogenes codificam uma variedade de proteínas, tais como fatores do crescimento, receptores de fatores do crescimento, proteína quinases, cuja ativação inadequada favorecem à proliferação celular (Tsatsanis et al., 1994).

Análises moleculares do linfoma associado ao FeLV têm identificado Sítios de Integração Comum (SIC), que favorecem a integração do próvirus e influenciam na expressão de um proto-oncogene próximo, resultando em vantagens de sobrevivência a célula. Os principais *locus* para SIC no linfoma associado ao FeLV são *c-myc*, *flvi-1*, *flvi-2*, *fit-1*, *pim-1* e *flit-1* (Fujino et al., 2008).

O primeiro SIC do FeLV, descrito, resulta em alterações na expressão e organização do proto-oncogene *c-myc*. O produto da proteína *myc* é uma fosfoproteína (Ramsay et al., 1982; Hann et al., 1983) nuclear que desempenha um papel na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular (Ramsay et al., 1982; Abrams et al., 1982; Persson et al., 1984).

Duas alterações do proto-oncogene *myc* têm sido descritas em linfomas associados ao FeLV: integração e transdução. As transformações nas células pelo gene *myc* podem ser, devido a desregulação de sua expressão. Isso ocorre pela alteração do proto-oncogene *myc*, devido a integração do vírus na proximidade do gene, gerando um oncogene denominado *c-myc*. A transdução do gene *myc* pelo retrovírus gera um oncogene viral *v-myc* que remove sua unidade normal de transcrição (Rezanka et al., 1992; Beatty, 2014).

As inserções provirais do FeLV nas regiões do gene *bmi-1*, codificadas por *flvi-2* e *pim-1*, são comumente afetadas em linfomas que também contêm *v-myc* e são descritos como ‘colaboradores do gene *myc*’ (Levy et al., 2008; Fujino et al., 2008). O *Flit-1* tem um papel importante no desenvolvimento de linfomas tímicos e parece representar um novo domínio de SIC proviral para o FeLV. A inserção está associada com a superexpressão de um gene celular, como o receptor de ativina A tipo II, que codifica um receptor na superfície da célula para a superfamília do fator de crescimento transformador β -TGF (Fujino et al., 2008).

Outra consequência de grande importância clínica em gatos infectados por FeLV é a imunossupressão, que promove uma diminuição dos mecanismos de vigilância tumoral causando um aumento indireto do risco do desenvolvimento de tumor. A imunossupressão aparentemente é específica para linfócitos T e particularmente linfócitos T helper ou CD4⁺ e linfócitos T supressores ou CD8⁺ (Hartmann, 2012b). Outro achado comum é a falha de linfócitos T helper, que causa uma vigilância tumoral ineficaz das células pré neoplásicas e neoplásicas portadoras de FOCMA (Rojko e Olsen, 1984).

3.2.2 Vírus da imunodeficiência Felina

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um retrovírus do gênero lentivírus. Infecta gatos domésticos, é endêmica em todo o mundo, com prevalências que variam de menos de 5% a mais de 30%, dependendo da região e da população testada (Bendinelli et al., 1995).

Os estudos que abordam o mecanismo de linfomagenese pelo FIV sugerem que a oncogênese direta é um evento raro (Terry et al., 1995; Endo et al., 1997). Parece provável que a linfomagenese seja uma consequência indireta da disfunção imune induzida pelo FIV. Avaliações dos parâmetros imunológicos em gatos infectados com FIV relataram uma diminuição de linfócitos CD4 que pode estar associada ao desenvolvimento do linfoma, devido a diminuição da “vigilância imunológica” realizada por essas células (Brown et al., 2009).

Wang et al. (2001), identificaram a presença de sequências provirais do FIV em dois dos quatorze casos de linfoma felino demonstrada por PCR e confirmada com análise de *Southern blot*. Os autores sugeriram que um papel oncogênico direto do FIV na estimulação proto-oncogênica poderia ser o responsável pelo desenvolvimento do linfoma.

Outras evidências sobre o mecanismo de indução do linfoma pelo FIV, seria a superestimulação antigênica de linfócitos B (Hutson et al., 1991), em gatos naturalmente infectados. Tal processo leva a consequente amplificação da mutação somática que ocorre normalmente na geração da diversidade de receptores de células B que pode predispor a mutações oncogênicas (Beatty, 2014).

Os linfomas que foram associados à infecção pelo FIV incluem tumores de células B, células T, não T e não B. Vários estudos caracterizaram o fenótipo do linfoma associado ao FIV, a grande maioria identificou linfomas de células B com maior frequência em gatos infectados com FIV do que os outros tipos de fenótipos. Magden et al. (2011), relataram que a frequência de linfoma de células B associado ao FIV tem sido entre 40 e 87%, enquanto que os linfomas de origem de células T variam entre 0 e 28%.

Beatty e colaboradores (1998) realizaram experimento inoculando o FIV em gatos e relataram a potencial importância que o FIV desempenha para disfunção imunitária e na tumorigênese. Elucidaram o mecanismo indireto do FIV, com a hiperatividade de linfócitos B, explicando a proliferação desses linfócitos e o risco do desenvolvimento de uma célula neoplásica.

3.2.3 *Gammaherpesvirus 1 Felis catus* (FcaGHV1)

Outro vírus oncogênico que está sendo estudado atualmente é o *Gammaherpesvirus 1 Felis catus* (FcaGHV1), descoberto em 2014. Estima-se que este infecte pelo menos um quarto dos gatos domésticos do mundo, cerca de 600 milhões (Troyer et al., 2014).

Como os outros gammaherpesvirus, o FcaGHV1 é linfotrópico e pode ser detectado circulando em linfócitos B e linfócitos T CD4+ e CD8+ (McLuckie et al., 2016). Em outras espécies, a oncogênese associada ao gammaherpesvírus é o resultado de infecção crônica. Fatores adicionais, como disfunção imune ou coinfeções, às vezes são necessários para a expressão do fenótipo maligno (Ackermann, 2006).

Alguns estudos corroboram o papel da infecção por FcaGHV1 na linfomagenese, particularmente nos casos em que há coinfeção com o lentivírus FIV. Em humanos, dependendo do subtipo de linfoma, 30 a 95% dos linfomas associados ao HIV são causados por gammaherpesvírus Epstein-barr (EBV) e o Herpesvirus associado com o Sarcoma de Kaposi (KSHV), levando a considerar que o FcaGHV1 pode ser um co-patógeno no linfoma associado ao FIV nos gatos (Cesarman, 2011).

Os herpesvírus alternam entre os ciclos de replicação lítica e latente. Os transcritos associados à latência conferem uma vantagem de sobrevivência para manter um reservatório viral por meio de diversos mecanismos que promovem o crescimento celular, inibem a apoptose e regulam negativamente os alvos imunológicos (Ackermann, 2006). Esses mesmos genes promovem a transformação celular e o câncer associado ao gammaherpesvírus, incluindo o linfoma (Pierangeli et al., 2015).

A presença do vírus transcricionalmente ativo nas células cancerígenas é um pré-requisito para estabelecer uma relação causal direta. Além de repertórios estabelecidos de transcritos associados à latência, um número crescente de genes líticos está implicado na tumorigênese (Tierney et al., 2015; Borozan et al., 2018).

Aghazadeh e colaboradores (2018) analisaram o RNA tumoral de alguns subtipos de linfoma em gatos que apresentavam coinfeção pelo FcaGHV1 e o FIV através do sequenciamento transcricional e o PCR transcriptase reversa. Concluíram que os transcritos de FcaGHV1 podem ser detectados em alguns linfomas associados a FIV, mas com baixo número de cópias. Isso impede uma avaliação mais precisa sobre a importância do papel potencial do FcaGHV1 na linfomagenese. Dessa forma consideraram que estudos mais complexos devam ser elaborados para elucidar o real potencial oncogênico que este gammaherpesvírus possui no desenvolvimento do linfoma.

3.2.4 Infecções bacterianas

Estudos em humanos demonstraram uma forte associação entre infecção por *Helicobacter pylori* e desenvolvimento de inflamação crônica e câncer gástrico (Richter, 2003; Hartmann, 2006). A infecção está fortemente associada ao desenvolvimento de adenocarcinoma e do linfoma associado à mucosa (MALT) (Farinha e Gascoyne, 2005; Wang et al., 2014). A infecção pela bactéria gástrica proporciona estimulação antigênica que pode ser suficiente para estimular os processos linfoproliferativos da transformação do MALT gástrico. Em humanos, o linfoma associado à MALT concomitante a infecção por *H.pylori* é potencialmente responsivo a antibioticoterapia, portanto pode ocorrer remissão da neoplasia após o tratamento (Mueller, 2005).

Bridgeford e colaboradores em 2008, realizaram um estudo sobre a correlação de cepas de *Helicobacter* spp. em gatos com linfoma gástrico. Apontaram que as estirpes gástricas de *Helicobacter heilmannii* (Hhe) promovem o linfoma gástrico felino. Estes autores utilizaram 47 gatos, onde respectivamente 14 de 16 e 2 de 16 apresentaram linfomas linfoblásticos e linfocitários e foram positivos para os microrganismos (especialmente as estirpes Hhe2 e Hhe 4).

Hoehne et al. (2016), analisaram 33 linfomas epiteliotrópicos de intestino delgado de células T de baixo grau e detectaram eubactérias invasoras da mucosa e a colonização da serosa em 18% e 11% dos casos, respectivamente. Em comparação, dos 17 linfomas do intestino delgado de alto grau, 14 (82%) foram associados a bactérias invasivas da mucosa; a colonização da serosa foi evidente em 10 (57%) e bactérias intravasculares foram observadas em 5 (29%) casos. As bactérias invasivas da mucosa foram observadas com mais frequência em gatos com linfoma de células grandes de qualquer imunofenótipo.

Ainda não está claro se bactérias invasoras podem desencadear o desenvolvimento do linfoma gastrointestinal ou, em vez disso, estão oportunisticamente colonizando a mucosa danificada após o desenvolvimento do linfoma (Hoehne et al., 2016).

3.2.5 Exposição à fumaça de tabaco

Vários estudos sugerem que a exposição ao tabaco possa aumentar o risco de desenvolver o linfoma não-Hodgkin (Herrinton e Friedman, 1998; Adami et al., 2000). Não há nenhum estudo consolidado que explique o mecanismo exato pelo qual o tabaco desenvolva o linfoma. Mas, hipóteses relacionam componentes da fumaça do tabaco que podem ser carcinogênicos para o tecido linfóide e causar mutação nos linfócitos precursores (Linnet et al., 1992; Adami et al., 2000). São conhecidos mais de 40 agentes mutagênicos e carcinogênicos da fumaça do tabaco, muitos dos quais foram implicados na carcinogênese humana (Bertone et al., 2002).

Bertone et al. (2002), realizaram um estudo correlacionando gatos com linfoma e o índice de exposição à fumaça de tabaco e sugeriram que o risco relativo de linfoma para gatos com qualquer exposição à fumaça de tabaco foi 2,4 vezes maior. O risco aumentou com a duração e quantidade de exposição, sendo 3,2 vezes maior, comparado com indivíduos de lares onde não haviam fumantes.

3.2.6 Inflamação crônica

Vários estudos em humanos têm sugerido associação de doenças inflamatórias intestinais crônicas, como doença celíaca e a doença inflamatória intestinal associada à sensibilidade ao glúten, com o desenvolvimento do linfoma gastrointestinal. Em indivíduos geneticamente predispostos, o linfoma de células T associado à enteropatia - EATCL (*Enteropathy-associated T-cell lymphoma*) pode surgir da transformação clonal de linfócitos intraepiteliais intestinais após estimulação antigênica crônica (Green e Cellier, 2007; Ferreri et al., 2011).

Várias linhas de evidências apoiam a proposição de que a doença inflamatória intestinal seja um fator de risco para o desenvolvimento de linfoma de células T (de qualquer grau histológico) e linfoma gastrointestinal de baixo grau (LGBG). Em dois estudos, 60% dos gatos com linfoma intestinal de

células T e 33% dos gatos com LGBG tinham doenças clínicas crônicas sugestivas de doença inflamatória preexistente (Moore et al., 2005; Roccabianca et al., 2006).

A enterite linfoplasmocitária felina (EPF) foi identificada em outras regiões do trato gastrointestinal em 41% dos gatos com LGBG de imunofenótipo de células T (Briscoe et al., 2003; Carreras et al., 2003). A progressão histológica aparente de EPF para linfoma gastrointestinal (LG) foi documentada em casos individuais (Barrs e Beatty, 2012).

3.2.7 Importância da Dieta e componentes genéticos

A dieta tem sido sugerida como um possível fator de risco para o linfoma gastrintestinal. A teoria deriva do aumento relativo e absoluto no número total de gatos diagnosticados com linfoma gastrointestinal nos últimos anos. Ao mesmo tempo, mudanças significativas na composição da dieta de alimentos comerciais para gatos ocorreram e nenhuma evidência conseguiu apoiar esta teoria (Vail, 2007).

A incidência do linfoma é particularmente variável em certas raças, sugerindo fortes influências genéticas negativas e positivas (Madewell e Theilen, 1987). Os gatos siameses parecem ter uma predisposição para o desenvolvimento do linfoma, principalmente do tipo mediastinal, com padrão de herança potencialmente recessivo. O linfoma mediastinal de início precoce foi documentado em raças de gatos do tipo siamês na Austrália e na Europa. A alta incidência de linfoma mediastinal em gatos siameses jovens, em torno de 2 anos de idade, e raças relacionadas aos siameses - por exemplo, a Oriental Shorthair - sugere uma predisposição genética (Louwerens et al., 2005).

3.3 Classificação do linfoma não-Hodgkin em felinos domésticos

3.3.1 Classificação anatômica do linfoma

Há quatro apresentações anatômicas do linfoma reconhecidas em cães e gatos: mediastinal, gastrointestinal, multicêntrica e extranodal (Couto, 2001).

A forma nodal que tem envolvimento limitado aos linfonodos periféricos é incomum no gato, representando aproximadamente 4 a 10% dos casos. Estima-se que um terço dos gatos com linfoma nodal apresentem imunofenótipo de células T e reagentes para o FeLV (Vail et al., 1998; Cotter, 1998). Uma forma incomum e distinta de linfoma nodal em gatos se refere ao “linfoma tipo Hodgkin”. Como envolvimento de linfonodos solitários ou regionais da cabeça e pescoço e histologicamente se assemelha ao linfoma Hodgkin em humanos (Day et al., 1999; Walton e Hendrick, 2001).

A forma mediastinal inclui timo e linfonodos mediastinais e esternais, que podem se estender para fora da entrada torácica. Os linfomas mediastinais são mais comumente originados por células T (Gabor et al., 1999) e os gatos afetados são geralmente jovens e positivos para FeLV (Court et al., 1997).

Na forma multicêntrica, ao contrário dos cães, o envolvimento de linfonodos periféricos por si só é raro em gatos. Mais comumente, há também envolvimento esplênico e / ou hepático, e a doença pode

evoluir para a medula óssea (Ettinger, 2003). Um importante diferencial para a linfadenomegalia periférica é a hiperplasia periférica distinta. A hiperplasia periférica distinta é um distúrbio não neoplásico de gatos jovens e está associada a episódios de febre, infecções virais prévias e gamopatia policlonal. Foi relatada uma forma rara e distinta de linfoma que envolve apenas linfonodos de cabeça e pescoço, solitários ou regionais (Gabor et al., 1998), que segundo Ettinger (2003) pode ser comparável ao linfoma do tipo Hodgkin humano.

Dentro da forma anatômica extranodal encontra-se o linfoma renal que pode ser primário ou associado ao envolvimento gastrointestinal ou multicêntrico. Vinte a 50% destes animais serão reagentes para FeLV. No momento da recaída, a extensão para o sistema nervoso central (SNC) é comumente observada (Mooney et al., 1987). Alguns autores classificam o linfoma renal no grupo alimentar; alguns a consideram uma forma separada, e alguns como um grupo de linfoma abdominal (Moore e Ogilvie, 2001).

O linfoma do SNC pode ser primário ou secundário à doença multicêntrica, especialmente se houver doença renal ou da medula óssea. O meningioma é a neoplasia cerebral mais comum em gatos e, portanto, é um diferencial para a doença intracraniana. As lesões do linfoma da medula espinhal são tipicamente extradurais e os gatos apresentam paresia dos membros posteriores, sendo geralmente jovens, idade média de 3-4 anos, e em 85-90% dos casos reagentes para FeLV (Mooney e Hayes, 1986; Court et al., 1997).

O tumor do trato respiratório mais comum em felinos é o linfoma (Santagostino et al., 2015). O linfoma nasal ou nasofaríngeo primário ocorre comumente em gatos mais velhos entre 8 a 9 anos e não reagentes para o FeLV. O imunofenótipo predominante é o de células B (Ettinger, 2003).

O linfoma cutâneo pode ser solitário ou generalizado e ocorre em gatos mais velhos, negativos para FeLV. Duas formas foram descritas: o epiteliotrópico que consiste de células T e a segunda forma, não-epiteliotrópica. Esta consiste de células B, que são observadas mais profundamente na epiderme (Ettinger, 2003).

O linfoma gastrointestinal no gato envolve tipicamente o intestino delgado, estômago, linfonodos mesentéricos e fígado. Outros órgãos que podem estar envolvidos incluem a boca, esôfago e pâncreas (Hittmair et al., 2000; Vail, 2007). O linfoma gastrointestinal de células grandes pode se estender além do sistema alimentar, envolvendo o baço, os linfonodos periféricos, os linfonodos torácicos e a medula óssea. Já os de pequenas células estão tipicamente contidas no sistema intestinal. As lesões podem ser focais ou difusas (Wilson, 2008). Embora todas as seções do trato gastrintestinal possam ser acometidas, os locais mais comuns incluem o jejuno, o íleo, intestino delgado e a junção íleo-cólico (Fondacaro et al., 1999; Lingard et al., 2009; Moore et al., 2012).

3.3.2 Classificação histológica do linfoma

Ao longo do último século patologistas desenvolveram vários sistemas de classificações para os tumores linfoides humanos. Os patologistas veterinários adaptaram essas classificações do linfoma não-Hodgkin em humanos para classificar os linfomas nos animais domésticos, baseados em critérios

morfológicos, imunofenotípicos e, recentemente, genotípicos. Todos os esquemas de classificação tentaram correlacionar os histotipos com o comportamento biológico, a fim de alcançar um prognóstico confiável, selecionar terapias eficientes e fornecer ao tutor do animal informações comparativas (Berhard e Hutchison, 1997; Parodi, 2001).

A classificação de Rappaport em 1966 representa um dos primeiros sistemas de classificação aplicado ao linfoma canino. Essa classificação se baseou na presença de modularidade e tamanho celular de linfócitos pequenos, médios, os grandes linfomas celulares foram denominados histiocitoses (Holmberg et al., 1976). Com o crescente conhecimento dos aspectos imunológicos dos linfomas malignos, uma melhor compreensão da maturação e diferenciação das células linfóides e o avanço da quimioterapia, novos sistemas de classificação foram desenvolvidos (Valli et al., 2011).

Quase simultaneamente, a classificação de Lukes-Collins (Lukes e Collins, 1974) na América do Norte e a classificação de Kiel (Lennert e Mohri, 1978) na Europa foram publicadas. A classificação de Lukes-Collins foi a primeira classificação baseada na origem celular (linfócito B ou T, histiócito), sítio de origem (folicular) e estado de transformação, pela combinação do tamanho celular (pequena ou grande) e forma nuclear (redondo ou clivado, relacionado à fissuras/edentações nucleares), e apontaram que apenas os linfomas de centro folicular resultavam em nodularidade. Já a classificação de Kiel introduziu o conceito de graduação tumoral, acrescentando-se o sufixo –cítico para tumores de baixo grau, e –blástico, para tumores de alto grau. Ambos os sistemas foram baseados em conceitos imunológicos e só diferiram significativamente na posição dos centrócitos dentro da linha de maturação em cada classificação. Apesar dessas diferenças, a tradução de uma classificação para outra ainda era possível (Lennert et al., 1983).

Para evitar mais confusão e, em uma tentativa de unificar as classificações européia e norte-americana, o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCIWF) realizou uma revisão, propondo um painel internacional de hematopatologistas, a partir do estudo de 1.175 casos de linfomas bem documentados (Valli et al., 2000 e Valli et al., 2011). As várias entidades de linfoma nesta classificação foram baseadas em grupos de pacientes humanos com curvas de sobrevivência semelhantes, e as características morfológicas de cada grupo foram descritas. Para auxiliar no prognóstico e no manejo, as categorias diagnósticas foram organizadas em três graus de progressão, sendo baixo, intermediário e alto (rapidamente progressivo). A classificação *Working Formulation* (WF) rapidamente se tornou o padrão internacional aceito, fornecendo aos patologistas um meio pragmático de comunicação do subtipo de tumor baseado no comportamento biológico (baixo, intermediário e alto grau) usando a tecnologia universal de preparações histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Valli et al., 2000).

O esquema NCIWF classifica o linfoma (figura 1) de acordo com sua taxa natural de progressão, reconhecendo três graus histológicos (alto, intermediário e baixo) e a frequência de mitoses (Barrs e Beatty, 2012).

Numerosos estudos abordaram as limitações da WF e nos anos subsequentes, essas deficiências tornaram-se mais aparentes à medida que novas entidades foram descritas (Lieberman et al., 1986; Delverdier et al., 1988; Burke, 1990). A WF tornou-se amplamente usada na América do Norte com

estudos em animais baseados nesse sistema, enquanto o sistema de Kiel tornou-se amplamente utilizado na Europa para seres humanos e animais (Valli et al., 2011).

Baixo Grau	Grau Intermediário	Alto Grau
Linfoma linfocítico de pequenas células	Linfoma folicular de grandes células	Linfoma imunoblástico de grandes células
Linfoma folicular de pequenas células	Linfoma difuso de pequenas células	Linfoma linfoblástico
Linfoma folicular misto de pequenas e grandes células	Linfoma difuso misto de pequenas e grandes células	Linfoma de células pequenas não clivadas (tipo <i>Burkitt</i> e não <i>Burkitt</i>)
	Linfoma difuso de grandes células	

Fonte: adaptado do *National Cancer Institute (NCI)*.

Figura 1. Classificação do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCIWF) para linfomas.

A classificação de Kiel foi “atualizada” e introduziram um conceito-chave baseado em critérios cito-imunológicos (Vonderhaar e Morrison, 2002), aplicável a linfomas malignos caninos. Múltiplos estudos documentaram sua utilidade prognóstica (Teske et al., 1994; Kiupel et al., 1999). A classificação de Kiel foi limitada à patologia nodal e os avanços na imunologia e imuno-histoquímica indicaram a necessidade de atualizar todos os sistemas anteriores (Valli et al., 2011). Isto levou à formação, em 1992, do Grupo Internacional de Estudo do Linfoma, que propôs uma nova classificação, a *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms-REAL* (Harris et al., 1994).

As características únicas da proposta REAL era que as neoplasias eram identificadas como doenças e não como tipos de células. Com a inclusão dos critérios diagnósticos das informações relevantes: morfologia celular e linhagem celular, bem como topografia e biologia geral de cada neoplasia, passou a ser definida como uma entidade específica de doença. Em 2002, o sistema REAL foi adotado, em grande parte intacto, como o sistema revisado de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (figura 2) (Harris et al., 1999).

Esta classificação foi adaptada da medicina sob a orientação da OMS por patologistas veterinários para classificação do linfoma de animais domésticos. O sistema de classificação da OMS para o linfoma animal é uma lista pragmática de neoplasias hematopoiéticas. Seu principal objetivo é correlacionar cada categoria de linfoma ao seu próprio comportamento e grau de malignidade (Valli et al., 2000; Vonderhaar e Morrison., 2002; Valli et al., 2007). Este sistema usa morfologia (citologia e histologia), IHQ, características moleculares e o comportamento biológico (indolente, agressivo e altamente agressivo) para chegar ao diagnóstico e classificação do linfoma (Valli et al., 2011).

Neoplasias de células B	Neoplasia de células T e Natural killer (NK)
Neoplasia de células B precursoras Linfoma e Leucemia linfoblástica de células B. Neoplasia de células B maduras (periféricas) Leucemia linfocítica crônica e Linfoma linfocítico de pequenas células B. Leucemia prolinfocítica de célula B. Linfoma linfoplasmocítico. Linfoma de células B de zona marginal esplênico. Linfoma de células B de zona marginal extranodal associado a mucosas (MALT). Linfoma de células B de zona marginal nodal. Linfoma folicular. Linfoma de células do manto. Linfoma difuso de grandes células B. Linfoma mediastinal de grandes células B. Linfoma primário de efusão. Linfoma de Burkitt ou Leucemia de células de Burkitt.	Neoplasia de células T precursoras Linfoma e Leucemia linfoblástica de células T. Neoplasia de células T maduras (periféricas) e de células NK Leucemia prolinfocítica de célula T. Leucemia linfocítica granular de células T. Leucemia de células NK agressivo. Leucemia ou Linfoma de célula T adultas. Linfoma extranodal de células T e NK, tipo nasal. Linfoma de células T, tipo enteropatia. Linfoma de células T hepatoesplênico. Linfoma subcutâneo de células T, do tipo paniculite. Míose fungóide e Síndrome de Sézary. Linfoma cutâneo primário de grandes células anaplásicas. Linfoma de células T periféricas, não especificado. Linfoma de células T angioimunoblástico. Linfoma de células T angiocêntrico.

Fonte: Valli et al. (2011).

Figura 2. Classificação das neoplasias linfoides segundo a Organização Mundial da Saúde.

3.3.3 Classificação Imuno-histoquímica do linfoma

A imunofenotipagem é uma ferramenta importante no diagnóstico e classificação de neoplasias linfóides (Waly et al., 2005), representando um método simples e eficaz para avaliar a expressão proteica em tecidos, além de ser uma ferramenta valiosa na pesquisa do câncer (Keller et al., 2007). Os marcadores mais utilizados na medicina veterinária são o CD3, que detecta linfócitos T e o CD79, que detecta linfócitos B. Em gatos, CD20 e Pax-5 são comumente usados no lugar do CD79, devido a artefatos na ligação nuclear que podem ocorrer com este marcador (Valli et al., 2016).

3.4 Manifestação clínica

Os achados clínicos associados com linfoma felino são variados e dependem da forma anatômica e da extensão da doença (Vail, 2013).

Pacientes com a forma generalizada ou multicêntrica podem apresentar sinais clínicos inespecíficos. Geralmente os tutores relatam perda de peso, anorexia e letargia. O edema pode aparecer, especialmente quando os linfonodos estiverem aumentados, o que consequentemente causa obstrução mecânica da drenagem linfática, e compressão da via aérea, o que pode levar à tosse como outra queixa presente (Couto, 2001). O exame físico de gatos com linfoma multicêntrico geralmente revela linfadenopatia, com ou sem hepatomegalia, esplenomegalia ou lesões extranodais, como por exemplo lesões oculares, cutâneas, renais ou neurais. Os linfonodos afetados podem estar acentuadamente aumentados, cerca de 5 a 15 vezes do tamanho normal, indolores e livremente móveis. Uma síndrome de linfadenopatia reativa idiopática ou hiperplasia atípica pode mimetizar as características clinicopatológicas do linfoma multicêntrico em gatos (Couto, 2014).

O estadiamento clínico (figura 3) tem sido usado para dar o prognóstico do linfoma multicêntrico, segundo Terry et al. (1995) adaptado por Vail (2013).

ESTÁGIO	LOCAL ANATÔMICO
I	Nódulo solitário (extranodal) ou em um único linfonodo (nodal). Inclui tumores primários intratorácicos.
II	Envolvimento de dois ou mais linfonodos do mesmo lado do diafragma. Presença de dois tumores extranodais localizados do mesmo lado do diafragma, com ou sem envolvimento dos linfonodos regionais. Presença de um nódulo primário localizado no TGI excisável, comumente na região ileocecal, com ou sem envolvimento apenas do linfonodo mesentérico associado.
III	Presença de dois tumores (extranodal) do mesmo lado do diafragma. Aumento de dois ou mais linfonodos acima ou abaixo do diafragma. Nódulo intra-abdominal primário não excisável. Nódulo paraespinal ou epidural, independente das outras áreas tumorais.
IV	Estágio I, II e III, com envolvimento do fígado e/ ou baço.
V	Estágio I, II, III, IV com envolvimento inicial do SNC e/ou medula óssea

Fonte: adaptado por Vail (2013).

Figura 3. Estadiamento clínico do linfoma felino multicêntrico.

Os sinais clínicos de gatos com linfoma mediastinal incluem dispneia, taquipneia, polifagia e regurgitação. Ao exame físico, as anormalidades geralmente estão confinadas à cavidade torácica e consistem em sons broncovesiculares diminuídos, deslocamento dos sons pulmonares normais para a cavidade torácica dorsocaudal, som do baço na percussão da cavidade torácica ventral e mediastinal anterior não compressível (Couto, 2001). Raramente, pode-se observar a síndrome de Horner e a síndrome da veia cava superior. Efusão pleural é comum e do tipo serosanguinolenta ou quilosa, e em muitos casos, células neoplásicas podem ser identificadas (Forrester et al., 1991; Davies e Forrester, 1996).

No linfoma gastrointestinal de baixo grau a perda de peso, vômito, diarreia e anorexia são os achados mais comuns, já a icterícia é incomum (Kiselow et al., 2008; Lingard et al., 2009; Gieger, 2011). A palpação abdominal é anormal em aproximadamente 70% dos casos, com metade consistindo de espessamento da parede intestinal e um terço com massa palpável. Os sinais clínicos geralmente estão presentes por vários meses (Kiselow et al., 2008).

Já a forma linfoblástica de alto grau tende a causar sinais clínicos similares, com progresso mais rápido, de dias ou semanas. Na palpação abdominal é perceptível a presença de massas, aumento do linfonodo mesentérico e fígado (Mahomy et al., 1995; Fondacaro et al., 1999; Gieger, 2011). Icterícia pode estar presente em linfomas de células grandes. Hematoquesia e tenesmo também podem ocorrer se caso o colón estiver envolvido (Slawinski et al., 1997). Nos linfomas de grandes células granulares pode ocorrer anorexia, perda de peso, letargia e vômito (Roccabianca et al., 2006; Krick et al., 2008). Na palpação abdominal pode haver presença de massas em aproximadamente metade dos casos. Efusão abdominal, efusão pleural e icterícia são observados em menos de 10% dos casos (Vail et al., 2013).

Os sinais clínicos e os achados do exame físico em gatos com linfoma extranodal são extremamente variáveis e dependem da localização da massa. Formas extranodais comuns em gatos incluem nasofaringe, ocular, renal e neural. Em geral, os sinais clínicos são o resultado da compressão ou deslocamento de células parenquimatosas normais no órgão afetado, como por exemplo, aumento de uréia e creatinina no linfoma renal, sinais neurológicos no linfoma do SNC (Couto, 2001).

As principais queixas clínicas para gatos com linfoma nasal são corrimento nasal, espirros, estertor, dispnéia, epífora ou secreção ocular, epistaxe e anorexia (Santagostino et al., 2015). A descarga nasal é geralmente mucopurulenta, embora a epistaxe possa ocorrer em um terço dos casos. Linfadenopatia regional pode estar presente. A média de duração dos sinais clínicos anterior ao diagnóstico é de 2 meses (Vail et al., 2013).

Gatos com linfoma renal apresentam sinais consistentes com insuficiência renal: inapetência, perda de peso, poliúria/polidipsia (Mooney et al., 1987; Taylor et al., 2009). O exame físico pode revelar renomegalia, geralmente bilateral, firme e irregular e palpável, na maioria dos casos (Vail et al., 2013).

Gatos com linfoma do SNC podem apresentar sinais como anorexia, letargia e sinais referentes a lesões intracranianas, lesões da coluna vertebral ou ambas (Spodnick et al., 1992; Lane et al., 1994; Tomek et al., 2006; Marioni-Henry et al., 2008; Taylor et al., 2009). Os sinais intracranianos podem incluir ataxia, consciência alterada, agressão, cegueira central e anormalidades vestibulares. Os sinais clínicos referentes ao acometimento da medula espinhal podem incluir paresia ou paraplegia, ataxia, dor e constipação, e sinais inespecíficos, como anorexia, letargia, perda de peso (Lane et al., 1992; Marioni-Henry et al., 2008). Em gatos com comprometimento da medula espinhal, o exame neurológico pode revelar ainda tetraparesia, flacidez da cauda e ausência de dor profunda. A disfunção neurológica pode ser insidiosa ou progredir rapidamente (Vail et al., 2013).

O linfoma ocular pode ser primário ou secundário à forma multicêntrica. Uma variedade de sinais e lesões pode estar presente nesses pacientes, incluindo fotofobia, blefaroespasmos, epífora, hifema, hipópio, massas oculares ou retro-orbitais, infiltração de terceira pálpebra, uveíte anterior, envolvimento coriorretiniano e descolamento de retina (Couto, 2014).

O linfoma cutâneo pode ser focal ou difuso com uma grande variedade de apresentações (Gilbert et al., 2004; Fontaine et al., 2011). Em ordem decrescente de probabilidade, as lesões podem incluir manchas eritematosas, alopecia, descamação, nódulos dérmicos ou placas ulcerativas. Linfadenopatia periférica também pode ocorrer. Em muitos gatos, os sinais clínicos podem ser prolongados, com duração de vários meses (Vail et al., 2010).

3.5 Diagnóstico do linfoma

A abordagem do diagnóstico do linfoma em felinos domésticos deve ser realizada com cautela, uma vez que essa neoplasia pode estar presente em qualquer localização. A avaliação clínica é muito importante para entender qual região do corpo está sendo acometida. Além disso, exames complementares são fundamentais para direcionar e concluir o diagnóstico definitivo do linfoma.

3.5.1 Exames complementares

A realização do teste sorológico para FIV e FeLV é fundamental para determinação do prognóstico do linfoma (Ettinger, 2003). Uma variedade de anormalidades hematológicas e bioquímicas séricas, não específicas, podem ser detectadas. Uma das causas da citopenia pode ser a infiltração da medula óssea pelas células neoplásicas. Como também pode ser devido a consequências da patogenia do FeLV, que pode levar a hipoplasia eritróide e megacariocítica, hiperplasia neutrofílica ineficaz, anemia hemolítica imune mediada. Pode ser observado anemia por doença crônica ou anormalidades paraneoplásicas relacionadas à imunidade, como anemia hemolítica ou trombocitopenia, mas é raro em gatos (Schmidt e Crystal, 2011; Couto, 2001). Alguns subtipos de LG podem resultar em alterações no leucograma. Como no linfoma de grandes células granulares pode ocorrer a leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda regenerativo. Além disso a linfocitose periférica pode vir acrescida de alterações morfológicas como a presença de linfócitos granulares (Barrs e Beatty, 2012).

Outras alterações hematológicas também podem ser observadas, tais como monocitose, reações leucemóides e eosinofilia, que podem ser causadas pela produção local ou sistêmica de substâncias bioativas pelas células tumorais, como por exemplo, fatores de crescimento hematopoiéticos e interleucinas (Couto, 2001).

A realização do perfil bioquímico pode ajudar a monitorar a saúde geral do animal e, em alguns casos, pode sugerir um local específico do envolvimento tumoral (Vail, 2013). As alterações bioquímicas que ocorrem podem ser por comprometimento direto ou indireto do linfoma. No caso, da hipoalbuminemia há um comprometimento indireto observada no LG. Ocorre devido à perda de albumina no lúmen através do comprometimento da parede intestinal (Barrs e Beatty, 2012). O aumento de enzimas hepáticas pode indicar infiltração neoplásica no tecido hepático e aumento de uréia e creatinina pode indicar linfoma renal (Vail, 2013).

Nos LG que acometem o intestino delgado, a concentração de cobalamina sérica pode estar baixa, especialmente devido a redução da absorção no íleo e no jejuno (Lingard et al., 2009; Briscoe et al., 2011; Moore et al., 2012). A utilização de cobalamina pela proliferação da microbioma intestinal no intestino proximal pode reduzir ainda mais a cobalamina disponível (Ruax, 2008).

A dosagem de folato em linfoma gastrointestinal é muito importante. Baixos níveis séricos de folato ocorrem em linfomas que atingem a região proximal do intestino delgado, devido à redução da absorção da mucosa. Nesta região se encontra a folato deconjugase que é a enzima necessária para a absorção de folato (Carreras et al., 2003 e Barrs e Beatty, 2012).

A hipercalcemia é raramente relatada em gatos com linfoma, mas pode ocorrer em casos de diferentes sítios anatômicos. A hipoglicemia já foi relada em um terço em gatos com linfoma em um estudo na Austrália (Garbor et al., 2000).

3.5.2 Exame de imagem

Anormalidades radiográficas em gatos com linfoma variam com as formas anatômicas e, em geral, são secundárias a linfadenopatia ou organomegalia, especialmente à hepatomegalia, esplenomegalia

e renomegalia (Couto, 2001). As radiografias torácicas são realizadas para avaliar a presença de massas mediastinais, que podem indicar timo ou linfonodo mediastinal. Efusão pleural em consequência ao infiltrado neoplásico pulmonar, ou outro envolvimento de linfonodos também pode ser observada (Ettinger, 2003).

A ultrassonografia abdominal facilita a avaliação do trato gastrointestinal pela avaliação da espessura da parede, camadas, motilidade e conteúdo luminal. A parede intestinal normal aparece como uma imagem de cinco camadas, alternadas hiper e hipoeoicas correspondendo à superfície luminal, mucosa, submucosa, muscular e serosa. As alterações encontradas no ultrassom abdominal em casos de linfoma são massas hipoeoicas da parede gástrica ou intestinal, focal. Espessamento difuso da parede gástrica, espessamento simétrico da parede intestinal (Couto, 2001), cujos valores normais são duodeno e jejuno $\leq 2,8\text{mm}$, íleo $\leq 3,2\text{mm}$ e cólon $\leq 1,7\text{mm}$ (Goggin et al., 2000), perda da aparência normal em camadas da parede gastrointestinal, e linfadenopatia abdominal. O diâmetro do linfonodo mesentérico é geralmente $\leq 5\text{mm}$, o aumento do tamanho e a hipoeogenicidade indicam linfadenomegalia mesentérica (Schreus et al., 2008).

A ultrassonografia é usada para avaliar massas mediastinais. Mudança na ecogeneidade dos órgãos parenquimatosos, ou seja, fígado, baço e rins refletem mudanças na textura do órgão secundária à infiltração neoplásica. Além disso, estruturas ou órgãos linfóides aumentados podem ser facilmente identificados e aspirados ou biopsiados (Couto, 2001).

3.5.3 Citologia

O linfoma felino pode ser difícil de diagnosticar definitivamente apenas pela citologia, devido ao aumento da prevalência de envolvimento de órgãos internos e morfologia de pequenas células, em comparação com o linfoma canino (Twomey e Alleman, 2006). Segundo Couto (2001), na citologia os diagnósticos compatíveis com linfoma podem ser realizados em 70 a 75% dos gatos avaliados. O método através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é obtido preferencialmente de linfonodo. Em órgãos internos a PAAF deve ser feita guiada por ultrassom.

Em alguns casos, somente a PAAF não é suficiente, devido a dificuldade em distinguir o linfoma de outras condições como a hiperplasia linfóide benigna ou linfonodo reativo. Nesses casos, a excisão total do linfonodo ou a biópsia do órgão envolvido é indicado, pois o exame histopatológico detalha sobre invasividade e anormalidades arquiteturais, que podem ser necessárias para o diagnóstico (Vail, 2013).

O linfoma linfoblástico é o tipo mais comum de ser diagnosticado por citologia. Quando mais de 60% da população de células linfóides em todas as áreas dos esfregaços ou *squashe* forem linfoblastos o diagnóstico de linfoma é conclusivo (Valenciano et al., 2011). No caso, de linfoma de pequenas células, a citologia pode ser sugestiva se houver uma população monomórfica de pequenos linfócitos maduros em grande número e, ausência de plasmócitos ou outras células inflamatórias. Ocasionalmente, a morfologia atípica dos pequenos linfócitos neoplásicos pode ser vista como um leve aumento na quantidade de citoplasma, que se afasta de uma extremidade do núcleo, formando uma pequena cauda citoplasmática. Esta morfologia não é de forma alguma específica para o linfoma, mas pode ser vista ocasionalmente com linfoma de baixo grau em citologia (Valenciano et al., 2011).

O diagnóstico de linfoma de grandes células granulares (LGL), que é um subtipo do linfoma gastrointestinal, é feito com base em critérios citológicos amplamente aceitos. As células têm morfologia de linfócitos maduros ou imaturos, com núcleos únicos redondos ou levemente edentados, citoplasma moderado a volumoso e com grânulos azurofílicos finos a grandes (Sapierzyński et al., 2015).

A aspiração ou biópsia da medula óssea deve ser incluída na avaliação, especialmente se houver anemia, linfocitose, linfócitos periféricos atípicos, neutropenia ou trombocitopenia. Um hemograma não exclui o comprometimento da medula óssea (Ettinger, 2003). O aspirado medular é necessário para confirmar um diagnóstico de linfoma da medula óssea, que deve ter como característica a presença de mais de 30% de linfoblastos. Também é útil o diagnóstico de linfoma espinhal, que geralmente tem envolvimento da medula óssea. Isso torna o diagnóstico mais fácil do que a coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) (Schmidt e Crystal, 2011).

3.5.4 Biópsia por endoscopia x biópsia por laparotomia

As biópsias endoscópicas são um teste conveniente e minimamente invasivo para distúrbios intestinais infiltrativos em gatos. A gastroduodenoscopia permite a coleta de amostras intestinais gástricas, duodenais e possivelmente jejunais. As amostras ileais também podem ser obtidas por colonoscopia, mas requerem preparação do cólon usando uma ou mais soluções de lavagem, catárticos e enemas (Scott et al., 2011).

A desvantagem é que a endoscopia não alcança tecidos abaixo da muscular da mucosa, portanto, a disseminação transmural é impossível de avaliar, resultando em um diagnóstico padrão de linfoma da mucosa. O diagnóstico de LG é baseado na citomorfologia do infiltrado, no grau de epiteliotropismo e no padrão de infiltração da lâmina própria, por isso a dificuldade de estabelecer o grau de invasividade com a biópsia por endoscopia (Moore et al., 2012).

Já as vantagens das biópsias obtidas cirurgicamente é que são transmural e, portanto, incluem todas as camadas do trato gastrointestinal, permitindo que o patologista avalie o processo da doença completamente. Além disso, o clínico pode obter biópsias dos linfonodos mesentéricos, fígado e pâncreas durante a laparotomia (Gieger, 2011). As desvantagens da cirurgia incluem maior tempo de anestesia e um procedimento mais invasivo, seguido por um período de cicatrização da cirurgia em um gato frequentemente debilitado (Gieger, 2011).

3.5.5 Histopatologia

Em muitos casos, quando a citologia não conclui o diagnóstico de linfoma o método padrão ouro é o histopatológico. Em especial os linfomas de pequenas células, requerem histopatologia, para confirmar o diagnóstico. O diagnóstico histopatológico do linfoma envolve observar a arquitetura do órgão acometido para anormalidades, como a infiltração das células neoplásicas e a invasão capsular (Valenciano et al., 2011). Determinar o tamanho da célula e o índice mitótico e diferenciar o padrão difuso do crescimento folicular (Valli et al., 2016).

O tamanho das células linfóides neoplásicas é baseado no tamanho de seus núcleos em comparação com os eritrócitos. As células linfóides pequenas têm núcleos 1-1,25 vezes o tamanho dos eritrócitos, as células linfóides intermediárias têm núcleos de aproximadamente 1,5 vezes o tamanho dos eritrócitos e as células grandes têm núcleos pelo menos 2 vezes maiores que os eritrócitos (Valli et al., 2011). O índice mitótico é determinado como o número médio de figuras mitóticas em 10 campos no aumento de 40x, nas áreas de maior atividade mitótica. Um índice mitótico baixo é definido como 0-5 mitoses, um índice mitótico médio de 6-10 mitoses e um alto índice mitótico é maior que 10 mitoses (Valli et al., 2016).

Atualmente há dois sistemas de classificação para o linfoma felino. Segundo a NCIWF os linfomas são graduados como baixo, intermediário e alto grau com base na morfologia celular e frequência de figuras mitóticas. Os linfomas de baixo grau têm menos de 5 mitoses/ média de 10 campos no aumento de 40x, o grau intermediário tem entre 5 e 10/ média de 10 campos no aumento de 40x e o alto grau com mais de 10 mitoses/ média de 10 campos no aumento de 40x (Gabor et al., 1999). O outro sistema é de acordo com *World Health Organisation (WHO)* que classifica o linfoma baseado na morfologia, imunofenótipo, comportamento biológico da doença para diferenciar os subtipos no grupo heterogêneo de linfomas (Wolfesberger et al., 2016).

Wolfesberger e colaboradores (2016), fizeram um estudo retrospectivo com 30 gatos e concluíram que o subtipo de linfoma mais prevalente em gatos era o Linfoma de células T periférico (37%; n=11), seguido por Linfoma difuso de grandes células B (23%; n=7), intestinal de células T (10%; n=3), linfoma de células B rico em T (10%; n=3), LGL (7%; n=2), linfoma de grandes células T anaplásico (7%; n=2), linfoma linfocítico de pequenas células B (3%; n=1), e por último o linfoma de angiotrópico de células T (3%; n=1).

3.5.6 Imuno-histoquímica

Atualmente a imuno-histoquímica se tornou uma ferramenta fundamental para o diagnóstico e classificação de neoplasias linfóides. Representa um método simples e eficaz em termos de tempo para avaliar a expressão de proteínas em tecidos e é uma ferramenta valiosa na pesquisa do câncer. Essa técnica tem sido aplicada a vários linfomas felinos, e foi utilizada em vários estudos que relataram a sua utilidade diagnóstica (Felisberto et al., 2016).

A imunofenotipagem é necessária para se chegar a um diagnóstico conclusivo, porque várias entidades de linfoma são morfológicamente indistinguíveis, mas são fenotipicamente heterogêneas. Como o linfoma linfocítico pequeno, linfoma linfoblástico, linfoma da zona marginal *versus* linfoma da zona T ou linfoma difuso de grandes células B *versus* linfoma T periférico (Valli et al., 2016).

Os anticorpos para proteínas específicas são aplicados ao tecido, geralmente seguido por um anticorpo secundário de uma espécie diferente do paciente ou do anticorpo primário. Os anticorpos secundários são conjugados a enzimas que catalisam uma mudança de cor quando o substrato é adicionado. Este método permite aos patologistas identificarem células individuais que expressam a proteína de interesse e colocar essas células no contexto da arquitetura do tecido (Avery et al., 2013).

Em animais, o CD3 é usado para detectar células T e o CD79a para linfócitos B. Em cães e gatos, o CD20 e o Pax-5 são comumente usados, em vez do CD79a que pode apresentar ligação nuclear artefactual (Valli et al., 2016).

As glicoproteínas CD3 e CD79a constituem os dois antígenos *clusters of differentiation* (CD) mais comuns utilizados para a caracterização do imunofenótipo do linfoma (Morrison e Neuberger, 2001). O CD3 é formado por um complexo de quatro polipeptídeos associados à cadeia dupla (α / β ou γ / δ) do receptor de células T (TCR), que é ativado através da estimulação antigênica (Morrison e Neuberger, 2001; Charney et al., 2002). Similarmente, CD79 existe como um heterodímero duplo (CD79A e CD79B) associado ao receptor de célula B (BCR) e é necessário para transdução de sinal intracelular de células B (Morrison e Neuberger, 2001).

O BLA.36 é uma glicoproteína de superfície celular de 36 kDa, expresso especialmente em células B pré-maturas, e B maduras, no centro germinal e na zona do manto de folículos reativos nos linfonodos e no baço. O BLA.36 também foi detectado na superfície das células de Reed-Sternberg de Hodgkin e em células malignas da linhagem de linfócitos B (Imam et al., 1990; Cohen et al., 1995).

O Pax 5, também conhecido como proteína ativadora específica de células B (BSAP) é um membro da família de fatores de transcrição de domínios pareados altamente conservados (PAX) e potencialmente regula o *gene* CD19 que é responsável por codificar uma proteína de superfície específica celular tornando-se um regulador chave no desenvolvimento e diferenciação de células B (Adams et al., 1992; Horcher et al., 2001). Alta expressão ocorre no desenvolvimento inicial das células B. Baixa expressão durante a maturação e completa ausência de expressão é observada em plasmócitos terminalmente diferenciadas e células T (Usui et al., 1997; Krenacs et al., 1998; Horcher et al., 2001; Mhaweche-Fauceglia et al., 2007; Feldman et al., 2010). O Pax5 é expresso na grande maioria de células B neoplásicas (Mhaweche-Fauceglia et al., 2007).

Em um estudo realizado em 2016 Felisberto et al. investigaram a expressão e detecção da BSAP usando um anticorpo monoclonal anti-Pax5 em amostras de tecido de linfoma não-Hodgkin felino para avaliar sua relevância diagnóstica como um marcador de célula B. Concluíram que o marcador anti-Pax5 apresentou imunomarcagem em 82,6% de todos os linfomas de células B e nenhuma expressão foi encontrada em nenhum dos linfomas de células T. A imunomarcagem do anticorpo anti-Pax5 em linfoma não-Hodgkin felino é semelhante à relatada em homólogos humanos e caninos e pode oferecer um excelente marcador de célula B em gatos.

Os linfomas de grandes linfócitos granulares são agrupados em duas linhagens; o de células T, que expressa CD3 e o de células *NK* que não expressam CD3. Outros marcadores devem ser utilizados para identificar este subtipo de linfoma. Segundo Roccabianca et al. (2006), em um estudo realizado com 21 gatos que apresentaram o linfoma de grandes células granulares, os linfócitos expressam 100% a leucointegrina CD18. O imunofenótipo de células T, CD3, foi expressado em 19 tumores, o imunofenótipo supressor e citotóxico, CD8 $\alpha\alpha^+$ foi observado em 13 gatos com esse subtipo de linfoma.

Além dos CD utilizados como marcadores para estabelecer a origem da neoplasia linfoide, também é utilizado marcadores de prognóstico, esses expressam a taxa de proliferação celular da neoplasia. A

porcentagem da expressão de Ki67 nas células parece ter uma correlação com o grau de malignidade da neoplasia (Fournel-Fleury et al., 1997). Outro indicador de taxa de proliferação celular é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Vail et al., 1998). Na figura 4 são descritos os marcadores imunohistoquímicos mais utilizados (Valli et al., 2016).

Antígeno	Reatividade
CD3	Linfócitos T
CD4	Linfócitos T auxiliar
CD8	Linfócitos T citotóxicos e supressores
Granzima B	Linfócitos T citotóxicos
CD20	Linfócitos B
CD79a	Linfócitos B
BLA36	Linfócitos B
Pax-5	Linfócitos B imaturos
Ki67	Taxa de proliferação celular
PCNA	Taxa de proliferação celular

Fonte: adaptado de Valli et al. (2016).

Figura 4. Marcadores imuno-histoquímicos usado em cães e gatos.

3.5.7 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Numerosas neoplasias linfoides são difíceis de diferenciar de condições inflamatórias. Em particular, o linfoma de células T associado a enteropatia ou a linfocitose cutânea. Atualmente, é utilizado uma ferramenta que se tornou padrão ouro para diferenciar neoplasia de linfócitos reativos, é denominado PCR para o rearranjo do receptor de antígeno (PARR) (Valli et al., 2016).

Um ensaio de clonalidade demonstrou que um grupo de células é derivado de um único clone. O termo é geralmente usado para se referir à detecção dos genes únicos encontrados em cada célula B ou T individual - genes de imunoglobulina em células B e genes de receptores de células T. A porção desses genes que codifica a região de ligação ao antígeno é a porção que varia entre as células, tanto em tamanho quanto em sequência. Quando as células B ou T se dividem, os genes da imunoglobulina-Ig e do TCR são passados para as células filhas (Delves e Roitt, 2000; Blom e Spits, 2006).

No curso de uma resposta imune normal a um patógeno, as células B e T são ativadas, expandidas e, eventualmente, morrem, deixando para trás um pequeno número de células de memória residuais. Por outro lado, quando uma célula neoplásica não responde mais aos controles de crescimento e sofre expansões ilimitadas. Portanto, se for houver linfócitos que têm o mesmo gene de Ig ou TCR, denominado de monoclonalidade, é mais provável que essas células sejam neoplásicas e não reativas (Swerdlow, 2003).

No processo de desenvolvimento normal dos linfócitos há um complexo rearranjo de genes do sistema imunológico de Ig e de TCR, entre as regiões variáveis (V), de diversidade (D), juncionais (J) e

constantes (C), para gerar grande variabilidade de resposta imunogênica, já que cada linfócito apresenta, após rearranjo, uma combinação específica destes segmentos (Scrideli et al., 2002; Poopak et al., 2014).

Os ensaios de clonalidade são realizados isolando o DNA de células suspeitas de serem neoplásicas e depois utilizando iniciadores de PCR dirigidos nas regiões conservadas de genes de TCR ou Ig. Os primers amplificando a variedade de métodos possíveis. A presença de produtos de PCR de tamanho único é indicativa de clonalidade, enquanto a presença de múltiplos tamanhos dos produtos de PCR indica um processo reativo. Este ensaio foi agora relatado por vários laboratórios (Avery et al., 2013).

Moore e colaboradores (2012), em um estudo retrospectivo, com LG de felinos domésticos, realizaram análise do rearranjo do TCR para detecção de linfoma de células T da mucosa intestinal e obtiveram uma sensibilidade de 91%. No caso, de linfoma de células T transmural a sensibilidade foi de 90%.

Porém, o teste PARR nunca deve dispensar as características histológicas, imunofenótípicas e achados clínicos (Valli et al., 2016). Falhas na detecção da clonalidade (resultando em policlonal) podem ocorrer se os segmentos gênicos iniciadores do TCR V e J não estiverem corretos (Moore et al., 2012).

3.6 Prognóstico do linfoma felino

As formas anatômicas do linfoma são heterogêneas, isso torna difícil a realização do prognóstico. O imunofenótipo (linfoma de células T versus linfoma de células B) não parece conferir a mesma informação prognóstica em gatos do que em cães (Hayes, 2006). Os fatores favoráveis ao prognóstico são a ausência da infecção pelo FeLV, começar o tratamento no estágio clínico inicial, presença de linfoma de baixo grau e uma resposta favorável ao tratamento instituído. Já os fatores desfavoráveis seriam o linfoma de células grandes granulares, pois a sua progressão é agressiva e responde mal aos tratamentos com quimioterápicos (Vail, 2010).

As taxas de resposta global à quimioterapia inicial (resposta completa) geralmente variam de 50 a 80%, com a duração da resposta inicial variando de quatro a 9 meses. As taxas de resposta do segundo tempo (resgate) e a duração da resposta são muito reduzidas. Cerca de 30 a 35% dos gatos com linfoma submetidos a quimioterapia têm taxas de resposta prolongadas e tempos de sobrevivência maior que 1 ano (Schmidt e Crystal, 2011).

Gatos jovens portadores da infecção pelo FeLV com linfoma mediastinal têm um tempo de sobrevida de aproximadamente dois a 3 meses com quimioterapia, sendo um dos piores prognósticos (Vail, 2007). Contudo, gatos com linfoma mediastinal com ausência de infecção pelo FeLV, apresentam uma boa resposta à quimioterapia e o tempo de sobrevida é superior a 1 ano, apresentando um prognóstico melhor (Frabrizio et al., 2014).

Os gatos com linfoma renal estão geralmente associados a tempos de sobrevivência curtos, de três a 6 meses. O prognóstico piora se o nitrogênio uréico sanguíneo (BUN) for superior a 150 mg / dL e/ou

se o gato for portador da infecção pelo FeLV, com possibilidade de progredir para envolvimento do SNC em 40 - 50% dos casos (Schmidt e Crystal, 2011).

O linfoma multicêntrico apresenta mediana da primeira duração da remissão e tempo de sobrevida de aproximadamente 4,5 meses (Vail et al., 1998).

Já o linfoma nasal é a forma anatômica que apresenta o prognóstico mais favorável, com mediana da primeira duração da remissão e tempo de sobrevida superior a 15 meses (Schmidt e Crystal, 2011). Em um estudo realizado por Santagostino e colaboradores (2015), concluiu-se que os fatores prognósticos decisivos foram a idade e o subtipo do linfoma, no caso o epiteliotropismo. Gatos mais novos ou mais velhos que 10 anos tiveram um valor prognóstico negativo. Já o risco de morte de indivíduos com epiteliotropismo negativo foi cerca de 2,5 vezes maior do que o risco de morte de indivíduos com epiteliotropismo positivo.

A resposta à terapia é um fator prognóstico para sobrevida tanto para LG de baixo grau quanto para linfoma gastrointestinal de alto grau (Zwahlen et al., 1998; Fondacaro et al., 1999; Malik et al., 2001; Carreras et al., 2003; Lingard et al., 2009).

O LG de baixo grau histológico é um fator prognóstico positivo, em comparação com grau intermediário e alto (Fondacaro et al., 1999). Os gatos com baixo grau têm tempo de remissão substancialmente mais longo e maior sobrevida. A média de sobrevida é de 19 - 29 meses para o linfoma de baixo grau *versus* 7 - 10 meses para de alto grau (Moore et al., 1996; Zwahlen et al., 1998; Vail et al., 1998; Fondacaro et al., 1999; Rassnick et al., 1999; Malik et al., 2001; Milner et al., 2005; Lingard et al., 2009). O imunofenótipo dos LG não se correlaciona com o tempo de remissão ou com o tempo de sobrevida (Zwahlen et al., 1998; Patterson-Kane et al., 2001).

Para linfomas de graus intermediário e alto, a adição de L-asparaginase, com ou sem doxorrubicina, aos protocolos tradicionais de ciclofosfamida, vincristina e prednisolona (COP) resultou em tempo de sobrevida mais longos em comparação com o tratamento apenas com COP ou terapia com um único agente (Moore et al., 1996; Zwahlen et al., 1998; Rassnick et al., 1999; Kristal et al., 2001).

Em estudo realizado sobre o prognóstico do linfoma Vail et al. (1998) fizeram as seguintes observações: Gatos com linfoma nasal apresentaram os maiores tempos de remissão e sobrevida. Já os LG também tiveram o tempo de remissão e sobrevida mais longos, comparando-se favoravelmente a sítios multicêntricos, mediastinais, renais e hepáticos. Isso pode refletir da adição de doxorrubicina em muitos destes casos. O sítio anatômico não foi independentemente prognóstico, presumivelmente por causa da associação do local a presença do FeLV, que foi fortemente preditivo da resposta geral. Dessa forma os autores apresentaram a seguinte conclusão: que os gatos negativos para FeLV que atingem uma remissão completa após a terapia de indução, provavelmente têm respostas duradouras e maiores que 6 meses. Isso ocorre, principalmente, quando a doxorrubicina é incluída no protocolo de quimioterapia. No entanto, os gatos positivos para FeLV tendem a ter tempos de remissão e sobrevida significativamente mais curtos mesmo com os protocolos quimioterápicos disponíveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

O presente projeto realizou um estudo retrospectivo e prospectivo, entre 2005 e 2018, dos casos de linfoma em felinos doméstico arquivados no setor de patologia veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, e que apresentavam relato da necropsia e blocos de tecidos fixados em parafina, disponíveis para novos cortes. Também foram obtidas amostras de tecidos parafinizados, nas mesmas características da Universidade de Vila Velha e do Laboratório externo Vetpat.

O critério de inclusão foi o diagnóstico prévio de linfoma através do exame histopatológico. Foram utilizados 56 casos, sendo 41 gatos advindos de necropsia, 08 de biópsia e 07 de biópsia por endoscopia. De todos os casos foi possível resgatar 36 prontuários, dos quais 19 gatos com linfoma eram do gênero feminino e os outros 19 gatos eram do gênero masculino.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-UFMG, protocolo nº 366/2018 – anexo 1.0

4.2 Histopatológico e imuno-histoquímica

Os tecidos selecionados foram seccionados em 3µm e corados por hematoxilina e eosina e para imuno-histoquímica.

As lâminas sinalizadas contendo cortes de 3µm de espessura foram desparafinizadas em xilol e álcool, em seguida hidratadas para a imunomarcção, de acordo com a metodologia ABC (estreptavidina-biotina-peroxidase), utilizando os anticorpos isolados em lâminas separadas. As reações de recuperação antigênica foram feitas em calor úmido pressurizado (Pascal®) com citrato pH 6,0 a 125°C por 2 minutos, para o anticorpo anti CD3, com resfriamento de 20 minutos após a retirada das cubas da Pascal e para o anticorpo anti CD79a foi utilizada a recuperação antigênica em Banho Maria a 95°C por 20 minutos, com resfriamento de 20 minutos. Na sequência foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos em tampão de fosfato salino (PBS), seguido pelo bloqueio da peroxidase (3 vezes de 5 minutos) e da proteína endógena (15 minutos) a temperatura ambiente, com 3 lavagens em PBS entre o bloqueio da peroxidase e da proteína.

As amostras foram então recobertas pelos anticorpos primários com o tempo de incubação *overnight* em temperatura 8°C em geladeira, dentro da câmara úmida (figura 5). Após 16 horas de incubação as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos, sendo realizada novamente 3 lavagens em PBS e aplicação do polímero, por mais 30 minutos. Foram utilizados todos os reagentes do Kit Novo Link – Leica® de acordo com as instruções do fabricante.

A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB – Kit Novo Link Leica) por 3 minutos para CD3 e 2 minutos para CD79, diluído 50µl de DAB para 1 ml de diluente, 15 minutos antes da aplicação, também conforme instruções do fabricante. A contra coloração foi realizada com hematoxilina.

As lâminas marcadas para CD3 e CD79 foram examinadas em objetiva de 40x, para avaliação da distribuição e da porcentagem das células marcadas, determinando o tipo celular predominante, conforme figura 5.

Anticorpo	Fonte	Diluição	Recuperação antigênica	Tempo(h)/temperatura de incubação
CD3 (Policlonal)	CL Davis	1:300	Pascal (125°C/2 min) com tampão de citrato pH 6.0	16h/8°C
CD79a (HM47/A9)	DBS	1:500	Banho Maria (95°C/20min) com tampão de citrato pH 6,0	16h/8°C

Figura 5. Etapa da reação do anticorpo primário e seus clones alvos.

4.3 Extração do DNA do tecido fixado e parafinizado

A extração do DNA dos tecidos foi realizada a partir de 6 cortes de 4µm de espessura do tecido neoplásico em blocos de parafina. Os cortes foram armazenados em *ependorf* estéril.

A desparafinização e a extração do DNA dos tecidos parafinizados foi realizada utilizando o kit comercial *Quick-DNA/RNA FFPE Kit - Zymo Research kit* (Zymo) seguindo as recomendações do fabricante.

4.3.1 PCR para avaliação da eficiência da extração do DNA

Para avaliar a eficiência da extração do DNA, foi utilizada o PCR convencional para o gene constitutivo actina beta que foi padronizada utilizando os iniciadores descritos por Souza et al. (2018) (Figura 6). Como controle positivo utilizou-se o DNA proveniente da capa leucocitária de um felino doméstico.

A reação de PCR era composta por 2 µL de DNA, 0,6 pmol/µL dos iniciadores Forward e Reverse (Figura 6); 0,20 mM de dNTP (LGC Biotecnologia, Brasil); 1,5 mM de MgCl₂ (Promega, EUA); 5 µL do tampão 5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, EUA); 0,04 U/ µL de Taq Gotaq® DNA polimerase (Promega,EUA) e água tratada com DEPC estéril para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Veriti™ 384 well (Applied Biosystems, EUA) com desnaturação inicial de 95 °C durante 2 minutos seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C durante 7 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5mg/mL). Utilizou-se 10µL do amplificado, e os produtos esperados foram identificados a partir da comparação com o padrão de peso molecular de 100 pares de bases.

4.3.2 PCR *semi-nested* para detecção do FeLV no tecido neoplásico

A detecção do DNA proviral do FeLV foi feita pelo PCR *semi-nested* para amplificação da região U3 do DNA proviral nas amostras de DNA com resultado positivo na PCR de Beta-Actina (Souza et al., 2018). A semi-nested PCR foi padronizada utilizando os iniciadores descritos por Suntz et al. (2010), descrita no quadro 6. Como controle positivo utilizou-se o DNA proveniente da capa leucocitária de um felino doméstico infectado pelo FeLV.

A reação externa era composta por 2uL de DNA, 0,36 pmol/μL dos iniciadores FW-1 e Rev (quadro 6); 0,20 mM de dNTP (LGC Biotecnologia, Brasil); 1,5 mM de MgCl₂ (Promega, EUA); 5 uL do tampão 5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, EUA); 0,06 U/μL de Taq Gotaq® DNA polimerase (Promega, EUA) e água tratada com DEPC estéril para um volume final de 25uL. A reação foi realizada em termociclador Veriti™ 384 well (Applied Biosystems, EUA) com desnaturação inicial de 95 °C durante 2 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação 92°C por 60 segundos, anelamento 54°C por 30 segundos e extensão 72°C por 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C durante 5 minutos.

A reação interna era composta por 2 uL do produto amplificado da reação externa, 0,36 pmol/μL dos iniciadores FW-2 e Rev (Tabela x); 0,20 mM de dNTP (LGC Biotecnologia, Brasil); 1,5 mM de MgCl₂ (Promega, EUA); 5 uL do tampão 5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, EUA); 0,06 U/μL de Gotaq® DNA polimerase (Promega, EUA) e água tratada com DEPC estéril para um volume final de 25uL. A reação foi realizada em termociclador Veriti™ 384 well (Applied Biosystems, EUA) com desnaturação inicial de 95 °C durante 2 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação 92°C por 60 segundos, anelamento 54°C por 15 segundos e extensão 72°C por 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C durante 5 minutos.

A visualização dos produtos amplificados da reação interna foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5mg/mL). Utilizou-se 10μL do amplificado e os produtos esperados foram identificados a partir da comparação com o padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Ludwig Biotec).

Gene	Iniciadores (5'3')	Tamanho do produto	Referência
Beta actina	Foward: GGCATCCTGACCCTGAAGTA Reverse: CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT	98 pb	Souza et al, 2018
U3 LTR - FeLV	FW-1: TTA CTCAAGTATGTTCCCATG Rev: AGGTCGA ACTCTGGTCAACT FW-2: CTTGAGGCCAAGAACAGTTA	185 pb (externa) 110 pb (interna)	Suntz et al, 2010

Figura 6. Descrição dos primers e o tamanho dos produtos para PCR dos genes beta actina e provírus do FeLV.

4.4 Análise Estatística

Para apresentação dos dados foi realizada estatística descritiva utilizando-se planilhas do Microsoft® Excel 2010 Office 365.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

A literatura consultada considera o linfoma como sendo a neoplasia hematopoiética mais comum dos felinos, sendo o FeLV comumente incriminado, especialmente antes da introdução do controle por intermédio da vacinação, que ocorreu em meados da década de 80, nos Estados Unidos (Rojko et al., 1989). No Brasil não há uma política bem consolidada de prevenção contra esse gammaretrovírus. Devido a essas falhas, existe um grande número de gatos infectados, que podem ser portadores de linfoma induzido pelo vírus. Os resultados obtidos nesse estudo revelaram informações variáveis referentes a forma anatômica do linfoma e ao imunofenótipo. No entanto, concordam com dados prévios de outros estudos, bem como a detecção do DNA proviral do FeLV.

Foram avaliadas amostras obtidas de 56 animais. Com relação a forma anatômica do linfoma a mais observada foi a gastrointestinal (42,86%), como pode ser observado nas figuras 7 e 8. Talvez esse resultado se deva à maior frequência de obtenção de material biopsiado. Entretanto tais achados corroboram os de estudos, em cujo controle do FeLV já é bem consolidado, como na América do Norte, Europa e Oceania que relataram 32 a 72% de casos de linfoma gastrointestinal em gatos (Wilson, 2008).

Forma Anatômica	FeLV+				FeLV-			Não Avaliado		
	n	CD3	CD79	Não T/B	n	CD3	CD79	n	CD3	CD79
Mediastinal	5	3	2	–	1	1	–	3	2	1
Multicêntrico	9	4	3	2	1	1	–	6	3	3
Gastrointestinal	4	1	3	–	3	2	1	17	10	7
Extramodal	6	2	4	–	–	–	–	1	–	1

Figura 7: Resultado dos casos que foram avaliados PCR para o provírus FeLV do tecido neoplásico e a marcação de imuno-histoquímica e as respectivas formas anatômicas do linfoma. Resultado dos casos que foram avaliados somente imuno-histoquímica.

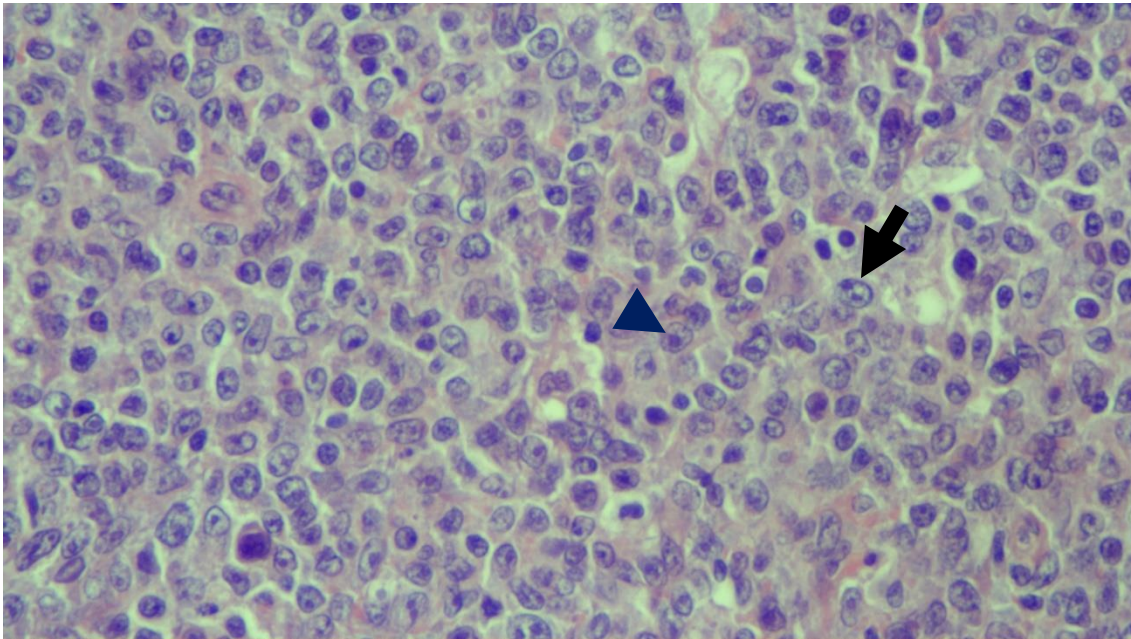


Figura 8: Linfoma gastrointestinal em região do cárdia. Observa-se linfócitos grandes (seta), núcleo redondo, nucléolo proeminente, único e central (cabeça de seta). Aumento de 40x (HE).

A forma multicêntrica foi a segunda mais frequente (28,57%) e a forma mediastinal foi a terceira (16,07%). Estudos em outros países como Estados Unidos e países da Europa, apontam as formas multicêntrica e mediastinal como sendo menos comuns. Em um estudo realizado por Meichner et al. (2015) a incidência do linfoma multicêntrico e mediastinal foram de 10% cada um. Contradizendo estes autores, trabalhos realizados entre os anos 80 e 90, encontraram uma prevalência de 69% para linfomas multicêntricos. Enquanto que a forma mediastinal representava 20-40% dos casos nos EUA, 10-50% dos casos no Reino Unido e 70% dos casos no Japão, todos esses estudos foram precedentes a instituição da vacinação contra FeLV (Takahashi et al., 1974).

O linfoma extranodal representou, nesse estudo, a forma anatômica menos comum (12,5%), dos quais quatro eram linfomas renais, o que representou 57,14% de todas as formas extranodais encontradas. Em um estudo realizado por Gabor et al. (1998), o envolvimento renal representou 31% dos casos extranodais. Segundo Jarrett et al. (1966) o linfoma renal é incomum no cão e considerado raro em pessoas (Kindle et al., 1993; Saito et al., 1996), embora ocorra em pacientes com HIV/AIDS (Tsang et al., 1994). Dessa forma a alta incidência deste achado pode estar relacionada aos fatores genéticos e ambientais, que operam em diferentes regiões geográficas e têm, uma grande influência na epidemiologia do linfoma em populações de gatos, como levantaram a hipótese Gabor et al. (1998) ao estudarem o envolvimento de retrovírus no desenvolvimento dessa neoplasia.

No presente estudo, o imunofenótipo de maior ocorrência foi o de células T (50%) seguido pelo de células B (48,21%) e o menos frequente foi o fenótipo não B não T (3,60%), como pode ser observado na figura 9. Existem controvérsias sobre o fenótipo mais comum do linfoma de felinos domésticos.

Alguns autores relatam que o fenótipo mais comum é o B, como descrito por Gabor et al. (1999) e Pohlman et al. (2009). Já outros autores, como Wolfesberger et al. (2016) e Vezalli et al. (2009), relataram que o linfoma de células T é o mais frequente. A explicação de alguns autores seria a localização do linfoma. Para a forma gastrointestinal, parece haver um predomínio de células B, principalmente para tumores localizados no estômago e no intestino grosso. Enquanto outros descrevem o linfoma de células T como o mais comum, localizados no intestino delgado (Moore et al., 2012).

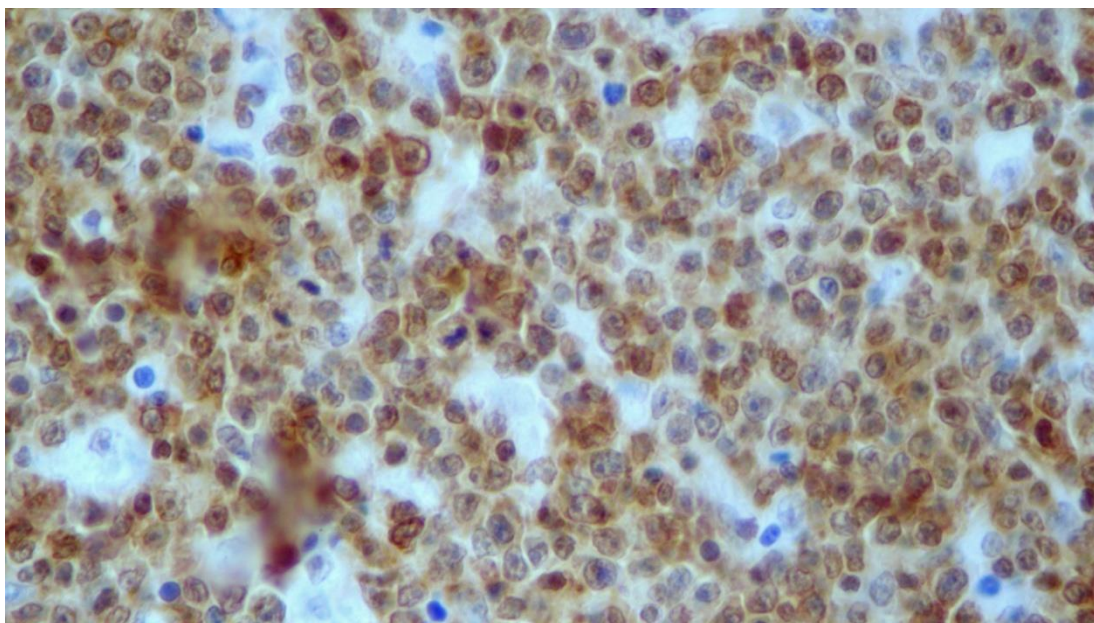


Figura 9: Gato, linfoma de células B. Imuno-histoquímica: na membrana e no citoplasma há marcação homogênea marrom. Aumento de 40x (marcador CD79).

Os resultados obtidos entre a relação da forma anatômica e o imunofenótipo do linfoma concordam com o que a literatura relata, principalmente para o linfoma mediastinal que denotaram 66,7% de linfomas do tipo T, no presente estudo. Em estudo realizado por Vail e colaboradores (1998), 85% dos linfomas mediastinais foram imunorreativos para o marcador CD3. Outros autores corroboraram com esse achado, como Gabor et al. (1999).

No presente estudo, 50% de linfócitos do tipo B e 50% de linfócitos do tipo T foram expressos no LG, alguns autores relatam o predomínio de linfócitos B sobre T e outros estudos contrapõem esse resultado. Em um estudo realizado por Pohlman et al. (2009) no qual foram avaliados somente LG, 54% eram originados de células B e 38% de células T. De acordo com os autores existe uma forte associação entre o imunofenótipo e a localização do tumor no sistema gastrointestinal, sendo que o fenótipo B tem predomínio no estômago e intestino grosso. No presente estudo foram avaliados dois linfomas gástricos e ambos foram classificados como sendo de imunofenótipo B, concordando com

a literatura. Outro estudo com LG realizado por Moore e colaboradores (2012) classificaram 120 LG baseados no imunofenótipo, na arquitetura da neoplasia, se era somente mucosa ou transmural e documentaram a localização anatômica e o tamanho da célula. Obtiveram 70% de linfomas do tipo T, e concluíram que o linfoma de células T são caracterizados pela perda da arquitetura tecidual da mucosa. Já o linfoma do tipo B ocorre como lesões transmurais, principalmente em estômago, jejuno e junção íleo-ceco-cólica.

Nesse estudo, dos linfomas extranodais 71,4% foram do tipo B, isso concorda com a literatura, mas depende do local que este linfoma se origina, como por exemplo dos quatros linfomas renais avaliados nesse trabalho, todos apresentaram o fenótipo tipo B. Gabor et al. (1999) realizaram avaliação de linfomas em gatos da Austrália, 28 linfomas eram renais e a grande maioria era do fenótipo B, de grau intermediário a alto. Das outras formas de linfoma extranodal a grande maioria também expressou fenótipo B.

Dois casos de linfomas cutâneos foram diagnosticados neste estudo, um era do fenótipo T e o outro B. De acordo com Day (1995) a origem dos linfomas cutâneos de células B são raros, sendo muito comum o do tipo T.

A extração do DNA do tecido parafinizado teve eficácia somente em 29 casos (51%), provavelmente devido a procedência das amostras. Alguns tecidos já estavam com leve a moderado comprometimento autolítico, que pode ter interferido na quantidade e qualidade do DNA extraído. Dos casos que tiveram eficácia na extração do DNA, 24 foram positivos pela PCR para o DNA proviral do FeLV (figura 10). Isso corresponde a 82,75% de presença do DNA proviral nos tecidos neoplásicos, corroborando com o trabalho realizado por Weiss et al. (2010), que analisaram 50 amostras de linfoma por PCR *semi nested*, para detecção do FeLV-A exógeno, que amplifica a região U3 LTR, e através da imuno-histoquímica para o antígeno do FeLV. Tais autores encontraram um grande percentual (68%) de provirus FeLV e 16% do antígeno do FeLV nos linfomas. Este resultado foi surpreendente, pois o DNA do provirus de FeLV está presente em uma alta porcentagem de linfomas felinos em países que já estabeleceram o controle da infecção através da vacinação.

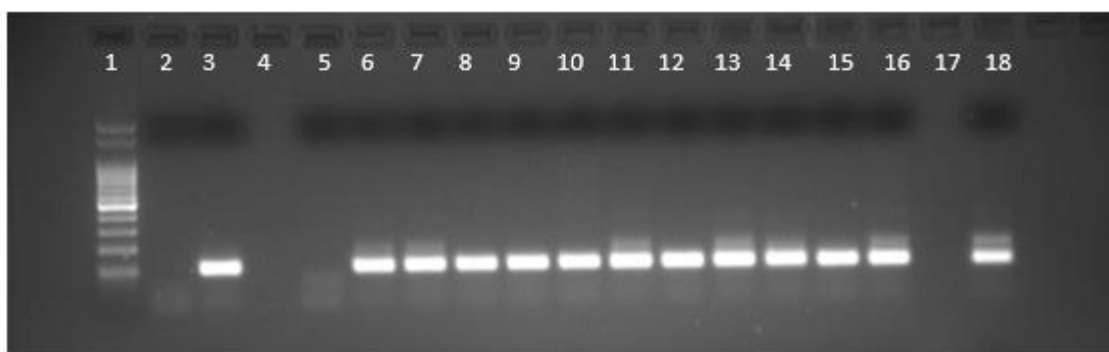


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do DNA proviral de FeLV em amostras de tecido parafinizado. Canaleta 1: marcador de peso molecular (100pb); canaleta 2: controle negativo; canaleta 3: controle positivo; canaleta 5-16 e 18: amostras de extração de DNA provirus FeLV do tecido de linfoma.

No presente estudo a relação entre a forma anatômica e a presença do DNA proviral do FeLV está de acordo a literatura, especialmente para o linfoma mediastinal. Esta forma do linfoma apresentou 20,8% do DNA proviral no tecido neoplásico. Estudos anteriores indicaram que o linfoma mediastinal ocorre mais frequentemente em gatos jovens positivos para o FeLV (Rojko et al., 1989; Vail et al., 1998; Couto, 2001). Em países nos quais a política de prevenção já está bem estabelecida, essa observação foi feita por base de dados epidemiológicos, obtidos a partir de relatos dos anos 80, quando a prevalência da antigenemia do FeLV entre gatos com linfoma foi estimada como sendo em torno de 70% (Fabrizio et al., 2013). No caso específico do linfoma mediastinal, estudos anteriores, demonstraram 50% a 73% de associação à antigenemia do FeLV (Hardy 1981; Jackson et al., 1996; Day 1997; Vail et al., 1998). Contrapondo a literatura atual, Weiss et al. (2010), tiveram 100% dos linfomas mediastinais positivos para o DNA provirus do FeLV. Um estudo realizado por Cristo et al. (2019) avaliou a relação da presença do FeLV com o linfoma pela imuno-histoquímica para o antígeno do vírus, no Brasil e encontrou 18 formas de linfoma mediastinal, do qual 12 expressavam o antígeno do FeLV. Esses resultados demonstram a alta relação entre a forma mediastinal com a presença do FeLV.

Outra forma anatômica muito relacionada à infecção pelo Gammaretrovírus felino é a multicêntrica. Jackson et al. (1993) avaliaram a presença do DNA proviral em linfomas de felinos domésticos, a forma multicêntrica foi a que obteve maior percentual da presença do provirus, apresentando 81% de positividade na PCR. Outro estudo realizado por Weiss et al., (2010) demonstrou que todos os linfomas multicêntricos continham o provirus de FeLV. No Brasil, Cristo et al. (2019) realizaram imuno-histoquímica para o antígeno FeLV nos linfomas de gatos e encontraram forte imunorreatividade em 56,52% dos linfomas multicêntricos. O resultado do presente estudo corrobora o que esses autores encontraram. Do total de PCR positivos para o provirus FeLV, 37,5% estavam em linfomas multicêntricos, que a forma anatômica com maior prevalência do provirus do FeLV. Mas, outros estudos contradizem estes resultados, tais como o de Meichner et al. (2012) que encontraram o antígeno positivo para o FeLV em dois dos 15 linfomas multicêntricos relatados. Já outro estudo encontrou somente 3% dos linfomas multicêntricos com a presença do provirus de FeLV (Gabor et al., 2001).

A forma extranodal teve uma alta relação com do DNA proviral do FeLV, sendo que nesse estudo 25% do total de casos positivos para o FeLV estavam presentes nesta forma anatômica. Todos os linfomas renais continham o DNA proviral do FeLV. Esse resultado corrobora com alguns autores que encontraram de 25% a 42% de positividade do provirus do FeLV no linfoma renal (Vail et al., 1998; Gabor et al., 2001). De acordo com Cristo et al. (2019) 33,33% dos linfomas renais avaliados foram positivos na imuno-histoquímica para o antígeno do FeLV. No presente estudo, o único linfoma cutâneo em que foi extraído o DNA para realizar o PCR do provirus FeLV foi positivo. A literatura é muito divergente sobre a presença do FeLV em neoplasias linfoides cutâneas. Entretanto, contrariando vários estudos, Weiss et al. (2010) obtiveram cerca 80% dos linfomas cutâneos positivo para o provirus do FeLV.

No presente estudo, o LG teve o menor percentual da presença do provirus do FeLV, contabilizando 16,7%. A baixa correlação da presença do FeLV com essa forma de linfoma é bem documentada na literatura. De acordo com Barrs e Beatty (2012) o LG tem pouca associação com a antigenemia, por sorologia do FeLV, geralmente sendo detectada em até 12% dos casos. Quando se trata da detecção do DNA proviral do FeLV no linfoma gastrointestinal nenhum consenso foi alcançado ainda. Em três

estudos diferentes, o DNA proviral foi detectado em 53%, 60% e 21% dos tumores intestinais (Gabor et al., 2001; Weiss et al., 2010; Russell et al., 2011).

Os tumores de células B eram geralmente considerados como negativos para FeLV (Hardy e Macewen, 1989; Rojko et al., 1989; Rezanka et al., 1992). Em um estudo realizado por Rojko et al. (1989) concluiu-se que o FeLV não transforma apenas células T maduras, mas também células imaturas ou protimócitos, células nulas e, possivelmente, células T auxiliares ou monócitos. A transformação de células B maduras foi excluída por falta da expressão de imunoglobulinas na superfície das linhas celulares do linfoma felino e nos tumores primários que foram examinados. No entanto, até os anos 90 havia falta de marcadores eficazes para células B, o que pode ter impedido sua investigação mais adequada (Jackson et al., 1996). Dessa forma, Jackson et al. (1996) em estudos posteriores relacionaram o imunofenótipo do linfoma felino, com marcadores de células B mais específicos, com a presença do FeLV nas células neoplásicas. Em seus estudos realizaram a identificação do fenótipo dos linfomas através da imuno-histoquímica e avaliaram a presença do antígeno FeLV pela IHQ e do provirus do FeLV pela PCR e concluíram que não há nenhuma diferença significativa na proporção de tumores de células T, em comparação com a proporção de tumores de células B que eram positivos para o FeLV.

Outros estudos mais recentes avaliaram a relação do fenótipo do linfoma com a presença do FeLV, como Gabor et al. (2001), que obtiveram 32% de linfomas de células T positivos para o provirus do FeLV, 47% em células B e 21% fenótipo não T não B. Já Weiss et al (2010) apresentaram um resultado diferente, sendo que a detecção do provirus FeLV foi feita em 79% linfomas T, 60% linfomas B e 67% linfomas não T não B. O presente estudo, assim como o de Gabor et al. (2001) também não demonstrou diferença significativa na relação do imunofenótipo e a presença do provirus do FeLV, sendo que 50% foram linfomas T, 41,7% linfomas B e 8,3% linfomas não T não B.

6. CONCLUSÃO

Baseado na análise histopatológica, imuno-histoquímica e na PCR *semi nested* dos tecidos parafinizados contendo o linfoma, pode-se concluir que:

1. A forma anatômica do linfoma felino mais frequente é a gastrointestinal.
2. Há alta frequência de linfoma associado ao FeLV.
3. A presença do DNA proviral do FeLV tem uma alta relação com a forma multicêntrica do linfoma.
4. Tanto linfomas T quanto B são frequentes em felinos domésticos, sem predisposição por um tipo celular específico.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Atualmente, o Brasil vive um cenário alarmante sobre os casos de gatos com infecção pelo FeLV, a falta de uma política de prevenção elaborada e efetiva traz consequências irreparáveis. Uma dessas consequências é o desenvolvimento do linfoma felino. Infelizmente, no Brasil há poucos estudos sobre a correlação da infecção pelo FeLV e o desenvolvimento do linfoma. Este trabalho teve como objetivo principal investigar essa relação, embora possam haver diferenças regionais, especialmente relacionadas a critérios de vacinação.

A detecção do DNA proviral do FeLV, utilizando o PCR possibilitou a identificação do DNA do vírus no genoma do gato. Mas, para concluir se as células neoplásicas estavam tendo a produção ativa do vírus, seria necessário a utilização de marcadores IHQ para detecção do antígeno do vírus, como o antígeno do capsídeo p27 e a glicoproteína gp70.

Seria muito interessante acrescentar a pesquisa de outros vírus que já são conhecidos ou suspeitos de estarem envolvido no desenvolvimento do linfoma, como o FIV e o Gammaherpesvirus felino. Esses resultados poderiam esclarecer algumas questões sobre a prevalência do envolvimento de co-infecções no desenvolvimento dessa neoplasia.

A pesquisa de outros vírus, que já são conhecidos ou suspeitos de estarem envolvidos no desenvolvimento do linfoma, como o FIV e o Gammaherpesvírus felino, também carecem de maiores estudos. Esses resultados poderiam esclarecer algumas questões sobre a ocorrência do envolvimento de co-infecções no desenvolvimento do linfoma.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, H. D., ROHRSCHEIDER, L. R., EISENMAN, R. N. Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell*. v.29. p.427-43,. 1982.
- ACKERMANN, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet. Microbiol.*v.113, p.211–222, 2006.
- ADAMI, J.; NYREN, O.; BERGSTROM, R.; BERGSTROM, R.; EKBOM, A.; ENGHOLM, G.; ENGLUNO, A.; GLIMELIUS, B. Smoking and the risk of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma (Sweden). *Cancer Causes & Control*. v.9, n.1, 49–56, 1998.
- ADAMS, B.; DÖRFLER, P.; AGUZZI, A.; KOZMIK, Z.; URBÁNEK, P.; MAURER-FOGY, I.; BUSSLINGER, M. Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes & Development*; v.6, p.1589–1607, 1992.
- AGHAZADEH, M.; SHI, M.; BARRS, V.; MCLUCKIE, A.; LINDSAY, S.; JAMESON, B.; HAMPSON, B.; HOLMES, E.; BEATTY, J. A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia. *Viruses*. v.10, p.269-275, 2018.
- AVERY, C. A; OLIVER, C.; KHANNA, C.; POLONI, M. Molecular Diagnostics. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. Withrow and MacEwen's. *Small animal clinical oncology*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 8, p.131-142.
- BARR, F. (ED.). Scientific Information Document Feline leukaemia vírus. *Journal Of Small Animal Practice*.. vol. 39, p. 41-43, 1998.
- BARRS, V.; BEATTY, J. Feline alimentary lymphoma. Classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. *J Fel Med and Sur*. v.14, p.182–190, 2012.
- BEATTY, J. A., TROYER, R. M., CARVER, S., BARRS, V. R., ESPINASSE, F., CONRADI, O., STUTZMAN-RODRIGUEZ, K., CHAN, C., TASKER, S., LAPPIN, M. R., VANDEWOUDE, S. *Felis catus gammaherpesvirus 1*: A widely endemic potential pathogen of domestic cats. *Virology*. v.460–461, p.100–107, 2014

BEATTY, J. A.; CALLANAN, J. J.; J TERRY, A.; JARRET, O.; NEIL, J. C. Molecular and immunophenotypical characterization of a feline immunodeficiency virus (FIV) – associated lymphoma: a direct role for FIV in B-cell-lymphocyte transformation? *J Virol.* v.72, p.767-771, 1998.

BEATTY, J. Viral causes of Feline lymphoma: Retroviruses and beyond. *The Veterinary Journal.* v.201, n.2, p.174-180, 2014.

BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI, L.; MALVALDI, G., TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: An interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews.* v.8, p.87–112, 1995.

BERHARD, C.; WANDHUTCHISON, R. E. The problem of classifying lymphomas: an orderly prescription for progress. *Annals of Oncology;* v.8, p.3–9, 1997.

BERTONE, E. R.; SNYDER, L. A.; MOORE, A. S. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am J Epidemiol.* v.156, p. 268–273, 2002.

BLOM, B.; SPITS, H. Development of human lymphoid cells, *Annu Rev Immunol.* v.24, p. 287-320, 2006.

BOROZAN, I.; ZAPATKA, M.; FRAPPIER, L.; FERRETTI, V. Analysis of Epstein-Barr Virus Genomes and Expression Profiles in Gastric Adenocarcinoma. *J. Virol.* v.92, n.2, p.1-19, 2018.

BRIDGEFORD, E. C.; MARINI, R. P.; FENG, Y.; PARRY, N. M. A.; RICKMAN, B.; FOX, J. G. Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol.* v.123, p.106–113, 2008

BRISCOE, K. A.; KROCKENBERGER, M.; BEATTY, J. A.; CROWLEY, A.; DENNIS, M. M.; CANFIELD, P. J.; Dhand, N.; Lingard, A. E.; Barrs, V. R. Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. *J Comp Pathol;* v.145, p.187–198, 2011.

BROWN, D. R.; KJAER, S. K.; SIGURDSSON, K.; IVERSEN, O. E.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; KOUTSKY, L. A.; TAY, E. H.; GARCIA, P.; et al., The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; Types 6, 11, 16, and 18) L1

Virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16–26 years. *Journal of Infectious Diseases*. v.199, 926–935, 2009.

BURKE, J. S. The histopathologic classification of Non-Hodgkin's lymphomas: ambiguities in the working formulation and two newly reported categories. *Sem Oncol* v.17, p.3–10, 1990.

CARRERAS, J. K.; GOLDSCHMID, T. M.; LAMB, M.; MCLEAR, R. C.; DROBATZ, K. J.; SORENMO, K. U. Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997–2000). *J Vet Intern Med*. v.17, p.326–331, 2003.

CESARMAN, E. Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett*. v.305, p.163–174, 2011.

CHARNEY S, VALLI V, KITCHELL B, et al. Histopathological, phenotypic, and molecular assessment of feline infiltrative enteric disease. A pilot study. In: Proceedings of the Veterinary Cancer Society Mid-year Conference. Galend (IL). p. 18, 2002.

CHINO, J., FUJINO, Y., KOBAYASHI, T., KARIYA, K., GOTO-KOSHINO, Y., OHNO, K., NAKAYAMA, H.; TSUJIMOTO, H.. Cytomorphological and Immunological Classification of Feline Lymphomas: Clinicopathological Features of 76 Cases. *J. Vet. Med. Sci*. v.75, p.701–707, 2013.

COELHO, F.M.; MAIA, M. Q.; LUPPI, M. M.; COSTA, E. A.; LUIZ, A. P. M. F.; RIBEIRO, N. A.; BOMFIM, M. R. Q.; FONSECA, F. G.; RESENDE, M. Ocorrência do vírus da Leucemia Felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.778-783, 2011.

COFFIN, J. M. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol*. v.42, p.1–26, 1979.

COHEN, P.; BUTMARC, J.; KADIN, M. Expression of Hodgkin's disease associated antigen BLA.36 in anaplastic large cell lymphomas and lymphomatoid papulosis primarily of T-cell origin. *American Journal of Clinical Pathology*; v.104, p. 50–53, 1995.

COTTER, S. M.; HARDY, W. D. JR.; ESSEX, M. Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J Am Vet Med Assoc*. v.166, p.449-454, 1975.

COTTER, S. M. Feline viral neoplasia. In Greene CE, editor: *Infectious diseases of the dog and cat*. ed. 3, Philadelphia. 1998.

COURT, E. A.; WATSON, A. D.; PEASTON, A. E. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J Jun*. v.75, p.424-427, 1997.

COUTO, C.G. Proceedings of AAEP/ESFM Symposium at WSAVA Congress 2001: what is new on feline lymphoma? *J Fel Med and Surg*. v.3, 171- 176, 2001.

COUTO, G. C. Lymphoma. In: NELSON, R.W.; COUTO, G. C. *Small animal internal medicine*. ed.4. Elsevier, 2014. Cap. 77, p.1160.

CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L.; PEREIRA, L. H. H. S.; WITHOEFT, J. A.; FURLAN, L. V.; COSTA, L. S.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Feline Lymphoma and a High Correlation with Feline Leukaemia Virus Infection in Brazil. *J Comp Path*. v.166, p.20-28, 2019.

DAVIES, C.; FORRESTER, S. D. Pleural effusion in cats: 82 cases (1987 to 1995), *J Small Anim Prac*. v. 37, p. 217-224, 1996.

DAY, M. J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. *J Comp Path*. v.112, p.79-96, 1995.

DAY, M. J.; KYAW-TANNER, M.; SILKSTONE, M. A.; et al. T-cell-rich B-cell lymphoma in the cat. *J. Comp. Pathol*. v.120, p.155-167, 1999.

DELVERDIER, M.; BUCHET, B.; VAN HAVERBEKE G. Histology and cytology of malignant canine lymphomas: a comparative study of current classifications. *Revue Vet Med*. v.139, p.1141–1150, 1988.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts, *N Engl J Med*.v. 343, p.37-49, 2000.

ENDO, Y., CHO, K. W., NISHIGAKI, K., MOMOI, Y., NISHIMURA, Y.,MIZUNO, T., GOTO, Y.,WATARI, T., TSUJIMOTO, H., HASEGAWA, A. Molecular characteristics of malignant lymphomas in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.57, p.153–167,1997.

- ESSEX, M.; SNYDER, S. P. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. I. Serologic studies with kittens exposed to cell-free materials from various fibrosarcomas. *J Nat Cancer Inst.* v.51, p. 1007-1012, 1973.
- ESSEX, M.; COTTER, S. M.; HARDY, W. D. JR.; et al. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. IV. Antibody titers in cats with naturally occurring leukemia, lymphoma, and other diseases. *J Nat Cancer Inst.* v.55, p.463-467, 1975.
- ETTINGER, S. N. Principles of Treatment for Feline Lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice.* v.18, n.2, p.98-102, 2003.
- FABRIZIO, F.; CALAM, A. E.; DOBSON, J. M.; MIDDLETON, S. A.; MURPHY, S.; et al. Feline mediastinal lymphoma: a retrospective study of signalment, retroviral status, response to chemotherapy and prognostic indicators. *J Fel Med & Sur.* v.16, p.637-644, 2014.
- FARINHA, P.; GASCOYNE, R. D. Helicobacter pylori and MALT lymphoma. *Gastroenterology.* v.128, p.1579–605, 2005.
- FELDMAN, A.; LAW, M.; INWARDS, D.; DOGAN, A.; MCCLURE, R.; MACON, W. PAX5-positive T-cell anaplastic large cell lymphomas associated with extra copies of the PAX5 gene locus. *Modern Pathology.* v.23, p.593–602, 2010.
- FELISBERTO, R.; MATOS, J.; ALVES, M.; CABEÇADAS, J.; HENRIQUES, J. Evaluation of *Pax5* expression and comparison with BLA.36 and CD79 α cy in feline non-Hodgkin lymphoma. *Vet Comp Onc.* v.15, n.4, p.1257-1268, 2016.
- FERRERI, A. J.; ZINZANI, P. L.; GOVI, S.; PILERI, S. A. Enteropathy associated T-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* v.79, p. 84–90, 2011.
- FONDACARO, J. V.; RICHTER, K. P.; CARPENTER, J. L.; HART, J. R.; HILL, S. L.; FETTMAN, M. J. Feline gastrointestinal lymphoma: 67 cases (1988–1996). *Eur J Comp Gastroenterol.* v.4, p.5–11, 1999.
- FONTAINE, J.; HEIMANN, M.; DAY, M. J. Cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma in the cat: a review of the literature and five new cases. *Vet Dermatol.* v.22, p.454-461, 2011.
- FORMAN, L. W.; PAL-GHOSH, R.; SPANJAARD, R. A.; et al. Identification of LTR-specific small non-coding RNA in FeLV infected cells. *FEBS Lett.* v.583, p.1386, 2009.

FORRESTER, S. D.; FOSSUM, T. W.; ROGERS, K. S. Diagnosis and treatment of chylothorax associated with lymphoblastic lymphosarcoma in four cats, *J Am Vet Med Assoc.* v.198, p.291-294, 1991.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol.* v.39, p.92–109, 2002.

FRANCIS, D.P.; ESSEX, M.; COTTER, S.; JAKOWSKI, R.M.; HARDY JR.; W.D. Feline leukemia virus infections, the significance of chronic viremia. *Leukemia Research.* v.3, p.435–441, 1979.

FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: insertional mutagenesis. *Vet Immunol Immunopathol.* v.123, p.138, 2008.

GABOR, L. J.; MALIK, R.; CANFIELD, P. J. Clinical and anatomical features of lymphosarcoma in 118 cats. *Aust Vet J.* v.76, p.725-732, 1998.

GABOR, L. J.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J.* v.77, p.436-441, 1999.

GABOR, L. J.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. Haematological and biochemical findings in cats in Australia with lymphosarcoma. *Aust Vet J.* v.14, p.1840189, 2000.

GABOR, L. J., LOVE, D. N., MALIK, R., CANFIELD, P. J. Feline immunodeficiency virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet Journal.* v.79, n.8, p.540-545, 2001.

GIEGER, T. Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* v.41, p. 419-432, 2011.

GILBERT, S.; AFFOLTER, V. K.; GROSS, T. L.; MOORE, P. F.; IHRKES P. J. Clinical, morphological and immunohistochemical characterization of cutaneous lymphocytosis in 23 cats, *Vet Dermatol.* v.15, p.3-12, 2004.

GLEICH, S., HARTMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 23, p.552–558, 2009.

GLEICH, S. E., KRIEGER, S., HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 11, p.985–992, 2009.

GOGGIN, J. M.; BILLER, D. S.; DEBEY, B. M.; PICKAR, J. G.; MASON, D. Ultrasonographic measurement of gastrointestinal wall thickness and the ultrasonographic appearance of the ileocolic region in healthy cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. v.36, p.224–228. 2000.

GOMES-KELLER, M. A.; TANDON, R.; GONCZI, E.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*. v.112, p.11–21, 2006.

GRANT, C.K.; HARRIS, D.; ESSEX, M. E.; et al. Protection of cats against feline leukemia virus-positive and virus-negative tumors by complement-dependent antibody. *J Nat Cancer Inst*. v.64:1527-1533, 1980.

GREEN, P. H. R.; CELLIER, C. Medical progress: celiac disease. *New Engl J Med*. v.357, p.1731–1743, 2007.

HAGIWARA, M.K.; RECHE, J.A.; LUCAS, S.R.R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. *Rev. Bras. Cienc. Vet.*, v.4, p.35-38, 1997.

HANN, S. R., ABRAMS, L. R., ROHRSCHEIDER, L. R., EISENMAN, R. N. Proteins encoded by *v-myc* and *c-myc* oncogenes: Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell*. v .34, p.789-798, 1983.

HARDY, W.D., MCCLELLAND, A.J., ZUCKERMAN, E.E., HESS, P.W., ESSEX, M., COTTER, S.M., MACEWEN, E.G., HAYES, A.A. Prevention of contagious spread of feline leukemia-virus and development of leukemia in pet cats. *Nature*. v. 263, p.326–328, 1976.

HARDY, W. D. The feline leukaemia virus. *J Amer An Hosp Assoc*. v. 17, p. 951-980, 1981.

HARDY, W. D.; MACEWEN, E. G. Hematopoietic tumors. In: Withrow SJ, MacEwen EG. eds. *Clinical Veterinary Oncology*, Philadelphia: JB Lippincott Company. 1989, p. 362-411.

HARRIS, N.; JAFFE, E.; STEIN, H.; BANKS, P.; CHAN, J.; CLEARY, M.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.; GROGAN, T.; ISAACSON, P.; KNOWLES, D.; MASON, D.; MULLER-HERMELINK, H.; PILERI, S.; PIRIS, M.; RALFKIAER, E.; WARNKE, R. A revised European-American classification of lymphoid neoplasma: a proposal for the international lymphoma study group. *Blood*. v.84, p.1361–1392, 1994.

HARRIS, N.; JAFFE, E.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H.; VARDIMAN, J.; LISTER, T.; BLOOMFIELD, C. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting. *J Clin Oncol*. v.17, p.3835–3849, 1999.

HARTMANN, K.. Feline leukemia virus infection. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. ed.3. Saunders/Elsevier, St. Louis, p. 104–131. 2006.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. *Greene Infections diseases of the dog and cat*. (4th ed). p.108-136, 2012a. Missouri: Elsevier.

HARTMANN, K. Clinical aspects of Feline Retroviruses: A Review. v.4, n.11, p.2684-2710, 2012b.

HERRINTON, L. J.; FRIEDMAN, G. D. Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin's lymphoma subtypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v.7, 25–28. 1998.

HITTMAIR, K.; KREBITZ-GRESSL, E.; KUBBER-HEISS, A.; MÖSTL, K. Feline alimentary lymphosarcoma: radiographic, ultrasonographic, histologic, and viral findings. *Wien Tierärztliche Monatsschrift*. v.87, n.6 , p.174-183, 2000

HOEHNE, S. N.; MCDONOUGH, S. P.; RISHNIW, M.; SIMPSON, K. W. Identification of Mucosa-Invasive and Intravascular Bacteria in Feline Small Intestinal Lymphoma. *Vet Pathol*. v.54, n.2, p.234-241, 2016.

HOLMBERG, C. A.; MANNING, J. S.; OSBURN, B. I. Canine malignant lymphomas: comparison of morphologic and immunologic parameters. *J Nat Cancer Inst*. v.59, p.125–135, 1976.

HOOVER, E. A., MULLINS, J. I. Feline leukemia virus infection and diseases. *J Amer Vet Med Assoc.* v.199, p.1287–1297, 1991.

HOOVER, E. A., PERIGO, N. A., QUACKENBUSH, S. L., MATHIASONDUBARD, C. K., OVERBAUGH, J. M., KLOETZER, W. S., ELDER, J. H., MULLINS, J. I. Protection against feline leukemia virus infection by use of an inactivated virus-vaccine. *J Amer Vet Med Assoc.* v.199, p.1392–1401, 1991.

HORCHER, M.; SOUABNI, A.; BUSSLINGER, M. PAX-5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity.* v.14, p.779–790, 2001.

HUTSON, C. A., RIDEOUT, B. A., PEDERSEN, N. C. Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of southern California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.199, n.10, p.1357–136, 1991

IMAM, A.; STATHOPOULOS, E.; HOLLAND, S.; EPSTEIN, A.; TAYLOR, C. Characterization of a cell surface molecule expressed on B-lymphocytes and Hodgkin's cells. *Cancer Research.* v.50, p.1650–1657, 1990.

JACKSON, M. L.; HAINES, D. M.; MERIC, S. M.; MISRA, V. Feline Leukemia Virus Detection by Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tumor Tissue from cats with Lymphosarcoma. *Can J Vet Res.* v.57, p.269-276, 1993.

JACKSON, M. L.; WOOD, S. L.; MISRA, V.; HAINES, D. M. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res.* v.60, p.199–204, 1996.

JARRETT, W. F. H.; CRIGHTON, G. W.; DALTON, R. G.; et al. Leukaemia and lymphosarcoma in animals and man. I- lymphosarcoma or leukaemia in the domestic animals. *Vet Rec.* v.79, p. 693-699, 1966.

KELLER, S. M.; KELLER, B. C.; GREEST, P.; BÖRGER, C. T.; GUSCETTI, F. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine lymphomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* v.19, p.652–659, 2007.

KINDLE, K. R.; SPEIGHTS, V. O.; CLANTON, C. W. Bilateral primary renal lymphoma. *J Am Board Fam Pract.* v.6, p.175-178, 1993.

KISELOW, M. A.; RASSNICK, K. M.; MCDONOUGH, S. P.; GOLDSTEIN, R. E.; SIMPSON, K. W.; WEINKLE, T. K.; ERB, H. N. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995-2005). *J Am Vet Med Assoc.* v.232, p.405-410, 2008.

KIUPEL, M.; BOSTOCK, D.; TESKE, E. Prognostic factors for the treatment of canine malignant lymphoma. *Vet Pathol.* v.36, p.292-300, 1999.

KRENACS, L.; HIMMELMANN, A.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; FEST, T.; RIVA, A.;WELLMANN, A.; BAGDI, E.; KEHRL, J. H.; JAFFE, E. S.; RAFFELD, M. Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. *Blood.* v.92, p.1308-1316, 1998.

KRICK, E. L.; LITTLE, L.; PATEL, R.; SHOFR, F. S.; SORENMO, K.; CLIFFORD, C. A.; BAEZ, J. L. Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of feline large granular lymphocyte lymphoma (1996-2004). *Vet Comp Oncol.* v.6, p.102-111, 2008.

KRISTAL, O.; LANA, S. E.; OGILVIE, G. K.; RAND, W. M.; COTTER, S. M.; MOORE, A. S. Single agent chemotherapy with doxorubicin for feline lymphoma: a retrospective study of 19 cases (1994-1997). *J Vet Intern Med.*; v.15, p.125-130, 2001.

LANE, S. B.; KORNEGAY, J. N.; DUNCAN, J. R.; OLIVER JR, J. E. Feline spinal lymphosarcoma: a retrospective evaluation of 23 cats. *J Vet Intern Med.* v.8, p.99-104, 1994.

LENNERT, K.; COLLINS, R. D.; LUKES, R. J. Concordance of the Kiel and Lukes-Collins classification of Non-Hodgkin's lymphomas. *Histopathology.* v.7, p.549-559, 1983.

LENNERT, K.; MOHRI, N. Malignant Lymphomas Other Than Hodgkin's Disease: Histopathology and Diagnosis of Non-Hodgkin's Lymphomas. *Springer-Verlag*, New York, 1978.

LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v. 228, p.371-376, 2006.

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; SUNDAHL, E.; THAYER, V. American association of feline practitioners feline retrovirus management guidelines. *J Feline Med Surg.* v. 10, p.300-316, 2008.

LIEBERMAN, P. H.; FILIPPA, D. A.; STRAUS, D. J.; THALER, H. T.; CIRRINCIONE, C.; CLARKSON, B. D. Evaluation of malignant lymphomas using three diferente classifications and theWorking Formulation: 482 cases with median follow-up of 11.9 years. *Am J Med.* v .81, p.365–379, 1986.

LINENBERGER, M. L., ABKOWITZ, J. L. Haematological disorders associated with feline retrovírus infections. *Bailliere's Clin. Haematol.* v.8, p.73-112, 1995.

LINET, M. S.; MCLAUGHLIN, J. K.; HSING, A. W.; WACHOLDER, S.; CO CHIEN, H. T.; SCHUMAN, L. M.; BJELKES, E.; BLOT, W. J. Is cigarette smoking a risk factor for non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma? Results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study. *Leuk Res.* v.16, p.621–624, 1992.

LINGARD, A. E.; BRISCOE, K.; BEATTY, J. A.; MOORE, A. S.; CROWLEY, A. M.; KROCKENBERGER, M.; CHURCHER, R. K.; CANFIELD, P. J.; BARRS, V. R. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. *J Feline Med Surg.* v.11, p.692–700, 2009.

LORIMER, H. Hereditary lymphosarcoma in Oriental Shorthair cats. *Feline Pract* 1999 (suppl):29.

LOUWERENS, M.; LONDON, C. A.; PEDERSEN, N. C.; LYONS, L. A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med.* v.19, p.329–335, 2005.

LUKES, R. J.; COLLINS, R. D. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer.* v.34, p.1488–1503, 1974.

LUTZ, H.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; et al. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* v.11, p.565–574, 2009.

MADEWELL, B. R.; THEILEN, G. H. *Canine Hematopoietic Neoplasms, Sarcomas and Related Conditions.* ed.2. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, p.392–407, 1987.

MAGDEN, E.; QUACKENBUSH, S. L.; VANDEWOUDE, S. FIV associated neoplasms—A mini-review. *Vet Immun and Immunop.* v. 143, p.227-234, 2011.

MAHONY, O. M.; MOORE, A. S.; COTTER, S. M.; ENGLER, S. J.; BROWN, D.; PENNINCK, D. G. Alimentary lymphoma in cats: 28 cases (1988-1993). *J Am Vet Med Assoc.* v.207, p.1593-1598, 1995.

MALIK, R.; GABOR, L. J.; FOSTER, S. F.; ET AL. MCCORKELL, B. E.; CANFIELD, P. J. Therapy for Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J.* v.79, p.808–817, 2001.

MARIONI-HENR, Y. K.; VAN WINCKLE, T. J.; SMITH, S. H.; VITE, C. H. Tumors affecting the spinal cord of cats: 85 cases (1980-2005), *J Am Vet Med Assoc.* v.232, p.237-243, 2008.

MCLUCKIE, A.J.; BARRS, V.R.; SMITH, A.L.; BEATTY, J.A. Detection of felis catus gammaherpesvirus 1 (FcaGHV1) in peripheral blood B- and T-lymphocytes in asymptomatic, naturally-infected domestic cats. *Virology.* v.497, p.211–216, 2016.

MCLUCKIE, A.J.; BARRS, V. R; LINDSAY, S; AGHAZADEH, M. Molecular Diagnosis of Felis catus Gammaherpesvirus 1 (FcaGHV1) Infection in Cats of Known Retrovirus Status with and without Lymphoma. *Viruses.* v.10, p. 1-14, 2018.

MEICHNER, K.; KRUSE, D. B.; HIRSCHBERGER, J.; HARTMANN, K. Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *Vet Rec.* v.171, p.348-355, 2012.

MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; SAXENA, R.C.; ZHANG, S.; TERRACCIANO L.; SAUTER, G.; GHADHURI, A.; et al. Pax-5 immunoexpression in various types of benign and malignant tumours: a high-throughput microarray analysis. *J Clin Pathol.* v.60, p. 709-714, 2007.

MILNER, R. J.; PEYTON, J.; COOKE, K.; FOX, L. E.; GALLAGHER, A.; GORDON, P. Response rates and survival times for cats with lymphoma treated with the University of Wisconsin–Madison chemotherapy protocol: 38 cases (1996–2003). *J Am Vet Med Assoc.* v.227, p.1118–1122, 2005.

MOONEY, S. C.; HAYES, A. A. Lymphoma in the cat: An approach to diagnosis and management. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* v.1, p.51-57, 1986.

MOONEY, S. C.; HAYES, A. A.; MATUS, R. E.; MACEWEN, E.G. Renal lymphoma in cats: 28 cases (1977-1984). *J Am Vet Med Assoc.* v.191, p.1473-1477, 1987.

MOORE, A. S.; OGILVIE, G. K. Lymphoma, in Ogilvie GK, Moore AS (eds): *Feline Oncology: A Comprehensive Guide to Compassionate Care*. Trenton, New Jersey, Veterinary Learning Systems. p.191-215, 2001.

MOORE, P. F.; WOO, J. C.; VERNAU, W.; KOSTEN, S.; GRAHAM, P. S. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol.*; v.106, p. 167–178, 2005.

MOORE, P. F.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; KASS, P. H. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype and molecular clonality. *Vet Pathol.* v.49, n.4, p.658-668, 2012.

MORRISON, S.; NEUBERGER, M. Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. In: *Immunobiology: the Immune System in Health and Disease*. ed. 5. CA Janeway, P Traver, M Walport and M Shlomchik Eds., New York, Garland Publishing. p.92–184, 2001.

MUELLER, A., O'ROURKE, J., CHU, P., CHU, A., DIXON, M.F., BOULEY, D.M., LEE, A., FALKOW, S. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of Helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am. J. Pathol.* v.167, p.797–812, 2005.

MÜLLER, A. M, et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol.* v.84, p.1-12, 2005.

MULLINS, J. I., CHEN, C. S., HOOVER, E. A. Disease-specific and tissue-specific production of unintegrated feline leukaemia virus variant DNA in feline AIDS. *Nature.* v.319, p.333–336, 1986.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – U. S. National Institutes of Health (n. d.). *Working Formulation for Non-Hodgkin Lymphoma*. Disponível em: <http://training.seer.cancer.gov/lymphoma/abstract-codestage/morphology/formulation.html>

OVERBAUGH, J., DONAHUE, P. R., QUACKENBUSH, S. L., HOOVER, E. A., MULLINS, J. I. Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science.* v. 239, p.906–910, 1988.

PACITTI, A. M.; JARRETT, O.; HAY, D. Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. *Vet Rec.* v.118, p. 381–84, 1986.

PARODI, A. L. Classification of malignant lymphoma in domestic animals: history and conceptual evaluation. *European Journal of Veterinary Pathology.* v.7, p.43–50, 2001.

PATTERSON-KANE, J. C.; KUGLER, B. P.; FRANCIS, K. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Pathol.* v.130, p. 220–222, 2004.

PEDERSEN, N. C., JOHNSON, L., THEILEN, G. H. Biological behavior of tumors and associated retroviremia in cats inoculated with Snyder–Theilen fibrosarcoma virus and the phenomenon of tumor recurrence after primary regression. *Infect. Immun.* v.43, p.631–636, 1984.

PEPIN, A. C.; TANDON, R.; CATTORI, V.; NIEDERER, E.; RIOND, B.; WILLI, B.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral RNA in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. *Virus Res.* v.127, p.9-16, 2007.

PERSSON, H., LEDER, P. Nuclear localization and DNA-binding properties of a protein expressed by the human *c-myc* oncogene. *Science.* v.225, p. 718-721, 1984.

PIERANGELI, A.; ANTONELLI, G.; GENTILE, G. Immunodeficiency-associated viral oncogenesis. *Clin. Microbiol. Infect.* v.21, p.975–983, 2015.

PIRELI, S. A.; ASCANI, S.; LEONCINI, L.; SABATTINI, E.; ZINZANI, P. L.; PICCALUGA, P. P.; PILERI, J. R. A.; GIUNTI, M.; FALINI, B.; BOLIS, G. B.; STEIN, H. Hodgkin's Lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol.* v.55, p.162-176, 2002.

POHLMAN, L. M.; HIGGINBOTHAM, M. L.; WELLES, E. G.; JOHNSON, C. M. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol.* v.46, p.259–268, 2009.

POOPAK, B.; PURFATHOLAH, A.; NAJMABADI, H.; MORTAZANI, Y.; ARIZANIAN, M. T., et al. Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor γ gene rearrangements in Iranian children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Hematology.* v.19, n.5, p. 259-266, 2014.

POULET, H., BRUNET, S., BOULARAND, C., GUIOT, A.L., LEROY, V., TARTAGLIA, J., MINKE, J., AUDONNET, J.C., DESMETTRE, P. Efficacy of a canarypox virus-vectored vaccine against feline leukaemia. *Veterinary Record*.v.153, p. 141–145, 2003.

RAMSAY, G. M., HAYMAN, M. J., BISTER, K. Phosphorylation of specific sites in the *gag-myc* polyproteins encoded by MC29-type viruses correlates with their transforming ability. *EMBO J.* v.1, p.111-1116, 1982.

RAPPAPORT, H. Atlas of Tumour Pathology. AFIP, section 3, fascicle 8, Washington, DC, 1966.

RASSNICK, K. M.; MAULDIN, G.N.; MOROFF, S. D.; MAULDIN, G. E.; MCENTEE, M. C.; MOONEY, S. C. Prognostic value of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in feline intestinal lymphoma. *J Vet Intern Med.*; v.13, p.187–190, 1999.

REZANKA, L.J., ROJKO, J.L., NEIL, J.C. Feline leukemia virus- pathogenesis of neoplastic disease. *Cancer Investigation.* v.10, p.371–389, 1992.

RICHTER, K.P. Feline gastrointestinal lymphoma. In: Willard, M.D. (Ed.), *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice, Gastroenterology.* W.B. Saunders, Philadelphia. p. 1083–1098, 2003.

RISSETTO, K.; VILLAMIL, J. A.; SELTING, K. A, TYLER, J.;HENRY, C. J. Recent trends in feline intestinal neoplasia: na epidemiologic study of 1129 cases in the Veterinary Medical Database from 1964 to 2004. *J Am Anim Hosp Assoc.* v.47, p.28–36, 2011.

ROCCABIANCA, P.; VERNAU, W.; CANIATTI, M.; MOORE, P. F. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8 alpha alpha phenotype. *Vet Pathol.* v.43, p.15–28, 2006.

ROHN, J. L., GWYNN, S. R., LAURING, A. S., LINENBERGER, M. L., OVERBAUGH, J. Viral genetic variation, AIDS, and the multistep nature of carcinogenesis: the feline leucemia virus model. *Leukemia.* v.10, p. 1867-1869, 1996.

ROJKO, J. L., HOOVER, E. A., MATHES, L. E., SCHALLER, J. P. AND OLSEN, R. G. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *J. Natl. Cancer Inst.* v.63, p.759-778, 1979.

ROJKO, J. L.; OLSEN, R. G. The Immunobiology of the Feline Leukemia Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.6, p. 107-165, 1984.

ROJKO, J. L.; KOCIBA, G. J.; ABKOWITZ, J. L.; HAMILTON, K. L.; HARDY, J. R. W. D.; IHLE, J. N. Feline lymphomas: immunological and cytochemical characterization. *Cancer Res*. v.49, p. 345–351, 1989.

ROJKO, J. L., KOCIBA, G. J. Pathogenesis of infection by the feline leukemia virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.199, p.1305-1310, 1991.

ROY-BURMAN, P. Endogenous env elements: partners in generation of pathogenic feline leucemia viruses. *Virus Genes*. v.11, p. 147-161, 1995.

RUAX, C. G. Laboratory tests for the diagnosis of intestinal disorders. In: Steiner JM (ed). *Small animal gastroenterology*. Hannover, Germany: Schlütersche Verlagsbuchhandlung. P.50, 2008.

RUSSELL, K. J.; BEATTY, J. A.; DHAND, N. K.; GUNEW, M.; LINGARD, A. E.; BARAL, R.; et al. Feline low-grade alimentary lymphoma (LGAL) – how common is it?. *Proceedings of the Australian College of Veterinary Scientists*. Gold Coast, Qld, Australia. p 7, 2011.

SAITO, S. Primary renal lymphoma. Case report and review of the literature. *Urolog Int*. v.56, p.192-195, 1996.

SANTAGOSTINO, S. F.; MORTELLARO, C. M.; BORACCHI, P.; AVALLONE, G.; CANIATTI, M.; FORLANI, A.; ROCCABIANCA, P. Feline Upper Respiratory Tract Lymphoma: Site, Cyto-histology, Phenotype, FeLV Expression, and Prognosis. *Vet Pathol*.v.52, n.2, p.250-259, 2015.

SAPIERZYŃSKI, R.; JANKOWSKA, U.; JAGIELSKI, D.; KLICZKOWSKA-KLAROWICZ, K. Large granular lymphoma in six cats. *Polish J Vet Sci*. v. 18, p. 163–169, 2015.

SATO, H.; FUJINO, Y.; CHINO, J.; TAKAHASHI, M.; FUKUSHIMA, K.; GOTO-KOSHINO, Y.; UCHIDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Classification of Feline Lymphoma. *J. Vet. Med. Sci*. v.76, n.6, p. 807–811, 2014.

SCHMIDT, B. R.; CRYSTAL, M. A. Lymphoma. In: NORSWORTHY, G. D.; GRACE, S. F.; CRYSTAL, M. A.; TILLEY, L. P. *The feline patient*. ed. 4. Iowa: Blackwell publishing, p.738, 2011.

SCHREURS, E.; VERMOTE, K.; BARBERET, V.; DAMINET, S.; RUDORF, H.; SAUNDERS, J. H. Ultrasonographic anatomy of abdominal lymph nodes in the normal cat. *Vet Radiol Ultrasound*. v.49, p.68–72, 2008.

SCRIDELI, C. A.; KASHIMA, S.; CIPOLLOTTI, R.; DEFAVERY, R.; BERNARDES, J. E; TONE, L. G. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leucemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leukemia Research*. v. 26, p. 431-438, 2002.

SHELTON, G.H.; GRANT, C. K.; COTTER S. M., et al. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: A retrospective study (1968–1988). *J Acquir Immune Defic Syndr*. v. 3, p.623–630, 1990.

SLAWIENSKI, M. J.; MAULDIN, G. E.; MAULDIN, G. N. Malignant colonic neoplasia in cats: 46 cases (1990-1996). *J Am Vet Med Assoc*. v.211, p.878-881, 1997.

SNYDER, H. W. JR.; HARDY, W. D. JR.; ZUCKERMANN, E. E, et al. Characterisation of a tumour-specific antigen on the surface of feline lymphosarcoma cells. *Nature*. v.275, p.656-658, 1978.

SOE, L. H.; DEV, B.G.; MULLINS, J.I.; ROY-BURMAN, P. Molecular cloning and characterization of endogenous feline leukemia virus sequences from a cat genomic library. *J Virol*. v.46, p.829–40, 1983.

SOUZA, J. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. *Clin. Vet*. v.36, p.14-21, 2002.

SOUZA, T. D.; CARVALHO, T.; MOL, J. P. S.; LOPES, J. V. M.; SILVA, M. F, PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Tissue distribution and cell tropismo of *Brucella canis* in naturally infected canine foetuses and neonates. *Scientific Reports*. v.8, p.1-10, 2018.

SPARKES, A. H. Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination. *Journal of Small Animal Practice*. v.38, p.187-194, 1997.

SPODNICK, G. J.; BERG, J.; MOORE, F. M. Spinal lymphoma in cats: 21 cases (1976-1989). *J Am Vet Med Assoc.* v.200, p.373-376, 1992.

SUNTZ, M.; FAILING, K.; HECHTA, W.; SCHWARTZA, D.; REINACHERA, M. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. *Vet Immun and Immunop.* v.136, p.71–80, 2010.

SWERDLOW, S. H. Genetic and molecular genetic studies in the diagnosis of atypical lymphoid hyperplasias versus lymphoma. *Hum Pathol.* v.34, p.346-351, 2003.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L. WHO classification of tumours of haemotopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.

TAKAHASHI, R.; GOTO, N.; ISHII, H.; OGISO, Y.; SAEGUSA, J. Pathological observations of natural cases of feline lymphosarcomatosis. *Nihon Juigaku Zasshi.* v.36, p.163–173, 1974.

TAYLOR, S. S.; GOODFELLOW, M. R.; BROWNE, W. J. Feline extranodal lymphoma: response to chemotherapy and survival in 110 cats, *J Small Anim Pract.* v.50, p. 584-592, 2009.

TERRY, A., CALLANAN, J. J., FULTON, R., JARRETT, O., NEIL, J. C. Molecular analysis of tumours from feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: An indirect role for FIV? *International Journal of Cancer.* v.61, p.227–232, 1995.

TESKE, E.; WISMAN, P.; MOORE, P. F.; VAN HEERDE, P. Histological classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp Hematol.* v.22, p.1179–1187, 1994.

TIERNEY, R. J.; SHANNON-LOWE, C. D.; FITZSIMMONS, L.; BELL, A. I.; ROWE, M. Unexpected patterns of Epstein–Barr virus transcription revealed by a High throughput PCR array for absolute quantification of viral mRNA. *Virology.* v.474, p.117–130, 2015.

TOMEK, A.; CIZINAUSKAS. S.; DOHERR, M. Intracranial neoplasia in 61 cats: localization, tumour types and seizure patterns, *J Feline Med Surg.* v.8, p.243-253, 2006.

TORRES, A.N.; MATHIASON, C.K.; HOOVER, E.A. Re-examination of feline leukemia virus: Host relationships using real-time PCR. *Virology*. v.332, p.272-283, 2005.

TROYER, R.M.; BEATTY, J.A.; STUTZMAN-RODRIGUEZ, K.R.; CARVER, S. et al. Novel gammaherpesviruses in north american domestic cats, bobcats, and pumas: Identification, prevalence, and risk factors. *J. Virol.* v.88, p.3914–3924, 2014.

TSANG, K.; KNEAFSEY, P.; GILL, M. J. Primary lymphoma of the kidney in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* v.117, p.541-543, 1994.

TSATSANIS, C.; FULTON, R.; NISHIGAKI, K. Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangement. *J Virol.* v.68, p.8296- 8303, 1994.

TWOMEY, L. N.; ALLEMAN, A. R. Cytodiagnosis of feline lymphoma. *Vet Compend Contin Educ.* v.27, p.17–30. 2005

USUI, T.;WAKATSUKI, Y.; MATSUNAGA, Y.; KANEKO, S.; KOSEKI, H.; KITA, T. Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype. *Journal of Immunology.* v.158, p.3197–3204, 1997.

VAIL, D. M.; MOORE, A. S.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med.* v.12, p.349–354, 1998.

VAIL, D. M. Hematopoietic tumors, in Withrow SJ, Vail, D. M (eds): *Small Animal Clinical Oncology*. ed 4. St Louis, Saunders Elsevier. p.769-783, 2007.

VAIL, D.M. Feline lymphoma and leukemia. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. Cap. 32, p.638-648.

VALENCIANO, A. C.; COWEL, R. L.; ARNDT, T. P. Pleural Effusions. In: NORSWORTHY, G. D.; GRACE, S. F.; CRYSTAL, M. A.; TILLEY, L. P. *The feline patient*. ed. 4. Iowa: Blackwell publishing, p.738, 2011.

VALLI, V. E.; JACOBS, R. M.; NORRIS, A.; COUTO, C. G.; MORRISONWB, M. C. C. A. W. D.; COTTER, S.; OGLIVIE., G.; MOORE, A. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute Working Formulation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.12, p. 295–306, 2000.

VALLI, V. E. *Veterinary Comparative Hematopathology*, Ames, Blackwell Publishing. p.318-127, 2007.

VALLI, V. E.; MYINT, M. S.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZKY, F.; DURHAM, A.; et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol*. v. 48, n. 1, p. 198-211, 2011.

VALLI, V. E.; KASS, P. H.; MYINT, M. S.; SCOOT, F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet pathol*. v. 50, n. 5, p. 738-748, 2013.

VALLI, V. E.; KIUPEL, M.; BIENZLE, D. *Hematopoietic System*. In: JUBB, KENNEDY AND PALMER'S. *Pathology of domestic animals*. 6 ed. St. Louis, Missouri. Editora Elsevier, p. 213, 2016.

VALLI, V. E.; BIENZLE, D.; MEUTEN, D. J. Tumors of the Hemolymphatic System. In: Meuten, D. J. *Tumors in domestic animals*. 5.ed. Ames, Iowa: John Wiley e Sons inc., 2017. Cap. 7, p.210-330.

VEZZALI, E.; PARODI, A. L.; MARCATO, P. S.; BETTINI, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet and comp onc*. v.8, n.1, p. 38-49, 2010.

VONDERHAAR, M. A.; MORRISON, W. B. Lymphosarcoma. In: *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*. WB Morrison,ed., Jackson, Teton New Media, 2002.

WALTON, R. M.; HENDRICK, M. J. Feline Hodgkin's-like lymphoma. *Vet. Pathol*. v.38, p.504-511, 2001.

WALY, N.; GRUFFYDD-JONES, T.; STOKES, C.; DAY, M. Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *Journal of Comparative Pathology*. v.133, p. 253–260, 2005.

- WANG, J., KYAW-TANNER, M., LEE, C., ROBINSON, W.F. Characterisation of lymphosarcomas in Australian cats using polymerase chain reaction and immunohistochemical examination. *Aust. Vet. J.* v.79, n.1, p.41–46, 2001.
- WANG, F.; MENG, W.; WANG, B.; QIAO, L. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* v.345, p.196–202, 2014.
- WEIJER, K., UIJTDEHAAG, F., OSTERHAUS, A. Control of feline leukemia virus infection by a removal program. *Veterinary Record*.v.119, p. 555–556, 1986.
- WEISS, A. T.; KLOPFESCH, R.; GRUBER, A, D. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *J Feline Med Surg.* v.12, p. 929–935, 2010.
- WILSON, H. M. Feline alimentary lymphoma: demystifying the enigma. *Top Companion Anim Med.* v.23, n.4, p.177–184, 2008.
- WOLFESBERGER, B.; SKOR O.; HAMMER S. E.; FLICKINGER I.; KLEITER M., RÜTGEN B. C., SCHWENDENWEIN I.; et al. Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats? *J Fel Med and Surg.* v.19, n.8, p. 897-906, 2016.
- ZWAHLEN, C. H.; LUCROY, M. D.; KRAEGEL, S. A.; MADEWELL, B. R. Results of chemotherapy for cats with alimentary malignant lymphoma: 21 cases (1993–1997). *J Am Vet Med Assoc.* v.213, p.1144–1149, 1998.

9. ANEXOS

9.1 Certificado do projeto na comissão de ética no uso de animais/ufmg

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 366/2018

Título do projeto: CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO LINFOMA FELINO SEGUNDO A OMS E SUA CORRELAÇÃO COM O VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Fabiola de Oliveira Paes Leme

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 26/11/2018. Validade: 26/11/2018 à 25/11/2023
Belo Horizonte, 26/11/2018.

Atenciosamente,
Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br